(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110430882 A
(43)申请公布日 2019.11.08

(21)申请号 201780088500.7

(22)申请日 2017.09.21

(30)优先权数据
62/468,259 2017.03.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.09.17

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/052663 2017.09.21

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2018/164715 EN 2018.09.13

(71)申请人 英特塞普特医药品公司
地址 美国纽约州

(72)发明人 安东尼奥·莫斯奇塔
耶稣·玛丽亚·巴尼亚莱斯·阿苏儿美蒂
路易斯·布罕达·费尔南德斯·德·佩罗拉
玛丽亚·耶稣·佩鲁戈里亚·蒙提尔
欧亨·埃里切·阿斯帕伦

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
代理人 凌翠 郑霞

(51)Int.Cl.
A61K 31/56(2006.01)
A61K 31/133(2006.01)
A61K 31/575(2006.01)
C07J 5/00(2006.01)
C07J 9/00(2006.01)
C07J 31/00(2006.01)

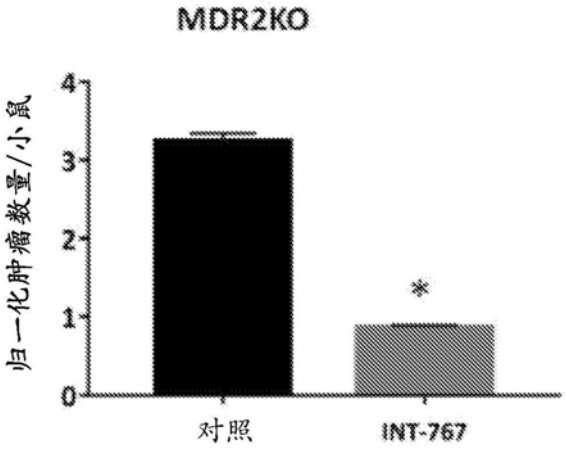
权利要求书2页 说明书21页 附图25页

(54)发明名称

治疗癌症的方法

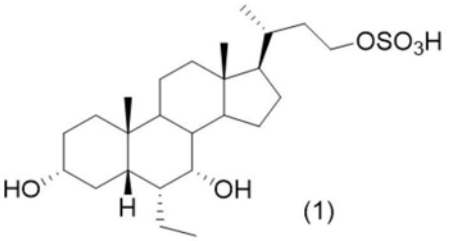
(57)摘要

本发明涉及治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括给予治疗有效量的本发明的化合物。



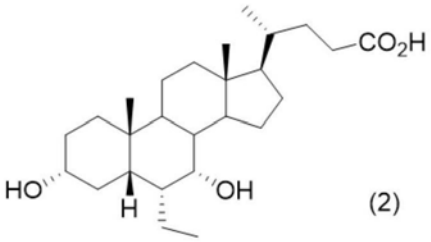
CN 110430882 A

1.一种治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法，该方法包括给予治疗有效量的FXR激动剂，该FXR激动剂选自化合物1或2：



(1)

或



(2)，

或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。

2.如权利要求1所述的方法，其中该癌症选自：肝细胞癌、胆管癌、胰腺癌、肾癌、前列腺癌、食管癌、乳腺癌、胃癌、肾癌症、唾液腺癌、卵巢癌、子宫体癌、膀胱癌和肺癌。

3.如权利要求1或2所述的方法，其中该癌症是肝细胞癌。

4.如权利要求3所述的方法，其中该肝细胞癌选自下组，该组由以下组成：早期肝细胞癌、非转移性肝细胞癌、原发性肝细胞癌、晚期肝细胞癌、局部晚期肝细胞癌、转移性肝细胞癌、缓解期肝细胞癌、或复发性肝细胞癌。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法，其中该FXR激动剂是化合物1或其药学上可接受的盐。

6.如权利要求5所述的方法，其中该FXR激动剂是化合物1的钠盐。

7.如权利要求5所述的方法，其中该FXR激动剂是化合物1的N,N-二乙烷胺盐。

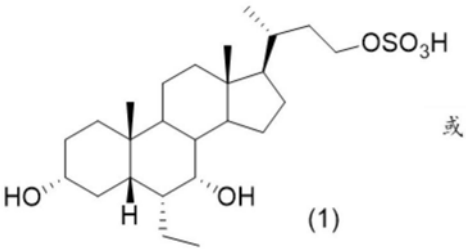
8.如权利要求1-4中任一项所述的方法，其中该FXR激动剂是化合物2或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。

9.如权利要求8所述的方法，其中该FXR激动剂是化合物2的甘氨酸缀合物。

10.如权利要求8所述的方法，其中该FXR激动剂是化合物2的牛磺酸缀合物。

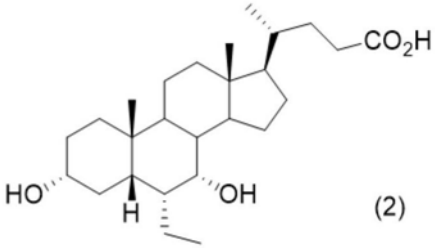
11.如权利要求8所述的方法，其中该FXR激动剂是化合物2的肌氨酸缀合物。

12.一种药物组合物，该药物组合物包含FXR激动剂和药学上可接受的赋形剂，该FXR激动剂选自用于治疗或预防有需要的受试者的癌症的化合物1或2：



(1)

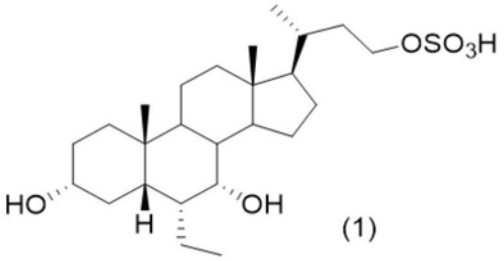
或



(2)，

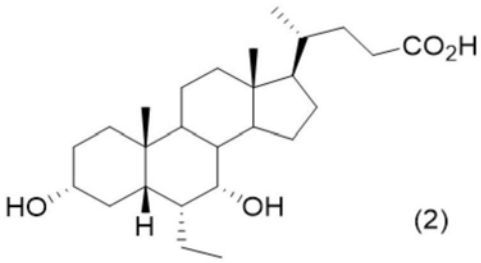
或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。

13.一种用于治疗或预防有需要的受试者的癌症的试剂盒，该试剂盒包含化合物1或化合物2：



(1)

或

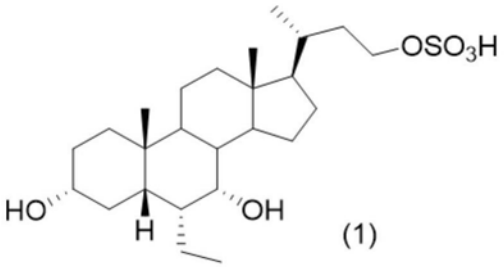


(2)

，

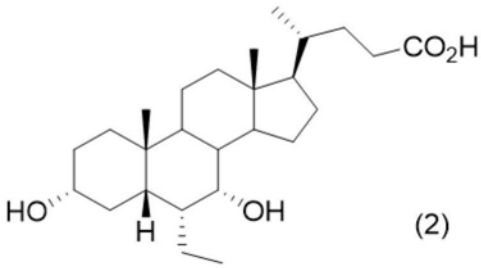
或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。

14.FXR激动剂在用于制备用于治疗或预防有需要的受试者的癌症的药物中的用途，该FXR激动剂选自化合物1或2：



(1)

或



(2)

，

或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。

15.如权利要求1或2所述的方法，其中该癌症是胆管癌。

16.如权利要求15所述的方法，其中该FXR激动剂是化合物1或其药学上可接受的盐。

治疗癌症的方法

背景技术

[0001] 癌症的特征主要在于源自给定正常组织的异常细胞的数量增加、异常细胞对邻近组织的侵入、或恶性细胞通过淋巴或血液扩散到局部淋巴结和远部位(转移)。临床数据和分子生物学研究表明,癌症是一个从轻微的肿瘤前变化开始的多步骤过程,其可能在某些条件下进展为瘤形成。

[0002] 原发性肝癌是世界上最常见的癌症形式之一。肝癌有两种主要类型:肝细胞癌(HCC)(也被称为恶性肝细胞瘤)和胆管细胞癌(也被称为胆管癌(CCA))。HCC是原发性肝癌的最常见形式,并且在肝细胞内发展。HCC主要发生在男性和患有肝硬化的患者中。HCC是世界范围内最常见的癌症之一,也是癌症相关死亡的第三大常见原因。该疾病通常在临床表现过程的晚期被诊断出来。因此,只有10%-15%的患者是治愈性外科手术的候选者。对于大多数HCC患者,全身化学疗法或支持疗法是主要的治疗选择。

[0003] 相反,胆管细胞癌或胆管癌症主要在肝脏内的小胆管上皮细胞(即胆管细胞)中发展。这种类型的癌症在女性中更为常见。胆管癌(CCA)的发病率在世界范围内不断升高,并且已经成为第二大最常见的原发性肝癌。由于这些肿瘤确诊晚及其难治性质,CCA患者显示不良结局。

[0004] 到目前为止,可以有效治疗癌症(如HCC和/或CCA)的药物数量有限。例如,局部治疗失败的患有转移性肝细胞癌或肝细胞癌的患者通常仅存活三至四个月。局部治疗失败的转移性肝细胞癌或肝细胞癌主要进行全身疗法。使用多柔比星(高剂量的他莫昔芬与多柔比星或EA-PFL(依托泊苷、阿霉素、顺铂、氟尿嘧啶和亚叶酸)组合)是一个有效的实例。这些药物的缓解率可达到15%至30%之间的水平。然而,由于肝细胞癌患者通常会出现肝硬化并发症和其他并发症(如白细胞减少、血小板减少或肝功能损害),因此不能进行全身化学疗法。此外,大多数化学治疗剂显示出有限的效果并且不能显著改善患者的存活。尽管正在进行努力,但大多数癌症患者的不良临床过程强调了对更有效的化学疗法的需求。

[0005] 胆管癌是一种相对罕见的肿瘤,被归类为腺癌(一种形成腺体或分泌大量粘蛋白的癌症)。在西方世界,胆管癌的年发病率为每10万例中有1-2例,但在过去的几十年里,胆管癌发病率在世界范围内不断上升。除非原发性肿瘤和任何转移瘤两者都可以通过外科手术完全切除,否则胆管癌被认为是无法治愈且迅速致死的癌症。除外科手术外,不存在潜在的治愈性治疗,但大多数人在发病时已患有晚期疾病,并且在诊断时已无法进行手术。通常通过化学疗法、放射疗法和其他姑息治疗措施控制胆管癌患者,但是无法治愈。

[0006] 本发明满足了这些需要。因此,本发明的目的是提供治疗或预防癌症(如肝细胞癌)和胆管癌的改善的方法。

附图说明

[0007] 图1A是显示化合物1-Na和对照饮食对多药抗性蛋白2(Mdr2$^{-/-}$)敲除小鼠中肝肿瘤数量的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0008] 图1B是显示化合物1-Na和对照饮食对Mdr2$^{-/-}$小鼠中肿瘤减少百分比(>5mm直径)

的影响的条形图。

[0009] 图2A是显示OCA(化合物2)和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$敲除小鼠中肝肿瘤数量的影响的条形图。

[0010] 图2B是显示OCA和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$小鼠中肿瘤减少百分比(>5mm直径)的影响的条形图。

[0011] 图3A是显示化合物1-Na和对照饮食对法尼醇X受体($FXR^{-/-}$)小鼠中肝肿瘤数量的影响的条形图。

[0012] 图3B是显示化合物1-Na和对照饮食对$FXR^{-/-}$小鼠中肿瘤减少百分比(>5mm直径)的影响的条形图。

[0013] 图4是显示化合物1-Na和对照饮食对$FXR^{-/-}$小鼠中肝肿瘤数量减少百分比的影响的条形图。

[0014] 图5A是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$小鼠中肝脏/体重比降低百分比的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0015] 图5B是显示化合物1-Na和对照饮食对$FXR^{-/-}$小鼠中肝脏/体重比降低百分比的影响的条形图。

[0016] 图6A是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠中丙氨酸转氨酶(ALT)水平的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0017] 图6B是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠中天冬氨酸转氨酶(AST)水平的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0018] 图7A是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠中成纤维细胞生长因子15(Fgf15)的回肠基因表达的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0019] 图7B是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠中小异二聚体配偶体(Shp)的回肠基因表达的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0020] 图8是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠中胆固醇7α-羟化酶(cyp7a1)下调的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0021] 图9A是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠中小异二聚体配偶体(Shp)的肝基因表达的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0022] 图9B是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠中胆汁盐输出泵(Bsep)的肝基因表达的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0023] 图10A是显示化合物1-Na和对照饮食对$Mdr2^{-/-}$小鼠中总血清胆汁酸的影响的条形图。*p<0.01对比对照。

[0024] 图10B是显示化合物1-Na3和对照饮食对$FXR^{-/-}$小鼠中总血清胆汁酸的影响的条形图。

[0025] 图11A显示与周围人组织相比,CCA肿瘤的整个组织中的FXR mRNA微阵列表达。

[0026] 图11B显示根据肿瘤分化等级分组的CCA肿瘤的整个组织中的FXRmRNA微阵列表达。

[0027] 图11C显示与正常人肝组织和周围人肝组织相比,CCA肿瘤中的FXRmRNA表达(qPCR)。

[0028] 图11D显示与匹配的周围人肝组织相比,CCA肿瘤中的FXR mRNA表达(qPCR)。

[0029] 图12A显示与周围人组织相比,CCA肿瘤的整个组织中的TGR mRNA微阵列表达。

[0030] 图12B显示在临床病理学参数(解剖位置和神经周围浸润)下,CCA肿瘤的整个组织中的TGR5 mRNA微阵列表达。

[0031] 图12C显示与周围人肝组织相比,CCA肿瘤中的TGR5 mRNA表达(qPCR)。

[0032] 图12D显示与匹配的周围人肝组织相比,CCA肿瘤中的TGR5 mRNA表达(qPCR)。

[0033] 图13A显示正常人胆管细胞和CCA细胞系中的FXR mRNA表达(qPCR)。

[0034] 图13B显示正常人胆管细胞和CCA细胞系中的TGR5 mRNA表达(qPCR)。

[0035] 图14A显示未处理的对照小鼠、OCA处理的小鼠和化合物4处理的小鼠的代表性MRI和肝脏图像。

[0036] 图14B是显示通过MRI定量的肿瘤体积倍数变化的条形图。

[0037] 图14C显示肝脏原位CCA肿瘤中增殖标志(即Ki67和PCNA)、胆道标志(即CK19)和上皮标志(即ZO-1)的mRNA表达水平。

[0038] 图14D显示未处理的小鼠或用OCA或化合物4处理的小鼠的肝原位CCA肿瘤中增殖标志(即Ki67和PCNA)的代表性免疫组织化学图像。

[0039] 图15A显示与未处理的对照细胞相比,在OCA处理后增殖标志的mRNA表达水平,和用OCA以10或25μM处理48h的CCA细胞(即EGI1)的增殖(通过流式细胞术使用CFSE细胞增殖染料染色进行)。

[0040] 图15B显示CCA细胞(即EGI1)中的迁移测定、和伤口愈合测定及相应定量的代表性显微图像、以及24小时的transwell迁移室的代表性显微图像。

[0041] 图15C显示在CCA细胞(即EGI1)中使用线粒体应激测试试剂盒的海马(Seahorse)耗氧率(OCR)和在OCR测量时计算的代谢参数的条形图。

[0042] 图15D显示未处理的或用10或25μM的OCA处理的CCA细胞(即EGI1)中,通过膜联蛋白V和碘化丙锭染色的基于流式细胞术的细胞凋亡测定,以及合并数据的代表性直方图和相应定量。

[0043] 图16A显示与未处理的对照细胞相比,在化合物4处理后增殖标志的mRNA表达水平,和用化合物3以10或25μM处理48h的CCA细胞(即EGI1)的增殖。

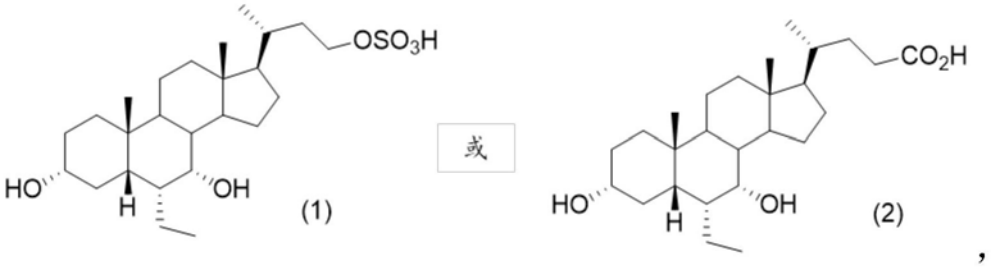
[0044] 图16B显示CCA细胞(即EGI1)中的迁移测定、伤口愈合测定和相应定量的代表性显微图像、以及未处理的和化合物4处理的细胞中24h的transwell迁移室和相应定量的代表性显微图像。

[0045] 图16C显示在未处理的或用化合物4(25μM)处理的CCA细胞(即EGI1)中使用线粒体应激测试试剂盒的海马耗氧率(OCR)和在OCR测量时计算的代谢参数的条形图。

[0046] 图17显示肝脏原位CCA肿瘤中的增殖标志(即Cdc25a、细胞周期蛋白D1和细胞周期蛋白D3)的mRNA表达水平。

发明内容

[0047] 本申请涉及治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括给予治疗有效量的法尼醇X受体(FXR)激动剂。在一个实施例中,该FXR激动剂是化合物1或化合物2:

[0048] 

[0049] 或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。

[0050] 在一个实施例中，该癌症选自下组，该组由以下组成：肝细胞癌、胰腺癌、肾癌、前列腺癌、食管癌、乳腺癌、胃癌、肾癌症、唾液腺癌、卵巢癌、子宫体癌、膀胱癌和肺癌。在一个实施例中，该癌症是肝细胞癌。在一个实施例中，该癌症是胰腺癌。在一个实施例中，该癌症是肾癌。在一个实施例中，该癌症是前列腺癌。在一个实施例中，该癌症是食管癌。在一个实施例中，该癌症是乳腺癌。在一个实施例中，该癌症是胃癌。在一个实施例中，该癌症是肾癌症。在一个实施例中，该癌症是唾液腺癌。在一个实施例中，该癌症是卵巢癌。在一个实施例中，该癌症是子宫体癌。在一个实施例中，该癌症是肺癌。

[0051] 在一个实施例中，该FXR激动剂是化合物1或其药学上可接受的盐。在另一个实施例中，该FXR激动剂是化合物1的钠盐(即化合物1-Na)。在又另一个实施例中，该FXR激动剂是化合物1的N,N-二乙烷胺盐(即化合物1-DEA)。

[0052] 在另一个实施例中，该FXR激动剂是化合物2或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。在一个实施例中，该FXR激动剂是化合物2的甘氨酸缀合物。在一个实施例中，该FXR激动剂是化合物2的牛磺酸缀合物。在一个实施例中，该FXR激动剂是化合物2的肌氨酸缀合物。

[0053] 本发明进一步涉及化合物1或其药学上可接受的盐或者化合物2或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物在制备用于治疗或预防有需要的受试者的癌症的药物中的用途。

[0054] 本发明进一步涉及化合物1或其药学上可接受的盐和化合物2或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物，用于在治疗或预防有需要的受试者的癌症中使用。

[0055] 本发明还涉及药物组合物，该药物组合物包含化合物1或其药学上可接受的盐和化合物2或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物(其用于治疗或预防有需要的受试者的癌症)以及药学上可接受的赋形剂。

[0056] 本发明进一步涉及用于治疗或预防有需要的受试者的癌症的试剂盒，该试剂盒包含化合物1或其药学上可接受的盐和化合物2或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。

具体实施方式

[0057] 本发明至少部分基于以下发现：化合物1和2可有效治疗预测癌症的动物模型中的癌症。如以下实例中所述，诸位发明人已发现本发明的化合物抑制自发性肝癌发生的鼠模型中的肿瘤生长。

[0058] 定义

[0059] 为了方便起见，在此集中了本说明书、实例和所附权利要求书中所用的某些术语。

[0060] 如本文所使用的术语“癌症”是指以受试者中存在癌组织为特征的任何疾病。

[0061] 如本文所使用的，“癌组织”是指包含恶性肿瘤细胞的组织，其表现出异常生长的细胞和/或过度增殖细胞。癌组织可以是源自组织或起源器官的原发性恶性肿瘤，或者它可

以是转移性恶性肿瘤，其生长在不是原始肿瘤来源的身体组织中。

[0062] 如本文所使用的，术语“肿瘤”可包括实体瘤或造血来源的癌症。在一些实施例中，肿瘤的特征在于其侵入周围组织、转移至身体其他部分和/或通过其血管生成活性的能力。示例性肿瘤由肝细胞癌、胃癌、肾癌症、前列腺癌、肾上腺癌、胰腺癌、乳腺癌、膀胱癌、唾液腺癌、卵巢癌、子宫体癌、以及肺癌产生。

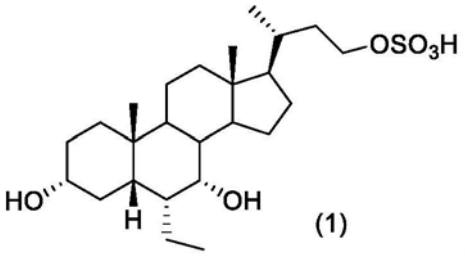
[0063] 如本文所使用的，术语“侵入性”是指细胞、一组细胞或恶性肿瘤从一个部位扩散到邻近部位的过程。

[0064] 如本文所使用的术语“转移性”是指细胞、一组细胞或恶性肿瘤从一个部位扩散到不与第一部位相邻的部位的过程。

[0065] 如本文所使用的，“肝细胞癌”、“HCC”和“恶性肝细胞瘤”可互换使用，并且是指源自肝组织的原发性和继发性(转移性)肿瘤。如本文所使用的术语“难治性肝细胞癌”是指如下肝细胞癌，该肝细胞癌不对抗肿瘤治疗作出有利反应。因此，如本文所使用的“治疗困难的肝细胞癌”是指如下肝细胞癌，该肝细胞癌不对治疗做出有利反应或对治疗产生抗性，或者可替代地对治疗产生有利反应后再发或复发。

