



(12) **Oversettelse av
europeisk patentskrift**

(11) **NO/EP 2376519 B1**

NORGE

(19) NO
(51) Int Cl.
C07J 9/00 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01)
C07J 31/00 (2006.01)
C07J 41/00 (2006.01)

Patentstyret

(21)	Oversettelse publisert	2014.03.31
(80)	Dato for Den Europeiske Patentmyndighets publisering av det meddelte patentet	2013.11.13
(86)	Europeisk søknadsnr	09760057.1
(86)	Europeisk innleveringsdag	2009.11.19
(87)	Den europeiske søknadens Publiseringsdato	2011.10.19
(30)	Prioritet	2008.11.19, EP, 08169462
(84)	Utpekte stater	AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO PL PT RO SE SI SK SM TR
	Utpekte samarbeidende stater	AL BA RS
(73)	Innehaver	Intercept Pharmaceuticals, Inc., 18 Desbrosses Street, New York, NY 10013, USA
(72)	Oppfinner	PELLICCIARI, Roberto, Via Ulisse Rocchi 60, I-06123 Perugia, IT-Italia
(74)	Fullmektig	Protector Intellectual Property Consultants AS, Oscarsgate 20, 0352 OSLO, Norge

(54) **Benevnelse** **TGR5 - Modulatorer og fremgangsmåte for anvendelse av disse**

(56) **Anførte publikasjoner**

EP-A- 0 186 023
US-A- 4 892 868
WO-A-2008/091540
ALDINI, R. ET AL.: STEROIDS, vol. 61, 1996, pages 590-597, XP002569578
PELLICCIARI, R. ET AL.: "Discovery of 16alpha-Ethyl-23(S)-methylcholic Acid (S-EMCA, INT-777) as a Potent and Selective Agonist for the TGR5 Receptor, a Novel Target for Diabetes", JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 52, 2009, pages 7958-7961,
PELLICCIARI, R. ET AL.: JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 47, 2004, pages 4559-4569, XP002569577
PELLICCIARI, R. ET AL.: JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, vol. 50, 2007, pages 4265-4268, XP002569576
SATO HIROYUKI ET AL: "Novel potent and selective bile acid derivatives as TGR5 agonists: biological screening, structure-activity relationships, and molecular modeling studies" JOURNAL OF MEDICINAL CHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, WASHINGTON, US, vol. 51, no. 6, 27 March 2008 (2008-03-27), pages 1831-1841, XP002520339 ISSN: 0022-2623 [retrieved on 2008-02-29]

TGR5 - MODULATORER OG FREMGANGSMÅTER FOR ANVENDELSE AV DISSE

Relatert søknad

[1] Foreliggende søknad krever prioritet for europeisk patentsøknad nr.
5 08169462,2, inngitt 19. november 2008.

Område for oppfinnelsen

[2] Foreliggende oppfinnelse vedrører forbindelser som modulerer TGR5 og sammensetninger som er nyttige i fremgangsmåter for behandling og / eller forebygging av forskjellige sykdommer.

10 Oppfinnelsens bakgrunn

[3] TGR5 - reseptoren er en G-protein - koblet reseptor som er blitt identifisert som en celle-overflate - reseptor som er mottakelig for gallesyrer (BA'er). Den primære strukturen til TGR5 og dens responsivitet til gallesyrene er blitt funnet å være sterkt konservert i TGR5 blant mennesker, krøtter, kanin, rotte og mus, og
15 antyder derved at TGR5 har viktige fysiologiske funksjoner. TGR5 har blitt funnet å være utbredt i ikke bare lymfoid - vev, men også i annet vev. Høye nivåer av TGR5 mRNA er påvist i morkake, milt, og monocytter / makrofager. Gallesyrer har vist seg å fremkalle internalisering av den TGR5 - fusjonsproteinet fra cellemembranen til cytoplasma. Kawamata et al. 2003, J. Bio. Chem., 278, 9435. TGR5 har blitt funnet å
20 være identisk med hGPCR19 rapportert av Takeda et al 2002, FEBS Lett. 520, 97-101.

[4] TGR5 er forbundet med den intracellulære akkumulering av cAMP, som er allment uttrykt i forskjellige celletyper. Mens aktiveringen av denne membranreseptor i makrofager avtar pro-inflammatorisk cytokin - produksjon, (Kawamata, Y., et
25 al. J. Biol. Chem. 2003, 278, 9435-9440) stimulering av TGR5 av BAs i adipocytter og myocytes forbedrer energiforbruket (Watanabe, M. et al. Nature. 2006, 439, 484 - 489). Denne sistnevnte virkning medfører at cAMP-avhengig induksjon av type 2 jodtyronin deiodinase (D2), som ved, lokalt å konvertere T4 til T3, gir opphav til økt tyroid hormon-aktivitet. Forenlig med rollen som TGR5 i kontroll av energi - stoffskiftet, viser
30 kvinnelige TGR5 knock-out mus en betydelig fett opphopning med vektøkning når utfordret med et høyt fettinnhold, noe som indikerer at mangel på TGR5 reduserer energiforbruket og utløser fedme (Maruyama , T., et al. J. Endocrinol. 2006, 191, 197-

205). I tillegg, og i samsvar med involvering av TGR5 i energihomeostase, har gallesyre - aktivering av membranreseptoren også blitt rapportert å fremme produksjon av peptid 1 (GLP-1) i murine enteroendokrine celledinjer (Katsuma, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 329, 386 - 390). På basis av alle de ovenfor angitte

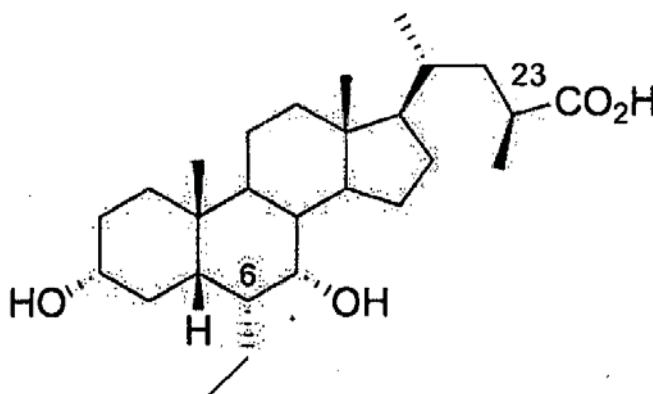
5 observasjoner er TGR5 et attraktivt mål for behandling av sykdommer, for eksempel fedme, diabetes og metabolsk syndrom.

[5] I tillegg til bruk av TGR5 agonister for behandling og forebygging av metabolske sykdommer, er forbindelser som modulerer TGR5 - modulatorer også nyttige for behandling av andre sykdommer, slik som for eksempel sentralnervesystem

10 sykdommer, så vel som inflammatoriske sykdommer (WO 01/77325 og WO 02 / 84286). Modulatorer av TGR5 gir også fremgangsmåter for regulering av gallesyre og kolesterol homeostase, fettsyre - absorpsjon, og protein - og karbohydrat - fordøyelsen.

[6] Relativt få eksempler av TGR5 agonister er blitt beskrevet i litteraturen. Nylig har det blitt rapportert om 23 - alkyl - substituerte og 6,23 - alkyl - disubstituerte

15 derivater av kenodeoksykolin syre (CDCA), slik som forbindelsen 6 α - etyl - 23 (S)-metyl - kenodeoksykolin syren vist nedenfor, som kraftige og selektive agonister av TGR5 (Pellicciari, R., et al. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 4265-4268).



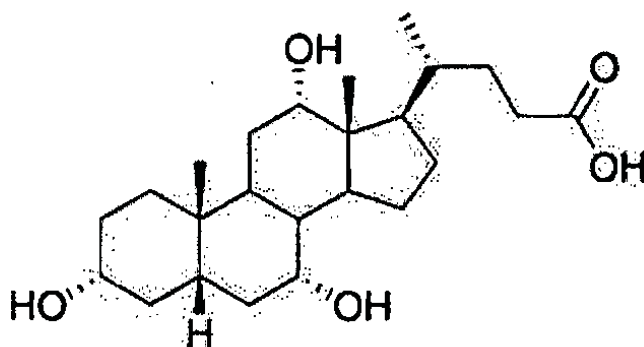
20 **[7]** Spesielt, metyleringen (S - konfigurasjon) i C₂₃-stillingen av naturlige gallesyrer (BA'er) tildeler en markert selektivitet til TGR5 over FXR (farnesoid X - reseptor) aktivering, mens 6 α - alkyl - substitusjon øker styrken på begge reseptorer. Noen eksempler på andre TGR5 agonister inkluderer 6 - metyl - 2 - okso - 4 - tioen - 2 - yl - 1 ,2, 3, 4 - tetrahydro - pyrimidin - 5 - karboksylsyre - benzyl -ester

25 (WO004067008, Takeda Chemical Industries LTD, Japan ,2004) og oleinsyre (Sato, H. et al. *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 2007, 362, 793-798, Ito, F. et al. WO2004067008, 2004). Mer nylig har den første syntesen av enantiomerisk

kenodeoksykolin syre (CDCA) og litokolin syre (LCA) gitt adgang til å studere spesifisiteten av samspillet mellom naturlige BA'er med TGR5 (Katona, BW et al. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 6048-6058).

[8] Nylig utviklede TGR5 agonister er også gitt for første gang en farmakologisk differensiering av genomisk versus ikke - genomiske effekter av BA'er, og har også tillatt for informative studier av struktur-aktivitet relasjoner, for eksempel har nærvær av en ekstra bindende lomme i TGR5 blitt funnet å spille en sentral rolle i å bestemme ligand selektivitet (Se, Pellicciari, et al. *J. Med. Chem.* 2007, 50, 4265-4268). I denne sammenheng er det nødvendig med tilgjengeligheten av mer potente og selektive TGR5 - modulatorer for ytterligere å identifisere andre egenskaper som påvirker reseptoraktivering og karakterisere de fysiologiske og farmakologiske virkninger av denne reseptoren for bedre å forstå relasjonen til forebygging og behandling av sykdom.

[9] For dette formål, av spesiell interesse var de biologiske og fysikalsk-kjemiske egenskaper til forbindelsen kolsyre (CA), som har strukturen vist nedenfor:



Kolsyre er en primær galle-syre hos mennesker og i og mange dyrearter, og er dessuten rapportert som en av de viktigste komponentene sammen med bilirubin av *Calculus Bovis*, en høyt verdsatt tradisjonell kinesisk medisin (Chen, X., *Biochem. Pharmacol.* 2002, 63, 533-541). Kolsyre (CA) er forskjellig fra kenodeoksykolin syre (CDCA) og dets derivater beskrevet ovenfor ved nærværet av, ved C- 12, en ytterligere alfa - hydroksylgruppe orientert på polare side av molekylet. Denne "mindre" strukturelle forskjellen utgjør de bemerkelsesverdige ulike fysiologiske og biologiske funksjoner av disse to gallesyrene. Med hensyn til CDCA, protonert CA er omtrent fire ganger mer oppløselige og har relativt mindre verdi som vaskemiddel som følge av sin hydrofobe / hydrofile balanse og polaritet. Videre er CA blottet for aktivitet mot FXR - reseptor (EC₅₀ > 100 μM) og viser samtidig moderat agonistisk aktivitet på TGR5 (EC₅₀ = 13,6

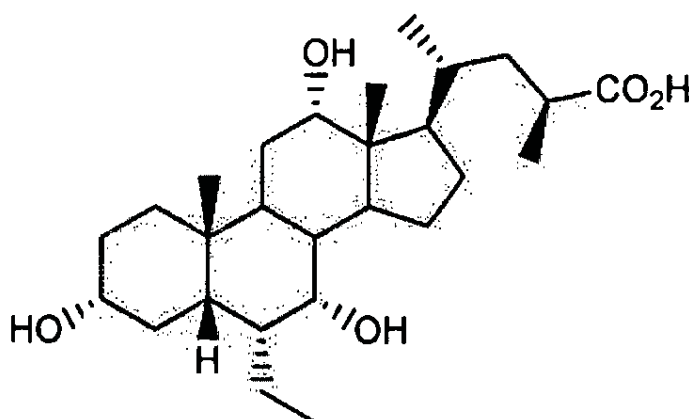
5 μM). Som en enda mer viktig faktor, ble det tidligere rapportert at farmakologisk administrering av CA ved 0,5 vekt - % i diett - induerte overvektige mus effektivt forhindrer og behandler metabolsk syndrom (Katsuma, S., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 329, 386). Selv om denne studien gitt interessante resultater i forbindelse med de endokrine funksjoner av gallesyrer, ville de høye doser som er nødvendig (0,5 % w / w) fortsatt begrense beviset på konseptet om den terapeutiske relevans av TGR5 innen konteksten av metabolske sykdommer, siden modulering av annen og ukjente mål kan ikke utelukkes ved den dosen. Et ytterligere problem var også den risikoen som var forbundet med å teste en høy dose av CA i kliniske studier

10 på grunn av produksjon av den giftige sekundære metaboliske BA DCA via omfattende og effektive tarmbakterier 7 α -dehydroksylering (Nagengast, F.M., *Eur. J. Cancer*, 1995, 31A, 1067).

15 **[10]** Således er det behov for utvikling av TGR5 - modulatorer for behandling og / eller forebygging av forskjellige sykdommer. Den foreliggende oppfinnelsen har identifisert forbindelser som modulerer TGR5, så vel som fremgangsmåter for anvendelse av disse forbindelser for å behandle eller forebygge sykdommer.