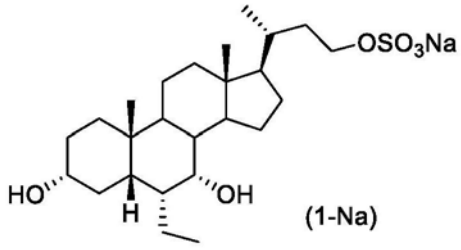
[0066] 如本文所使用的，“胆管癌”或“CCA”或“胆管细胞癌”或胆管癌症是由起源于将胆汁从肝脏排入小肠的胆管的突变的上皮细胞(或显示上皮分化特征的细胞)组成的癌症形式。一部分CCA在胆汁淤积的肝脏状况下出现。尽管胆汁酸的肝内积聚不能直接诱导致癌作用，但它们可通过促进胆管细胞增殖和炎症以及通过降低FXR依赖性化学保护来促进致癌作用。

[0067] 如本文所使用的，术语“化合物1”是指

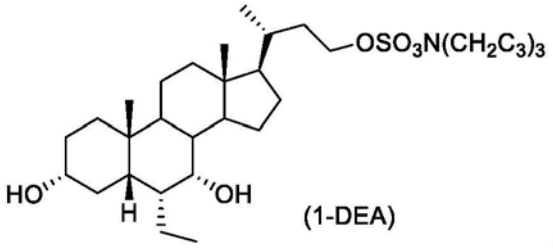
[0068] 

(1)，

[0069] 其也被称为6α-乙基-3α,7α,23-三羟基-24-降-5β-胆烷-23-硫酸氢。“化合物1-Na”或“1-Na”(其也被称为6α-乙基-3α,7α,23-三羟基-24-降-5β-胆烷-23-硫酸钠”)可互换使用，并且是指化合物1的钠盐。如本文所使用的，“化合物1-DEA”或“1-DEA”(其也被称为6α-乙基-3α,7α,23-三羟基-24-降-5β-胆烷-23-硫酸盐N,N-二乙基乙烷胺”)可互换使用，并且是指化合物1的N,N-二乙基乙烷胺盐。化合物1-Na和化合物1-DEA的结构如下。

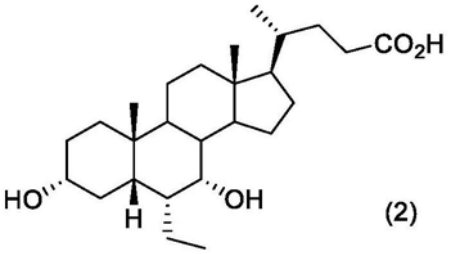
[0070] 

(1-Na)



(1-DEA)。

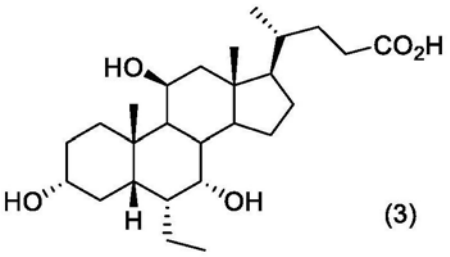
[0071] 如本文所使用的“化合物2”是指

[0072] 

(2)，

[0073] 其也被称为奥贝胆酸(OCA)、6-ECDCA、6-α-乙基鹅去氧胆酸、或6α-乙基-3α,7α-二羟基-5β-胆烷-24-酸。

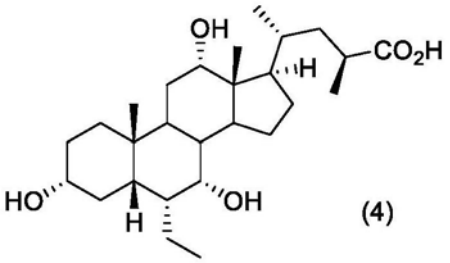
[0074] 如本文所使用的，“化合物3”是指

[0075] 

(3)，

[0076] 其也被称为3α,7α,11β-三羟基-6α-乙基-5β-胆烷-24-酸。

[0077] 如本文所使用的，“化合物4”是指

[0078] 

(4)，

[0079] 其也被称为6α-乙基-23(S)-甲基-3α,7α,12α-三羟基-5β-胆烷-24-酸。美国专利号8,114,862中描述的化合物4是TGR5调节剂。在一个实施例中，TGR5调节剂是激动剂。

[0080] 术语“TGR5调节剂”意指与TGR5受体相互作用的任何化合物。相互作用不限于充当TGR5受体的拮抗剂、激动剂、部分激动剂或反向激动剂的化合物。

[0081] 通常，术语“激动剂”意指增强另一分子或受体位点活性的化合物。根据经典定义，激动剂(无论是正构位点激动剂(orthosteric agonist)、变构激动剂、反向激动剂或协同激动剂(co-agonist))具有与受体结合的特性、改变其受体状态并导致生物作用。因此，激动被定义为激动剂或配体产生生物作用的特性。更特别地，TGR5激动剂是结合TGR5的受体配体或化合物，并且在表达受体的细胞中使环腺苷一磷酸(cAMP)的浓度增加至少20％。

[0082] 如本文所使用的“本发明的化合物”涵盖化合物1、1-Na、1-DEA、2和3，或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。

[0083] 如本文所使用的术语“治疗”是指成功治疗或改善癌症的任何标志。治疗可以包括例如减轻或缓解癌症的一种或多种症状的严重程度，或者其可以包括降低患者经历的疾病、缺陷、障碍或不利病症等的症状的频率。“治疗”还可以指减少或消除身体的一部分(例如细胞、组织或体液，如血液)的病症。

[0084] 如本文所使用的，术语“预防”是指部分或完全预防个体或群体中或身体的一部分

(例如细胞、组织或体液,如血液)中的癌症。术语“预防”不要求在整个治疗个体的群体或个体的细胞、组织或液体中完全预防疾病或病症。如本文所使用的术语“治疗或预防”使指导致某种程度的治疗或改善癌症的方法,并且考虑针对该目的的一系列结果,包括但不限于完全预防癌症。

[0085] 如本文所使用的短语“治疗有效量”是指包含足以使肿瘤缩小和/或降低该肿瘤的生长率(如压制肿瘤生长)或预防或延迟癌症中其他不希望的细胞增殖的量的有效量。在一些实施例中,有效量是足以延迟癌症发展的量。在一些实施例中,有效量是足以预防或延迟再发的量。有效量能够以一次或多次给予来进行给予。在HCC或CRC的情况下,药物或组合物的有效量可以是:(i)减少肿瘤细胞的数量;(ii)减小肿瘤大小;(iii)抑制、延迟、在一定程度上减慢并且优选地停止癌细胞浸润到外周器官中;(iv)抑制(即,在一定程度上减慢并且优选地停止)肿瘤转移;(v)抑制肿瘤生长;(vi)预防或延迟肿瘤的发生和/或再发,和/或(vii)在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。

[0086] 如本文所使用的术语“方案”是指用于给药和/或定时给予本发明的化合物用于治疗癌症的方案。方案可以包括如本领域中已知的主动给予期和休息期。主动给予期包括在限定的时间过程中给予本发明的化合物,其包括例如组合物给药的次数和时间。在一些方案中,可以包括一个或多个休息期,在休息期中不主动给予化合物,并且在某些情况下,该休息期包括此类化合物的效力可能是最小的时间段。

[0087] 如本文所使用的,“组合疗法”是指本发明的化合物可以与另一种治疗剂联合给予。“与……联合”是指除了给予一种治疗模式外,还给予另一种治疗模式,例如除了给予同一受试者本文所述的本发明的化合物外,还给予另一种治疗剂。因此,“与……联合”是指在向受试者递送第二治疗模式之前、期间或之后给予一种治疗模式。

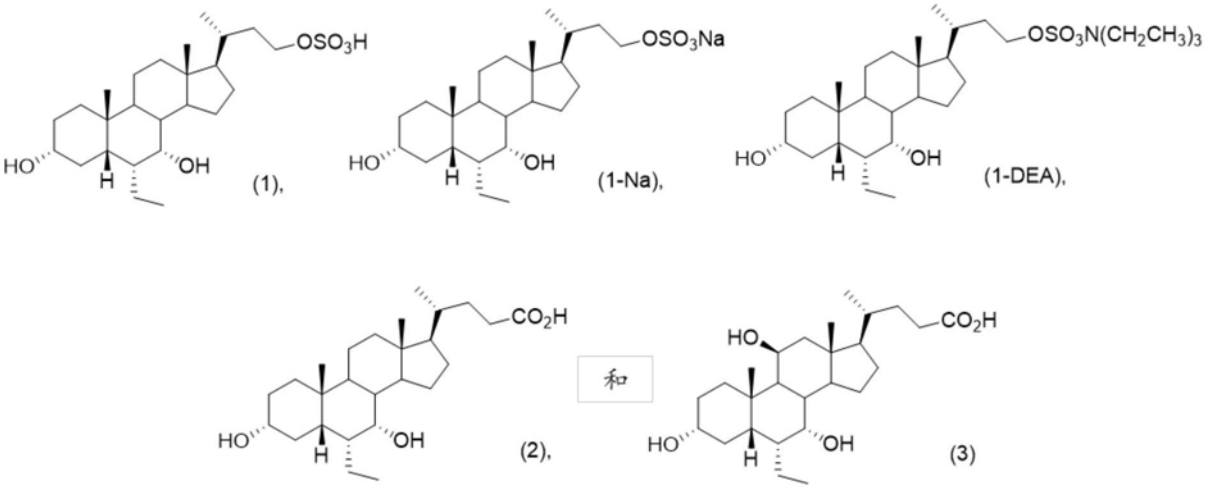
[0088] 如本文所使用的,“药学上可接受的”是指不是生物学上或其他方面不期望的材料,例如,该材料可以掺入向患者给予的药物组合物中,而不引起任何不期望的生物学效应或以有害的方式与包含它的组合物的任何其他组分相互作用。药学上可接受的载体或赋形剂符合毒理学和制造测试的所需标准和/或包含在由美国食品和药物管理局(U.S.Food and Drug administration)制备的非活性成分指南(Inactive Ingredient Guide)中。

[0089] 当指可测量的值(例如量、持续时间等)时,如本文所使用的术语“约”意在涵盖指定值的±20%或±10%的变化(在一些实施例中±5%,在一些实施例中±1%,并且在一些实施例中±0.1%),因为此类变化适于实践所披露的方法,或适于制造和使用所披露的化合物以及在要求保护的方法中。

[0090] 治疗癌症的方法

[0091] 本发明至少部分基于以下发现:本发明的化合物在预测人癌症的鼠模型中有效治疗癌症。因此,本申请涉及治疗或预防有需要的受试者的癌症的方法,该方法包括给予治疗有效量的FXR激动剂,该FXR激动剂选自下组,该组由以下组成:化合物1、1-Na、1-DEA、2和3:

[0092]



[0093] 或其药学上可接受的盐或氨基酸缀合物。在一个实施例中，该FXR激动剂是化合物1。在一个实施例中，该FXR激动剂是化合物1-Na。在另一个实施例中，该FXR激动剂是化合物1-DEA。在一个实施例中，该FXR激动剂是化合物2。在一个实施例中，该FXR激动剂是化合物3。

[0094] 在本文所述的方法中，示例性癌症选自下组，该组由以下组成：肝细胞癌、胆管癌、胰腺癌、前列腺癌、食管癌、乳腺癌、胃癌、肾癌症、唾液腺癌、卵巢癌、子宫体癌、膀胱癌和肺癌。用于癌症的适当治疗方案取决于肿瘤所来源的细胞的类型、恶性的分期和严重程度、以及促成肿瘤的遗传性异常。

[0095] 癌症分期系统描述癌症进展的程度。一般而言，这些分期系统描述癌症扩散的程度，并将具有相似预后和治疗的患者分入同一分期组。一般而言，对于已经变得侵入性或转移的肿瘤，预后较差。在一种类型的分期系统中，病例被分为四个阶段，用罗马数字I至IV表示。在I期，癌症通常是局部的，且通常是可治愈的。II期和IIIA期癌症通常更晚期，并且可能已侵入周围组织并扩散至淋巴结。IV期癌症包括已经扩散至淋巴结外部位的转移性癌症。

[0096] 另一种分期系统是TNM分期，它代表类别：肿瘤、节和转移。在这个系统中，根据各个类别的严重程度描述恶性肿瘤。例如，T将原发肿瘤的程度从0至4分类，其中0代表不具有侵入性活性的恶性肿瘤，并且4代表已经从原始部位延伸侵入其他器官的恶性肿瘤。N将淋巴结受累的程度分类，其中0代表没有淋巴结受累的恶性肿瘤，并且4代表伴有广泛淋巴结受累的恶性肿瘤。M将转移的程度从0至1分类，其中0代表无转移的恶性肿瘤，并且1代表具有转移的恶性肿瘤。

[0097] 这些分期系统或这些分期系统的变化或其他适合的分期系统可以用于描述肿瘤。根据癌症的分期和特征，可供用于治疗癌症的选择很少。治疗包括外科手术、用索拉非尼治疗和靶向疗法。一般而言，外科手术是用于早期局部癌症的第一线治疗。另外的全身治疗可以用于治疗侵入性和转移性肿瘤。

[0098] 根据本发明的一个方面，提供了用于治疗肝细胞癌(或恶性肝细胞瘤)的方法。特别地，该方法包括用治疗有效量的本发明的化合物治疗患有肝细胞癌的有需要的受试者。即，本发明涉及本发明的化合物在制备用于治疗鉴定为或诊断为患有肝细胞癌的肝细胞癌

患者的药物中的用途。在单独的实施例中，治疗方法任选地包括诊断或鉴定患者患有肝细胞癌的步骤。然后用治疗有效量的本发明的化合物治疗或将其给予所鉴定的患者。肝细胞癌可以用本领域已知的任何常规诊断方法诊断，包括超声、CT扫描、MRI、甲胎蛋白测试、des-γ羧基凝血酶原筛选和活组织检查。

[0099] 本发明还提供了治疗难治性肝细胞癌的方法，该方法包括用治疗有效量的本发明的化合物治疗被鉴定为患有难治性肝细胞癌的患者。在特定的实施例中，患者患有治疗困难的肝细胞癌，该治疗包含一种或多种选自下组的药物，该组由以下组成：索拉非尼、瑞格非尼、蒽环霉素(例如多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星)、铂剂(例如顺铂、卡铂、奥沙利铂、吡铂)、5-FU和卡培他滨。本发明还涉及本发明的化合物在制备用于治疗难治性肝细胞癌的药物中的用途，例如对于选自下组的一种或多种药物而言是难治性的肝细胞癌，该组由以下组成：索拉非尼、瑞格非尼、蒽环霉素(例如多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星)、铂剂(顺铂、卡铂、奥沙利铂、吡铂)、5-FU和卡培他滨。

[0100] 为了检测难治性肝细胞癌，可以仔细监测接受初始治疗的患者的抗性、无应答性或再发性肝细胞癌的迹象。这可以通过监测患者的癌症对初始治疗的应答来实现，该初始治疗例如可以包含一种或多种选自下组的药物，该组由以下组成：索拉非尼、瑞格非尼、多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、顺铂、卡铂、奥沙利铂、吡铂、5-FU、替加氟和卡培他滨。癌症对初始治疗的应答、缺乏应答或复发可以通过本领域实践的任何合适的方法确定。例如，这可以通过评估肿瘤大小和数量来实现。肿瘤大小的增加或者可替代地肿瘤数量的增加表明肿瘤对化学疗法没有反应或者已经发生复发。可以根据Therasse等人，J.Natl.Cancer Inst.[国立癌症研究所杂志]92:205-216(2000)中详细描述的“RECIST”标准进行测定。

[0101] 根据本发明的又另一个方面，提供了用于预防或延迟肝细胞癌(或肝细胞癌)发作、或预防或延迟肝细胞癌的再发的方法，该方法包括用预防有效量的本发明的化合物治疗需要预防或延迟的患者。

[0102] 已知患有乙型肝炎或丙型肝炎感染或患有肝硬化的受试者患肝细胞癌的风险增加。此外，患有急性和慢性肝性卟啉病(急性间歇性卟啉病、迟发性皮肤卟啉病、遗传性粪卟啉病、不定性卟啉病)和I型酪氨酸血症的人患肝细胞癌的风险也增加。这些人都可以是使用预防有效量的本发明的化合物预防或延迟肝细胞癌发作的本发明的方法的候选者。此外，还可以鉴定具有肝细胞癌家族史的患者，以应用本发明的预防或延迟肝细胞癌发作的方法。为了预防或延迟肝细胞癌的再发，已经治疗并且处于缓解期或处于稳定期或无进展状态的肝细胞癌患者可以用预防有效量的本发明的化合物治疗，以有效地预防或延迟肝细胞癌的再发或复发。

[0103] 根据本披露的一个方面，提供了用于治疗胆管癌(CCA)的方法。特别地，该方法包括用治疗有效量的本发明的化合物治疗患有胆管癌的有需要的受试者。即，本发明涉及本发明的化合物在制备用于治疗鉴定为或诊断为患有胆管癌的胆管癌患者的药物中的用途。在单独的实施例中，治疗方法任选地包括诊断或鉴定患者患有胆管癌的步骤。然后用治疗有效量的本发明的化合物治疗或将其给予所鉴定的患者。胆管癌可以用本领域已知的任何常规诊断方法诊断，包括超声、CT扫描、MRI、癌胚抗原(CEA)和碳水化合物抗原19-9(CA19-9)筛选和活组织检查。

[0104] 根据本发明的又另一个方面，提供了用于预防或延迟胆管癌发作、或预防或延迟胆管癌的再发的方法，该方法包括用预防有效量的本发明的化合物治疗需要预防或延迟的患者。

[0105] 为了预防或延迟胆管癌的再发，已经治疗并且处于缓解期或处于稳定期或无进展状态的胆管癌患者可以用预防有效量的本发明的化合物治疗，以有效地预防或延迟胆管癌的再发或复发。

[0106] 根据本发明的另一个方面，提供了用FXR激动剂抑制CCA细胞增殖和迁移的方法。

[0107] 根据本发明的另一个方面，提供了用治疗有效量的本发明的化合物抑制CCA细胞增殖和迁移的方法。根据本发明的另一个方面，提供了抑制CCA进展的方法，该方法包括用治疗有效量的本发明的化合物治疗有需要的患者。

[0108] 一个实施例是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗胰腺癌的方法。另一个实施例是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗前列腺癌的方法。另一个实施例是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗肾癌的方法。另一个实施例是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗前列腺癌的方法。在仍另一个实施例中，是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗食管癌的方法。在仍另一个实施例中，是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗乳腺癌的方法。一个实施例是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗胃癌的方法。在另一个实施例中，是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗肾癌症的方法。在仍另一个实施例中，是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗唾液腺癌的方法。在仍另一个实施例中，是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗卵巢癌的方法。一个实施例是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗子宫体癌的方法。在另一个实施例中，是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗膀胱癌的方法。在仍另一个实施例中，是通过给予治疗有效量的本发明的化合物治疗肺癌的方法。

[0109] 在本发明的化合物可用于治疗本文所述的癌症的情况下，此类化合物可与第二药剂共同给予。可用于治疗本文提供的癌症的方法的第二药剂可以包括任何已知类的抗癌剂，像例如放射疗法、手术、烷基化剂、抗代谢物、蒽环霉素、喜树碱、长春花生物碱、紫杉烷类或铂、以及本领域中已知的其他抗肿瘤剂。这种抗癌剂和抗肿瘤剂分类是本领域已知的，并且根据其一般和普通的含义使用。

[0110] 示例性抗癌剂包括但不限于：ABRAXANE；阿比特龙；ace-11；阿柔比星；阿西维辛；盐酸阿考达唑；阿克罗宁；放线菌素；酰基夫文；腺环戊醇；阿多来新；阿霉素；阿地白介素；全反式维甲酸(ATRA)；六甲蜜胺；氨莫司汀；安波霉素；醋酸阿美蒽醌；阿米多克斯(amidox)；氨磷汀；氨鲁米特；氨基乙酰丙酸；氨柔比星；安吖啶；阿那格雷；阿那曲唑；穿心莲内酯；安雷利克斯；安曲霉素；阿非迪霉素甘氨酸；脱嘌呤核酸；ara-CDP-DL-PTBA；精氨酸脱氨酶；ARRY-162；ARRY-300；ARRY-142266；AS703026；天冬酰胺酶；曲林菌素；阿苏莱克林(asulacrine)；阿他美坦；阿莫司汀；阿瓦斯丁；阿耐司汀(axinastatin)1；阿耐司汀(axinastatin)2；阿耐司汀(axinastatin)3；阿扎司琼；阿扎毒素；重氮酪氨酸；阿扎胞苷；AZD8330；阿扎替派；阿佐霉素；巴拉诺(balanol)；巴马司他；BAY11-7082；BAY 43-9006；BAY 869766；苯达莫司汀；苯并二氢卟酚；苯佐替派；苯甲酰星状孢菌素(benzoylstaurosporine)；β-alethine；亚阿克拉霉素B；桦木酸；b-FGF抑制剂；比卡鲁胺；比生群；双吖丙啶基精胺；双奈法德；二甲磺酸双奈法德；Bistratene A；盐酸比生群；博来