Oppsummering av oppfinnelsen

20 **[11]** Den foreliggende oppfinnelse vedrører TGR5 - modulatorer og deres anvendelse for å behandle og / eller forebygge forskjellige sykdommer. Foreliggende oppfinnelse vedrører forbindelser ifølge formel **1h3e**:



25 **1h3e** eller et salt, solvat, hydrat eller glysin - eller taurin - aminosyrekonjugat derav. Oppfinnelsen omfatter en sammensetning omfattende en forbindelse ifølge

oppfinnelsen eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, hydrat eller glysin - eller taurin - aminosyrekonjugat derav., og minst ett farmasøytisk akseptabelt hjelpestoff. Oppfinnelsen omfatter en forbindelse for anvendelse i en fremgangsmåte for behandling eller forebygging av sykdom i et emne. Oppfinnelsen omfatter også
 5 anvendelse av et preparat eller forbindelse ifølge oppfinnelsen eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat, hydrat glysin - eller taurin - aminosyrekonjugat derav i fremstillingen av et medikament for behandling eller forebygging av en sykdom i et emne. I et aspekt, er sykdommen er valgt fra metabolsk sykdom, inflammatorisk sykdom, leversykdom, autoimmune sykdommer, hjertesykdommer, nyresykdommer,
 10 kreft - og gastrointestinale sykdommer.

[12] Den ovenstående beskrivelse setter ganske grovt frem de mer viktige trekk ved den foreliggende oppfinnelse for at den detaljerte beskrivelse derav som følger kan forstås, og for at foreliggende bidrag til teknikken bedre kan bli verdsatt. Andre formål og trekk ved den foreliggende oppfinnelse vil fremgå fra den følgende
 15 detaljerte beskrivelse sett i sammenheng med eksemplene.

Kort beskrivelse av figurene

[13] Figur 1 er en graf som viser virkningen av forbindelse lh3e på økningen i
 20 kroppsvekt for mus som mates med grøttrik (chow - diett) og fet mat.

Figur 2 er en serie med ni grafer (A - I) som viser endringene i den metabolske profilen for mus matet med mye fett og behandlet med forbindelsen **lh3e**. Plasma-analyse i diett-induserte overvektige mus behandlet med forbindelsen **lh3e**. A - D forholder seg til leverenzymmer. F-I forholder seg til plasmalipider.

25 Figur 3 er en serie med grafer (A - B) som viser resultatene for plasmainsulinanalyse og oral glukosetoleranse - test av i mus som mates med grøttrik (chow - diett) og fet mat og behandlet med forbindelsen **lh3e**.

Figur 4 er en graf som viser endringer i glukosenivået for mus med grøttrik (chow - diett)t kosthold og behandlet med forbindelsen **lh3e**.

30 Figur 5 er en serie med grafer (A - D) som viser insulin frigjøring in vivo etter et testmåltid i mus som mates med grøttrik (chow - diett) og fet mat og behandlet med forbindelsen **lh3e**.

Fig. 6 er en serie med grafer (A - D) som viser oksygenforbruk og CO₂ - produksjonen målt ved indirekte kalorimetri i mus som mates med grøttrik (chow - diett) og fet mat og
 35 behandlet med forbindelsen **lh3e**.

Figur 7 er tre grafer (A - C) som viser respirasjonsforholdets (RER) tallverdi som beregnes etter indirekte kalorimetri i mus som mates med grøttrik (chow - diett) og fet mat og behandlet med forbindelsen **lh3e**.

Figur 8 er en serie med grafer (A - B) som viser lokomotorisk aktivitet, og mat og vann inntak for mus som mates med grøttrik (chow - diett) og fet mat og behandlet med forbindelsen **lh3e**.

Figur 9 er en serie med grafer (A - C) som viser endringer i organvekt for mus som mates med grøttrik (chow - diett) og fet mat og behandlet med forbindelsen **lh3e**.

Figur 10 er en graf som viser overflatespenningen plottet mot logaritmen av konsentrasjonen for forbindelsen **lh3e** (mM) i 0,15 M NaCl.

Fig. 11 er et galle - flytdiagram for et duodenalt infusjonseksperiment utført ved bruk av forbindelsen **lh3e**.

Fig. 12 er et galle - flytdiagram for et femoralt infusjonseksperiment utført ved bruk av forbindelsen **lh3e**.

Figur 13 er en graf som viser sekresjonsrater versus tid i lårben og duodenale infusjonseksperiment utført ved hjelp av forbindelse **lh3e**.

Figur 14 er en serie med grafer (A - D) som er relatert til forbindelsen **lh3e** og dens metabolitter. Figur 14A som viser forbindelsen **lh3e** og dets viktigste metabolitter identifisert i galle ved hjelp av massespektrometri i iv - eksperimentet. Data blir rapportert som absolutte arealverdier. Figur 14B er en zoom - visning av figur 14A. Figur 14C viser forbindelse **lh3e** og dens viktigste metabolitter identifisert i galle ved hjelp av massespektrometri. Figur 14D er en zoom-visning av figur 14C.

Figur 15 er et diagram som viser stabiliteten for forbindelsen **lh3e** (trekant) og CA (firkantet) i en kultur med menneskelig avføring.

Figur 16 er et søylediagram som viser den dose-avhengige frigjøringen av GLP-1 ex - vivo induert av forbindelsen **lh3e**.

Figur 17A viser korrelasjonsplotter for leverens mRNA - uttrykk for TGR5 og CoxVII a i BxD genetisk referansepopulasjon (n = 41) av mus.

Fig. 17B er et stolpediagram som viser Cox-aktivitet i STC-1 celler behandlet i 1 time med forbindelsen **lh3e** ved angitt konsentrasjon. Vehikel -eller adenylatsyklase - inhibitor MDL- 12330-A (MDL) (1 μ M) ble tilsatt 15 minutter før behandling (n = 3).

Figur 17C er et diagram som viser oksygenforbruket i STC-1-celler som målt ved hjelp av XF24 - ekstracellulær fluksanalysator (Seahorse Bioscience). Den første vertikale stiplede linjen indikerer tilsetning av vehikel eller MDL- 12330-A (MDL) til kulturmediet,

og den andre stiplede linjen viser behandlingen med forbindelsen **Ih3e** ved 1 μM ($n = 10$).

Fig. 17D er et søylediagram som viser ATP / ADP -tallforhold i STC-1 celler behandlet som i figur B ($n = 3$).

- 5 Figur 17E viser korrelasjonsplotter for leverens mRNA - uttrykk for TGR5 og Kir6.2 i musens BxD genetiske referansepopulasjon i henhold til en tilsvarende strategi som den beskrevet Figur A.

- Fig. 17F er et søylediagram som viser mRNA-ekspresjonsnivåer av TGR5, CoxIV og Kir6.2 i STC-1-celler transfektert i 36 timer med regulering eller mTGR5 shRNA som
10 ble målt ved sanntidskvantitativ PCR. Mål-mRNA-nivåer ble normalisert til 36B4 mRNA nivåer ($n = 3$). Dataene er presentert som gjennomsnittet \pm SE, Student's unpaired t-test, * $p < 0,05$.

- Figur 18A viser korrelasjonsplotter for leverens mRNA - uttrykk for TGR5 og Cav2.2 i musens BxD genetiske referansepopulasjon ($n = 41$), som finnes i GeneNetwork, på
15 nettsiden for University of Tennessee.

Figurene 18B og 18C er diagrammer som viser intracellulært kalsiumnivå i NCI-H716 - celler transfektert med en skinnvektor, hTGR5 ekspresjonsvektor, eller hTGR5 siRNA i 36 timer og behandlet med 1 (B), eller 10 μM (C) av forbindelsen **Ih3e**. Pilen betegner behandling med forbindelsen **Ih3e** ($n = 3$).

- 20 Figur 18D er et diagram som viser det intracellulære kalsiumnivå i NCI-H716 - celler behandlet med 3- μM av forbindelse **Ih3e** (angitt med pil) i nærvær av vehikelet eller adenylatsyklase - inhibitor MDL- 12330-A (MDL) (10 μM). MDL eller bærer ble tilsatt 15 min før behandling med forbindelsen **Ih3e** ($n = 3$).

- Figur 18E er et diagram som viser det intracellulære kalsiumnivået i NCI-H716 - celler
25 ble behandlet med 1 % glukose og deretter med 1 μM av forbindelse **Ih3e** ($n = 3$).

Fig. 18F er et søylediagram som viser GLP-1 frigjøring i NCI-H716 - celler behandlet med 1 % glukose eller 1 μM av forbindelse **Ih3e**, eller en kombinasjon av begge midlene ($n = 3$).

- Figur 18G er et søylediagram som viser GLP-1 frigjøring i STC-1-celler transfektert i 36
30 timer med regulering, mTGR5 ekspresjonsvektor, eller mTGR5 shRNA og deretter eksponert i 30 min til forbindelse **Ih3e** ved den indikerte konsentrasjon. En DPP4 - inhibitor (Millipore) ble tilsatt til kulturmediet på 0,1 % ($n = 3$).

- Figur 18H er et søylediagram som viser virkningen av 30 min av forbindelse **Ih3e** -
35 behandling på GLP-1 frigjøring i STC-1-celler transfektert med mTGR5 ekspresjonsvektor i nærvær av vehikelet eller adenylatsyklase - inhibitor MDL-I 2330-A

(10 μ M). MDL eller vehikel ble lagt 15 min før behandling med lh3e - forbindelse. En DPP4 - inhibitor (Millipore) ble tilsatt til kulturmediet ved 0,1 % (n = 3). Dataene er presentert som gjennomsnittet \pm SE. Student's unpaired t-test; #p < 0,05 vehikel versus behandling med lh3e - forbindelse; #p < 0,05 vehikel versus MDL-I 2330-A
5 behandling.

Figur 19A er en graf som viser resultatene av en oral glukosetoleranse test (OGTT) i mannlige TGR5-Tg mus føret i 10 uker med HF - kosthold og i alders - matchet mannlige kullsøsken matet med en CD- eller et HF- kosthold med samme varighet. Alle musene var 8 uker gammel ved In1tiering av HF - kosthold. Kroppsvekt for TGR5-Tg
10 og kontrollkullsøsken var 37,9 \pm 1,7 g og 37,0 \pm 1,8 g, henholdsvis (n = 8; ikke statistisk forskjellige). Det tilstøtende søylediagrammet representerer det gjennomsnittlige arealet under kurven (AUC) (n = 8).

Figurer 19B og 19C viser plasmanivå for insulin (øverste panel) og GLP-1 (bunnpanelet) under OGTT (19B) eller før og etter en testmåltidsutfordring (19C) (n =
15 8).

Fig. 19D er et søylediagram som viser GLP-1 frigjøring fra ileale eksplantater isolert fra kontroll og TGR5-Tg - mus av hankjønn ble matet i 18 uker med HF - kosthold og eksponert i 1 time i de indikerte konsentrasjonene for LCA (n = 4).

Figur 19E er en serie med bilder som er representative immunofluorescente
20 insulinfarget bukspyttkjertelseksjoner fra TGR5-Tg hannmus som ble matet med et HF - kosthold i 20 uker eller fra mannlige alders matchet littermates matet med en CD eller et HF - kosthold med samme varighet. Figur 19F er et søylediagram som viser en fordelingsprofil av bukspyttkjertelområder fra mannlige TGR5-Tg mus og kullsøsken - kontroll matet med et CD - eller et HF - kosthold som beskrevet i (Figur 19E). Områder
25 ble talt opp og størrelse av ImageJ - analyse programvare på fire H & E - farget vekslete bukspyttkjertelsseksjoner hver fordelt med mellomrom 150 μ m (n = 5).

Figur 19G er et søylediagram som viser insulininnhold i kollagenaseklassene-isolert bukspyttkjertelområder fra mannlige TGR5-Tg mus og kullsøsken - kontroll matet med en CD eller et HF - kosthold som beskrevet i (Figur 19E). Figur 19H er en graf som
30 viser resultatene fra en OGTT i TGR5^{-/-} og TGR5^{+/+} hannmus som ble matet med et HF - kosthold i 8 uker. Det innfelte representerer det gjennomsnittlige AUC Kroppsvekten for TGR5^{-/-} og TGR5^{+/+} hannmus ved analysen var 46,3 \pm 3,9 g og 51,9 \pm 2,0 g, henholdsvis (n = 8; ikke statistisk forskjellige).

- Figurene 19I og 19J er grafer som viser plasma GLP-1 nivå i CD - matet TGR5^{+/+} (Figur 19I) og TGR5^{-/-} mus (figur 19J) etter en oral glukoseutfordring, forvarslet 30 min før ved oral administrasjon av saltløsning eller forbindelsen **lh3e** (30 mg / kg), alene eller i kombinasjon med en dipeptidyl-peptidase-4 inhibitor (DPP4i, 3 mg / kg) (n = 6).
- 5 Dataene er representert som gjennomsnittlig +/- SE. Student's unpaired t-test; #p < 0,05, HF-matet forhold til HF - matet mus behandlet med forbindelse **lh3e**, og #p < 0,05, HF-matet versus CD-matet mus med unntak av (I) og (J), hvor * vurderte saltvanns- eller DPP4i-behandlede mus versus mus behandlet med forbindelse **lh3e** eller **lh3e** + DPP4i- behandlede mus, og #saltvanns-versus DPP4i-behandlede mus.
- 10 Fig. 20A er graf som viser resultatene fra måling ved hjelp av HPLC med plasmaforbindelse **lh3e** - nivåer i CD-, HF-, og HF-matet **lh3e**-behandlede hann C57BL6/J-mus.
- Figur 20B er en graf som viser resultatet av kostintervensjon med forbindelse **lh3e** (30 mg / kg / d), som ble startet etter en 14 - ukers periode med HF – mating på det
- 15 tidspunkt som indikeres av pilen. Kroppsvekt utvikling i alle grupper ble fulgt i løpet av studien (n = 8).Figur 20C er et søylediagram som viser kroppssammensetning som vurdert med qNMR etter åtte uker med kostintervensjon (n = 8).
- Figur 20D er et søylediagram som viser organmasse, som uttrykt som prosent av vekten for CD-matet kontrollmus.
- 20 Figur 20E er et søylediagram som viser matinntak (n = 8).Figur 20F er en serie med søylediagrammer som viser spontan horisontal aktivitet og energiforbruk, evaluert ved måling av oksygenforbruk (VO₂) og karbondioksid frigjøring (VCO₂), som ble overvåket over en 18 timers perioden og 6 uker etter initiering av kostintervensjonen. Den respiratoriske kvotient (RQ) ble beregnet som forholdet VCO₂ / VO₂.
- 25 Stolpediagrammene representerer den gjennomsnittlige AUC. For RQ, søylediagrammer representerer den gjennomsnittlige (n = 8).
- Figur 20G er et søylediagram som viser gen - ekspresjon i BAT ved sanntids kvantitativ PCR etter 18 uker med kostintervensjon. Mål-mRNA-nivåer ble normalisert til 36B4 mRNA nivåer (n = 8).Figur 20H er en graf som viser primære brune fettceller isolert fra
- 30 CD-matet C57BL/6J hannmus, og ble dyrket i 12 timer med vehikel eller 3 µM forbindelse **lh3e**, og O₂ forbruket ble målt ved hjelp av XF24 - ekstracellulær fluksanalysator (Seahorse Bioscience) (n = 5). De stiplede linjene illustrerer tilsetningen av frakoplingsmiddelet FCCP ved suksessive doser på 250 og 500 nM.
- Figur 20I er en serie med bilder som er representative bilder av olje redO (ORO) -
- 35 farging av kryopartier (øverste panel) og Sirius - rødfarging av parafin-nedsenkede

partier (nederst panel) i leveren ved enden av kostintervensjonen. Fibrose er indikert med pilen. Fig. 20J er en serie med søylediagrammer som viser ILipid - innhold i leverprøvene ekstrahert ifølge Folch's metode (n = 8).

Figurer 20K og 20L er en serie med søylediagrammer som viser plasmanivåer for leverenzymmer (Fig. 20K) og lipider (Fig. 20L) ved enden av kostintervensjonen (n = 8). Dataene er representert som gjennomsnittlig +/- SE. Student's unpaired t-test; * p < 0,05, HF - matede forhold til HF - matede **lh3e** - behandlede mus, og #p < 0,05, HF - matet versus CD - matede mus. Figur 21A er en graf som viser resultatet av en OGTT i CD- og HF - matede mannlige C57BL6/J mus supplert med 30 mg / kg / d forbindelse **lh3e** i åtte uker etter at begynnelsen på fedmen ble indusert ved å mate et HF - kosthold i løpet av 10 uker. Det innfelte representerer det gjennomsnittlige AUC. Kroppsvekt på vehikel- og forbindelse- **lh3e** behandlede mus var 38,08 +/- 1,83 g og 32,26 +/- 0,95 g, henholdsvis (n = 8, p < 0,05). Figur 21B er en graf som viser faste-glykemia og -insulinemia (4 timers fasting) i DIO - mus etter tre uker med kostintervensjon med forbindelse **lh3e** (øverste panel). Plasma insulin nivåer under OGTT i DIO mus (nedre panel).

Figur 21C er et diagram som viser resultatet av en OGTT i 14 uker gamle CD-matede db/db hannmus som ble behandlet med 30 mg / kg / d av forbindelse **lh3e** i 6 uker. Det innfelte viser gjennomsnittlig AUC (n = 8). Figur 21D er en graf som viser fastende (4 t) glykemia og insulinemia i db/db mus etter seks ukers behandling med forbindelse **lh3e** (øverste panel). Plasma insulin nivåer under OGTT i DIO - mus (nedre panel).

Figur 21E er en serie med to søylediagrammer som viser insulinfølsomhet evaluert gjennom den gjennomsnittlige glukoseinfusjonshastighet ved likevekt (euglykemia) i en hyperinsulinemisk euglykemisk klemme (10 mU insulin / min / kg) i DIO - mus (etter begynnelsen av fedmen indusert ved å mate en HF - kosten i løpet av 10 uker) etter 10 uker på kostintervensjon med forbindelse **lh3e** (30 mg / kg / d) (n = 5). Evalueringen av leverglukoseproduksjon og dens undertrykkelse av insulin, så vel som frekvensen av glukose forsvinning, ble vurdert ved ekvilibrium ved anvendelse av 3H-glukose (n = 5). Figur 21F er en serie med søylediagrammer som viser insulinstimulert glukoseopptak i de angitte vev, målt ved hjelp av 14 C- 2 - deoksyglukose tracere (n = 5).

Figur 21G er en serie av søylediagrammer som viser genekspresjonsprofilering i leveren som ble utført ved sanntids-kvantitativ PCR. Mål-mRNA-nivåer ble normalisert til 36B4 nivåer (n = 8). Dataene er representert som gjennomsnittlig +/- SE. Student's unpaired t-test; * p < 0,05, HF-matede sammenlignet med HF-matede mus behandlet

med forbindelse **lh3e**, og $^{\#}p < 0,05$, HF-matede versus CD-matede mus. Figur 22A er en serie med grafer som viser resultatene av en studie hvor TGR5^{+/+} og TGR5^{-/-} hannmus ble matet et HF - kosthold i 9 uker, og en første OGTT ble utført deretter. HF ble deretter supplert med forbindelsen **lh3e** ved 30 mg / kg / d. En andre OGTT ble utført fire uker etter behandling med forbindelsen **lh3e** i 1tiert. Kurvene representerer glukosetoleranse før og etter fire ukers behandling med forbindelse **lh3e** i TGR5^{+/+} (venstre panel) og TGR5^{-/-} (høyre panel) mus. Det innfelte representerer den gjennomsnittlige AUC. I TGR5^{+/+} mus var kroppsvekten før og etter behandling med **lh3e** - forbindelse henholdsvis 46,86 +/- 3,54 g og 43.50 +/- 3,47 g (n = 8; ikke statistisk forskjellige). I TGR5^{-/-} mus var kroppsvekten før og etter behandling med **lh3e** - forbindelse henholdsvis 54,34 +/- 2,23 g og 52,30 +/- 2,72 g, (n = 8; ikke statistisk forskjellige).

Figur 22B er en serie med grafer som viser plasma insulin nivåer som samtidig ble målt under OGTT i DIO i TGR5^{+/+} (venstre panel) og TGR5^{-/-} (høyre panel) mus før og etter 4 ukers behandling med forbindelse **lh3e**. Det innfelte representerer det gjennomsnittlige AUC (n = 8). Dataene er representert som gjennomsnittlig +/- SE. Student's unpaired t-test; *p < 0,05, vehikel sammenlignet med forbindelse **lh3e** 7 behandlede mus.

Figur 23 er en graf som viser forbindelsene **lh3e**- og **li3e**- gallestrømningshastigheter i et femoralt infusjonsekperiment ved 1 μMol / min / kg i 1 time og gallestrømningshastighet i et femoral teksperiment som kontroll med infusjon av 3 % BSA fysiologisk oppløsning i 1 h. Figur 24 er et diagram som viser forbindelsen **lh3e**- og tauro-**lh3e**- sekresjonrater mot tid i et femoralt eksperiment ved 1 μMol / min / kg i 1 time.

Figur 25 er et diagram som viser forbindelsen **lh3e**- og tauro-**lh3e**- sekresjonrater mot tid i femoralt eksperiment ved 1 μMol / min / kg i 1 time. Figur 26 er en graf som viser forbindelsen **lh3e** og dets viktigste metabolitter identifisert i galleprøver tatt i lårbens infusjonsekperiment. Data er rapportert som absolutte arealverdier.

Figur 27 er en zoom - visning av Figur 26.

30

Beskrivelse av oppfinnelsen

[14] Detaljene i en eller flere utførelsesformer av oppfinnelsen er angitt i den medfølgende beskrivelse. Selv om enhver fremgangsmåte og materialer lignende eller ekvivalente til de som er beskrevet heri kan brukes i praksis eller testing av

foreliggende oppfinnelse, vil fremgangsmåter og materialer nå bli beskrevet. Andre egenskaper, formål og fordeler ved oppfinnelsen vil fremgå fra beskrivelsen. I beskrivelsen og kravene, vil entallsformer også inkludere flertallsformer med mindre sammenhengen klart tilsier noe annet. Med mindre det er definert på annen måte, vil alle tekniske og vitenskapelige begreper som brukes heri ha den samme betydning som vanligvis forstås av en fagmann innenfor det faget som denne oppfinnelsen tilhører. I tilfelle konflikt, vil den foreliggende beskrivelse være styrende.

Definisjoner

10

[15] Av praktiske hensyn vil visse uttrykk brukt i beskrivelsen, eksempler og vedlagte krav være samlet her.

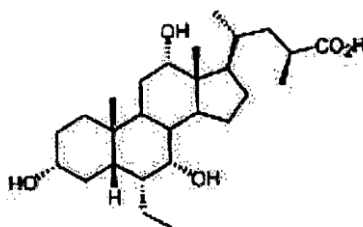
[16] Betegnelsen "behandling", som anvendt heri, betyr lindrende, minske, redusere, eliminere, modulere eller lindring, det vil si å forårsake regresjon av sykdomstilstanden eller tilstanden.

[17] Begrepet "forebygge", som anvendt heri, betyr å fullstendig eller nesten fullstendig stoppe en sykdomstilstand eller en tilstand, fra å kunne oppstå hos en pasient eller et emne, spesielt når pasienten eller emnet er predisponert for noe slikt, eller ved risiko for en sykdomstilstand eller tilstand. Forebygging kan også inkludere inhibering, det vil si arrestere utvikling av en sykdomstilstand eller tilstand, og lindre eller forbedre, det vil si å forårsake regresjon av sykdomstilstanden eller tilstanden, for eksempel når den sykdomstilstanden eller tilstanden allerede kan være til stede.

20

[18] Uttrykket "6 - Et, 23 (S)-MECA" refererer seg til forbindelsen **1h3e** som har følgende kjemiske strukturen:

25



Alternativt vil forbindelsen **1h3e** også kunne bli referert til som 6 α - etyl - (23S)- metyl - 3- α , 7 α , 12 α trihydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre.

[19] Som anvendt her, betyr "BA" gallesyre-og gallesyrederivater. Gallesyrer er steroid karboksylsyrer avledet fra kolesterol. De primære gallesyreene er kol- og

30

kenodeoksykolin syrer. I kroppen blir disse syrene konjugert med glysin eller taurin, før de blir utskilt i gallen.

[20] "Alkyl" innbefatter mettede alifatiske grupper, inkludert rettkjedede alkylgrupper (for eksempel metyl, etyl, propyl, butyl, pentyl, heptyl, oktyl, nonyl, 5 decyl), forgrenede alkyl-grupper (for eksempel, isopropyl, tert-butyl, iso-butyl), cykloalkyl (for eksempel alicyklisk) grupper (for eksempel cyklopropyl, cyklopentyl, cykloheksyl, cykloheptyl, cyklooktyl), alkyl-substituerte cykloalkyl-grupper, og cykloalkylgrupper substituert alkylgrupper. I visse utførelsesformer, har en rettkjedet eller forgrenet alkyl seks eller færre karbonatomer i sin kjede, referert til som "lavere 10 alkyl" (for eksempel, C₁-C₆ - for rettkjedet betyr 1, 2, 3, 4, 5 eller 6. karbonatomer, C₃-C₆ - for forgrenet betyr 3, 4, 5 eller 6 karbonatomer). I noen eksempler, har en rettkjedet eller forgrenet alkyl fire eller færre karbonatomer i sin kjede. Videre, cykloalkyler har 3, 4, 5, 6, 7 eller 8 karbonatomer i sin ringstruktur.

[21] Betegnelsen "substituert alkyl" refererer seg til et alkyl -grupper som har 15 en substituent som erstatter ett eller flere hydrogenatomer på minst ett eller flere karboner av hydrokarbon kjede. Slike substituenten kan inkludere, for eksempel, alkyl, alkenyl, alkynyl, halogen, hydroksyl, alkylkarbonyloksy, arylkarbonyloksy, alkoksykarbonyloksy, aryloksykarbonyloksy, karboksylat, alkylkarbonyl, arylkarbonyl, alkoksykarbonyl, aminokarbonyl, alkylaminokarbonyl, dialkylaminokarbonyl, 20 alkyltiokarbonyl, alkoksyl, fosfat, fosfonato, fosfinato, cyano, amino (inklusive alkyl - amino, dialkylamino, arylamino, diarylamino og alkylarylamino), acylamino (inkludert alkylkarbonylamino, arylkarbonylamino, karbamoyl og ureido), amidino, Im1no, sulfhydryl, alkyltio, aryltio, tiokarbonylat, sulfater, alkylsulfinyl, sulfonato, sulfamoyl, sulfonamido, nitro, trifluormetyl, cyano, azido, heterosyklil, alkylaryl eller en aromatisk 25 eller heteroaromatisk rest.