霉素;硫酸博来霉素;白消安;比折来新;布瑞弗莱特(breflate);硼替佐米;布喹那钠;溴匹立明(bropirimine);布度钛;丁胱亚磺酰亚胺;苔藓抑素;放线菌素C;卡普睾酮;卡泊三醇;卡弗他丁C;喜树碱衍生物;卡培他滨;甲酰胺-氨基-三唑;羧基酰氨基三唑;CaRest M3;CARN 700;卡醋胺;卡贝替姆;卡铂;卡莫司汀;盐酸卡柔比星(carubicin hydrochloride);卡折来新;粟树精胺;天蚕素B;西地芬戈;塞来昔布;西曲瑞克;二氢卟酚;氯喹喔啉磺酰胺;西卡前列素;苯丁酸氮芥;氯融蛋白;西罗霉素;顺铂;CI-1040;顺卟啉;克拉屈滨;氯米芬类似物;克霉唑;柯林斯霉菌素A;柯林斯霉菌素B;康普瑞汀A4;考布他汀类似物;康那格林(conagenin);康伯西汀(crambescidin)816;克立那托;甲横酸克立那托(crisnatolmesylate);念珠藻环肽8;念珠藻环肽A衍生物;库拉素A;环戊蒽醌;赛克普拉特(cycloplatam);赛普米新(cypemycin);环磷酰胺;阿糖胞苷;阿糖胞苷十八烷基磷酸酯;溶细胞因子;磷酸己烷雌酚;达卡巴嗪;更生霉素;柔红霉素;盐酸柔红霉素;氨烯咪胺;达昔单抗;达沙替尼;地西他滨;脱氢膜海鞘素B;地洛瑞林;地塞米松;右异环磷酰胺;右雷佐生;右维拉帕米;右奥马铂;地扎胍宁;甲磺酸地扎胍宁(dezaguaninemesylate);地吖醌;膜海鞘素B;迪多克斯(didox);二乙基去甲精胺;二氢5氮杂胞苷;二氢紫杉酚;9-二氧杂霉菌素;联苯螺莫司汀;二十二醇;多拉司琼;多西他赛;多柔比星;盐酸多柔比星;脱氧氟尿苷;屈洛昔芬;柠檬酸屈洛昔芬;丙酸屈他雄酮;屈大麻酚;达佐霉素;多卡米新SA;依布硒;依考莫司汀;依地福新;依决洛单抗;依达曲沙;盐酸依洛尼塞(eflornithine hydrochloride);依洛尼塞;榄香烯;乙嘧替氟;依沙芦星;恩洛铂;恩普氨酯;依匹哌啶;表柔比星;盐酸表柔比星;依立雄胺;厄布洛唑;艾日布林;盐酸伊索比星;雌莫司汀;雌莫司汀磷酸钠;依他硝唑;依托泊苷;磷酸依托泊苷;氯苯乙嘧胺;依西美坦;法倔唑;盐酸法倔唑;法扎拉滨;芬维A胺;非格司亭;非那雄胺;夫拉平度(flavopiridol);氟卓斯汀;弗拉斯特伦(fluasterone);氟尿苷(floxuridine);磷酸氟达拉滨;氟达拉滨;氟盐酸柔红霉素;福酚美克;福美斯坦;氟尿嘧啶;氟尿苷(floxouridine);氟西他滨;磷喹酮;福司曲星钠;福司曲星;福莫司汀;钆替沙林;硝酸镓;加洛他滨;加尼瑞克;明胶酶抑制剂;吉西他滨;格尔德霉素;gossyphol;GDC-0973;GSK1120212/曲美替尼;赫赛汀;羟基脲;hepsulfam;调蛋白;六甲撑二乙酰胺;金丝桃素;伊班膦酸;依鲁替尼;伊达比星;盐酸伊达比星;异环磷酰胺;坎磷酰胺;伊莫福新;异丙铂;艾多昔芬;伊决孟酮;伊莫福新;伊洛马司他;咪唑并吖啶酮;伊马替尼(例如,GLEEVEC);咪喹莫特;iniparib(BSI201);碘苄胍;碘阿霉素;依波米醇;伊立替康;盐酸伊立替康、伊索拉定;异本伽唑(isobengazole);异高软海绵素(isohomohalicondrin)B;伊他司琼;依莫福辛;白细胞介素IL-2(包括重组白细胞介素II;或rlL.sub.2);干扰素α-2a;干扰素α-2b;干扰素α-n1;干扰素α-n3;干扰素β-1a;干扰素γ-1b;jasplakinolide;海蛞蝓提取物(kahalalide)F;三乙酸层状素N;兰瑞肽;来那米新(leinamycin);来格司亭;硫酸香菇多糖;莱普妥斯新(leptolstatin);来曲唑;抑那通(leuprorelin);左旋咪唑;来那度胺;乐伐替尼;利阿唑;lissoclinamide 7;洛铂;蚯蚓磷脂;洛美曲索;氯尼达明;洛索蒽醌;洛伐他汀;洛索立宾;勒托替康;替沙林镥;利索茶碱;醋酸兰瑞肽;拉帕替尼;来曲唑;亚叶酸;亮丙瑞林乙酸盐;盐酸利阿唑;洛美曲索钠;洛莫司汀;盐酸洛索蒽醌;泊马度胺(pomalidomide);LY294002;美坦新;制甘糖酶素A;马立马司他;马索罗酚;乳腺丝抑蛋白;基质溶解因子抑制剂;美诺立尔;美巴龙;美替瑞林;甲硫氨酸酶;甲氧氯普胺;MIF抑制剂;米非司酮;米替福新;米立司亭;米托胍腙;二溴卫矛醇;米托萘胺;米托蒽醌;莫法罗汀;莫

拉司亭;莫哌达醇;mycaperoxide B;myriaporone;美坦辛;盐酸氮芥;醋酸甲地孕酮;醋酸美仑孕酮;美法仑;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;甲氨蝶呤钠;氯苯氨啶;美妥替哌;米丁度胺;米托克星;丝裂红素;米托洁林;米托马星;丝裂霉素;米托司培;米托坦;盐酸米托蒽醌;麦考酚酸;那法瑞林;那瑞替喷;napavin;naphterpin;那托司亭;奈达铂;奈莫柔比星;奈立膦酸;尼鲁米特;尼萨霉素(nisamycin);一氧化氮调节剂;氮氧化物抗氧化剂;尼图林(nitrullyn);诺考达唑;诺拉霉素;奥利莫森(GENASENSE);奥曲肽;奥琪森酮(okicenone);奥拉帕尼(LYNPARZA);寡核苷酸;奥那司酮;昂丹司琼;奥罗新(oracin);口服细胞因子诱导剂;奥马铂;奥昔舒仑;oxaloplatin;奥沙特隆;奥沙利铂;奥克萨霉素(oxaunomycin);帕劳霉素(palauamine);棕榈酰根瘤菌素(palmitoylrhizoxin);帕米膦酸;人参炔三醇;帕诺米芬;副球菌素;PARP(聚ADP核糖聚合酶)抑制剂;帕折普汀;培门冬酶;培得星;木聚硫钠;喷司他丁;pentrozole;全氟溴烷;培磷酰胺;紫苏醇;苯连氮霉素;苯乙酸酯;磷酸酯酶抑制剂;沙培林;盐酸毛果芸香碱;吡柔比星;吡曲克辛;普拉斯汀(placetin)A;普拉斯汀B;甲基丝裂霉素;泼尼松;前列腺素J2;吡唑啉吖啶;紫杉醇;PD035901;PD184352;PD318026;PD98059;培利霉素;戊氮芥;硫酸培洛霉素;PKC412;哌泊溴烷;哌泊舒凡;盐酸吡罗蒽醌;普卡霉素;普洛美坦;鬼臼毒素;多酚E;卟吩姆钠;甲基丝裂霉素;泼尼莫司汀;丙卡巴肼;盐酸丙卡巴肼;嘌呤霉素;盐酸嘌呤霉素;吡唑呋林;雷替曲塞;雷莫司琼;去甲基瑞替普汀;根霉素;利妥昔单抗;RII维甲酰胺(retinamide);罗谷亚胺;罗希吐碱;罗莫肽;罗喹美克;rubiginone B1;如波希尔(ruboxyl);利波腺苷;罗米地辛;rucaparib;沙芬戈;盐酸沙芬戈;saintopin;肌肉叶绿醇A;沙格司亭;司莫司汀;西佐喃;索布佐生;硼卡钠;苯乙酸钠;索沃绕(solverol);索纳明;索拉非尼;舒尼替尼;膦门冬酸;穗霉素D;螺莫司汀;斯耐潘定;海绵素1;海绵素2;海绵素3;海绵素4;海绵素5;海绵素6;海绵素7;海绵素8;和海绵素9;角鲨胺;斯蒂匹酰胺;间充质溶解素抑制剂;萨菲诺辛(sulfinosine);suradista;苏拉明;苦马豆素;SB239063;司美替尼/AZD6244;辛曲秦;SP600125;司泊索非钠;司帕霉素;盐酸锗螺胺;螺铂;链黑霉素;链脲菌素;磺氯苯脲;他莫司汀;他莫昔芬甲碘化物;talazoparib(BMN673);牛磺莫司汀;他扎罗汀;替可加兰钠;替加氟;替鲁里姆(tellurapyrylium);替莫泊芬;替莫唑胺;替尼泊苷;四氯十氧化物;四唑胺(tetrazomine);thaliblastine;噻可拉林;血小板生成素;胸腺法新;胸腺生成素受体激动剂;胸腺曲南;替拉扎明;二茂基二氯化钛;妥普森汀(topsentin);托瑞米芬;维甲酸;三乙酰尿苷;曲西立滨;三甲曲沙;曲普瑞林;托烷司琼;妥罗雄脲;酪氨酸磷酸化抑制剂;太利苏霉素;TAK-733;泰索帝;替加氟;盐酸替洛蒽醌;替罗昔隆;睾内酯;硫咪嘌呤;硫鸟嘌呤;噻替派;噻唑呋林;替拉扎明;柠檬酸托瑞米芬;曲妥珠单抗;醋酸曲托龙;磷酸曲西立滨;三甲曲沙;葡萄糖醛酸三甲曲沙;曲普瑞林;盐酸妥布氯唑;肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体(TRAIL);UBC抑制剂;乌苯美司;U0126;乌拉莫司汀;乌瑞替派;伐普肽;维瑞尔林(variolin)B;维拉雷琐;维利帕尼(ABT-888);藜芦胺;维替泊芬;长春瑞滨;维撒丁(vinxaltine);vitaxin;长春碱;硫酸长春碱;硫酸长春新碱;长春地辛;硫酸长春地辛;硫酸长春匹定;硫酸长春甘酯;硫酸长春罗辛;酒石酸长春瑞滨;硫酸长春罗定;硫酸长春利定;伏氯唑;渥曼青霉素;XL518;扎诺特隆;折尼铂;亚苄维C;净司他丁斯酯;净司他丁;和盐酸佐柔比星。

[0111] 其他示例性抗癌剂包括厄布洛唑(例如,R-55104);多拉司他汀10(例如,DLS-10和NSC-376128);羟乙磺米伏布林(例如,CI-980);NSC-639829;圆皮海绵内酯(例如,NVP-XX-

A-296);ABT-751(雅培公司(Abbott);例如,E-7010);阿托海汀A;阿托海汀C;盐酸西马多丁(例如,LU-103793和NSC-D-669356);CEP 9722;埃坡霉素A;埃坡霉素B;埃坡霉素C;埃坡霉素D;埃坡霉素E;埃坡霉素F;埃坡霉素B N-氧化物;埃坡霉素A N-氧化物;16-氮杂-埃坡霉素B;21-氨基埃坡霉素B;21-羟基埃坡霉素D;26-氟代埃坡霉素;澳瑞他汀PE(例如,NSC-654663);索利多汀(例如,TZT-1027);LS-4559-P(法玛西亚公司(Pharmacia);例如,LS-4577);LS-4578(法玛西亚公司;例如,LS-477-P);LS-4477(法玛西亚公司);LS-4559(法玛西亚公司);RPR-112378(安内特公司(Aventis));DZ-3358(大一针公司(Daiichi));FR-182877(藤泽公司(Fujisawa);例如,WS-9265B);GS-164(武田公司(Takeda));GS-198(武田公司);KAR-2(匈牙利科学院(Hungarian Academy of Sciences));BSF-223651(BASF;例如,ILX-651和LU-223651);SAH-49960(礼来(Lilly)/诺华(Novartis));SDZ-268970(礼来/诺华);AM-97(阿迈德(Armad)/协和发酵(Kyowa Hakko));AM-132(阿迈德);AM-138(阿迈德(Armad)/协和发酵(Kyowa Hakko));IDN-5005(英第爱纳(Indena));念珠藻环肽52(例如,LY-355703);AC-7739(味之素(Ajinomoto);例如,AVE-8063A和CS-39.HCl);AC-7700(味之素;例如,AVE-8062;AVE-8062A;CS-39-L-Ser.HCl;和RPR-258062A);Vitilevuamide;微管蛋白抑制剂A;加纳单索;CA-170(库里斯公司(Curis));矢车菊黄素(例如,NSC-106969);T-138067(Tularik;例如,T-67;TL-138067和TI-138067);COBRA-1(帕克休斯研究所(Parker Hughes Institute);例如,DDE-261和WHI-261);H10(堪萨斯州立大学(Kansas State University));H16(堪萨斯州立大学);Oncocidin A1(例如,BTO-956和DIME);DDE-313(帕克休斯研究所);Fijianolide B;Laulimalide;SPA-2(帕克休斯研究所);SPA-1(帕克休斯研究所;例如,SPIKET-P);3-IAABU(细胞骨架公司(Cytoskeleton)/西奈山医学院(Mt.Sinai School of Medicine);例如,MF-569);那可丁(例如,NSC-5366);Nascapine;D-24851(爱斯达制药公司);A-105972(雅培公司);哈米特林;3-BAABU(细胞骨架公司/西奈山医学院;例如,MF-191);TMPN(亚利桑那州立大学(Arizona State University));二茂基乙酰丙酮化钒;T-138026(Tularik);Monsatrol;lnanocine(例如,NSC-698666);3-IAABE(细胞骨架公司/西奈山医学院);A-204197(雅培公司);T-607(Tularik;例如,T-900607);RPR-115781(安内特公司(Aventis));艾榴塞洛素(例如,脱甲基艾榴塞洛素;脱乙酰基艾榴塞洛素;异艾榴塞洛素A;和Z-艾榴塞洛素);卡利贝苷;卡利贝林;软海绵素B;D-64131(爱斯达制药公司);D-68144(爱斯达制药公司);Diazonamide A;A-293620(雅培公司);NPI-2350(海神公司(Nereus));箭根酮内酯A;TUB-245(安内特公司);A-259754(雅培公司);Diozostatin;(-)-苯丙氨酸(例如,NSCL-96F037);D-62638(爱斯达制药公司);D-62636(爱斯达制药公司);肌基质蛋白B;D-43411(Zentaris;例如,D-81862);A-289099(雅培公司);A-318315(雅培公司);HTI-286(例如,SPA-110;三氟乙酸盐)(惠氏公司(Wyeth));D-82317(Zentaris);D-82318(Zentaris);SC-12983(NCI);力司弗拉司达汀(Resverastatin)磷酸钠;BPR-OY-007(国家卫生研究院(National Health ResearchInstitutes));和SSR-250411(赛诺菲公司(Sanofi));戈舍瑞林;亮丙瑞林;雷公藤甲素;高三尖杉酯碱;拓扑替康;伊曲康唑;脱氧腺苷;舍曲林;匹伐他汀;氯法齐明;5-壬氧基色胺;威罗菲尼;达拉菲尼;吉非替尼(IRESSA);埃罗替尼(TARCEVA);西妥昔单抗(ERBITUX);拉帕替尼(TYKERB);帕木单抗(VECTIBIX);凡德他尼(CAPRELSA);阿法替尼/BIBW2992;CI-1033/卡奈替尼;来那替尼/HKI-272;CP-724714;TAK-285;AST-1306;ARRY334543;ARRY-380;AG-1478;达可替尼/

PF299804;OSI-420/去甲基厄洛替尼;AZD8931;AEE726;培利替尼/EKB-569;CUDC-101;WZ8040;WZ4002;WZ3146;AG-490;XL647;PD153035;5-硫唑嘌呤;5-氮杂-2'-脱氧胞苷;17-N-烯丙氨基-17-去甲氧基格尔德霉素(17-AAG);20-表-1,25二羟基维生素D3;5乙炔基尿嘧啶;和BMS-599626。

[0112] 一个实施例是用于通过与卡培他滨和/或PLX4032(Plexxikon公司)组合给予本发明的化合物治疗患有(任选的难治性的)肝细胞癌的患者的方法。

[0113] 在另一个实施例中,是用于通过与卡培他滨、希罗达和/或CPT-11组合给予本发明的化合物治疗(任选的难治性的)肝细胞癌的方法。

[0114] 在另一个实施例中,是用于通过与卡培他滨、希罗达和/或CPT-11组合给予本发明的化合物治疗(任选的难治性的)肝细胞癌的方法。

[0115] 在另一个实施例中,是用于通过与卡培他滨和伊立替康组合给予本发明的化合物治疗患有(任选的难治性的)肝细胞癌的患者或患有不可切除或转移性肝细胞癌的患者的方法。

[0116] 在另一个实施例中,是用于通过与干扰素α或卡培他滨组合给予本发明的化合物治疗患有不可切除或转移性肝细胞癌的患者的方法。

[0117] 在另一个实施例中,是用于通过与吉西他滨组合给予本发明的化合物治疗患有胰腺癌的患者的方法。

[0118] 一个实施例是用于通过与另一种或多种药剂(或其组合)组合给予本发明的化合物治疗患有CCA的患者的方法。

[0119] 一个实施例是用于通过与吉西他滨、顺铂(或其组合)组合给予本发明的化合物治疗患有CCA的患者的方法。

[0120] 药物组合物

[0121] "药物组合物"是配制品,该配制品含有处于适于给予至受试者的形式的本发明的化合物。在一个实施例中,该药物组合物处于散装形式或单位剂型。以易于给予和实现剂量均匀性的剂量单位形式配制组合物可以是有利的。剂量单位形式的规格由活性试剂的独特特性和欲实现的特定治疗效果决定,且直接取决于它们。

[0122] 可能的配制品包括适于口服、舌下、经颊、肠胃外(例如,皮下、肌内或静脉内)、直肠、局部(包括透皮、鼻内和吸入)给予的那些。对于特定患者,最适合的给予方式将取决于正治疗疾病的性质和严重程度或所用疗法的性质并且取决于活性化合物的性质,但是可能的话,口服给予可用于预防和治疗癌症。适于口服给予的配制品能以离散单位形式提供,如各自含有预定量的活性化合物的片剂、胶囊、扁囊剂、锭剂;以粉末或颗粒提供;以水性或非水性液体中的溶液或悬浮液提供;或以水包油或油包水乳剂提供。

[0123] 适于舌下或经颊给予的配制品包括:锭剂,其含有本发明的化合物和典型地调味基体,该调味基体如糖和阿拉伯胶或黄耆胶;以及软锭剂,其包含在惰性基体中的活性化合物,该惰性基底如明胶和甘油、或蔗糖阿拉伯胶。

[0124] 适于胃肠外给予的配制品典型地包括含有预定浓度的活性化合物的无菌水溶液;该溶液可以是与预期接受者的血液等渗的。适于胃肠外给予的另外的配制品包括含有生理上适合的共溶剂和/或络合剂(如表面活性剂和环糊精)的配制品。对于胃肠外配制品,水包油型乳剂也是适合的。尽管这些溶液可以通过静脉内给予,但是它们也可以通过皮下或肌

内注射来给予。

[0125] 适于直肠给予的配制品可以被提供为单位剂量的栓剂，这些栓剂包含在形成栓剂基体的一种或多种固体载体(例如可可脂)中的本发明的化合物。

[0126] 适于局部或鼻内施用的配制品包括软膏、乳膏、洗剂、糊剂、凝胶、喷雾剂、气雾剂和油。用于此类配制品的合适载体包括凡士林、羊毛脂、聚乙二醇、醇及其组合。

[0127] 本发明的配制品可以通过任何合适的方法制备，典型地通过将本发明的化合物与液体或细碎的固体载体或两者以所需的比例均匀且紧密地混合，并且然后如果需要，使所得混合物成形为所希望的形状。

[0128] 例如，可以通过压制包含活性成分的粉末或颗粒和一种或多种任选成分(如粘合剂、润滑剂、惰性稀释剂或表面活性分散剂)的均匀混合物，或者通过模塑粉状的活性成分和惰性液体稀释剂的紧密混合物来制备片剂。通过吸入给予的适合配制品包括可通过各种类型的定量加压气雾剂、喷雾器或吹入器产生的细颗粒粉末或雾。

[0129] 对于经由口进行的肺部给予，粉末或液滴的粒径典型地在约0.5μM-10μM或1μM-5μM的范围内，以确保递送到支气管树中。对于鼻内给予来说，可以使用在约10μM-500μM范围内的粒径，以确保保留在鼻腔中。

[0130] 定量吸入器是加压的气溶胶分配器，它典型地含有本发明的化合物于液化的推进剂中的悬浮液或溶液配制品。在使用期间，这些装置将配制品射过经改造适合递送计量体积(典型地从约10μM至150μM)的阀门，以产生含有活性成分的细颗粒喷雾。适合的推进剂包括某些氯氟化碳化合物，例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷及其混合物。配制品可另外地含有一种或多种共溶剂，例如乙醇表面活性剂(如油酸或脱水山梨糖醇三油酸酯)、抗氧化剂和适合的调味剂。

[0131] 喷雾器是可商购的装置，其通过使压缩气体(典型地是空气或氧气)加速穿过狭窄的文丘里管孔口或通过超声搅拌，将活性成分的溶液或悬浮液转化成治疗性气溶胶雾。用于在喷雾器中使用的合适的配制品由分散于液体载体中且占配制品的高达约40％w/w、并且可以包含低于约20％w/w的活性成分组成。该载体典型地为水或稀释的水性醇溶液，优选通过添加例如氯化钠使之与体液是等渗的。任选的添加剂包括防腐剂(如果配制品未无菌制备的话)，例如羟苯甲酸甲酯、抗氧化剂、调味剂、挥发油、缓冲剂和表面活性剂。

[0132] 适于通过吹入法给予的配制品包括精细粉碎的粉末，这些粉末可以通过一种吹入器递送或以鼻吸药的方式带进鼻腔。在吹入器中，粉末被包含在典型地由明胶或塑料构成的胶囊或药筒中，这些胶囊或药筒可在原位被刺穿或打开，并且粉末通过在吸入时的装置或通过手动泵抽过的空气来递送。用于吹入器的粉末可以只由活性成分组成或由包含活性成分、适合的粉末稀释剂(如乳糖)、和任选的表面活性剂的粉末共混物组成。活性成分典型地占配制品的从约0.1％至100％w/w。

[0133] 在另一实施例中，本发明提供了药物组合物，该药物组合物包含作为活性组分的本发明的化合物连同至少一种药物载体或稀释剂，和/或本发明的化合物与至少一种药物载体或稀释剂的混合物。

[0134] 载体是药学上可接受的并且必须与该组合物中的其他成分相容，即不会对其他成分造成不利影响。载体可以是固体或液体，并且优选被配制为单位剂量配制品，例如可能含有按重量计从约0.05％至95％的活性成分的片剂。如果需要，也可以将其他生理活性成分

掺入在本发明的药物组合物中。

[0135] 除了以上特别提到的成分之外，本发明的配制品可以包括药学领域的技术人员已知的其他药剂，这与所讨论的配制品的类型有关。例如，适于口服给予的配制品可以包括调味剂，并且适于鼻内给予的配制品可以包括香料。

[0136] 在一个实施例中，以如下剂型给予药物组合物，该剂型包含每日从约0.1-1500mg、0.2-1200mg、0.3-1000mg、0.4-800mg、0.5-600mg、0.6-500mg、0.7-400mg、0.8-300mg、1-200mg、1-100mg、1-50mg、1-30mg、4-26mg、5-25mg或5-10mg的总量的本发明的化合物。

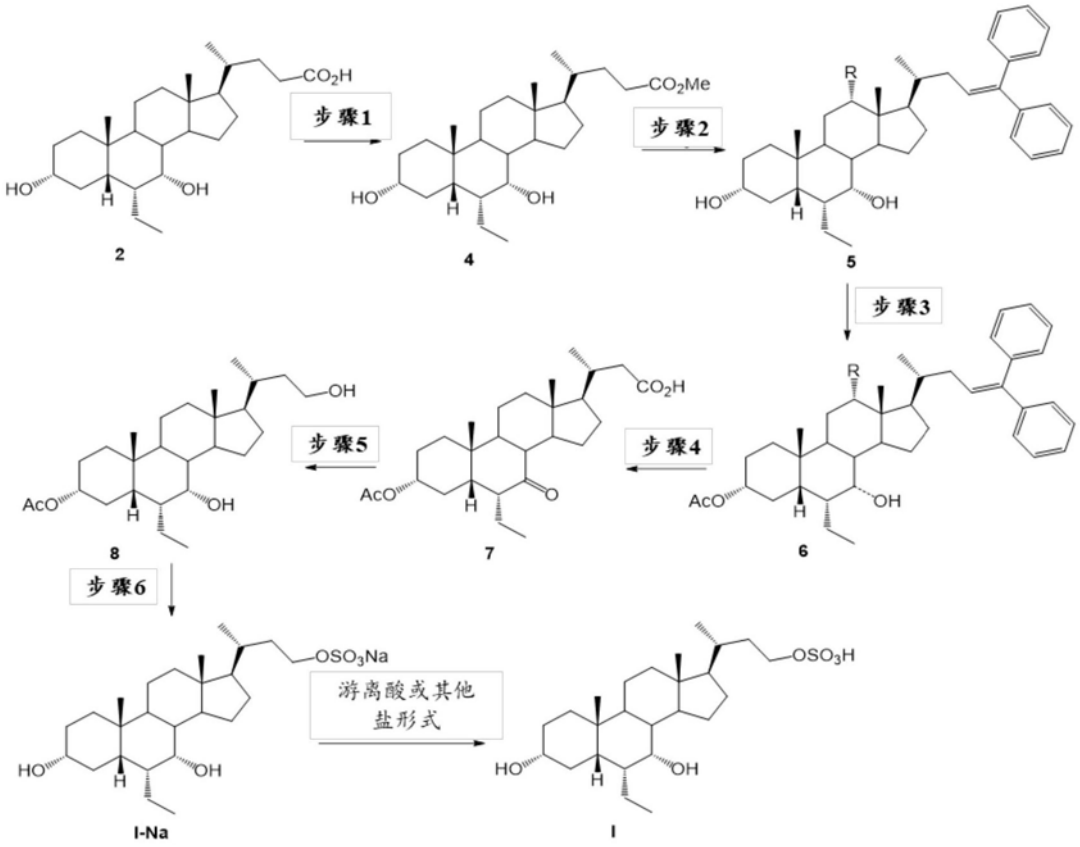
[0137] 本发明的化合物可以与其他肝细胞癌治疗药物组合使用，例如抗癌化学治疗药物、激素、一种或多种生物应答调节剂和其他血管生成抑制剂；或与免疫疗法或基因疗法组合使用。

[0138] 实例1.化合物1的合成

[0139] 化合物1可通过本领域已知的方法制备(例如，美国专利号7,932,244中描述的那些)。例如，化合物1可以通过如方案1所示的并披露于WO 2014/066819的方法制备。

[0140] 方案1

[0141]



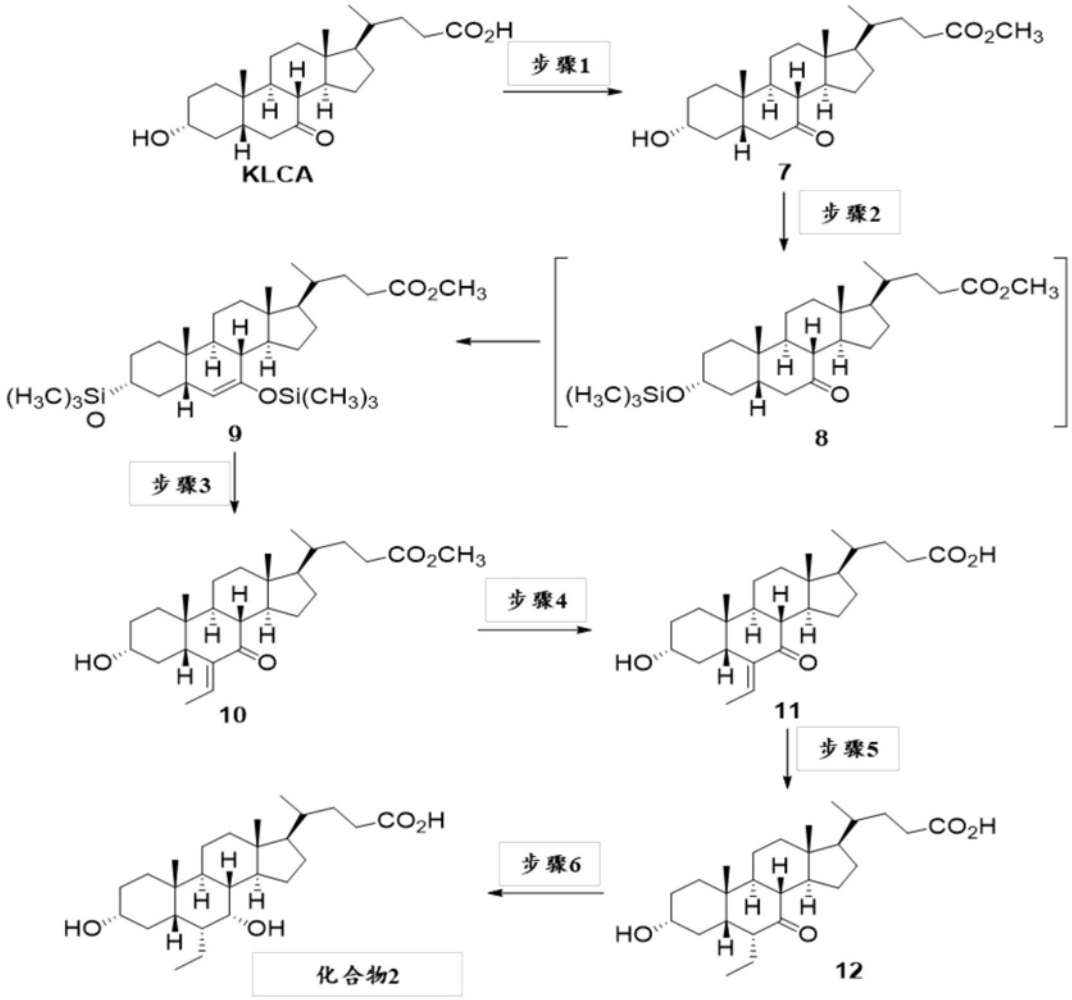
[0142] 步骤1是化合物2的酯化以获得化合物4。步骤2是从化合物4形成化合物5的反应。步骤3是保护在化合物5的C3位置的羟基基团以得到化合物6。步骤4是化合物6的氧化裂解以得到化合物7。步骤5是化合物7的还原以得到化合物8。步骤6是化合物8的磺化以得到化合物1的钠盐(1-Na)。根据本领域已知的程序，可将化合物1的钠盐转化为其游离酸形式(即化合物1)或其他盐形式(例如化合物1-DEA或化合物1的N,N-二乙烷胺盐)。

[0143] 实例2.化合物2的合成

[0144] 化合物2可以通过常规方法(例如，美国公开号2009/0062526、美国专利号7,138,

390和WO 2006/122977中描述的那些方法)，如通过产生化合物1(奥贝胆酸或OCA)后的6-步合成来制备，如以下方案2所示的。

[0145] 方案2

[0146] 

[0147] 上述方法是一个6步合成。步骤1是在酸性催化剂和加热存在下，使用甲醇酯化7-酮基石胆酸(KLCA)的C-24羧酸，以产生甲基酯化合物7。步骤2是使用强碱从化合物a形成硅烯醇醚，接着用氯硅烷处理以产生化合物8。步骤3是化合物8的硅烯醇醚和乙醛的醛醇缩合反应，以产生化合物10。步骤4是化合物10的C-24甲酯皂化，以产生化合物11。步骤5是化合物11的6-亚乙基部分的氢化，以产生化合物12。步骤6是化合物12的7-酮基基团选择性还原成7α-羟基基团，以产生化合物1。

[0148] 实例3.$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠的肝癌发生

[0149] 多药抗性蛋白2(Abcb4)是ATP结合盒(ABC)转运蛋白超家族的成员。多药抗性蛋白2基因敲除小鼠($Mdr2^{-/-}$)提供自发性肝癌发生的体内模型(Katzenellengoben等人，Mol.Cancer Res.[分子癌症研究]2007,5,11,1159-1170)。缺乏由多药抗性-2基因编码的Abc4蛋白的小鼠发展成慢性周围炎症和胆汁淤积性肝病，导致肝细胞癌的发展。

[0150] 法尼醇X受体蛋白(FXR)是作为控制胆汁酸稳态的胆汁酸传感器起作用的核受体。该受体在肝脏和其他器官中高度表达。FXR敲除($FXR^{-/-}$)小鼠在15个月大之后发展肝细胞腺瘤和癌(Yang等人，Cancer Res.[癌症研究]，2007,67,863)。

[0151] 评估了OCA、化合物1-Na和对照饮食在$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠中对肝细胞癌发展的影

响。OCA是FXR激动剂，而化合物1-Na是双重FXR/TGR5激动剂。化合物1-Na对FXR的效力比OCA高约10倍。

[0152] 研究设计

[0153] 将$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠随机分成三个实验组。给小鼠饲喂特定的啮齿动物饮食或饲喂补充有OCA、化合物1-Na的饮食或饲喂对照饮食15个月。所有小鼠在无病原体的条件下在温度受控的室内(23℃)12小时光照/黑暗循环饲养并随意饮用水。巴里大学伦理委员会(Ethical Committee of the University of Bari)批准了这一实验设置，该设置也得到了意大利卫生部(Italian Ministry of Health)的认可，符合国际公认的动物护理指南。16个月后，处死小鼠并收集血清、肝脏和肠。计数肝肿瘤的总数并测量每个肿瘤的直径。

[0154] 处理组

[0155] 组1:对照饮食

[0156] 给小鼠(n＝4)饲喂对照饮食15个月。

[0157] 组2:OCA

[0158] 以10mg/kg的剂量给小鼠(n＝8)饲喂补充有OCA的对照饮食15个月。

[0159] 组3:化合物1-Na

[0160] 以10mg/kg的剂量给小鼠(n＝15)饲喂补充有化合物1-Na的对照饮食15个月。

[0161] 结果

[0162] 胆汁盐诱导的$Mdr2^{-/-}$小鼠中肝脏炎症和毒性导致肝细胞异型增生的发展。到16个月大时，几乎100％的$Mdr2^{-/-}$对照小鼠都患上了肝肿瘤。年龄为16个月的$FXR^{-/-}$小鼠患上自发性肝细胞癌。

[0163] 肿瘤减少和大小

[0164] 图1A和2A显示化合物1-Na、OCA和对照对$Mdr2^{-/-}$小鼠中肿瘤数量减少的影响。与对照相比，化合物1-Na在本研究中明确预防了肝细胞癌的发展。对于化合物1-Na组，几乎观察到统计学显著性(p＝0.055)，但由于研究中使用的对照动物(n＝2)的数量较少而未实现。$Mdr2^{-/-}$对照小鼠和OCA处理的小鼠显示清楚可识别的肝肿瘤，而在化合物1-Na组中发现微小肿瘤。图1B和2B显示化合物1-Na、OCA和对照对直径>5mm的肿瘤的减小百分比的影响。在$Mdr2^{-/-}$小鼠中，在OCA和对照组中发现的近80％的肿瘤具有大于5mm的直径。相反，用化合物1-Na、OCA和对照处理的$FXR^{-/-}$小鼠表现出若干个大的肝肿瘤，表明预防肝细胞癌的发展主要是FXR依赖性的(图3A、3B和4)。

[0165] 肝脏重量/体重(LW/BW)

[0166] 图5A和5B描述了化合物1-Na和对照对肝脏重量和体重的百分比的影响。与先前生成的数据一致，与对照和OCA处理的$Mdr2^{-/-}$小鼠相比，化合物1-Na处理的$Mdr2^{-/-}$小鼠表现出LW/BW比率的显著降低。在$FXR^{-/-}$组中没有观察到LW/BW比率的差异。

[0167] 生化参数

[0168] 为了评估$Mdr2^{-/-}$和$FXR^{-/-}$小鼠的肝损伤，分析了化合物1-Na和对照对肝酶、丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)水平的影响。如图6A和6B所示，用化合物1-Na处理显著降低$Mdr2^{-/-}$小鼠中的ALT和AST水平。然而，在$FXR^{-/-}$处理的小鼠中没有观察到ALT和AST水平的差异。

[0169] 回肠FXR靶基因表达

[0170] 为了证明FXR参与预防肝细胞癌，评估了化合物1-Na和对照对回肠FXR靶基因表达的影响。如所预期的，OCA和化合物1-Na仅在Mdr2$^{-/-}$组中刺激成纤维细胞生长因子15(Fgf15)和小异二聚体配偶体(Shp)基因表达(图7A和7B)。

[0171] 肝FXR靶基因表达

[0172] 胆固醇7α-羟化酶(cyp7a1)是将胆固醇转化为胆汁酸的经典生物合成途径中的限速酶。化合物1-Na和OCA均仅在Mdr2$^{-/-}$小鼠中抑制Cyp7a1基因表达(图8)。胆汁盐输出泵(Bsep)是一种膜蛋白，利用ATP水解的能量来主动运输胆汁酸盐。如图9A和9B所示，化合物1-Na给予诱导Mdr2$^{-/-}$小鼠中的肝Bsep活化。OCA没有促进肝Bsep诱导，这表明与化合物1-Na(其有效活化肠道和肝脏中的FXR)相反，OCA在Mdr2$^{-/-}$小鼠中不太可能具有肝脏活性。

[0173] 血清总胆汁酸

[0174] 化合物1-Na显著降低Mdr2$^{-/-}$小鼠中的血清胆汁酸水平(图10A)。通过观察到FXR$^{-/-}$小鼠中未发生降低证实了该发现的FXR依赖性(图10B)。

[0175] 实例4.FXR或TGR5活化在胆管癌进展中的不同影响

[0176] 方法

[0177] 通过使用2种方法(mRNA微阵列和qPCR)和2种不同的患者组(哥本哈根(Copenhagen)和圣塞巴斯蒂安(San Sebastian))在CCA人活组织检查和对照中，以及在与正常人胆管细胞(NHC)相比不同的人CCA细胞系中(通过qPCR)，确定FXR和TGR5表达。在慢性给予特定的FXR或TGR5激动剂(分别为OCA或化合物4；在食物中0.03％，持续2个月；拦截制药公司(Intercept Pharmaceuticals))后，免疫缺陷小鼠中人CCA的原位模型的生长通过磁共振成像(MRI)评估。还评估了FXR或TGR5活化对体外CCA和NHC细胞的增殖、迁移和线粒体能量代谢的差异影响。

[0178] 结果

[0179] 与哥本哈根和圣塞巴斯蒂安组中的正常肝周组织和正常肝内胆管相比，FXR在人CCA组织样品中下调并且TGR5上调(分别通过mRNA微阵列和qPCR)。FXR的活化通过调节增殖、迁移和线粒体能量代谢抑制CCA进展(而TGR5的活化可促进该进展)。对FXR和TGR5活性的调节代表了CCA的潜在治疗策略。在体外，与NHC相比，还发现FXR在不同的人CCA细胞系中下调和TGR5上调。

[0180] 如图11A-11D所示，在CCA肿瘤中FXR表达降低并且与肿瘤分化相关：图11A代表与周围人组织(n＝60)相比，CCA肿瘤的整个组织(n＝104)中的FXR mRNA微阵列表达(哥本哈根组)(曼-惠特尼检验(Mann-Whitney test))；图11B代表根据肿瘤分化等级分组的CCA肿瘤的整个组织中的FXR mRNA微阵列表达：分化良好的(n＝10)，中度分化的(n＝34)或分化不良的(n＝9)(哥本哈根组)(曼-惠特尼检验)；图11C代表与正常人肝组织(n＝20)和周围人肝组织(n＝7)(圣塞巴斯蒂安组)相比，CCA肿瘤(n＝5)中的FXR mRNA表达(qPCR)(曼-惠特尼检验)；并且图11D代表与匹配的周围人肝组织(n＝4)(圣塞巴斯蒂安组)相比，CCA肿瘤中的FXR mRNA表达(qPCR)(配对T检验)。

[0181] 如图12A-12D所示，在CCA肿瘤中TGR5表达增加、在门周比在肝内CCA中更高、并且与神经周围浸润相关(图12A)。图12B代表与周围人组织(n＝60)相比，CCA肿瘤的整个组织(n＝104)中的TGR5 mRNA微阵列表达(哥本哈根组)(曼-惠特尼检验)。图12C显示在临床病理学参数(解剖位置[门周(n＝36)或肝内(n＝68)]和神经周围浸润[阴性(n＝50)或阳性(n

＝42)])下,CCA肿瘤的整个组织中的TGR5 mRNA微阵列表达(哥本哈根组)(曼-惠特尼检验)。图12C代表与周围人肝组织(n＝27)相比,CCA肿瘤(n＝15)中的TGR5 mRNA表达(qPCR)(圣塞巴斯蒂安组)(曼-惠特尼检验)。图12D显示与匹配的周围人肝组织(n＝11)相比,CCA肿瘤中的TGR5 mRNA表达(qPCR)(圣塞巴斯蒂安组)(威尔科克森匹配对象符号秩检验(Wilcoxon matched-paires signed rank test))。

[0182] 如图13A和13B所示,与正常人胆管细胞相比,CCA细胞系中FXR表达降低并且TGR5表达增加:图13A显示正常人胆管细胞(n＝6)和CCA细胞系(分别为n＝5和6)中的FXR mRNA表达(qPCR)(曼-惠特尼检验或未配对T检验);图13B显示正常人胆管细胞(n＝6)和CCA细胞系(分别为n＝5和4)中的TGR5 mRNA表达(qPCR)(非配对T检验或曼-惠特尼检验)。

[0183] 与未治疗的动物相比,向原位CCA小鼠模型慢性给予FXR激动剂OCA抑制肿瘤生长,并且这种影响与所治疗的动物的肿瘤内PCNA和Ki67表达降低相关。如图14A-14D所示,FXR激动剂奥贝胆酸(OCA)抑制体内肿瘤生长,这与增殖标志、胆道标志和上皮标志的表达降低相关。将EGI1细胞皮下注射到CD1裸鼠雄性小鼠中。一旦肿瘤生长,将肿瘤原位植入CD1裸雄性小鼠的肝脏中。两周后,进行MRI分析并在饮食中开始治疗给予。通过MRI监测1个月和2个月的肿瘤生长。图14A显示未处理的对照小鼠、OCA处理的小鼠和化合物4处理的小鼠的代表性MRI和肝脏图像。图14B的条形图显示通过MRI定量的肿瘤体积倍数变化(对照n＝8,OCA n＝6,化合物4n＝9(曼-惠特尼检验,单尾)。图14C代表肝原位CCA肿瘤中增殖标志(即Ki67和PCNA)、胆汁标志(即CK19)和上皮标志(即ZO-1)的mRNA表达水平。n＝5-8(曼-惠特尼或未配对T检验,单尾)。图14D显示未处理或用OCA或化合物4处理的小鼠的肝原位CCA肿瘤中的增殖标志(即Ki67和PCNA)的代表性免疫组织化学图像。相反,在用TGR5激动剂化合物4慢性治疗的动物中未观察到对CCA肿瘤生长的影响。

[0184] 图17显示OCA和化合物4在增殖标志的肝脏异种移植肿瘤表达中的影响。肝原位CCA肿瘤中增殖标志(即Cdc25a、细胞周期蛋白D1和细胞周期蛋白D3)的mRNA表达水平。n＝5-8(曼-惠特尼或未配对T检验,单尾)。