[22] "Aryl" inkluderer grupper med aromatisitet, inkludert 5 - og 6 - leddet "ukonjugert" eller enkelt-ring, aromatiske grupper som kan inneholde fra null til fire heteroatomer, i tillegg til "konjugerte" eller multisykliske, systemer med minst én aromatisk ring. Eksempler på arylgrupper inkluderer benzen, fenyl, pyrrol, furan, tiofen, 30 tiazol, isotiazol, Im1dazol, triazol, tetrazol, pyrazol, oksazol, isooksazol, pyridin, pyrazin, pyridazin, pyrimidin og, og lignende. Videre, begrepet "aryl" inkluderer multi arylgruppene, for eksempel trisykliske, bisykliske, for eksempel, naftalen, benzoksazol, benzodioksazol, benzotiazol, benzoimidazol, benzotiofen, metylendioksyfenyl, kinolin, isokinolin, naftridin, indol, benzofuran, purin, benzofuran, deazapurin, eller indolizin. De 35 arylgrupper som har heteroatomer i ringstrukturen, kan også bli referert til som "aryl",

- "heterocykler heterocykler," "heteroaryler" eller "heteroaromater". Den aromatiske ring kan være substituert ved minst ett ringposisjon med slike substituentter som beskrevet ovenfor, som for eksempel halogen, hydroksyl, alkoksy, alkylkarbonyloksy, arylkarbonyloksy, alkoksykarbonyloksy, aryloksykarbonyloksy, karboksylat, alkylkarbonyl, alkylaminokarbonyl, aralkylaminokarbonyl, alkenylaminokarbonyl, 5 alkylkarbonyl, arylkarbonyl, aralkylkarbonyl, alkenylkarbonyl, alkoksykarbonyl, aminokarbonyl, alkyltiokarbonyl, fosfat, fosfonato, fosfinato, cyano, amino (inklusive alkyl -amino, dialkylamino, arylamino, diarylamino og alkylarylamino), acylamino (inkludert alkylkarbonylamino, arylkarbonylamino, karbamoyl og ureido), amidino, 10 Im1no, sulfhydryl, alkyltio, aryltio, tiokarboksylat, sulfater, alkylsulfinyl, sulfonat, sulfamoyl, sulfonamido, nitro, trifluormetyl, cyano, azido, heterosykl, alkylaryl eller en aromatisk eller heteroaromatisk rest. Arylgrupper kan være smeltet eller brodannet med alicykliske eller heterocykliske ringer, som ikke er aromatiske, så som å danne et multisystem (for eksempel tetralin, metylendioksyfenyl).
- 15 **[23]** Dersom antallet karbonatomer er angitt som noe annet, vil "lavere alkyl" omfatte en alkylgruppe, som definert ovenfor, men vil ha fra en til ti, for eksempel fra en til seks, karbonatomer i sin kjede-struktur.
- [24]** Uttrykket "alkoksy" og "alkoksy" omfatter alkyl, alkenyl og alkynylgrupper kovalent bundet til et oksygenatom. Eksempler på alkoksy-grupper (eller alkoksy - 20 radikaler) omfatter metoksy, etoksy, isopropyloksy, propoksy, butoksy, og pentoksy grupper.
- [25]** Betegnelsen "eter" innbefatter forbindelser eller rester som inneholder en oksygen bundet til to forskjellige karbonatomer eller heteroatomer. For eksempel innbefatter betegnelsen "alkoksyalkyl", som refererer seg til en alkyl -, alkenyl -eller 25 alkynyl – gruppe, kovalent bundet til et oksygenatom som er kovalent bundet til en annen alkylgruppe.
- [26]** Betegnelsen "ester" omfatter forbindelser og rester som inneholder et karbon eller et heteroatom bundet til et oksygenatom som er bundet til karbonet til en karbonylgruppe. Betegnelsen "ester" omfatter alkoksykarboksy grupper som 30 metoksykarbonyl, etoksykarbonyl, propoksykarbonyl, butoksykarbonyl, pentoksykarbonyl, og så videre. Alkyl -, alkenyl -eller alkynylgrupper er som definert ovenfor.
- [27]** Begrepet "hydroksy" og "hydroksyl" omfatter grupper med en-OH eller-O.

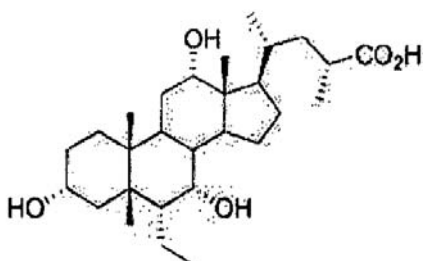
[28] Uttrykket "halogen" omfatter fluor, brom, klor, jod, og så videre. Betegnelsen "perhalogenert" refererer seg til en rest hvori alle hydrogenatomer er erstattet med halogenatomer.

[29] En "anionisk gruppe", som anvendt heri, refererer seg til en gruppe som er negativt ladet ved fysiologisk pH. Anioniske grupper er karboksylat, sulfat, sulfonat, sulfinat, sulfamat-, tetrazolyl -, fosfat-, fosfonat, fosfinat eller fosfortioat eller funksjonelle ekvivalenter derav. "Funksjonelle ekvivalenter" av anioniske grupper er ment å omfatte bioisosterer, for eksempel, bioisosterer av en karboksylat-gruppe. Bioisosterer omfatter både klassiske bioisosterisk ekvivalenter og ikke-klassiske bioisosterisk ekvivalenter. Klassiske og ikke-klassiske bioisosterer er kjent i teknikken (se for eksempel Silverman, R.B: The Organic Chemistry of Drug Design and Drug handling, Academic Press, Inc. San Diego, Calif, 1992, s.19 - 23). En annen anionisk gruppe er et karboksylat.

[30] Uttrykket "ustabil funksjonalitet" refererer seg til en substitusjonsmønster som inneholder en labil binding, for eksempel en funksjonalitet eller et binding som er utsatt for hydrolyse eller spalting under fysiologiske betingelser (for eksempel, vandige løsninger i det nøytrale pH-området). Eksempler på ustabile funksjoner inkluderer acetaler og ketaler.

[31] Begrepene "krystall polymorfer" eller "polymorfer" refererer seg til eksistensen av mer enn en krystallform til en forbindelse, salt eller solvat derav. Krystall polymorfer av gallesyreanaloge forbindelser fremstilles ved krystallisering under forskjellige betingelser.

[32] Uttrykket "R-EMCA" refererer seg til forbindelsen 6 α - etyl - 23 (R)- metylkol syre med strukturen:



25

Alternativt vil det kunne bli referert til som 6 α - etyl - (23R)- metyl - 3- α , 7 α , 12 α trihydrokso- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre.

[33] I tillegg, forbindelsene ifølge den foreliggende oppfinnelse, for eksempel saltene av forbindelsene, kan eksistere i enten hydratisert eller i hydratisert (vannfri) form eller som solvater med andre løsningsmiddel-molekyler. Begrensede eksempler på hydrater inkluderer monohyrater, dihydrater og så videre. Ikke - begrensede eksempler på solvatene inkluderer etanol solvatene, aceton solvatene og så videre.

[34] "Solvater" betyr løsningsmiddel tilsetningsformer som inneholder enten støkiometriske eller ikke-støkiometriske mengder av løsningsmiddel. Noen forbindelser har en tendens til å felle et fast molart forhold av løsningsmiddel-molekyler i den krystallinske faste tilstand, og danner således et solvat. Hvis løsningsmiddelet er vann, danner solvatet et hydrat, når løsningsmidlet er alkohol, danner solvatet et alkoholat. Hydrater blir dannet ved kombinasjonen av ett eller flere molekyler vann med en av substansene hvor vannet beholder sin molekylære tilstand som H₂O, en slik kombinasjon er i stand til å danne ett eller flere hydrater.

[35] Det vil bemerkes at strukturen av noen av forbindelsene ifølge oppfinnelsen omfatter asymmetriske karbonatomer. Det skal forstås derfor at de isomerer som oppstår fra slik asymmetri (for eksempel alle enantiomerer og diastereomerer) er inkludert innenfor omfanget av oppfinnelsen, med mindre annet er angitt. Slike isomerer kan erholdes i hovedsakelig ren form av klassiske separasjonsteknikker og ved stereokontrollert syntese. Enantiomerer (R-og S-konfigurasjoner) er navngitt i henhold til systemet utviklet av R.S. Cahn, C. Ingold og V. Prelog.

[36] Videre, strukturene og andre forbindelser som er omtalt i denne søknaden omfatter alle atropiske isomerer derav. Atropiske isomerer er en type stereoisomer hvori de atomer av to isomerer er anordnet på en annen måte i rommet. Atropiske isomerer skyldes deres eksistens i en begrenset rotasjon som skyldes hindring av rotasjon av store grupper rundt en sentral binding. Slike atropiske isomerer eksisterer vanligvis som en blanding, men som et resultat av nylige fremskritt i kromatografiske teknikker, har det vært mulig å separere blandinger av to atropiske isomerene i enkelte tilfeller.

[37] "Stabil forbindelse" og "stabil struktur" er ment å angi en forbindelse som er tilstrekkelig robust til å overleve isolering til en nyttig renhetsgrad fra en reaksjonsblanding, og formulering til et effektivt terapeutisk middel.

[38] Som anvendt heri refererer betegnelsen "analog" til en kjemisk forbindelse som er strukturelt lik hverandre, men er litt forskjellig sammensetning (som i erstatning av ett atom av et atom av et annet element, eller i nærvær av en spesiell

funksjonell gruppe, eller utskifting av en funksjonell gruppe av en annen funksjonell gruppe). Således er en analog av en forbindelse som er lik eller tilsvarende i funksjon og utseende til referanseforbindelsen.

[39] Som definert heri, uttrykket "derivat", for eksempel i uttrykket "gallesyre-derivater", refererer seg til forbindelser som har en felles kjerne med 4 - leddet ringstruktur, og er substituert med forskjellige grupper som beskrevet heri.

[40] Betegnelsen "bioisostere" refererer seg til en forbindelse som følge av utvekslingen av et atom eller en gruppe av atomer med en annen, stort sett det samme, atom eller gruppe av atomer. Den bioisosterisk erstatning kan være physicochemically eller topologisk basert. Eksempler på karboksylsyre-bioisosterer inkluderer acyl sulfonimider, tetrazoler, sulfonater og fosfonater. Se, for eksempel Patani og Lavoie, Chem. Rev 96, 3147-3176 (1996).

[41] "Kombinasjonsbehandling" (eller "ko - behandling") inkluderer administrering av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, og i det minste et andre middel som en del av en bestemt behandlingsregime som er ment å gi den fordelaktige effekt av ko-handling av disse terapeutiske midler (det vil si forbindelsen ifølge oppfinnelsen, og i det minste et andre middel). Den fordelaktige effekt av kombinasjonen omfatter, men er ikke begrenset til, farmakokinetiske eller farmakodynamiske co-handling som resulterer fra kombinasjon av terapeutiske midler. Administrasjon av disse terapeutiske agenter i kombinasjon vanligvis er utført over en definert tidsperiode (vanligvis minutter, timer, dager eller uker, avhengig av kombinasjonen som er valgt).

"Kombinasjonsbehandling" kan, men vanligvis er ikke, ment å omfatte administrering av to eller flere av disse terapeutiske midler som en del av separate monoterapiregimer som forøvrig vilkårlig, og resultere i kombinasjonene ifølge den foreliggende oppfinnelse. "Kombinasjonsbehandling" er ment å omfatte administrering av de terapeutiske midler på en sekvensiell måte, det vil si, karakterisert ved at hvert terapeutisk middel blir administrert på et annet tidspunkt, så vel som administrering av disse terapeutiske midlene, eller i det minste to av de terapeutiske midler, i en i den vesentlige samtidige måte. Hovedsakelig samtidig administrasjon kan erholdes, for eksempel, ved å administrere til individet en enkelt kapsel som har et fast forhold mellom hvert terapeutisk middel, eller i flere, enkelt kapsler for hver av de terapeutiske midler. Sekvensiell eller i alt vesentlig samtidig administrering av hvert terapeutisk middel kan utføres ved en hvilken som helst egnet rute inklusive, men ikke begrenset til, orale ruter, intravenøst, intramuskulære ruter og direkte absorpsjon gjennom slimhinnevevet. De terapeutiske midler kan bli administrert ved den samme rute eller

via forskjellige ruter. For eksempel kan et første terapeutisk middel av kombinasjonen velges bli administrert ved intravenøs injeksjon, mens de andre terapeutiske midler av kombinasjonen kan administreres oralt. Alternativt kan for eksempel alle terapeutiske midler kan bli administrert oralt eller alle terapeutiske midler kan bli administrert ved intravenøs injeksjon. Rekkefølgen i hvilken de terapeutiske midlene administreres er ikke snevert kritisk.

[42] "Kombinasjonsbehandling" omfatter også administrering av de terapeutiske midler som er beskrevet ovenfor i ytterligere kombinasjon med andre biologisk aktive bestanddeler og ikke-medikament terapi (for eksempel kirurgi eller mekaniske behandlinger). Når kombinasjonsterapien innbefatter et ikke-medikament behandling ytterligere, kan den ikke- medikamentbehandlingen bli utført ved et hvilket som helst tidspunkt så lenge den fordelaktige effekten av ko-virkning fra kombinasjonen av de terapeutiske midler og ikke-medikamentbehandling blir beholdt. For eksempel, i passende tilfeller, vil fordelaktig effekt likevel beholdes når ikke-medikament behandlingen er midlertidig fjernet fra administrering av de terapeutiske midler, kanskje med dager eller til og med uker.

[43] Uttrykkene "parenteral administrering" og "administrert parenteralt" som anvendt heri henviser til administreringsmåter andre enn enteral og topisk administrering, vanligvis ved injeksjon, og omfatter, uten begrensning, intravenøs, intramuskulær, intraarteriell, intratekal, intrakapsulær, intraorbital, intrakardiale, intradermal, intraperitonisk, transtrakeal, subkutan, subkutikulær, intraartikulær, subkapsulær, subaraknoidalblødning, intraspinal og intrasternal injeksjon og infusjon.

[44] Betegnelsen "pulmunal" som anvendt heri refererer seg til en hvilken som helst del, vev eller organ hvis primære funksjon er gassutveksling med det ytre miljø, for eksempel O₂/CO₂ utveksling, i en pasient. "pulmunal" refererer vanligvis til vev i luftveiene. Dermed refererer uttrykket " pulmunal administrasjon" for å administrere de formuleringer som er beskrevet her til enhver del, vev eller organ hvis primære funksjon er gassutveksling med det ytre miljø (for eksempel, munn, nese, svelg, orofarynks, laryngofarynks, strupehode, luftrør, carina, bronkiene, bronkiolene, alveolene). For formålene med den foreliggende oppfinnelse, «pulmunal» inkluderer også et vev eller hulrom som er betinget av luftveiene, særlig bihulene.

[45] En "terapeutisk effektiv mengde" av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, eller en kombinasjon av forbindelser er en mengde (mengde eller konsentrasjon) av forbindelse eller forbindelser. I en utførelsesform, når det av en terapeutisk effektiv mengde av en forbindelse administreres til et individ med behov for behandling av

symptomer forbundet med sykdom som lindres umiddelbart, eller etter administrering av forbindelsen en eller flere ganger. Mengden av den forbindelse som skal administreres til et individ, vil avhenge av den spesielle lidelsen, administrasjonsmåten, ko-administreres forbindelsene, om noen, og egenskapene til emnet, slik som generell helse, andre sykdommer, alder, kjønn, genotype, kroppsvekt og toleranse for narkotika. En fagmann på området vil være i stand til å bestemme passende doser avhengig av disse og andre faktorer.