[0185] 在体外,用OCA活化FXR抑制CCA细胞的增殖和迁移,并且这些事件与相比对照的线粒体能量代谢减少(即基线呼吸、最大呼吸和与ATP相关的呼吸减少)相关。在另一方面,FXR活化不影响CCA细胞的存活。如图15A-15D所示,FXR激动剂OCA以剂量依赖性方式抑制CCA细胞增殖并抑制CCA细胞迁移(其与CCA细胞中线粒体代谢减少相关),而不诱导细胞凋亡。图15A显示与未处理的对照细胞(n＝4)相比,用OCA(n＝5)以10或25μM处理48h的CCA细胞(即EGI1)的增殖(通过流式细胞术使用CFSE细胞增殖染料染色进行)(非配对T检验)。至少在三个独立实验中进行测定。与未处理的对照细胞相比,在OCA(25μM)处理3-6-12h的CCA细胞(即EGI1)中增殖标志(即Ki67、PCNA、细胞周期蛋白D1和细胞周期蛋白D3)的mRNA表达。n＝5-6,对未处理对照的未配对T检验。图15B显示CCA细胞(即EGI1)中迁移测定的结果。在指定的时间点和条件下(即未处理的对照或OCA处理)的伤口愈合测定和相应定量(在每种条件下,n＝6)的代表性显微图像(非配对T检验)。在两个独立的实验中进行测定。在未处理的和OCA处理的细胞中24h的transwell迁移室的代表性显微图像。进行一次测定。图15C显示使用未处理的或用OCA(25μM)处理(预处理3h)的CCA细胞(即EGI1)中的线粒体应激测试试剂盒的海马耗氧率(OCR)。在OCR测量时计算的代谢参数的条形图。每组n＝11-12(非配对T检验)。至少在三个独立实验中进行测定。图15D代表未处理的或用10或25μM的OCA处理的CCA

细胞(即EGI1)中,通过膜联蛋白V和碘化丙锭染色的基于流式细胞术的细胞凋亡测定。来自两个独立实验的合并数据的代表性直方图和相应定量,总n＝6-7(非配对T检验)。在三个独立的实验中进行测定。

[0186] 相反,用化合物4活化TGR5确实刺激CCA细胞的增殖和迁移,并且这些事件与相比对照的线粒体能量代谢增加(即基线呼吸、质子泄漏和与ATP相关的呼吸增加)相关。如图16A-16C所示,TGR5激动剂化合物4轻微刺激CCA细胞的增殖、迁移和线粒体代谢。图16A显示与未处理的对照细胞相比,用化合物4以10或25μM处理48h的CCA细胞(即EGI1)的增殖(通过流式细胞术使用CFSE细胞增殖染料染色分析)。n＝5-6(非配对T检验)。在三个独立的实验中进行测定。与未处理的对照细胞相比,在化合物4(25μM)处理3-6-12h的CCA细胞(即EGI1)中的增殖标志(即Ki67、PCNA、细胞周期蛋白D1和细胞周期蛋白D3)的mRNA表达。n＝6(对未处理对照的未配对T检验或曼-惠特尼检验)。图16B代表CCA细胞(即EGI1)中的迁移测定。在指定的时间点和条件下(即未处理的对照或化合物4处理的)的伤口愈合测定和相应定量的代表性显微图像。来自两个独立实验的合并数据(总n＝9和6)(非配对T检验)。至少在三个独立实验中进行测定。在未处理的和化合物4处理的细胞中24h的transwell迁移室和相应定量(n＝4和2)的代表性显微图像。在三个独立的实验中进行测定。图16C显示使用未处理的或用化合物4(25μM)处理(预处理3h)的CCA细胞(即EGI1)中的线粒体应激测试试剂盒的海马耗氧率(OCR)。在OCR测量时计算的代谢参数的条形图。每组n＝11-12(非配对T检验)。至少在三个独立实验中进行测定。

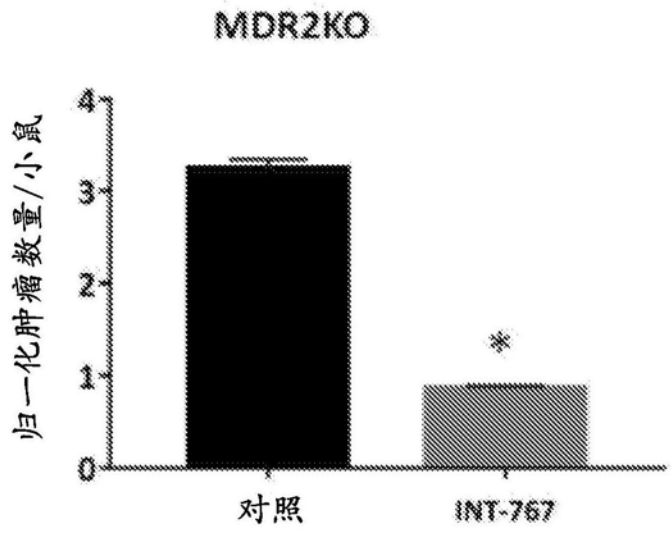

MDR2KO
归一化肿瘤数量/小鼠
0
1
2
3
4
*
对照
INT-767

图1A

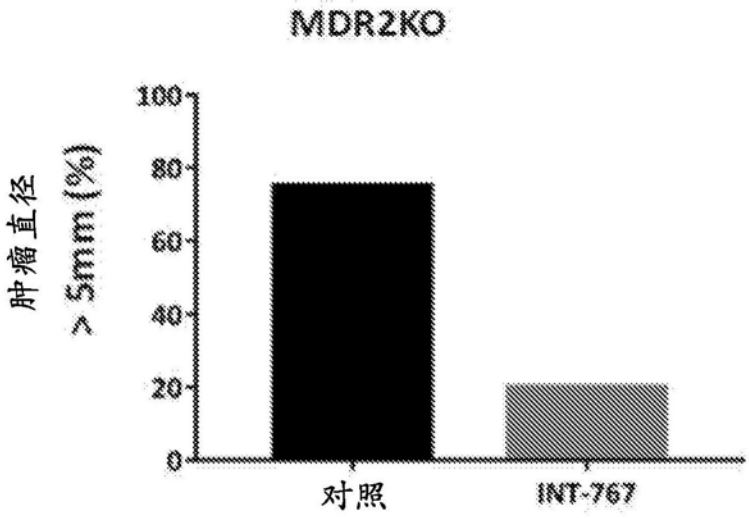

MDR2KO
肿瘤直径
>5mm(%)
0
20
40
60
80
100
对照
INT-767

图1B

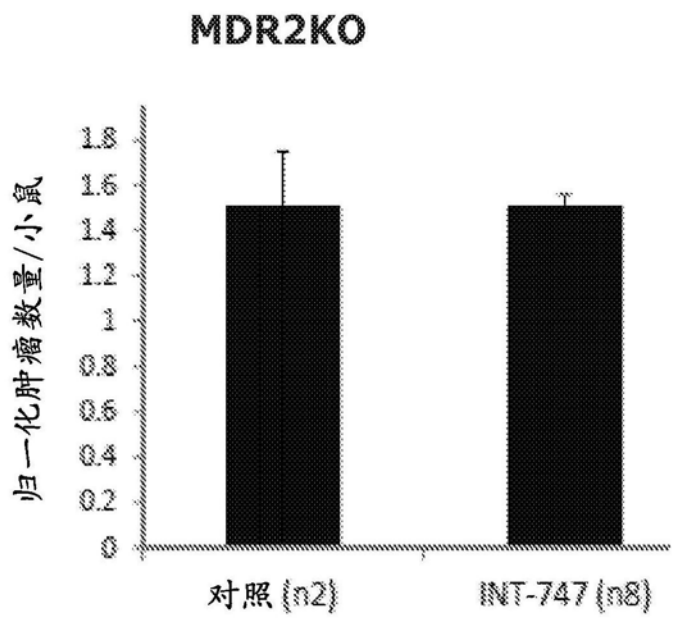

MDR2KO
归一化肿瘤数量/小鼠
1.8
1.6
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
对照 (n2)
INT-747 (n8)

图2A

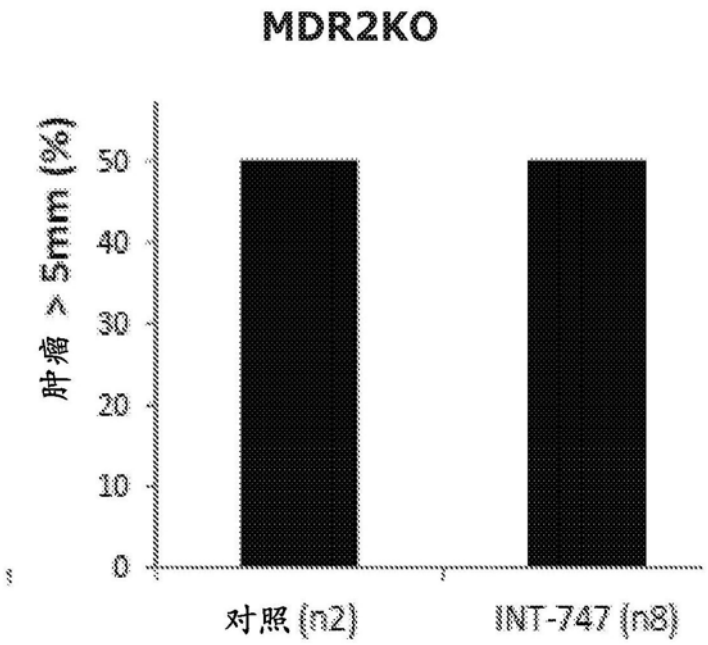

MDR2KO
肿瘤 ≥ 5mm (%)
50
40
30
20
10
0
对照 (n2)
INT-747 (n8)

图2B

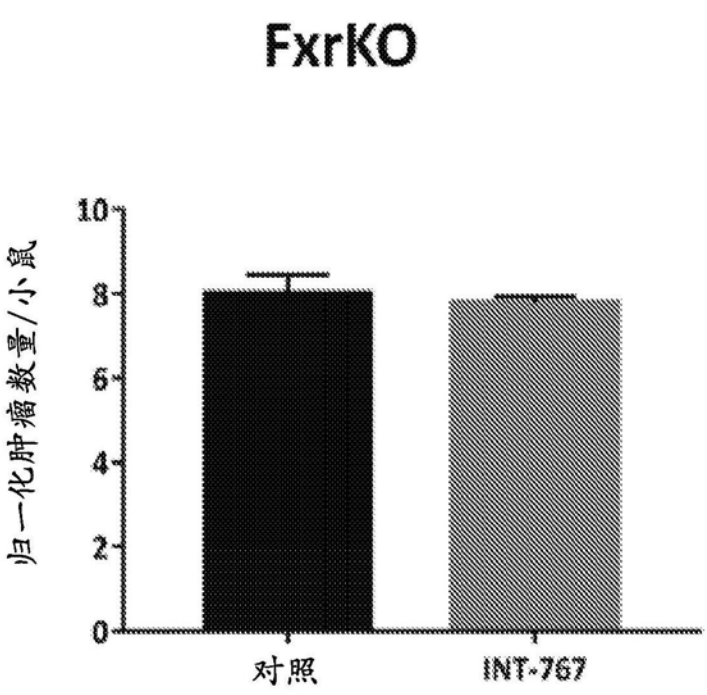

FxrKO
归一化肿瘤数量/小鼠
10
8
6
4
2
0
对照
INT-767

图3A

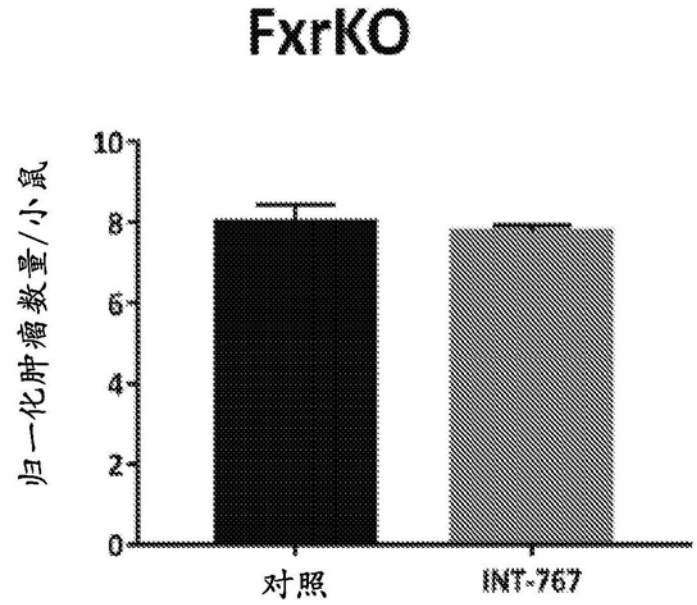

FxrKO
归一化肿瘤数量/小鼠
10
8
6
4
2
0
对照
INT-767

图3B

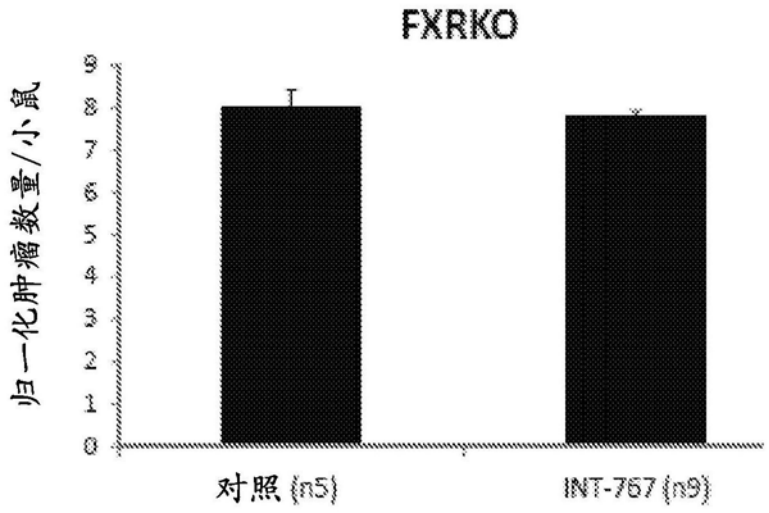

FXRKO
归一化肿瘤数量/小鼠
对照 (n5)
INT-767 (n9)

图4

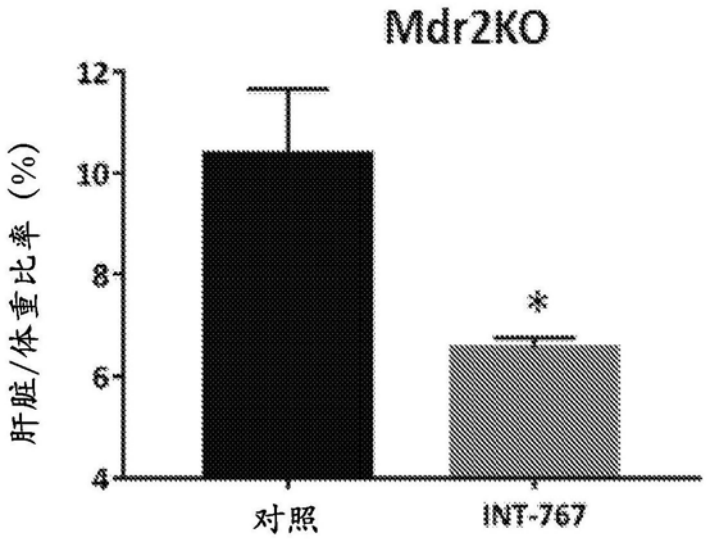

Mdr2KO
肝脏/体重比率 (%)
12
10
8
6
4
*
对照
INT-767

图5A

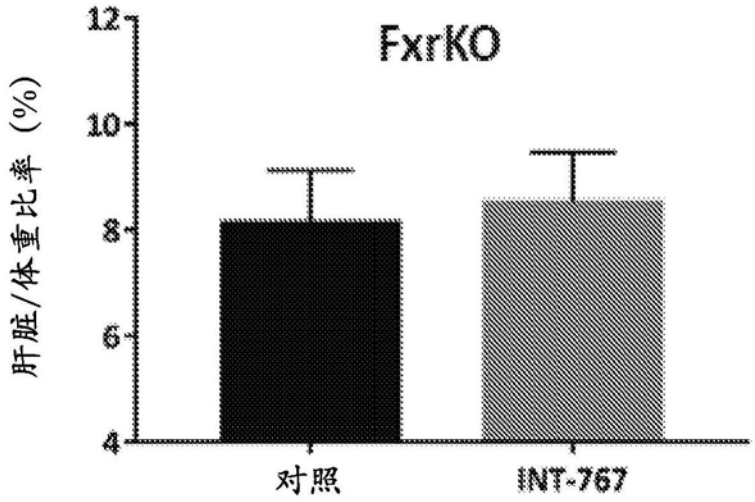

FxrKO
肝脏/体重比率（%）
12
10
8
6
4
对照
INT-767

图5B

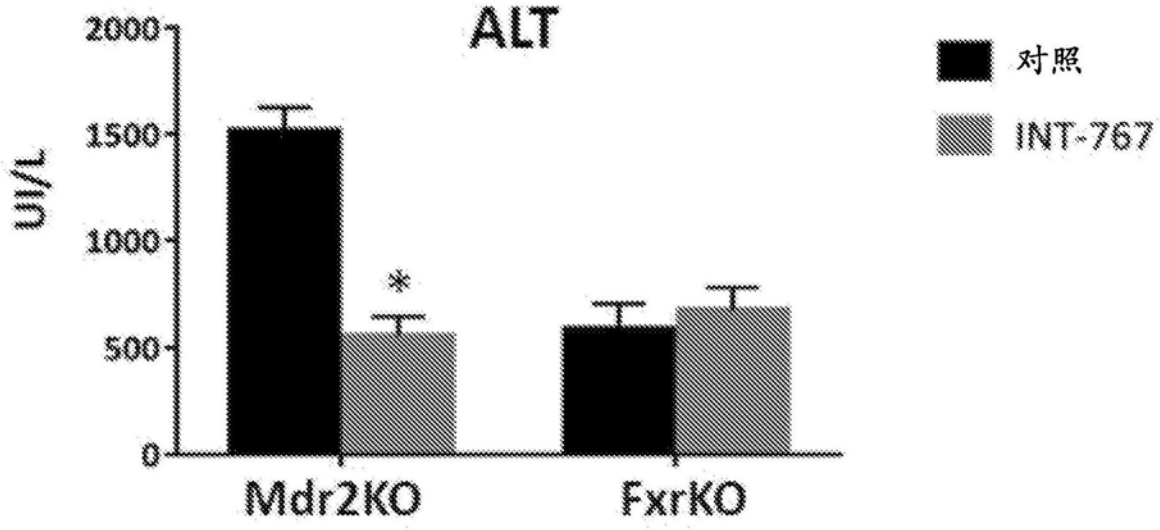

ALT
U/L
2000
1500
1000
500
0
*
Mdr2KO
FxrKO
对照
INT-767

图6A

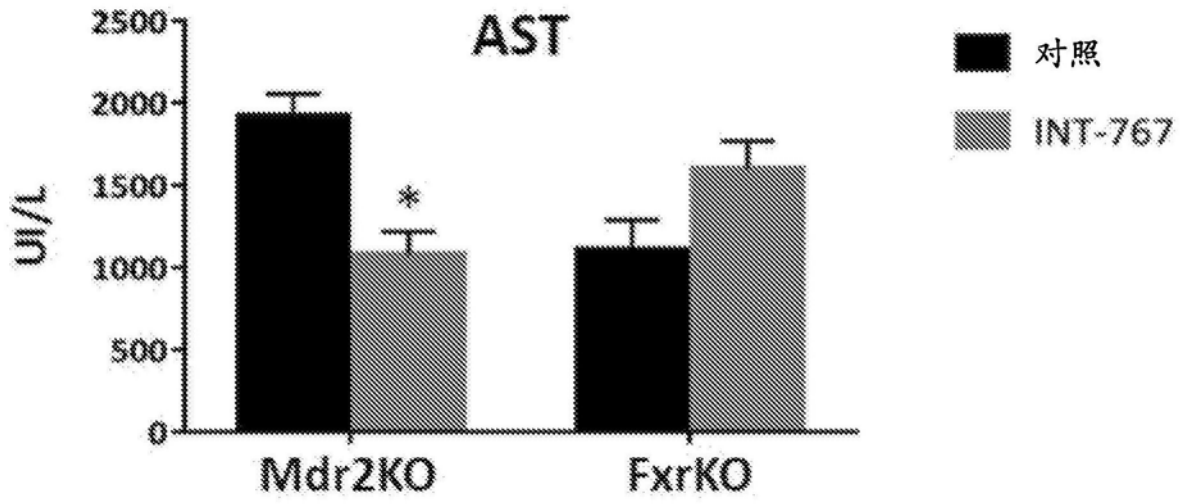

AST
2500
2000
1500
1000
500
0
UI/L
*
Mdr2KO
FxrKO
对照
INT-767

图6B

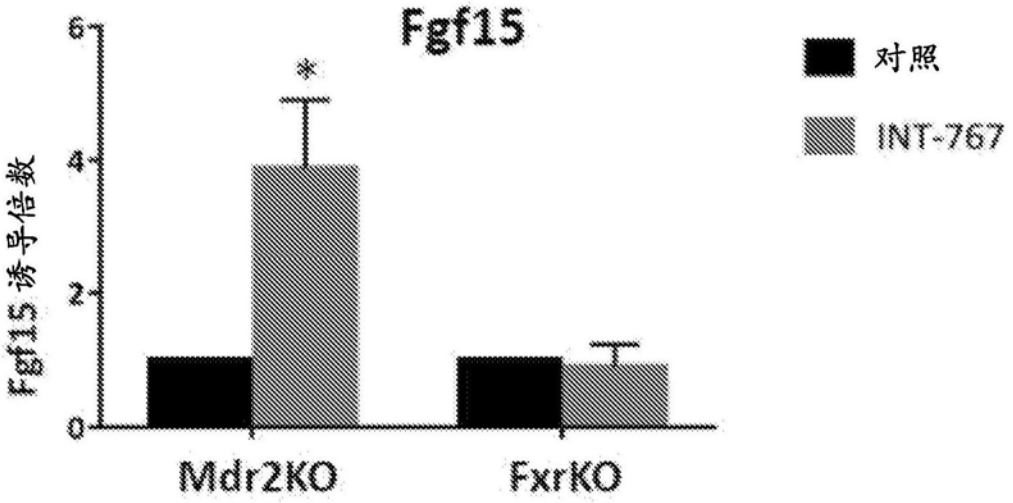

Fgf15
6
4
2
0
Fgf15 诱导倍数
*
Mdr2KO
FxrKO
对照
INT-767

图7A

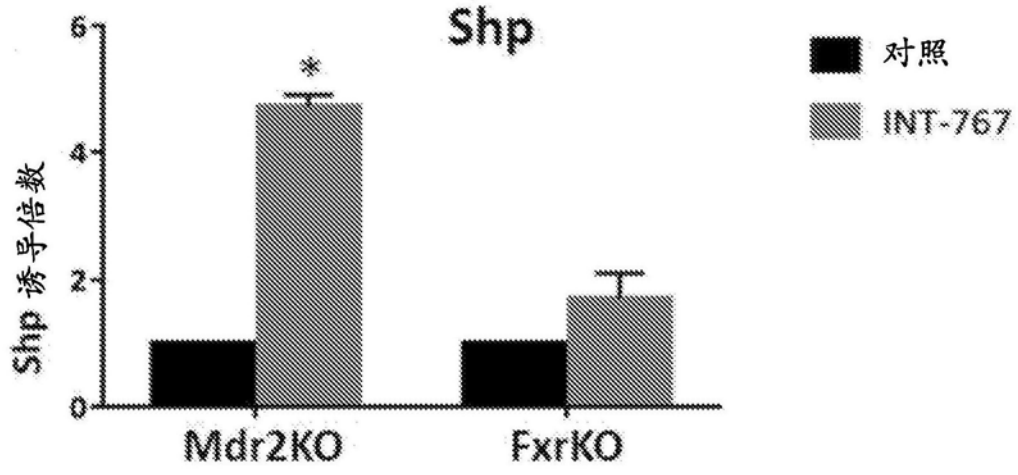

Shp
Shp 诱导倍数
6
4
2
0
*
Mdr2KO
FxrKO
对照
INT-767

图7B

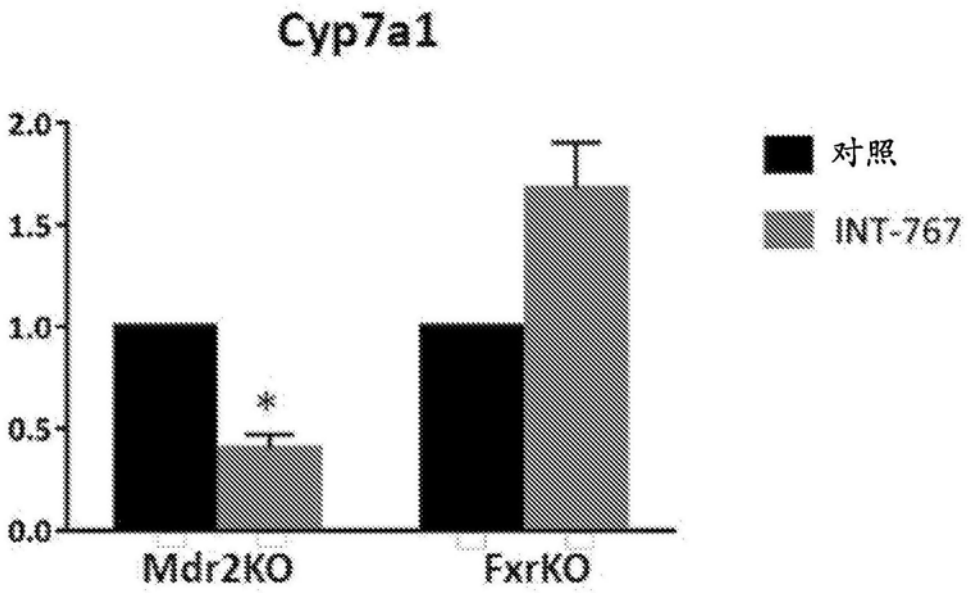

Cyp7a1
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
*
Mdr2KO
FxrKO
对照
INT-767

图8

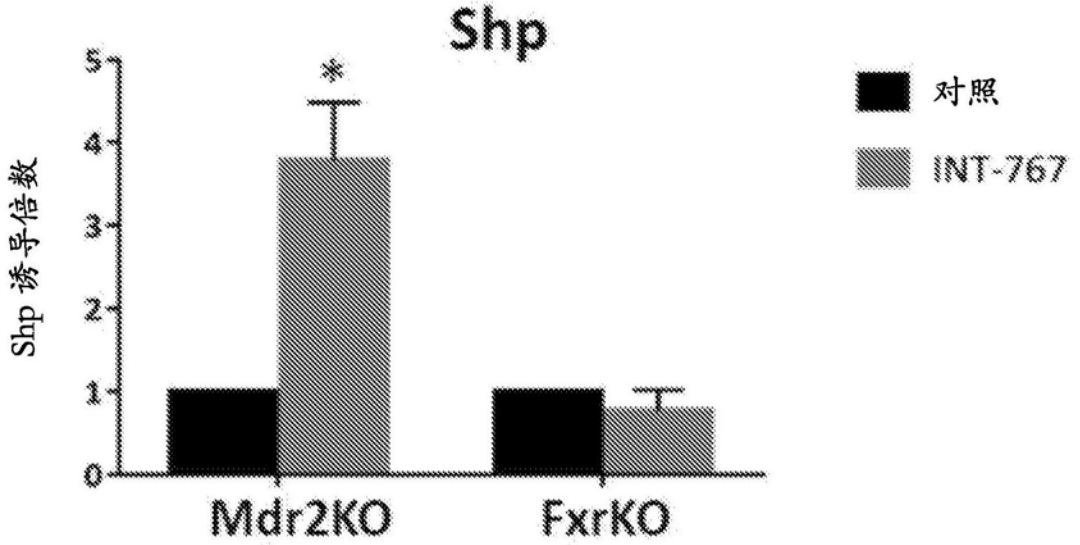

Shp
Shp 诱导倍数
0
1
2
3
4
5
*
Mdr2KO
FxrKO
对照
INT-767

图9A

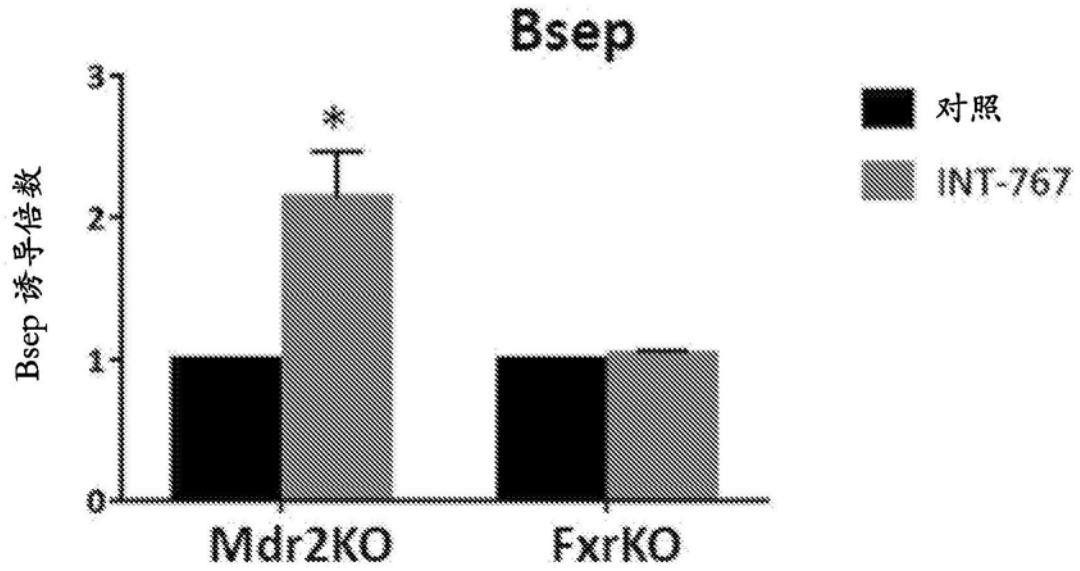

Bsep
Bsep 诱导倍数
0
1
2
3
*
Mdr2KO
FxrKO
对照
INT-767

图9B

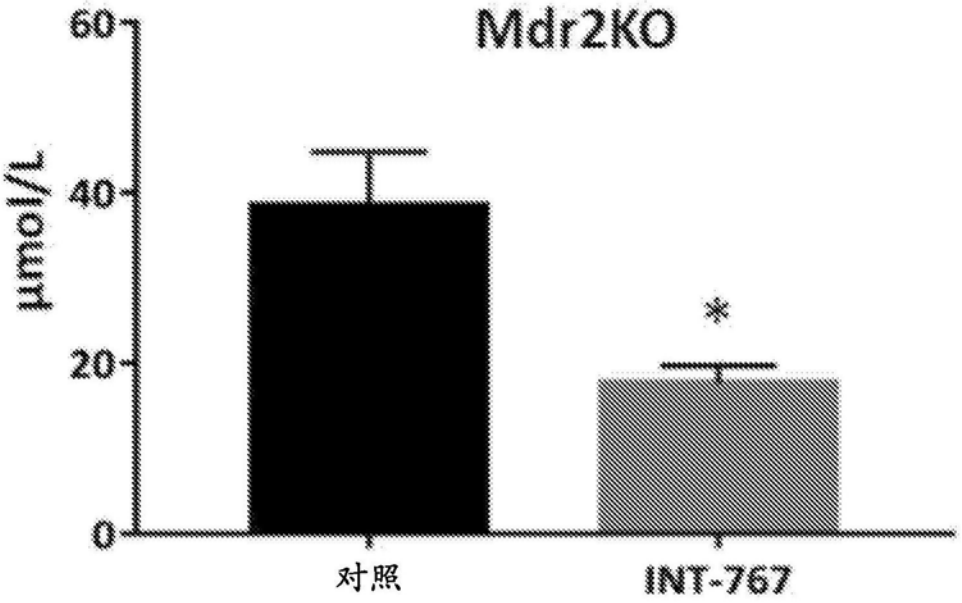

Mdr2KO
60
40
20
0
μmol/L
*
对照
INT-767

图10A

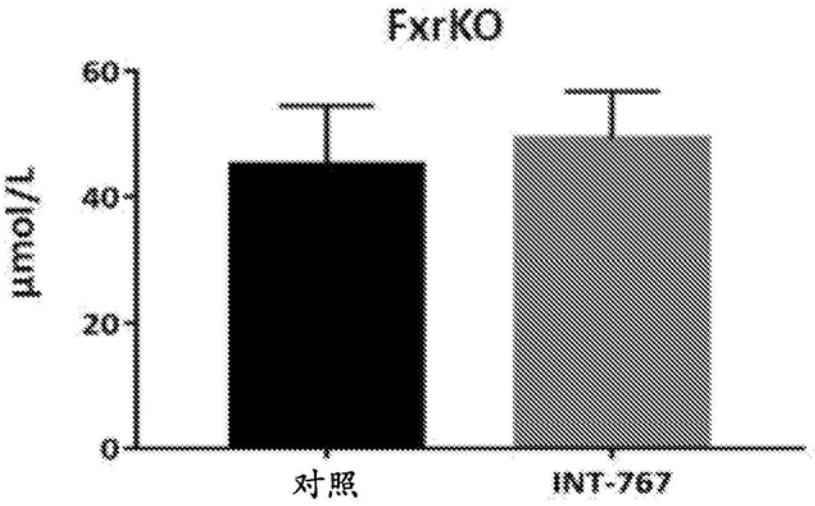

FxrKO
60
40
20
0
μmol/L
对照
INT-767

图10B

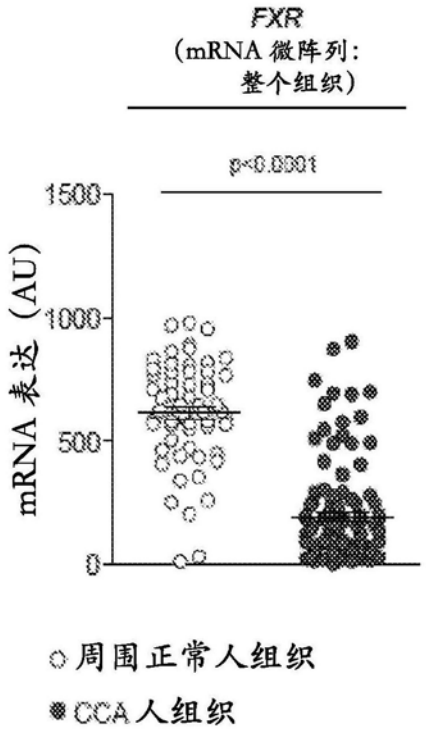

FXR
(mRNA 微阵列:
整个组织)
p<0.0001
1500
1000
500
0
mRNA 表达 (AU)
○ 周围正常人组织
● CCA 人组织

图11A

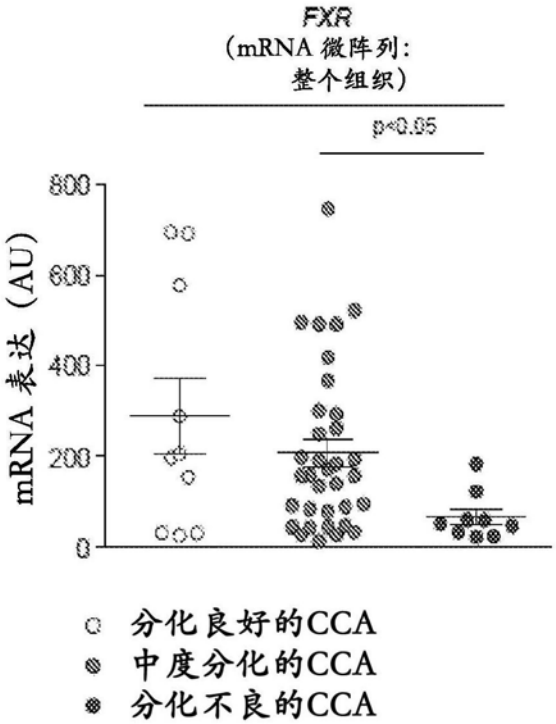

FXR
(mRNA 微阵列:
整个组织)
p<0.05
800
600
400
200
0
mRNA 表达 (AU)
○ 分化良好的CCA
● 中度分化的CCA
● 分化不良的CCA

图11B

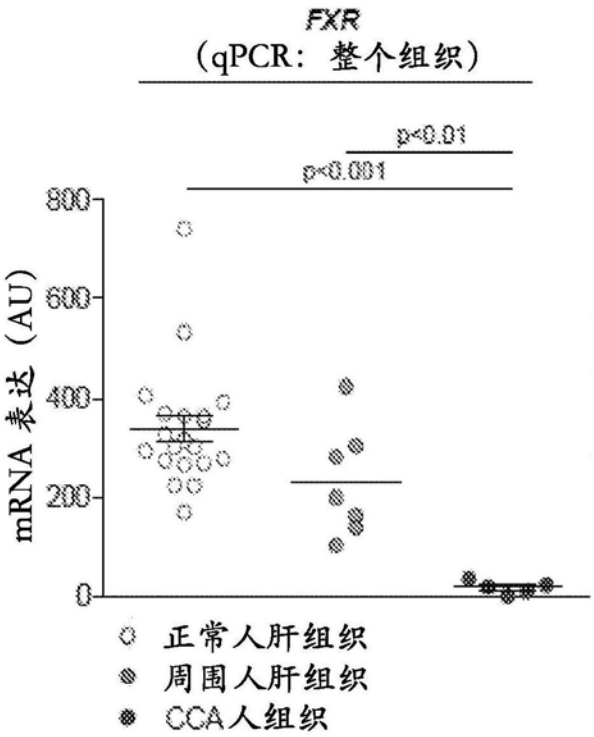

FXR
(qPCR: 整个组织)
p<0.01
p<0.001
mRNA 表达 (AU)
800
600
400
200
0
正常人肝组织
周围人肝组织
CCA人组织

图11C

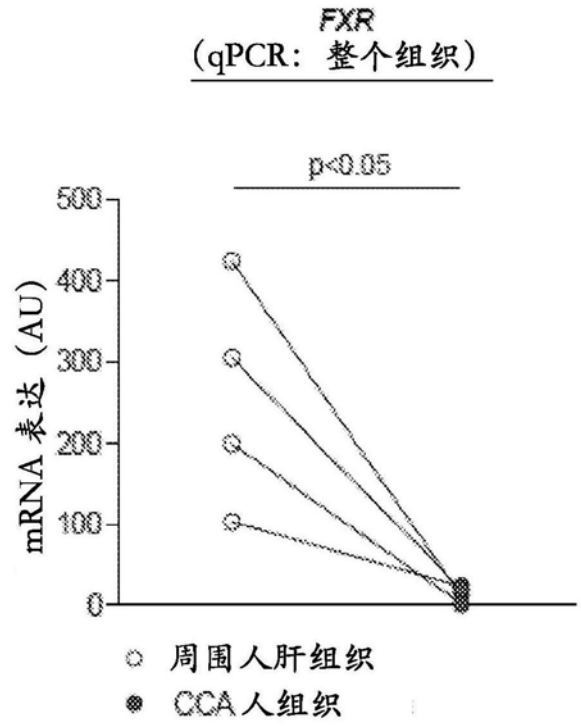

FXR
(qPCR: 整个组织)
p<0.05
mRNA 表达 (AU)
500
400
300
200
100
0
周围人肝组织
CCA人组织

图11D

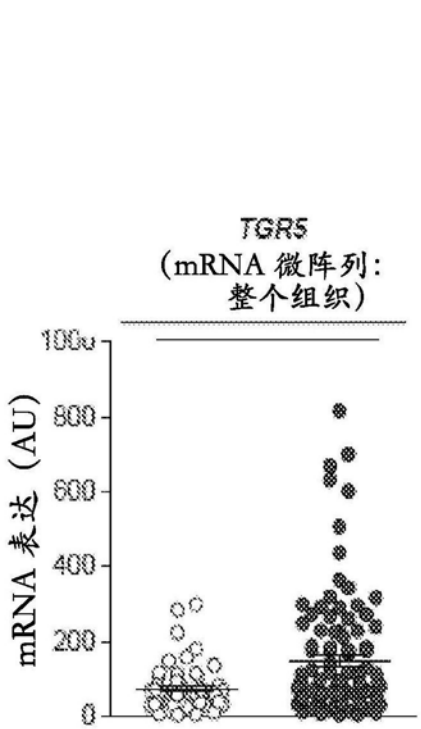

TGR5
(mRNA 微阵列:
整个组织)
mRNA 表达 (AU)
1000
800
600
400
200
0

图 12A

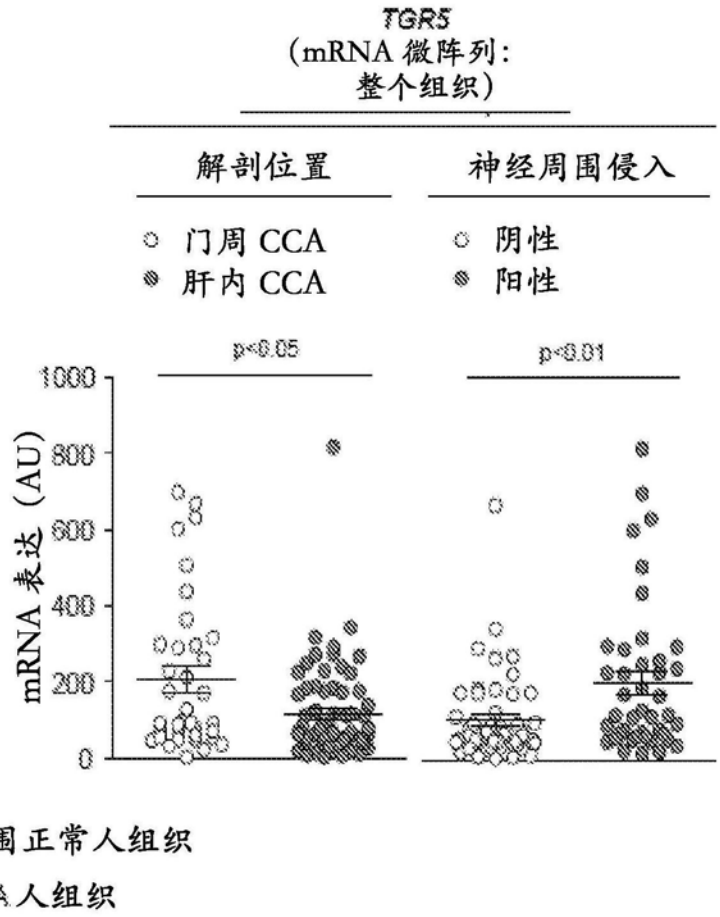

TGR5
(mRNA 微阵列:
整个组织)
解剖位置
门周 CCA
肝内 CCA
神经周围侵入
阴性
阳性
p<0.05
p<0.01
mRNA 表达 (AU)
1000
800
600
400
200
0
周围正常人组织
CCA 人组织