[46] Betegnelsen "profylaktisk effektiv mengde" betyr en mengde (mengde eller konsentrasjon) av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, eller en kombinasjon av forbindelser, som administreres for å forebygge eller redusere risikoen for en sykdom, - med andre ord, en mengde som er nødvendig for å gi en forebyggende eller profylaktisk effekt. Mengden av foreliggende forbindelse som skal administreres til en pasient vil avhenge av den spesielle lidelsen, administrasjonsmåten, samtidig administrerte forbindelser, om noen, og egenskapene til emnet, slik som generell helse, andre sykdommer, alder, kjønn, genotype, kroppsvekt og toleranse for narkotika. En fagmann på området vil være i stand til å bestemme passende doser avhengig av disse og andre faktorer.

[47] Uttrykket "å redusere risikoen for", som anvendt heri, betyr å redusere sannsynligheten og sannsynligheten for at en sykdom i sentralnervesystemet, en inflammatorisk sykdom og / eller metabolsk sykdom oppstår hos en pasient, spesielt når pasienten eller emnet er predisponert for en slik hendelse

[48] Et "farmasøytisk akseptabelt salt" eller "salt" av en forbindelse ifølge oppfinnelsen er et produkt av forbindelsen som inneholder en ionisk binding, og blir vanligvis fremstilt ved omsetning av forbindelsen med enten en syre eller en base, egnet for administrering til et individ.

[49] Som anvendt heri, "farmasøytisk akseptable salter" refererer seg til derivater av forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, karakterisert ved at utgangsforbindelsen er modifisert ved å lage syre- eller basesalter derav. Eksempler på farmasøytisk akseptable salter omfatter, men er ikke begrenset til, mineral-eller organiske syresalter av basiske rester slik som aminer; alkali-eller organiske salter av sure rester slik som karboksylsyrer, og lignende. De farmasøytisk akseptable salter omfatter de konvensjonelle ikke-toksiske salter eller de kvaternære ammoniumsalter av moderforbindelsen dannet, for eksempel fra ikke-toksiske uorganiske eller organiske syrer. For eksempel, slike konvensjonelle ikke-toksiske salter omfatter, men er ikke begrenset til, de som er avledet fra uorganiske og organiske syrer valgt fra 2 -

acetoksybenzo-syre, 2 - hydroksyetansulfonsyre sulfonsyre, eddiksyre, askorbinsyre, benzen-sulfonsyre, benzosyre, bikarbonisk, karbonsyre, sitronsyre, edetic, etan disulfonsyre, etan-sulfonsyre, fumarsyre, glukohexon, glukonsyre, glutaminsyre, glykolsyre, glykollyarsanil, heksylresorcinic, hydrabamisk, hydrobrom-, salt-,
 5 hydrojodid, hydroksymaleinsyre, hydroksynaftoisk, isetionsyre, melkesyre, laktobionisk, lauryl -sulfonsyre, maleinsyre, eplesyre, mandelsyre, metan sulfonsyre, napsyl, salpetersyre, oksalsyre, pamoinsyre, pantotensyre, fenyleddiksyre, fosforsyre, polygalakturonsyre, propionsyre, salicylsyre, stearinsyre, subeddiksyre, ravsyre, sulfaminsyre, sulfanil-, svovelsyre, garvesyre, vinsyre, og toluen-sulfonsyre.

10 **[50]** De farmasøytisk akseptable salter ifølge foreliggende oppfinnelse kan syntetiseres fra utgangsforbindelsen som inneholder en basisk eller sur gruppe ved konvensjonelle kjemiske fremgangsmåter. Generelt kan slike salter fremstilles ved å omsette de frie syre-eller baseformer av disse forbindelser med en støkiometrisk
 15 mengde av den passende base eller syre i vann eller i et organisk oppløsningsmiddel, eller i en blanding av de to, generelt, ikke-vandige media som eter, som etylacetat, etanol, isopropanol eller acetonitril foretrukket. Lister over egnede salter finnes i *Remington 's Pharmaceutical Sciences*, 18th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, USA, s. 1445 (1990).

20 **[51]** Uttrykket "farmasøytisk akseptabelt" er anerkjent innen faget. I visse utførelsesformer, omfatter uttrykket sammensetninger, polymerer og andre materialer, og / eller doseformer som er, innenfor omfanget av sunn medisinsk bedømmelse, egnet for anvendelse i kontakt med vevene hos mennesker og dyr uten overdreven toksisitet, irritasjon, allergisk respons, eller annet problem eller komplikasjon, i samsvar med en rimelig nytte / risiko-forholdet.

25 **[52]** Uttrykket "farmasøytisk akseptabel bærer" er anerkjent innen faget, og inkluderer, for eksempel farmasøytisk akseptable materialer, sammensetninger eller vehikel, for eksempel et flytende eller fast fyllstoff, fortynningsmiddel, eksipient, løsningsmiddel eller innkapslende materiale, involvert i bæring eller transport av en hvilken som helst gjenstand sammensetning fra ett organ eller en del av kroppen til et
 30 annet organ eller en del av kroppen. Hver bærer må være "akseptabel" i betydning av å være kompatible med de andre bestanddeler i et emne sammensetning og ikke skadelig for pasienten. I visse utførelsesformer er en farmasøytisk akseptabel bærer ikke-pyrogen. Noen eksempler på materialene som kan tjene som farmasøytisk akseptable bærere omfatter: (1) sukker, så som laktose, glukose og sukrose; (2)
 35 stivelser, slik som maisstivelse og potetstivelse; (3) cellulose og dets derivater, som for

eksempel natrium-karboksymetylcellulose, etylcellulose og cellulose-acetat, (4) pulverisert tragakantgummi; (5) malt; (6) gelatin; (7) talkum; (8) eksipienter, slik som kakaosmør og stikkpillevekser; (9) oljer, for eksempel som jordnøttolje, bomullsfrøolje, solsikkeolje, sesamolje, olivenolje, maisolje og soyabønneolje, (10) glykoler, slik som propylenglykol; (11) polyoler, slik som glyserin, sorbitol, mannitol og polyetylglykol; (12) estere, slik som etyloleat og etyl - laurat, (13) agar; (14) buffermidler, slik som magnesiumhydroksid og aluminiumhydroksid; (15) alginsyre, (16) pyrogenfritt vann; (17) isoton saltløsning; (18) Ringers løsning; (19) etylalkohol; (20) fosfatbufferløsninger, og (21) andre ikke-toksiske kompatible substanser som anvendes i farmasøytiske formuleringer.

[53] En "sammensetning" eller "farmasøytisk akseptabel sammensetning" er en formulering inneholdende en forbindelse ifølge oppfinnelsen eller et salt, en solvat eller et hydrat derav. I en utførelsesform er det farmasøytiske preparat i bulk eller i enhetsdoseform. Enhets-doseringsformen er en hvilken som helst av en rekke former, inkludert, for eksempel, en kapsel, en infusjonspose, en tablett, en enkelt pumpe på en aerosol-inhalator eller en ampulle. Mengden av aktiv ingrediens (for eksempel en formulering av en forbindelse ifølge oppfinnelsen eller salter derav) i en enhetsdose av preparatet er en effektiv mengde, og blir variert i henhold til den spesielle behandlingen som er involvert. En fagmann på området vil sette pris på at det er noen ganger nødvendig å foreta rutinemessige variasjoner på doseringen avhengig av alder og tilstanden til pasienten. Doseringen vil også avhenge av administrasjonsveien. En rekke fremgangsmåter er omfattet, inkludert oral, pulmonal, rektal, parenteral, transdermal, subkutan, intravenøs, intramuskulær, intraperitonisk, intranasal, og lignende. Doseringsformer for topisk eller transdermal administrasjon av en forbindelse av denne oppfinnelse inkluderer pulvere, spray, salver, pastaer, kremer, lotions, geler, oppløsninger, plaster og sniffing. I en annen utførelsesform blir den aktive forbindelsen blandes under sterile betingelser med en farmasøytisk akseptabel bærer, og med eventuelle konserveringsmidler, buffere eller drivmidler som er nødvendige.

[54] Betegnelsen "flash dose" refererer seg til sammensatte formuleringer som er raskt dispergerende doseringsformer.

[55] Uttrykket "umiddelbar frigivelse" er definert som en frigjøring av forbindelsen fra en doseringsform i en relativt kort periode, vanligvis opp til omtrent 60 minutter. Uttrykket "modifisert frigjøring" er definert til å omfatte forsinket frigjøring, forlenget frigjøring og pulset frigjøring. Uttrykket "pulset frigjøring" er definert som en rekke utgaver av medikament fra en doseringsform. Uttrykket "forlenget frigivelse" eller

"forlenget frigivelse" er definert som kontinuerlig frigjøring av en forbindelse fra en doseringsform over en lengre periode.

[56] En "gjenstand" omfatter pattedyr, for eksempel mennesker, selskapsdyr (for eksempel, hunder, katter, fugler og lignende), husdyr (for eksempel, kyr, sauer, griser, hester, fugl og lignende) og forsøksdyr (for eksempel rotter, mus, marsvin, fugler og lignende). Vanligvis er emnet et menneske.

[57] Slik det anvendes her vil begrepet "aminosyre-konjugater" referere seg til konjugater av forbindelsene ifølge oppfinnelsen med en hvilken som helst egnet aminosyre. Taurin ($\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$) og glysin ($\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$) er eksempler på aminosyre-konjugater. Egnede aminosyre-konjugater av forbindelsene har den ytterligere fordel av forbedret integritet i galle- eller tarmfluidet. Egnede aminosyrer er ikke begrenset til taurin og glysin. Oppfinnelsen omfatter aminosyre-konjugater av forbindelsene ifølge oppfinnelsen. Nærmere bestemt innbefatter oppfinnelsen aminosyre konjugater av forbindelsen **lh3e**.

[58] Uttrykket "forbindelser ifølge oppfinnelsen" refererer seg til forbindelser med formlene som har formelen beskrevet med **lh3e**, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, hydrate eller glysin eller taurin aminosyre konjugat derav.

[59] Begrepet "TGR5 - modulator" betyr enhver forbindelse som samhandler med TGR5 - reseptoren. Denne interaksjon er ikke begrenset til en forbindelse som virker som en antagonist, agonist, partiell agonist eller invers agonist av TGR5 - reseptoren. I et aspekt kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse virker som en antagonist av TGR5 - reseptoren. I et annet aspekt kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse virker som en agonist av TGR5 - reseptoren. I et annet aspekt kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse fungerer som en partiell agonist av TGR5 - reseptoren. I et annet aspekt kan forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse som en invers agonist av TGR5 - reseptoren. Profilene for ligander er tradisjonelt endogene eller syntetiske, karakterisert ved sin iboende effekt 'e', som opprinnelig beskrevet av Furchgott i 1966. Den brukes for å uttrykke graden som de forskjellige ligander produsere varierende biologiske responser mens opptar det samme antall reseptorer. Generelt vil begrepet "agonist" betyr en forbindelse som øker aktiviteten for et annet molekyl eller et reseptor-sete. En agonist, ved den klassiske definisjonen, hvorvidt den er ortosterisk, allosterisk, inverse eller en co-agonist, har den egenskapen av å binde til reseptoren, endre sin reseptor tilstand og gi en biologisk funksjon. Følgelig er agonisme definert som en egenskap for en agonist eller en ligand for å produsere en biologisk funksjon. I motsetning til dette, er en "antagonist" i virkeligheten

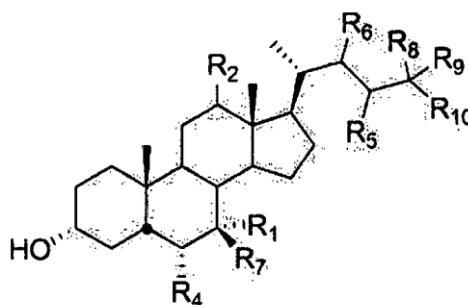
en agonist med høy affinitet til det samme reseptor makromolekylet, men med meget mindre eller ubetydelig reell effekt, og gir derved et sterisk hindrer for den biologiske effekten til en agonist. Som en egenskap, kan antagonisme være funksjonell eller fysiologisk, der en agonist er en direkte konkurranse for reseptorsetet i tidligere og motstående effekter via et annet reseptor-budbringer system i det senere. Mer spesifikt, en agonist TGR5 er en reseptor-ligand eller en forbindelse som binder seg til TG R5 og øker konsentrasjonen av cyklisk adenosinmonofosfat (cAMP) med minst 20 % i celler som uttrykker reseptoren. Omvendt, vil en TGR5 antagonist være et stoff som motvirker eller blokkerer aktiviteten for en agonist, for derved å bevirke en reduksjon i konsentrasjonen av cAMP

[60] Den foreliggende oppfinnelsen gjelder forbindelser som har TGR5 - reseptor modulerende aktivitet, og deres anvendelse for å behandle og / eller forhindre en rekke sykdommer, inkludert metabolsk sykdom, inflammatorisk sykdom, leversykdom, autoimmun sykdom, hjertesykdom, nyresykdom, kreft, og gastrointestinal sykdom. Videre, den foreliggende oppfinnelse vedrører forbindelser med formlene som har blitt beskrevet heri.

Forbindelser og sammensetninger

20

[61] Forbindelsene ifølge oppfinnelsen er definert i krav 1. Videre beskrevet her er forbindelser med formel A:



25 (A) eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvori: R₁ er hydrogen, hydroksy, substituert eller usubstituert alkyl eller halogen, R₂ er hydrogen eller α - hydroksy, R₃ er hydrogen, hydroksy, NH(CH₂)_mSO₃H, eller NH(CH₂)_nCO₂H, R₄ er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl -, eller halogen, R₅ er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl; R₆ er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller R₅ og R₆ tatt sammen med de

30 karbonatomene til hvilket de er bundet til danner en ring av størrelse 3, 4, 5 eller 6

atomer, R_7 er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl, eller hydroksy; R_8 er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl, R_9 er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl eller tatt sammen R_8 og R_9 danner en karbonylgruppe, R_{10} er R_3 eller SO_3H , m er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5, og n er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5. I et
 5 aspekt, når R_5 er metyl, R_1 er hydroksyl, og R_3 er hydroksyl eller $NHCH_2CH_2SO_3H$, da er R_4 ikke hydrogen.