图 12B

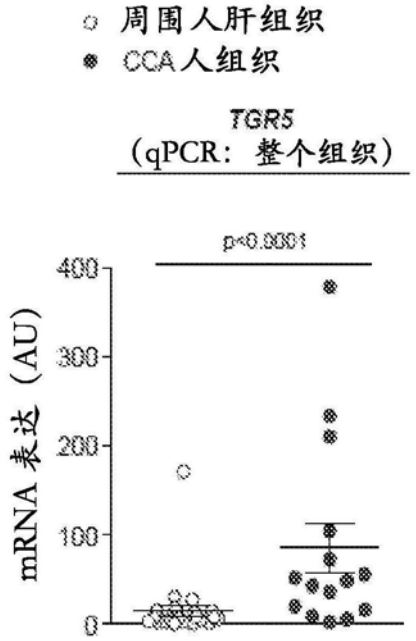

周围人肝组织
CCA人组织
TGR5
(qPCR: 整个组织)
p<0.0001
mRNA 表达 (AU)
400
300
200
100
0

图12C

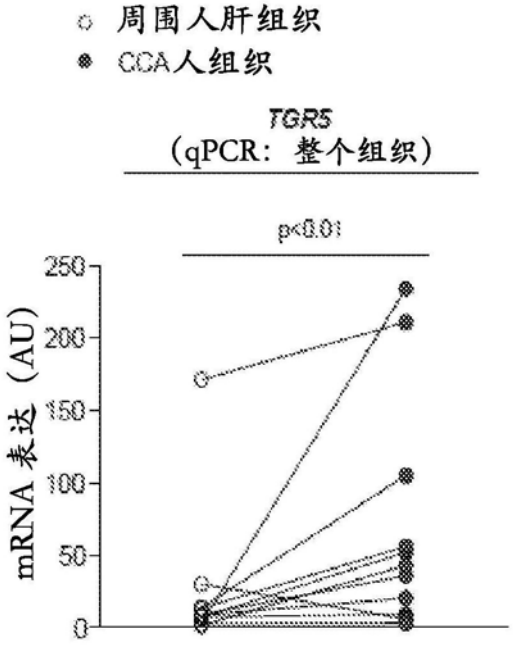

周围人肝组织
CCA人组织
TGR5
(qPCR: 整个组织)
p<0.01
mRNA 表达 (AU)
250
200
150
100
50
0

图12D

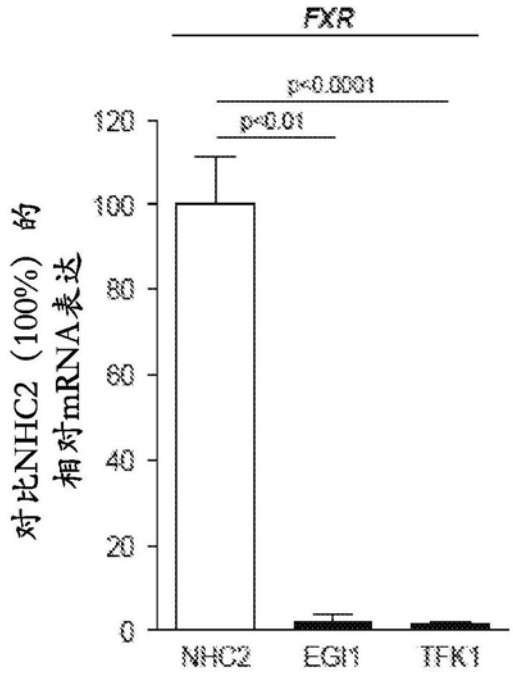

FXR
p<0.0001
p<0.01
对比NHC2（100%）的
相对mRNA表达
120
100
80
60
40
20
0
NHC2
EGI1
TFK1

图13A

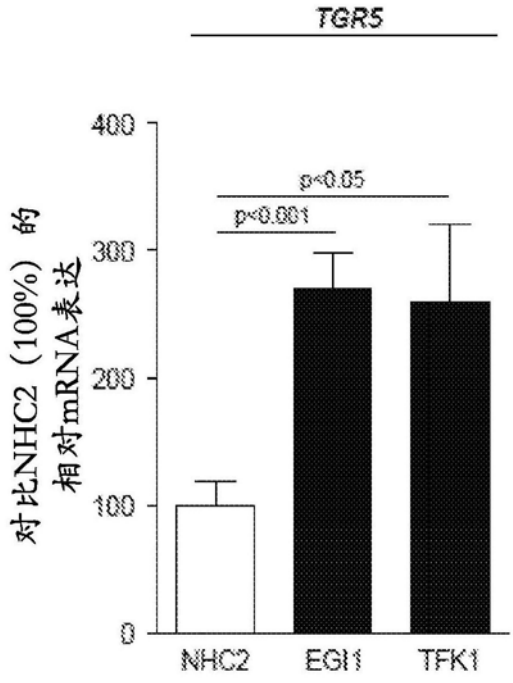

TGR5
p<0.05
p<0.001
对比NHC2（100%）的
相对mRNA表达
400
300
200
100
0
NHC2
EGI1
TFK1

图13B

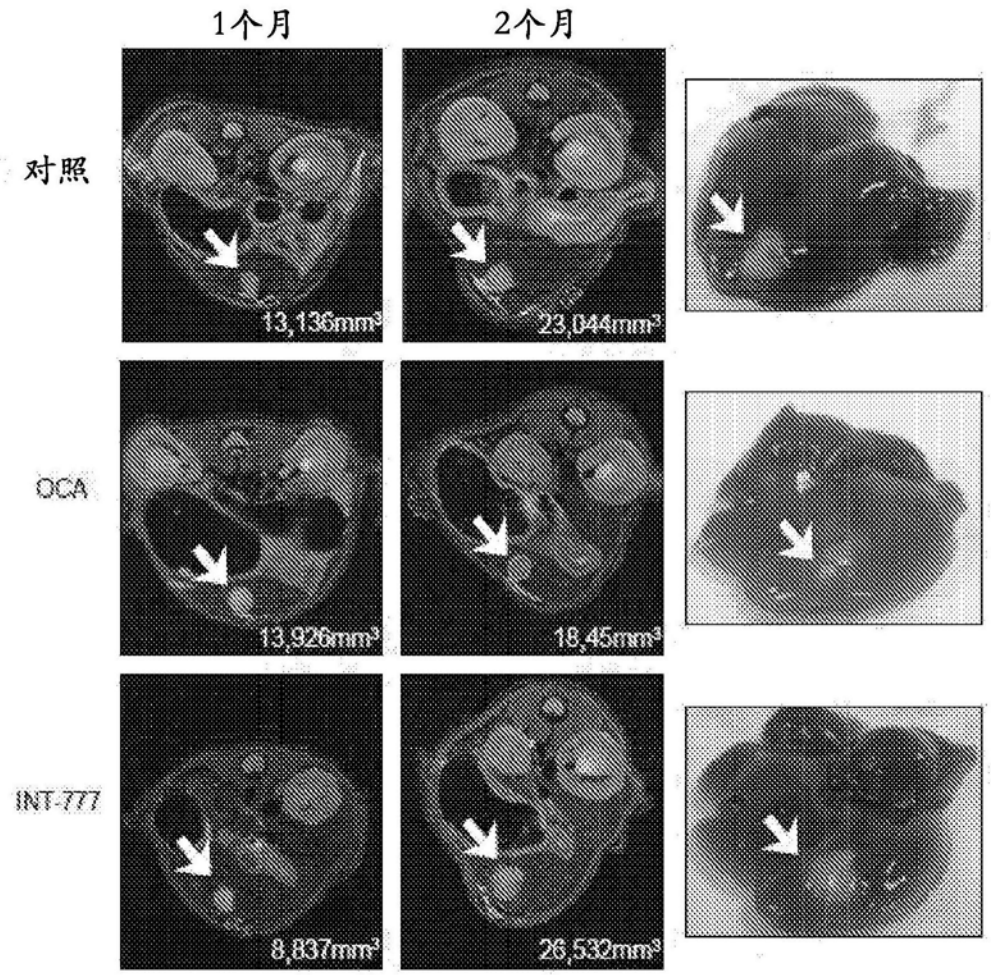

1个月
2个月
对照
OCA
INT-777
13,136mm³
23,044mm³
13,926mm³
18,45mm³
8,837mm³
26,532mm³

图14A

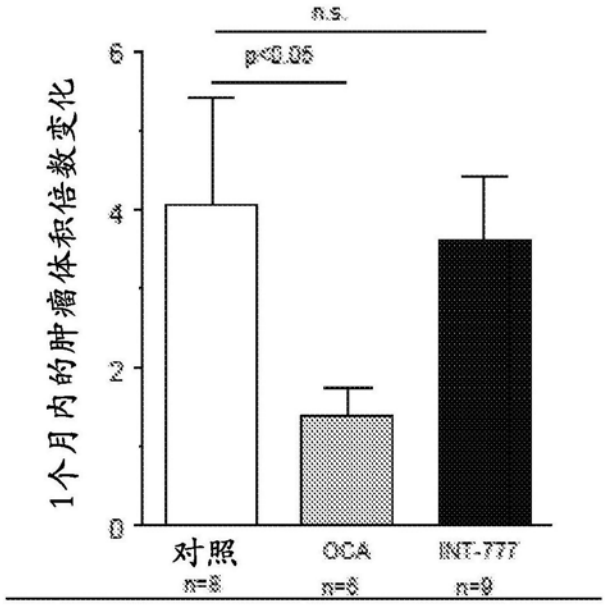

n.s.
p<0.05
1个月内的肿瘤体积倍数变化
0
2
4
6
对照
n=8
OCA
n=8
INT-777
n=9

图14B

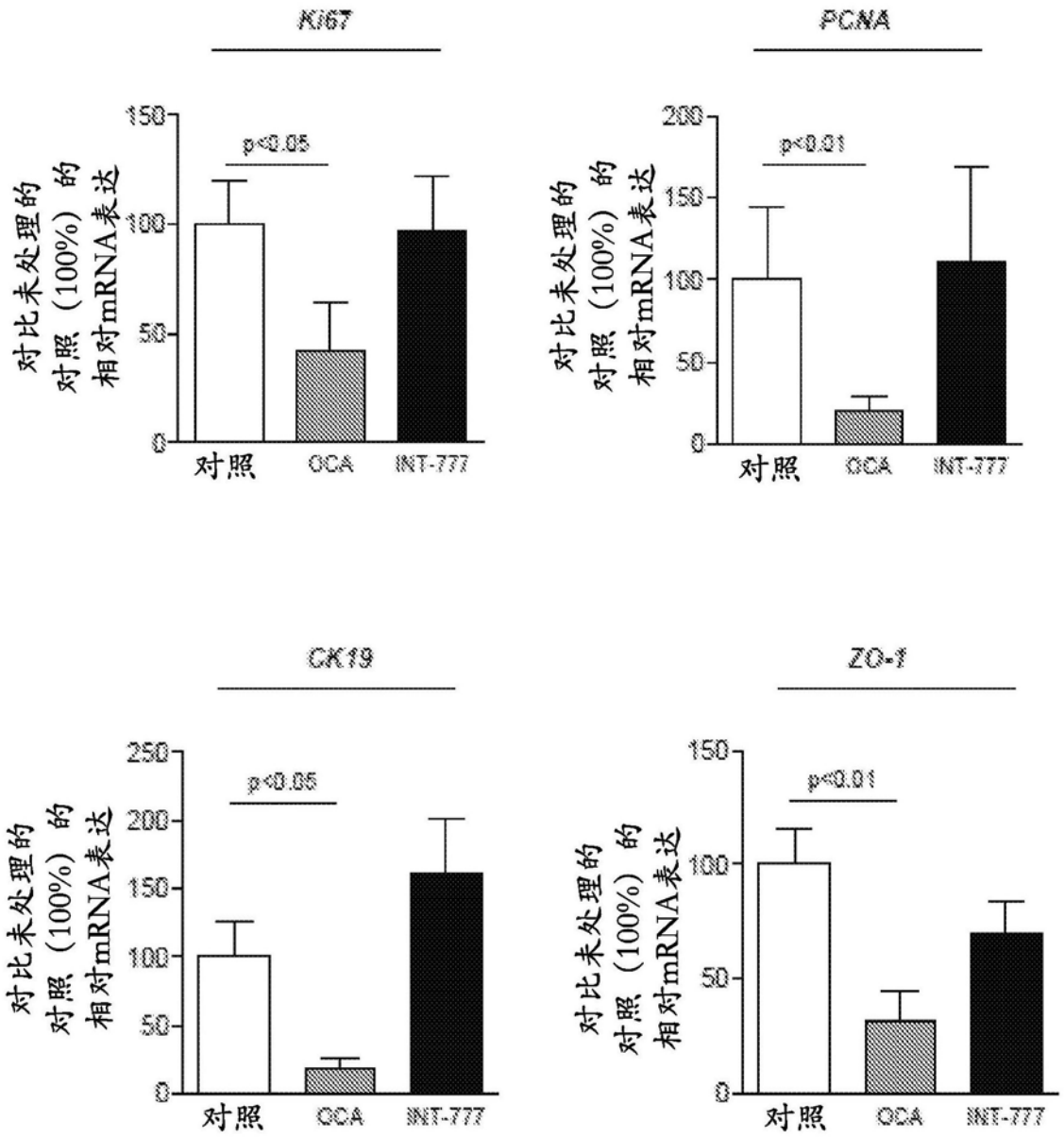

Ki67
p<0.05
对比未处理的
对照（100%）的
相对mRNA表达
0
50
100
150
对照
OCA
INT-777
PCNA
p<0.01
0
50
100
150
200
对照
OCA
INT-777
CK19
p<0.05
0
50
100
150
200
250
对照
OCA
INT-777
ZO-1
p<0.01
0
50
100
150
对照
OCA
INT-777

图14C

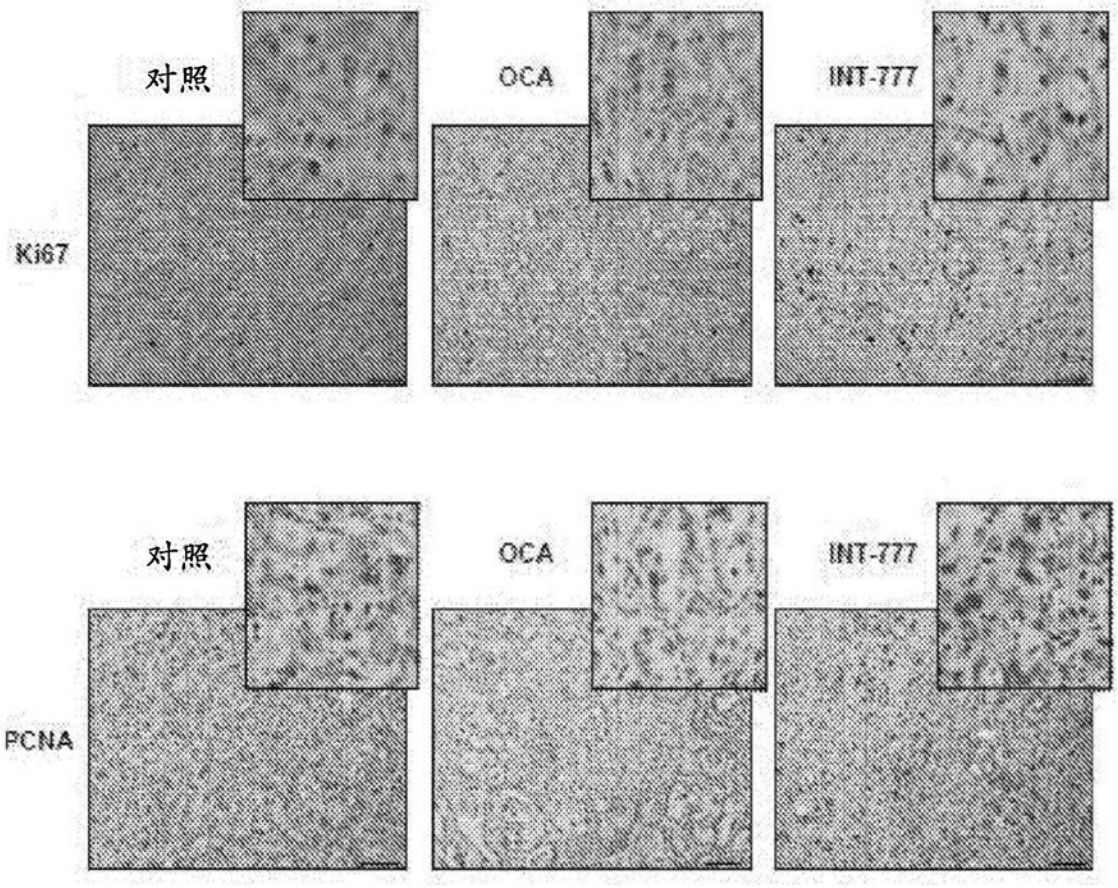
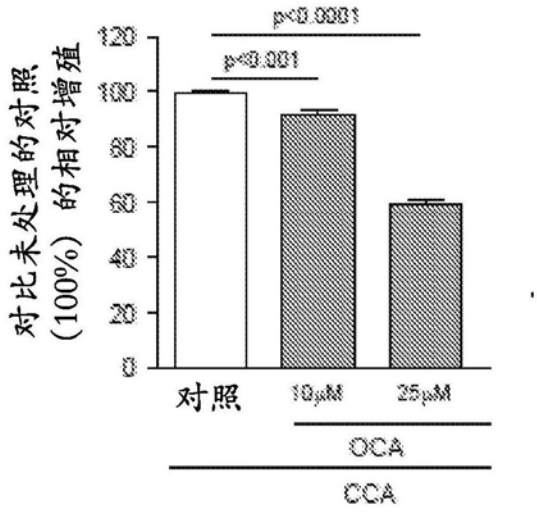


图14D


对比未处理的对照
(100%) 的相对增殖
p<0.0001
p<0.001
120
100
80
60
40
20
0
对照
10μM
25μM
OCA
CCA

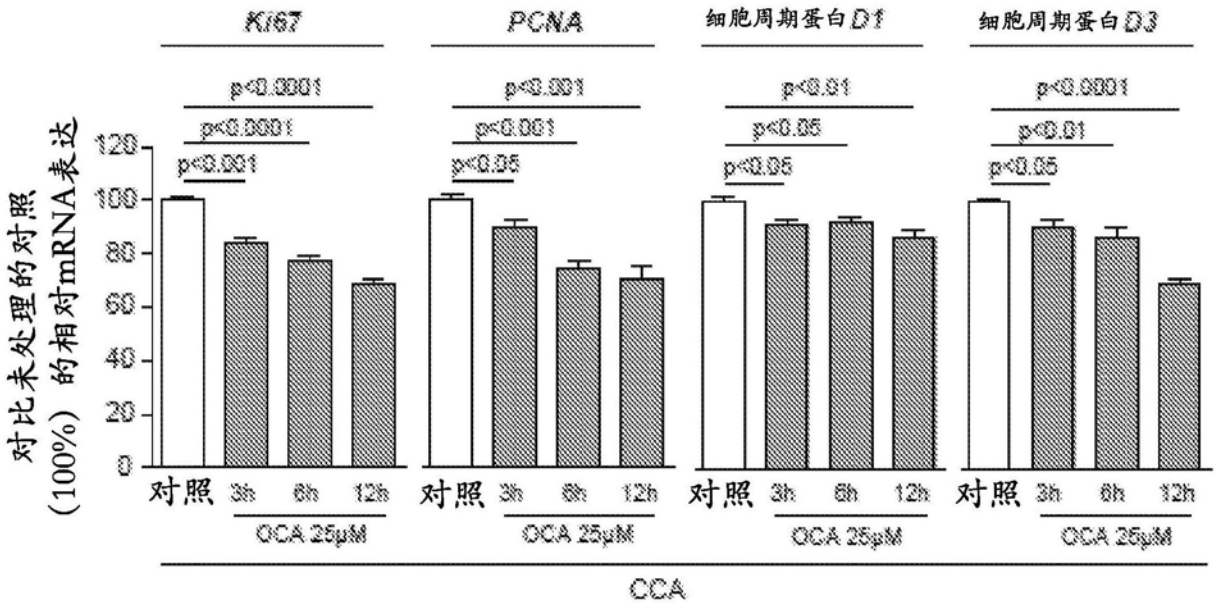
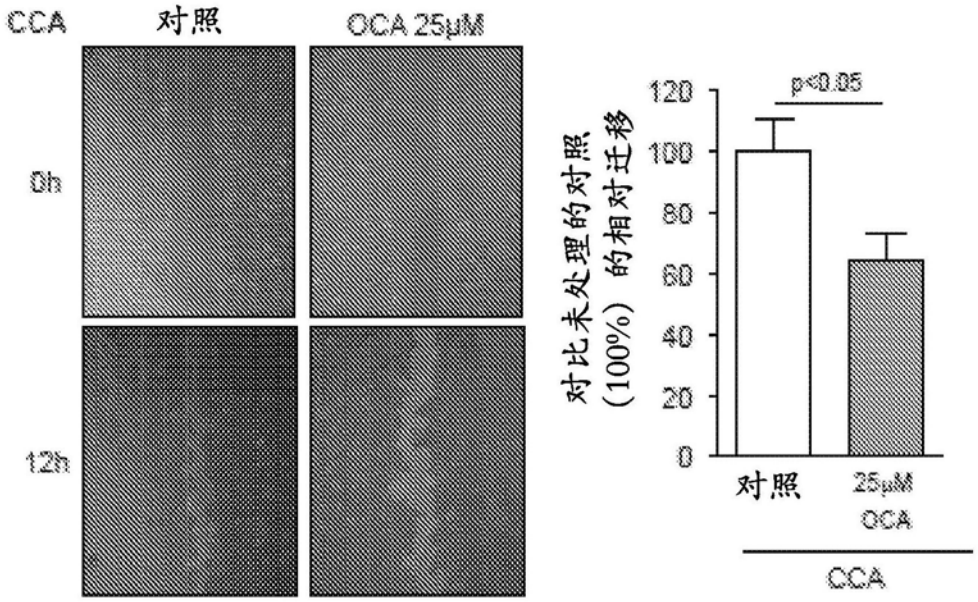

KI67
PCNA
细胞周期蛋白D1
细胞周期蛋白D3
对比未处理的对照
(100%) 的相对mRNA表达
p<0.0001
p<0.001
p<0.01
p<0.05
120
100
80
60
40
20
0
对照
3h
6h
12h
OCA 25μM
CCA

图15A


CCA
对照
OCA 25μM
0h
12h
对比未处理的对照（100%）的相对迁移
p<0.05
120
100
80
60
40
20
0
对照
25μM OCA
CCA

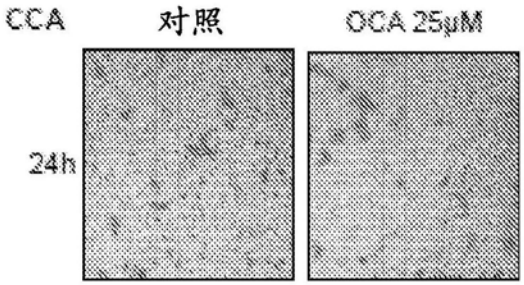

CCA
对照
OCA 25μM
24h

图15B

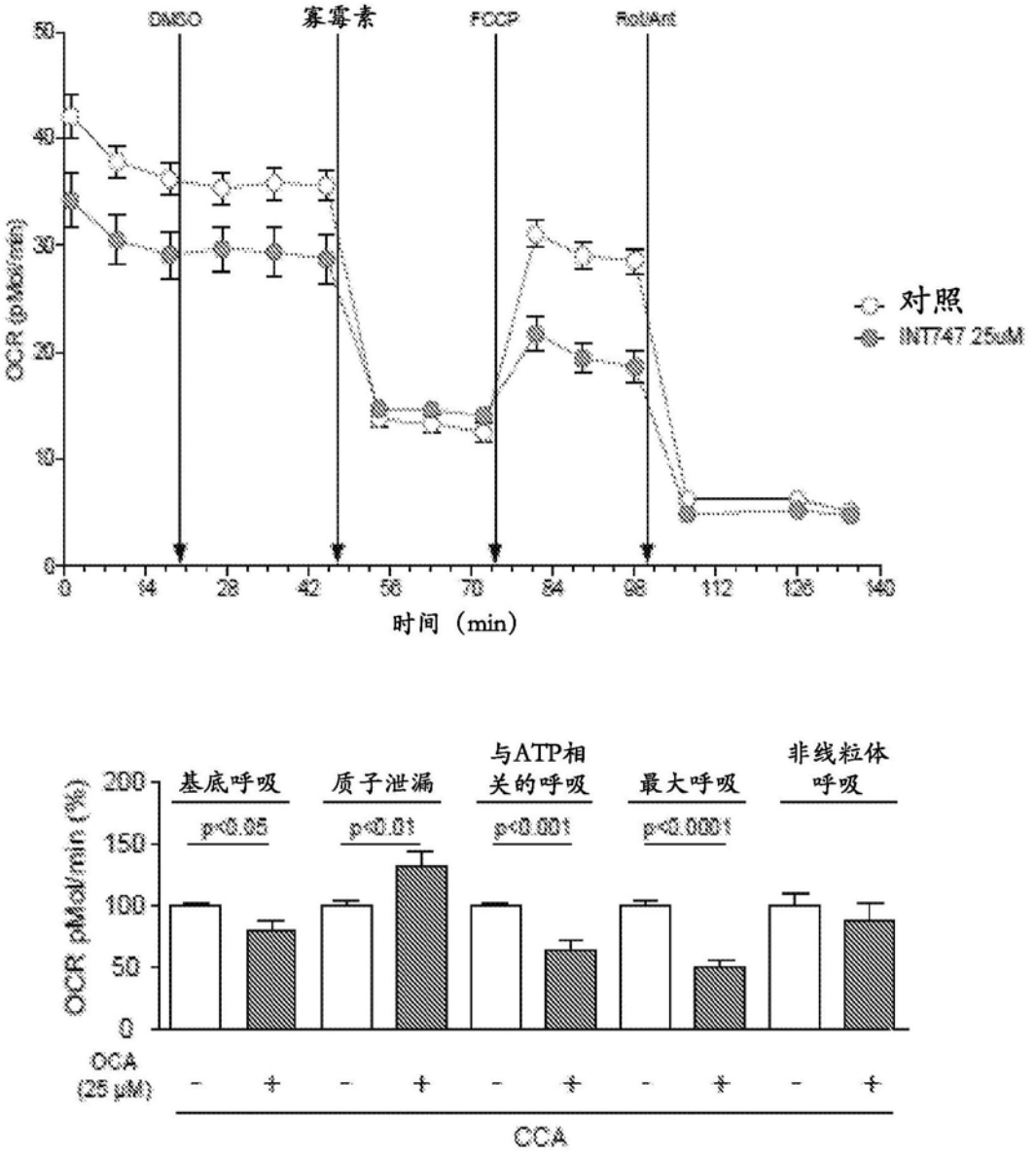

DMSO
寡霉素
FCCP
Rot/Ant
OCR (pMol/min)
时间 (min)
对照
INT747 25uM
基底呼吸
质子泄漏
与ATP相关的呼吸
最大呼吸
非线粒体呼吸
p<0.05
p<0.01
p<0.001
p<0.0001
OCR pMol/min (%)
OCA (25 μM)
CCA

图15C

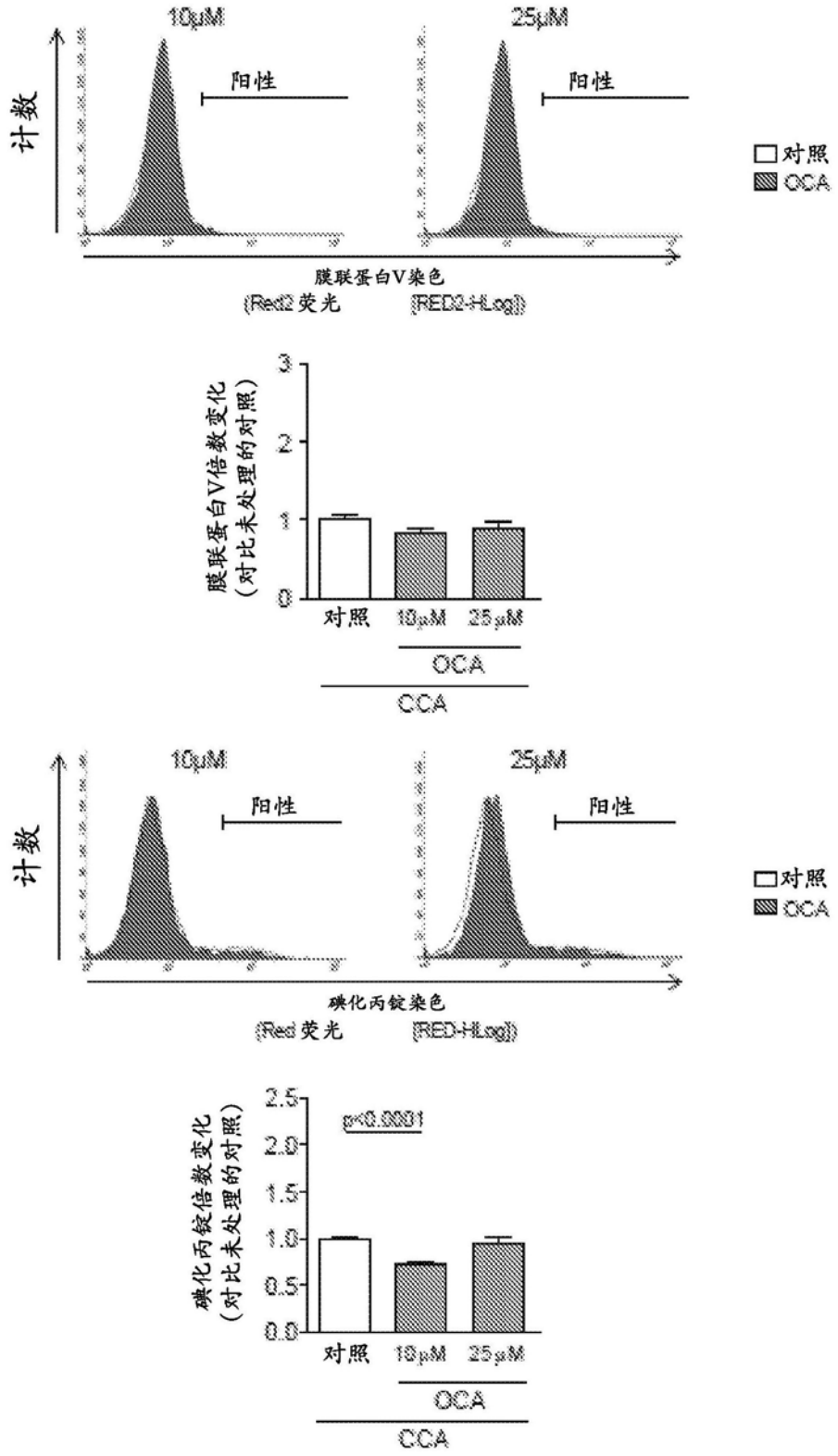
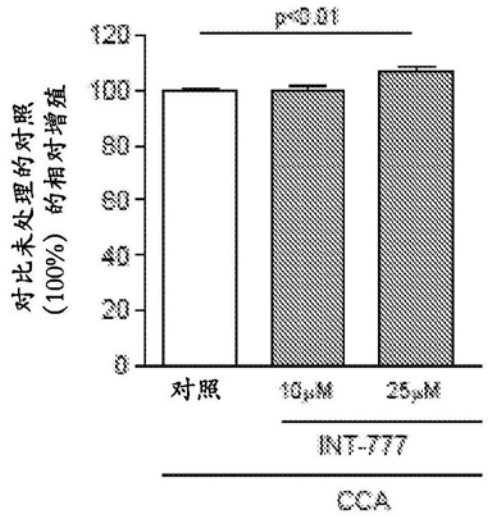

10μM
25μM
阳性
阳性
计数
对照
OCA
膜联蛋白V染色
(Red2 荧光 (RED2-HLog))
膜联蛋白V倍数变化
(对比未处理的对照)
3
2
1
0
对照
10μM
25μM
OCA
CCA
10μM
25μM
阳性
阳性
计数
对照
OCA
碘化丙锭染色
(Red 荧光 (RED-HLog))
碘化丙锭倍数变化
(对比未处理的对照)
p<0.0001
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
对照
10μM
25μM
OCA
CCA

图15D


p<0.01
对比未处理的对照（100%）的相对增殖
120
100
80
60
40
20
0
对照
10μM
25μM
INT-777
CCA

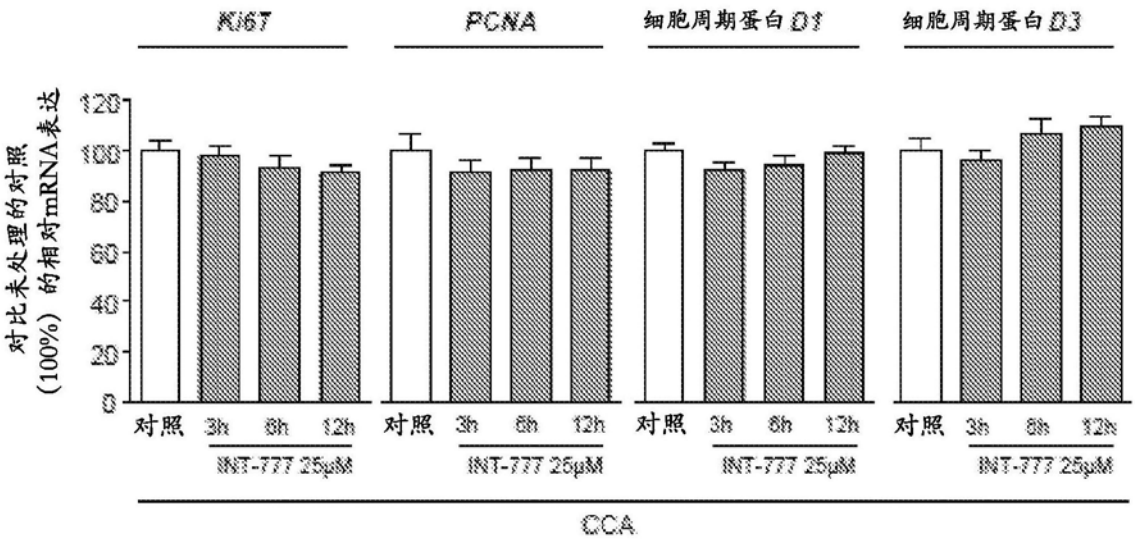

Ki67
PCNA
细胞周期蛋白D1
细胞周期蛋白D3
对比未处理的对照（100%）的相对mRNA表达
120
100
80
60
40
20
0
对照
3h
6h
12h
INT-777 25μM
CCA

图16A

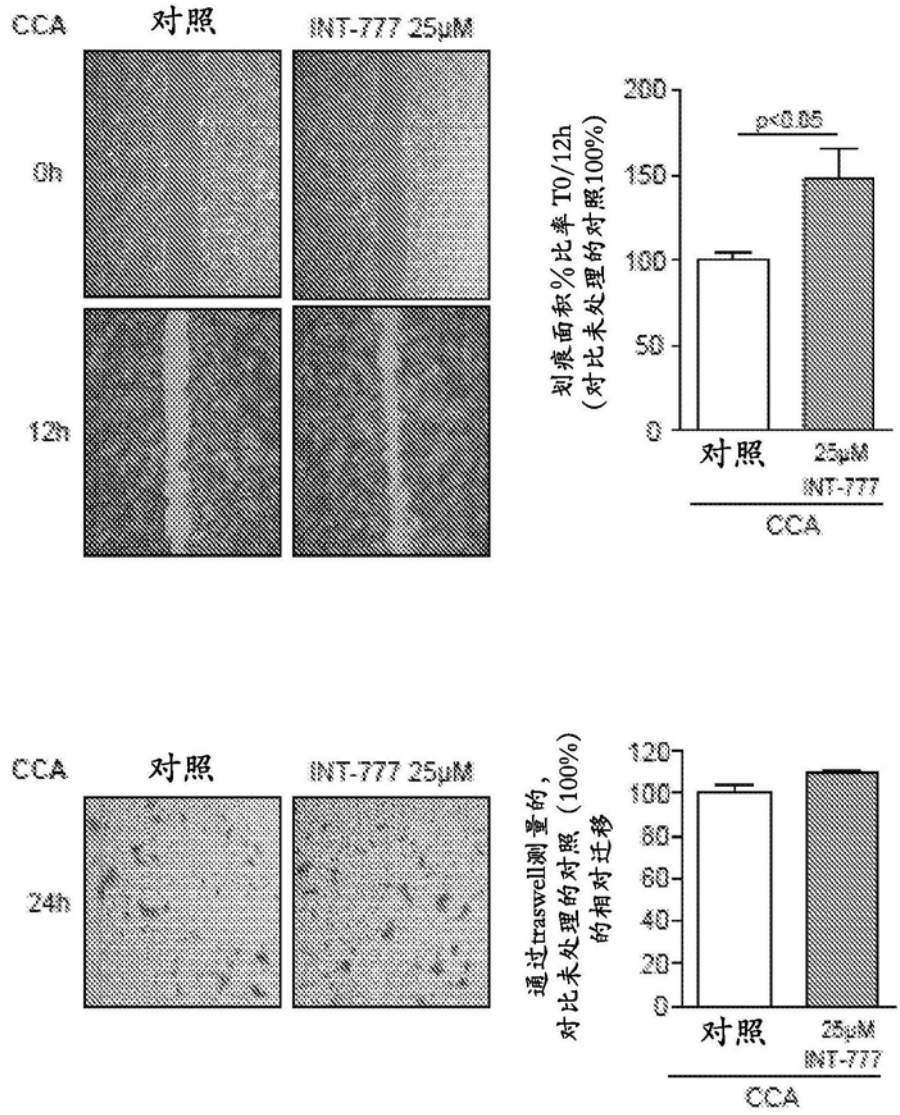

CCA
对照
INT-777 25μM
0h
12h
划痕面积%比率T0/12h
(对比未处理的对照100%)
200
150
100
50
0
p<0.05
对照
25μM
INT-777
CCA
CCA
对照
INT-777 25μM
24h
通过traswell测量的,
对比未处理的对照(100%)
的相对迁移
120
100
80
60
40
20
0
对照
25μM
INT-777
CCA

图16B

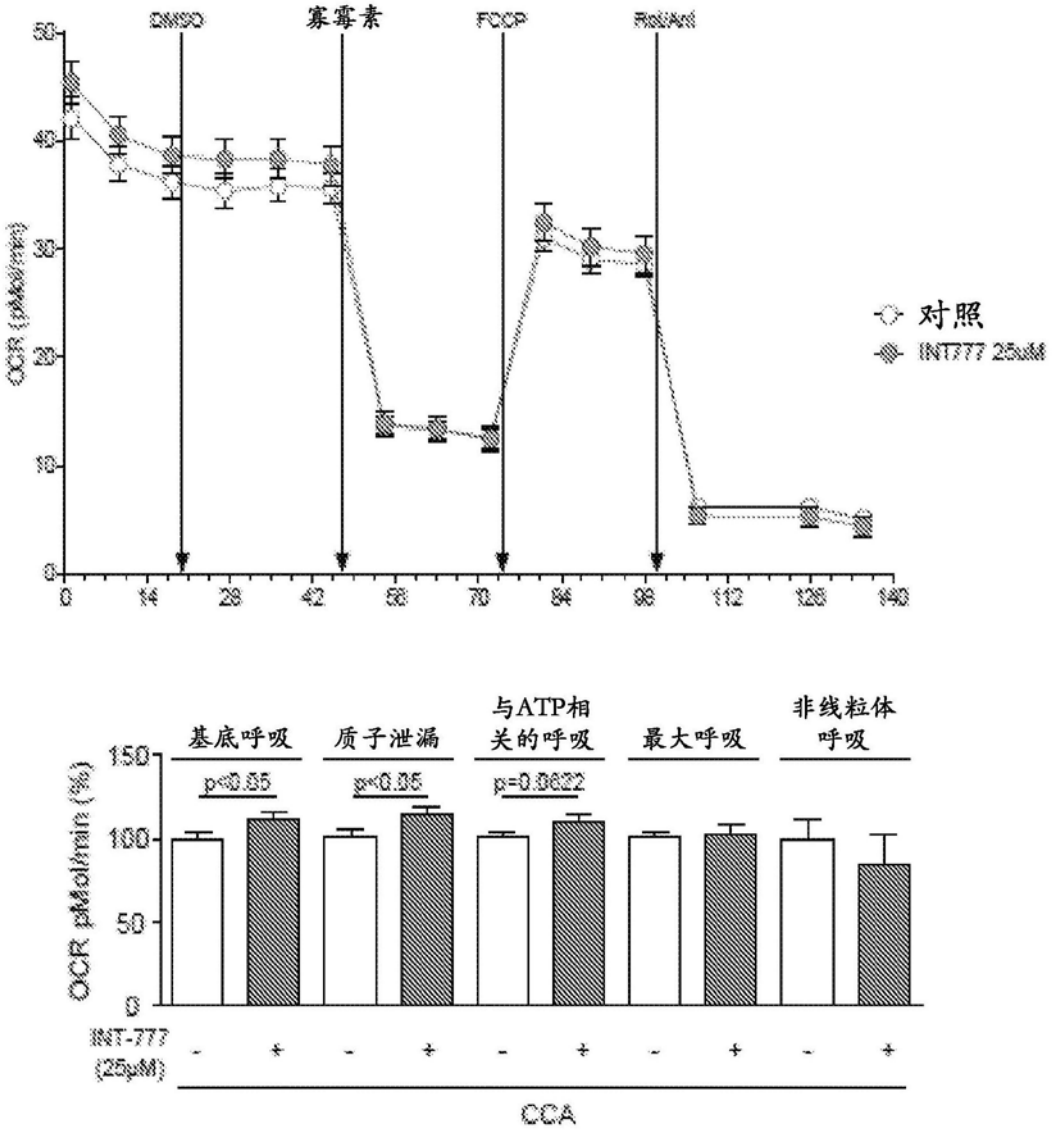

DMSO
寡霉素
FCCP
Rot/AA
OCR (pMol/min)
对照
INT777 25uM
基底呼吸
质子泄漏
与ATP相关的呼吸
最大呼吸
非线粒体呼吸
p<0.05
p<0.05
p=0.0622
OCR pMol/min (%)
INT-777 (25μM)
CCA

图16C

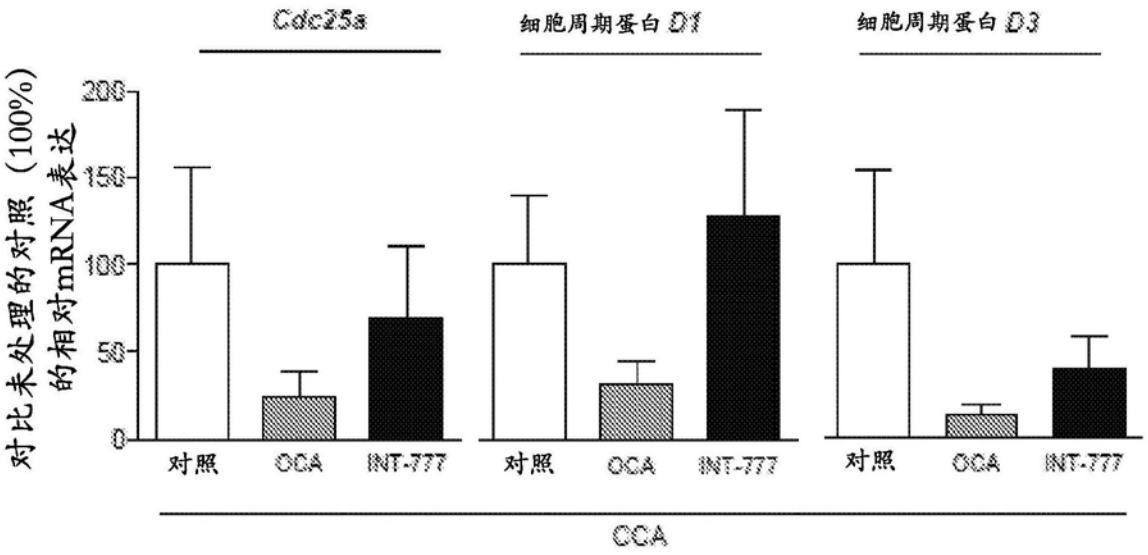

Cdc25a
细胞周期蛋白 D1
细胞周期蛋白 D3
对比未处理的对照（100%）的相对mRNA表达
200
150
100
50
0
对照
OCA
INT-777
对照
OCA
INT-777
对照
OCA
INT-777
OCA

图17