[62] I et aspekt av oppfinnelsen er R_1 hydrogen eller hydroksy. R_1 er hydroksy. R_1 er hydrogen. R_2 er α - hydroksy. R_1 er hydroksy og R_2 er α - hydroksy. R_1 er hydroksy og R_2 er H. R_1 er hydroksy og R_2 er H. Minst en av R_1 eller R_2 er hydroksy.
 10 Minst en av R_1 eller R_2 er hydrogen. R_1 og R_2 er de samme. R_1 og R_2 hver er α - hydroksy. R_1 og R_2 er hver seg hydrogen.

[63] I et annet aspekt ved oppfinnelsen, vil R_{10} være R_3 . R_3 er hydroksyl, $NH(CH_2)_mSO_3H$, eller $NH(CH_2)_nCO_2H$. R_3 er hydroksyl. R_3 er ikke hydroksyl. R_3 er $NH(CH_2)_mSO_3H$. R_3 er $NH(CH_2)_mSO_3H$ og m er 2. R_3 er $NH(CH_2)_nCO_2H$. R_3 er $NH(CH_2)_nCO_2H$, og n er 1. I et annet aspekt ved oppfinnelsen, er R_4 hydrogen eller usubstituert alkyl. R_4 er hydrogen. R_4 er usubstituert alkyl. R_4 er usubstituert alkyl. R_4 er metyl eller etyl. R_4 er metyl. R_4 er etyl. R_3 og R_4 er de samme. R_3 og R_4 er forskjellige. R_3 og R_4 er hver seg hydrogen. R_3 er hydroksyl, og R_4 er hydrogen. R_3 er $NH(CH_2)_mSO_3H$ og R_4 er hydrogen. R_3 er $NH(CH_2)_mSO_3H$, R_4 er hydrogen, og m er 2.
 15 R_3 er $NH(CH_2)_nCO_2H$, og R_4 er hydrogen. R_3 er $NH(CH_2)_nCO_2H$, R_4 er hydrogen, og n er 1. R_3 er H og R_4 er usubstituert alkyl. R_3 er OH og R_4 er metyl. R_3 er OH og R_4 er etyl. R_3 er OH og R_4 er metyl.
 20

[65] I et annet aspekt er R_5 en usubstituert eller substituert alkyl. R_5 er i S - konfigurasjonen. R_5 er i R- konfigurasjonen. R_5 er metyl eller etyl. R_5 er S- metyl. R_5 er R- metyl. R_5 er S-etyl. R_5 er R etyl. R_5 er substituert alkyl substituert med fenyl. R_5 er benzyl. R_5 er S-benzyl. R_5 er R-benzyl. R_5 er aryl. R_5 er fenyl. R_4 og R_5 er hver segusubstituert alkyl. R_4 og R_5 er hver usubstituert alkyl -, hvor R_5 er i S - konfigurasjon og R_4 er i alfa-konfigurasjon. R_4 og R_5 er hver usubstituert alkyl, og R_1 er hydroksy. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert alkyl, og R_2 er hydrogen. R_4 og R_5 er hver usubstituert
 25 alkyl, R_1 er hydroksy og R_2 er hydrogen.
 30

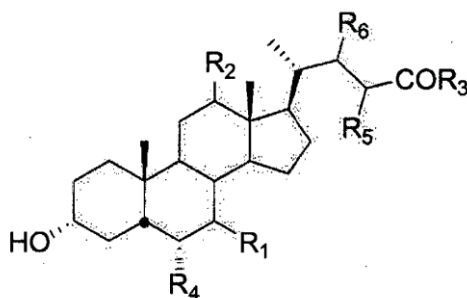
[66] I et aspekt av oppfinnelsen vil R_1 , R_2 , R_3 og R_4 være hydrogen. R_2 , R_3 og R_4 er hydrogen. R_2 og R_3 er hydrogen. Minst en av R_1 , R_2 , R_3 , eller R_4 er hydrogen. Minst to av R_1 , R_2 , R_3 , eller R_4 er hydrogen. Minst tre av R_1 , R_2 , R_3 , eller R_4 er hydrogen. Minst fire av R_1 , R_2 , R_3 , eller R_4 er hydrogen.

- [67]** I et aspekt av oppfinnelsen er R_1 , R_2 , og R_4 hydrogen og R_3 er OH. R_2 og R_4 er hydrogen og R_3 er OH. R_2 er hydrogen og R_3 er OH. Minst en av R_1 , R_2 eller R_4 er hydrogen og R_3 er OH. Minst to av R_1 , R_2 eller R_4 er hydrogen og R_3 er OH. R_1 , R_2 og R_4 er hydrogen og R_3 er OH.
- 5 **[68]** I et annet aspekt ved oppfinnelsen er minst en av R_1 eller R_7 et usubstituert alkyl. Minst en av R_1 eller R_7 er metyl. Minst en av R_1 eller R_7 er etyl. Minst en av R_1 eller R_7 er propyl. R_1 er metyl. R_1 er etyl. R_1 er propyl. R_7 er metyl. R_7 er etyl. R_7 er propyl. Både R_1 og R_7 er usubstituert alkyl. Både R_1 og R_7 er metyl. Både R_1 og R_7 er etyl. R_7 er hydrogen. R_7 er hydroksy. R_1 er hydrogen. R_1 er hydroksyl. En av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og den andre R_1 eller R_7 er hydrogen. En av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og den andre R_1 eller R_7 er hydroksy. Minst en av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og R_5 er usubstituert eller substituert alkyl. Minst en av R_1 eller R_7 er metyl, og R_5 er metyl. R_7 er hydroksy, og både R_1 og R_5 er usubstituert alkyl. R_1 er hydroksyl, og både R_7 og R_5 er usubstituert alkyl. Minst en av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og R_5 er usubstituert eller substituert alkyl, videre karakterisert ved at R_5 er i S - konfigurasjon. Minst en av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og R_5 er usubstituert eller substituert alkyl, videre karakterisert ved at R_5 er i R- konfigurasjonen.
- 10 **[69]** I et annet aspekt er R_1 hydroksy, og R_7 er metyl. R_1 er metyl og R_7 er hydroksy. R_6 er usubstituert alkyl. R_6 er metyl. R_6 er etyl. R_6 er propyl.
- 15 **[70]** I et annet aspekt, er R_8 hydrogen. R_8 er usubstituert alkyl. R_8 er metyl. R_8 er etyl. R_8 er propyl. R_2 er α - hydroksy-og R_8 er usubstituert alkyl. I et annet aspekt, danner R_8 og R_9 en karbonylgruppe.
- 20 **[71]** I et annet aspekt vil R_{10} være R_3 . R_3 er hydroksyl. Minst en av R_8 eller R_9 er hydrogen. R_8 og R_9 begge er hydrogen. Minst en av R_8 eller R_9 er usubstituert alkyl. Minst en av R_8 eller R_9 er metyl. Minst en av R_8 eller R_9 er etyl. I et annet aspekt vil R_{10} være SO_3H .
- 25 **[72]** I et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelse, når R_2 , R_4 og R_6 hver seg er hydrogen, er R_3 hydroksyl, og den ene av R_1 og R_7 er hydrogen eller hydroksyl, og den andre R_1 eller R_7 er ikke metyl. I et annet aspekt, når R_2 er α - OH, er R_3 hydroksyl, R_4 og R_6 er hver seg hydrogen, og den ene av R_1 og R_7 er hydrogen eller hydroksyl, da er den andre R_1 eller R_7 ikke metyl. I et annet aspekt vil den foreliggende oppfinnelse ikke inkludere følgende forbindelser: 3 α , 7 α - dihydroksy-7 β -metyl -5 β -kolanoisk syre, 3- α , 7 β -dihydroksy-7- α - metyl - 5 - β -kolanoisk syre, 3- α - hydroksy-7- ϵ - metyl - 5- β -kolanoisk syre, 3- α , 7 β 12 α - trihydroksy-7- α - metyl - 5 - β -Kolan- 24 -
- 30

oisk syre, 3- α , 7 α , 12 α - trihydroksy-7 β - metyl - 5 β -kolan- 24 - oisk-syre, og 3 α , 12 α - dihydroksy-7 ϵ - metyl - 5- β -kolan- 24 - oisk-syre.

[73] I et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelse, når R_3 er hydroksyl, og den ene av R_1 og R_7 er metyl, og den andre R_1 og R_7 er hydrogen eller hydroksyl, og R_2 , R_4 og R_6 ikke alle er hydrogen. I et annet aspekt, når R_2 er α - OH, R_3 er hydroksyl, og en av R_1 og R_7 er metyl, og den andre R_1 og R_7 er hydrogen eller hydroksyl, og R_4 og R_6 ikke alle er hydrogen.

[74] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse med formel I:



10

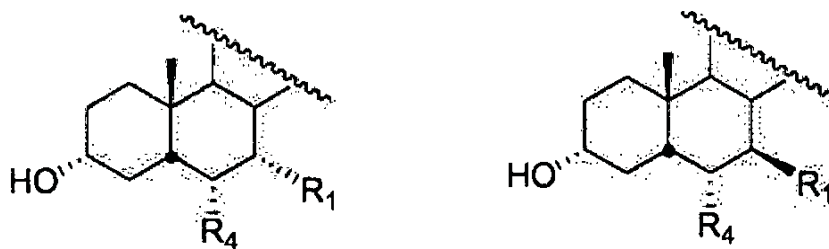
(I) eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvori: R_1 er hydrogen, hydroksy, eller halogen, R_2 er hydrogen eller α - hydroksy, R_3 er hydroksy, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, eller $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_4 er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller halogen, R_5 er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl, R_6 er hydrogen eller R_5 og R_6 tatt sammen med de karbonatomer til hvilke de er bundet danner en ring av størrelse 3, 4, 5 eller 6 atomer, m er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5, og n er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5. I et aspekt, når R_5 er metyl, vil R_1 være hydroksyl, og R_3 er hydroksyl eller $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, da er R_4 ikke hydrogen.

15

[75] I et aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse forbindelser hvor R_1 er hydrogen eller hydroksy. R_1 er hydroksy. R_1 er hydrogen. R_1 er α - hydroksy. R_1 er β -hydroksy.

20

[76] I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse forbindelser hvor R_1 er halogen. R_1 er fluor. R_1 er α - fluor. R_1 er β -fluor. Stereokjemien for R_1 i α - og β - konfigurasjoner er vist nedenfor:



R₁ alfa (α -) konfigurasjon

R₁ alfa (β -) konfigurasjon.

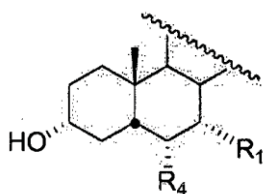
5

[77] I et annet aspekt er det forbindelser hvor R₂ er α - hydroksy. R₂ er hydrogen. R₁ er β -hydroksy og R₂ er α - hydroksy. R₁ er β -hydroksy og R₂ er H. R₁ er α - hydroksy, og R₂ er H.

[78] I et annet aspekt er det forbindelser hvor hvor minst den ene av R₁ eller R₂ er hydroksy. I et annet aspekt er det forbindelser hvor minst den ene av R₁ eller R₂ er hydrogen. R₁ og R₂ er de samme. R₁ og R₂ er hver seg α - hydroksy. R₁ og R₂ er hver seg hydrogen.

[79] I et annet aspekt tilveiebringer foreliggende oppfinnelse forbindelser hvor R₃ er hydrogen, hydroksyl, NH(CH₂)_mSO₃H, eller NH(CH₂)_nCO₂H. R₃ er hydroksyl. R₃ er ikke en hydroksy. R₃ er NH(CH₂)_mSO₃H. I et annet aspekt er R₃ NH(CH₂)_mSO₃H og m er 2. R₃ er NH (CH₂)_nCO₂H. I et annet aspekt er R₃ NH(CH₂)_nCO₂H, og n er 1.

[80] I et annet aspekt er R₄ hydrogen eller alkyl. R₄ er hydrogen. R₄ er lavere alkyl. R₄ er lavere alkyl, og den lavere alkylgruppe er i alfalfa-konfigurasjon. R₄ i alfalfa-konfigurasjonen gjør at R₄ har den stereokjemien som er vist i strukturen nedenfor.

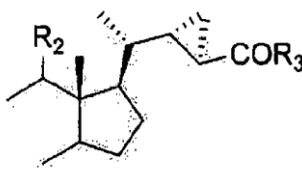


20

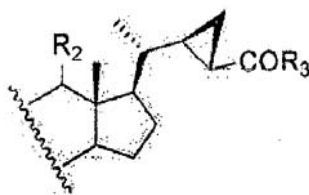
R₄ alfa (α -) konfigurasjon.

[81] I et annet aspekt vil R₄ være halogen. R₄ er fluor. R₄ er halogen, og halogenet er i alfa-konfigurasjon. R₄ er α - fluor.

- [82]** I et annet aspekt er R_4 metyl eller etyl. R_4 er metyl. R_4 er etyl. R_4 er α -metyl. R_4 er α -etyl. R_3 og R_4 er de samme. R_3 og R_4 er forskjellige. R_3 og R_4 er hver seg hydrogen. R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ og R_4 er hydrogen. R_3 er hydroksyl, og R_4 er hydrogen. I et annet aspekt er R_3 $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, R_4 er hydrogen og m er 2. R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, og R_4 er hydrogen. I et annet aspekt er R_3 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_4 er hydrogen og n er 1.
- [83]** I et annet aspekt er R_3 OH, og R_4 er alkyl. R_3 er OH og R_4 er lavere alkyl. Lavere alkyl står i alfalfa-konfigurasjon. R_3 er OH og R_4 er metyl. R_3 er OH og R_4 er etyl. R_3 er OH og R_4 er α -metyl. R_3 er OH og R_4 er α -etyl.
- 10 **[84]** I et annet aspekt er R_5 en usubstituert eller substituert alkyl. R_5 er usubstituert eller substituert lavere alkyl. R_5 er i S-konfigurasjon. R_5 er i R-konfigurasjon. R_5 er metyl eller etyl. R_5 er S-metyl. R-metyl. R_5 er S-etyl. R-etyl. R_5 er alkyl substituert med fenyl. R_5 er lavere alkyl substituert med fenyl. R_5 er benzyl. R_5 er S-benzyl. R_5 er R-benzyl.
- 15 **[85]** I et annet aspekt er R_5 aryl. R_5 er fenyl.
- [86]** I et annet aspekt, R_4 og R_5 er hver seg usubstituert alkyl. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert lavere alkyl. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert lavere alkyl, og R_5 er i S-konfigurasjon. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert lavere alkyl, og R_4 er i alfa-konfigurasjon. I et annet aspekt er R_4 og R_5 ikke hydrogen.
- 20 **[87]** I et annet aspekt er R_4 og R_5 hver seg usubstituert lavere alkyl, og R_1 er α -hydroksy. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert lavere alkyl, og R_2 er hydrogen. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert lavere alkyl, R_1 er α -hydroksy og R_2 er hydrogen.
- [88]** I et annet aspekt er R_5 og R_6 tatt sammen med de karbonatomer til hvilket de er festet og danner en ringstørrelse på 3, 4, 5 eller 6 atomer. R_5 og R_6 tatt sammen med de karbonatomer til hvilke de er bundet danner en 3-leddet ring. Den 3-leddete ringen har følgende stereokjemi:



Den 3-leddete ringen har følgende stereokjemien:

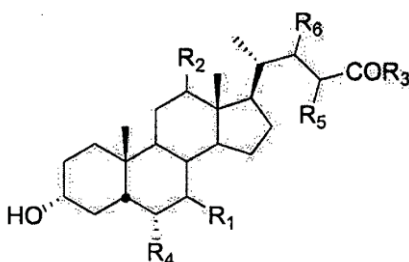


[89] I et annet aspekt er R_1 , R_2 , R_3 og R_4 hydrogen. R_2 , R_3 og R_4 er hydrogen. R_2 og R_3 er hydrogen. I et annet aspekt er R_1 , R_2 , og R_4 er hydrogen og R_3 er OH. R_2 og R_4 er hydrogen og R_3 er OH. R_2 er hydrogen og R_3 er OH.

[90] I et annet aspekt er minst en av R_1 , R_2 , R_3 eller R_4 hydrogen. I et annet aspekt er minst to av R_1 , R_2 , R_3 eller R_4 hydrogen. I et annet aspekt, er minst tre av R_1 , R_2 , R_3 eller R_4 hydrogen. I et annet aspekt er R_1 , R_2 , R_3 og R_4 hydrogen. I et annet aspekt er minst en av R_1 , R_2 eller R_4 hydrogen og R_3 er OH. I et annet aspekt er minst to av R_1 , R_2 eller R_4 hydrogen og R_3 er OH. I et annet aspekt vil de beskrevne forbindelsene ikke være inkludert når R_5 er metyl, R_4 er hydrogen og R_2 er H eller OH.

[91] Det er også beskrevet forbindelser valgt fra forbindelsene **la, lb, lc, lg, lh, li, lo, lp, lq, la1, lb1, lc1, lg1, lh1, li1, ll1, lm1, ln1, lo1, lp1, lq1, la2, lb2, lc2, ld2, le2, lf2, lg2, lh2, li2, ll2, lm2, ln2, lo2, lp2, lq2, la3, lb3, lc3, ld3, le3, lf3, lg3, lh3, li3, ll3, lm3, ln3, la4, lb4, lc4, ld4, le4, lf4, lg4, lh4, li4, ll4, lm4, ln4, la5, lb5, lc5, ld5, le5, lf5, lg5, lh5, li5, ll5, lm5, ln5, lb3e, lc3e, ld3e, le3e, lf3e, lg3e, lh3e, li3e, ll3e, lm3e, ln3e, la4e, lb4e, lc4e, ld4e, le4e, lf4e, lg4e, lh4e, li4e, ll4e, lm4e, ln4e, la5e, lb5e, lc5e, ld5e, le5e, lf5e, lg5e, lh5e, ll5e, ll5e, lm5e, lo5, lp5, lq5 og lr5.**

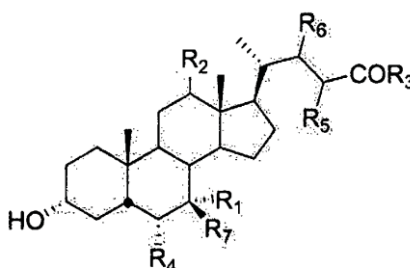
[92] Også skrevet for informasjon bare, er en sammensetning eller et preparat som omfatter en forbindelse med formel I:



(I), eller et salt, solvat eller hydrat derav, og minst én farmasøytisk akseptabel ekspiens, hvor R_1 er hydrogen, hydroksey eller halogen, R_2 er hydrogen eller α -hydroksey, R_3 er hydroksey, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, eller $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_4 er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller halogen, R_5 er usubstituert eller substituert lavere alkyl, eller aryl, R_6 er hydrogen eller R_5 og R_6 tatt sammen med de

karbonatomer hvortil de er knyttet danner en ring av størrelse 3, 4, 5 eller 6 atomer, m er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5, og n er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5. I et annet aspekt innbefatter foreliggende oppfinnelse et preparat eller medikament som omfatter en forbindelse med formel I med det forbehold at når R_5 er metyl er R_1 hydroksyl, og R_3 er hydroksy eller $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, og da er R_4 ikke hydrogen.

[93] Også beskrevet for informasjon bare, er forbindelser med formel IA:



(IA) eller et salt, solvat eller et hydrat derav, hvori: R_1 er hydrogen, hydroksy, substituert eller usubstituert alkyl eller halogen, R_2 er hydrogen eller α -hydroksy, R_3 er hydroksy, hydrogen, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ eller $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_4 er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl- eller halogen, R_5 er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl; R_6 er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller R_5 og R_6 tatt sammen med de karbonatomene til hvilket de er bundet til og danner en ring av størrelse 3, 4, 5 eller 6 atomer, R_7 er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl, eller hydroksy, m er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5, og n er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5 I et aspekt, når R_5 er metyl så er R_1 hydroksyl, og R_3 er hydroksy eller $\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, og R_4 er da ikke hydrogen.

[94] I et aspekt er R_1 hydrogen eller hydroksy. R_1 er hydroksy. R_1 er hydrogen. R_1 er hydroksy og R_2 er α -hydroksy. R_1 er hydroksy og R_2 er H. R_1 er hydroksy og R_2 er H. I det minste en av R_1 eller R_2 er hydroksy. Minst den ene av R_1 eller R_2 er hydrogen. R_1 og R_2 er like. R_1 er hydroksyl, og R_2 er α -hydroksy. R_1 og R_2 er hvert seg hydrogen.

[95] I et aspekt er R_3 hydrogen, hydroksy, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, eller $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$. R_3 er hydroksy. R_3 er ikke hydroksy. R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$. R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ og m er 2. R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$. R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, og n er 1.

[96] I et annet aspekt er R_4 hydrogen eller usubstituert alkyl. R_4 er hydrogen. R_4 er usubstituert alkyl. R_4 er usubstituert alkyl. R_4 er metyl eller etyl. R_4 er metyl. R_4 er

etyl. R_3 og R_4 er de samme. R_3 og R_4 er forskjellige. R_3 og R_4 er hver seg hydrogen. R_3 er OH og R_4 er hydrogen.

[97] I et annet aspekt er R_3 $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$ og R_4 er hydrogen. R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, R_4 er hydrogen, og m er 2. R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, og R_4 er hydrogen.
 5 R_3 er $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_4 er hydrogen, og n er 1. R_3 er OH og R_4 er usubstituert alkyl. R_3 er OH og R_4 er usubstituert alkyl. R_3 er OH og R_4 er metyl. R_3 er OH og R_4 er etyl. R_3 er OH og R_4 er metyl.

[98] I et aspekt er R_5 en usubstituert eller substituert alkyl. R_5 er i S - konfigurasjon. R_5 er i R - konfigurasjon. R_5 er metyl eller etyl. R_5 er S - metyl. R_5 er R - metyl. R_5 er S - etyl. R_5 er R etyl. R_5 er substituert med fenyl. R_5 er benzyl. R_5 er S - benzyl. R_5 er R-benzyl. I et annet aspekt er R_5 aryl. For eksempel er R_5 fenyl.
 10

[99] R_4 og R_5 er hver usubstituert alkyl. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert alkyl, videre karakterisert ved at R_5 er i S - konfigurasjon. R_4 og R_5 er hver usubstituert alkyl. R_4 og R_5 er hver usubstituert alkyl, og R_1 er hydroksy. R_4 og R_5 er hver usubstituert
 15 alkyl, og R_2 er hydrogen. R_4 og R_5 er hver usubstituert alkyl, R_1 er hydroksy og R_2 er hydrogen.

[100] I et aspekt er R_1 , R_2 , R_3 og R_4 hydrogen. R_2 , R_3 og R_4 er hydrogen. R_2 og R_3 er hydrogen. Minst en av R_1 , R_2 , R_3 eller R_4 er hydrogen. Minst to av R_1 , R_2 , R_3 eller R_4 er hydrogen. Minst tre av R_1 , R_2 , R_3 eller R_4 er hydrogen. R_1 , R_2 , R_3 og R_4 er
 20 hydrogen.

[101] I et aspekt er R_1 , R_2 og R_4 hydrogen og R_3 er OH. R_2 og R_4 er hydrogen og R_3 er OH. R_2 er hydrogen og R_3 er OH. Minst den ene av R_1 , R_2 eller R_4 er hydrogen og R_3 er OH. Minst to av R_1 , R_2 eller R_4 er hydrogen og R_3 er OH. Alle av R_1 , R_2 og R_4 er hydrogen og R_3 er OH.

[102] I et annet aspekt er minst et av R_1 eller R_7 usubstituert alkyl. Minst én av R_1 og R_7 er metyl. Minst en av R_1 eller R_7 er etyl. Minst en av R_1 eller R_7 er propyl. Både R_1 og R_7 er usubstituert alkyl. Både R_1 og R_7 er metyl. Både R_1 og R_7 er etyl. R_1 og R_7 er like. R_1 og R_7 er forskjellige. R_7 er hydrogen. R_7 er hydroksy. En av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og de gjenværende R_1 eller R_7 er hydrogen. En av R_1 eller R_7 er
 30 usubstituert alkyl, og de gjenværende R_1 eller R_7 er hydroksy. Minst en av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl og R_5 er usubstituert eller substituert alkyl. Minst en av R_1 eller R_7 er metyl, og R_5 er metyl.

[103] Både R_1 og R_5 er usubstituert alkyl, og R_7 er hydroksy. Både R_7 og R_5 er usubstituert alkyl, og R er hydroksy. R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og R_5 er
 35 usubstituert eller substituert alkyl videre hvor R_5 er i S - konfigurasjon. R_1 eller R_7 er

usubstituert alkyl, og R_5 er usubstituert eller substituert alkyl, videre hvor R_5 er i R - konfiguration.

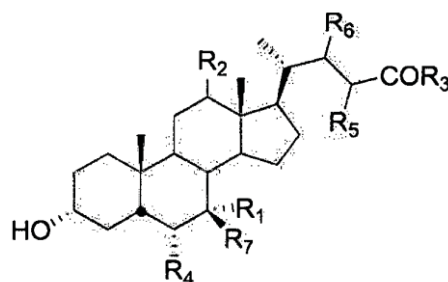
5 **[104]** I et annet aspekt er R_1 hydroksy og R_7 er metyl. R_1 er metyl og R_7 er hydroksy. R_6 er usubstituert alkyl. R_6 er metyl. R_6 er etyl. R_2 og R_6 er hver seg hydrogen. R_2 og R_6 er hydrogen og R_5 er usubstituert alkyl. R_2 og R_6 er hydrogen, er R_5 usubstituert alkyl, og minst en av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl.

10 **[105]** I et aspekt velges forbindelsen fra forbindelser **la6, lb6, lc6, lg6, lh6, li6, lo6, lp6, lq6, la7, lb7, lc7, lg7 lh7, li7, ll7, lm7, ln7, lo7, lp7, lq7, la8, lb8, lc8, ld8, le8, lf8, lg8, lh8, li8, ll8, lm8, ln8, loS, lp8, lq9, la9, lb9, lc9, ld9, le9, lf9, lg9, lh9, li9, ll9, lm9, ln9, la10, lb10, lc10, ld10, le10, lf10, lg10, lh10, li10, ll10, lm10, ln10, la11, lb11, lc11, ld11, le11, lf11, lg11, lh11, li11, ll11, lm11, ln11, la9e, lb9e, lc9e, ld9e, le9e, lf9e, lg9e, lh9e, li9e, ll9e, lm9e, ln9e, la10e, lb10e, lc10e, ld10e, le10e, lf10e, lg10e, lh10e, li10e, ll10e, lm10e, ln10e, la11e, lb11e, lc11e, ld11e lf11e, lg11e, lh11e, li11e, ll11e, lm11e og ln11e.**

15 **[106]** I et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelse, når R_2 , R_4 og R_6 begge er hydrogen, er R_3 hydroksyl, og en av R_1 og R_7 er hydrogen eller hydroksyl, og den andre R_1 eller R_7 er ikke metyl. I et annet aspekt, når R_2 er α - OH, er R_3 hydroksyl, R_4 og R_6 er hver seg hydrogen, og en av R_1 og R_7 er hydrogen eller hydroksyl, og den andre R_1 eller R_7 er ikke metyl. I et annet aspekt vil den foreliggende oppfinnelse ikke
20 inkluderer de følgende forbindelsene: 3 α , 7 α - dihydroksy-7 β -metyl -5 β -kolanoisk syre, 3- α , 7 β -dihydroksy-7- α - metyl - 5 - β -kolanoisk syre, 3- α - hydroksy-7- ϵ - metyl - 5- β -kolanoisk syre, 3- α , 7 β 12 α - trihydroksy-7- α - metyl - 5 - β - kolan- 24 - oisk syre, 3- α , 7 α , 12 α - trihydroksy-7 β - metyl - 5 β -kolan- 24 - oisk syre, og 3 α , 12 α - dihydroksy-7 ϵ - metyl - 5 - β - kolan- 24 - oisk syre.

25 **[107]** I et annet aspekt av den foreliggende oppfinnelse, når R_3 er hydroksyl, og en av R_1 og R_7 er metyl, og den andre R_1 og R_7 er hydrogen eller hydroksyl, og R_2 , R_4 og R_6 ikke alle er hydrogen. I et annet aspekt, når R_2 er α - OH, R_3 er hydroksyl, og en av R_1 og R_7 er metyl, og den andre R_1 og R_7 er hydrogen eller hydroksyl, og R_4 og R_6 ikke er hydrogen.

30 **[108]** Også beskrevet for informasjon bare er en sammensetning eller medikament som omfatter en forbindelse av formel IA:

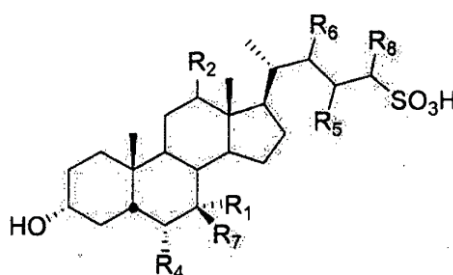


(IA), eller et salt, solvat eller hydrat derav, og minst én farmasøytisk akseptabel
eksipiens, hvor: R₁ er hydrogen, hydroksy, substituert eller usubstituert alkyl eller
5 halogen, R₂ er hydrogen eller α - hydroksy, R₃ er hydroksy, NH(CH₂)_mSO₃H, eller
NH(CH₂)_nCO₂H, R₄ er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl -, eller halogen, R₅
er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl; R₆ er hydrogen, usubstituert eller
substituert alkyl, eller R₅ og R₆ tatt sammen med de karbonatomer til hvilke de er
bundet danner en ring av størrelse 3, 4, 5 eller 6 atomer, R₇ er hydrogen, substituert
10 eller usubstituert alkyl eller hydroksy, og m er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4, eller 5, og n er et
helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5.

[109] I et aspekt av oppfinnelsen, når R₅ er metyl, vil R₁ være hydroksyl, og R₃
er hydroksyl eller NHCH₂CH₂SO₃H, da vil R₄ ikke være hydrogen.

[110] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse med formel II:

15



(II) eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvori: R₁ er hydrogen, hydroksy, substituert
eller usubstituert alkyl eller halogen, R₂ er hydrogen eller α - hydroksy, R₄ er hydrogen,
20 substituert eller usubstituert alkyl, eller halogen, R₅ er usubstituert eller substituert alkyl
eller aryl; R₆ er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller R₅ og R₆ tatt sammen
med de karbonatomer til hvilket de er bundet, og danner en ring av størrelse 3, 4, 5
eller 6 atomer; R₇ er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl eller hydroksy; og R₈
er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl. I et aspekt, når R₅ er metyl og R₁ er
25 hydroksyl, da er R₄ ikke hydrogen.

[111] I et aspekt er R_1 hydrogen eller hydroksy. R_1 er hydroksy. R_1 er hydrogen. R_1 er β - hydroksy. R_2 er α - hydroksy. R_1 er hydroksy og R_2 er α - hydroksy. R_1 er hydroksy og R_2 er H. I det minste en av R_1 eller R_2 er hydroksy. Minst en av R_1 eller R_2 er hydrogen. R_1 og R_2 er like. R_1 er hydroksyl, og R_2 er α - hydroksy. R_1 og R_2 er hver seg hydrogen.

[112] I et annet aspekt, er R_4 hydrogen eller usubstituert alkyl. R_4 er hydrogen. R_4 er usubstituert alkyl. R_4 er usubstituert alkyl. R_4 er metyl eller etyl. R_4 er metyl. R_4 er etyl.

[113] I et aspekt er R_5 en usubstituert eller substituert alkyl. R_5 er i S - konfigurasjon. R_5 er i R-konfigurasjon. R_5 er metyl eller etyl. R_5 er S - metyl. R_5 er R - metyl. R_5 er S - etyl. R_5 er R - etyl. R_5 er substituert med fenyl. R_5 er benzyl. R_5 er S - benzyl. R_5 er R - benzyl. R_5 er aryl. R_5 er fenyl. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert alkyl. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert alkyl, ytterligere hvor R_5 er i S - konfigurasjonen. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert alkyl og R_1 er hydroksy. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert alkyl, og R_2 er hydrogen. R_4 og R_5 er hver seg usubstituert alkyl, R_1 er hydroksy og R_2 er hydrogen.

[114] I et aspekt er R_1 , R_2 og R_4 hydrogen. R_2 og R_4 er hydrogen. R_2 er hydrogen. Minst en av R_1 , R_2 eller R_4 er hydrogen. Minst to av R_1 , R_2 eller R_4 er hydrogen. Alle av R_1 , R_2 eller R_4 er hydrogen.

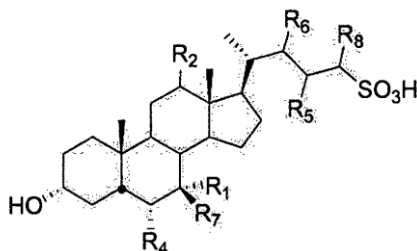
[115] I et aspekt er R_1 eller R_7 usubstituert alkyl. R_1 eller R_7 er metyl. R_1 eller R_7 er etyl. R_1 eller R_7 er propyl. Både R_1 og R_7 er usubstituert alkyl. R_7 er hydrogen. R_7 er hydroksy. En av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og de gjenværende R_1 eller R_7 er hydrogen. En av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og de gjenværende R_1 eller R_7 er hydroksy. Minst en av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og R_5 er usubstituert eller substituert alkyl. Minst en av R_1 eller R_7 er metyl, og R_5 er metyl. R_7 er hydroksy, og både R_1 og R_5 er usubstituert alkyl. R_1 er hydroksy, og både R_7 og R_5 er usubstituert alkyl. Minst en av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og R_5 er usubstituert eller substituert alkyl, videre hvor R_5 er i S - konfigurasjon. Minst en av R_1 eller R_7 er usubstituert alkyl, og R_5 er usubstituert eller substituert alkyl, videre karakterisert ved at R_5 er i R - konfigurasjon. R_7 er hydroksy, og både R_1 og R_5 er usubstituert alkyl, videre hvor R_5 er i S - konfigurasjon. R_7 er hydroksy, og både R_1 og R_5 er usubstituert alkyl, videre hvor R_5 er i R - konfigurasjon. R_1 er hydroksy og både R_7 og R_5 er usubstituert alkyl, videre hvor R_5 er i S - konfigurasjon. R_1 er hydroksy og både R_7 og R_5 er usubstituert alkyl, videre hvor R_5 er i R - konfigurasjon. R_1 er hydroksy og R_7 er metyl. R_1 er metyl og R_7 er hydroksy.

[116] I et annet aspekt, er R6 substituert alkyl. R6 er metyl. R6 er etyl. R8 er hydrogen.

[117] R8 er usubstituert alkyl. R8 er metyl. R8 er etyl. R2 er α - hydroksy-og R8 er usubstituert alkyl.

5 [118] Også beskrevet for informasjon bare, blir forbindelsen valgt fra forbindelsene: **la12, lb12, lc12, lg12, lh12, li12, lo12, lp12, lq12, la13, lb13, lc13, lg13, lh13, li13, ll13, lm13, ln13, lo13, lp13, lq13, la14, lb14, lc14, ld14, le14, lf14, lg14, lh14, li14, ll14, lm14, ln14, lo14, lp14, lq14, la15, lb15, lc15, ld15, le15, lf15, lg15, lh15, li15, ll15, lm15, ln15, la16, lb16, lc16, ld16, le16, lf16, lg16, lh16, li16,**
 10 **ll16, lm16, ln16, la17, lb17, lc17, ld17, le17, lf17, lg17, lh17, li17, ll17, lm17, ln17, la15e, lb15e, lc15e, ld15e, le15e, lf15e, lg15e, lh15e, li15e, ll15e, lm15e, ln15e, la16e, lb16e, lc16e, ld16e, le16e, lf16e, lg16e, lh16e, li16e, ll16e, lm16e, ln16e, la17e, lb17e, lc17e, ld17e, le17e, lm17e, lg17e, lh17e, li17e, ll17e, lm17e og ln17e.**

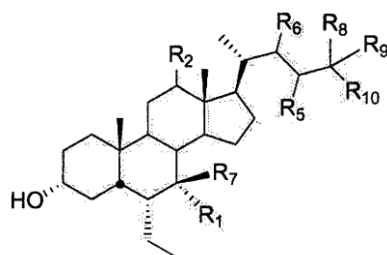
[119] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse med formel II:



15

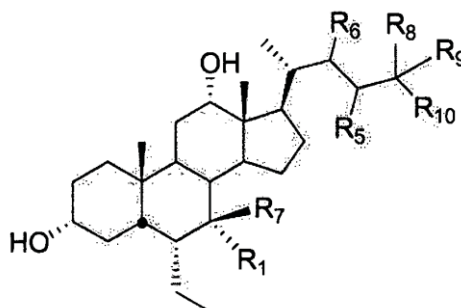
(II), eller et salt, solvat eller hydrat derav, og minst én farmasøytisk akseptabel eksipiens, hvor: R₁ er hydrogen, hydroksy, substituert eller usubstituert alkyl eller halogen, R₂ er hydrogen eller α - hydroksy, R₄ er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl -, eller halogen, R₅ er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl; R₆
 20 er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller R₅ og R₆ tatt sammen med de karbonatomer til hvilket de er bundet, danner en ring av størrelse 3, 4, 5 eller 6 atomer, R₇ er hydrogen, substituert eller usubstituert alkyl, eller hydroksy, og R₈ er hydrogen eller substituert eller usubstituert alkyl. I et aspekt, når R₅ er metyl, R₁ er hydroksyl, og R₃ er hydroksyl eller NHCH₂CH₂SO₃H, da er R₄ ikke hydrogen.

25 [120] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse med formel III:



(III) eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R₁ er hydrogen, hydroksy eller halogen, R₂ er hydrogen eller α -hydroksy, R₃ er hydroksy, NH(CH₂)_mSO₃H, eller NH(CH₂)_nCO₂H, R₅ er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl, R₆ er hydrogen eller R₅ og R₆ tatt sammen med de karbonatomer hvortil de er bundet til, danner en ring av størrelse 3, 4, 5 eller 6 atomer, R₇ er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl eller hydroksy, R₈ er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, R₉ er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller R₈ og R₉ tatt sammen med karbonatomet til hvilket de er bundet til, danner en karbonylgruppe, R₁₀ er R₃ eller SO₃H, m er et heltall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5, og n er et heltall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5.

[121] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse med formel IIIA:

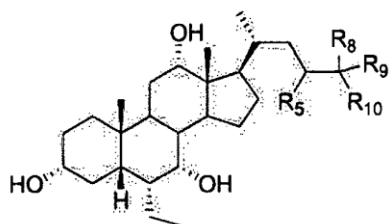


(IIIa) eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R₁ er hydrogen, hydroksy eller halogen; R₃ er hydroksy, NH(CH₂)_mSO₃H, eller NH(CH₂)_nCO₂H, R₅ er usubstituert eller substituert alkyl, eller aryl, R₆ er hydrogen eller R₅ og R₆ tatt sammen med de karbonatomer til hvilke de er bundet danner en ring av størrelse 3, 4, 5 eller 6 atomer, R₇ er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl eller hydroksy, R₈ er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, R₉ er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller R₈ og R₉ tatt sammen med karbonatomet til hvilket de er bundet til, danner en karbonylgruppe, R₁₀ er R₃ eller SO₃H, m er et heltall 0, 1, 2, 3, 4, eller 5, og n er et heltall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R₁ er hydroksyl.

[122] Det er også beskrevet en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_8 og R_9 tatt sammen med karbonet til hvilket de er bundet til, danner en karbonylgruppe, og R_{10} er R_3 . I et aspekt er R_3 valgt fra hydroksy, $NH(CH_2)_2SO_3H$ og $NHCH_2CO_2H$. I et aspekt er R_3 hydroksy. I et aspekt er R_3 $NH(CH_2)_2SO_3H$. I et aspekt er R_3 $NHCH_2CO_2H$. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_6 er hydrogen. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvori R_5 er usubstituert alkyl. I et aspekt er R_5 metyl. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er i S - konfigurasjon. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er i S - konfigurasjon, og R_5 er metyl. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_7 er hydrogen.

[123] Et aspekt av oppfinnelsen innbefatter en forbindelse valgt fra forbindelser $lg3e$, $lh3e$, $li3e$, $lg4e$, $lh4e$, $li4e$, $lg5e$, $lh5e$ og $li5e$

[124] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse med formel IIIB:

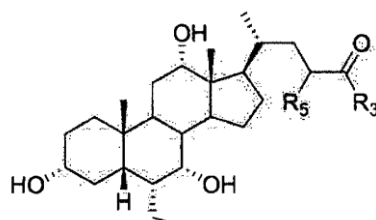


(IIIB) eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_3 er hydroksy, $NH(CH_2)_mSO_3H$, eller $NH(CH_2)_nCO_2H$, R_5 er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl, R_8 er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, R_9 er hydrogen, usubstituert eller substituert alkyl, eller R_8 og R_9 tatt sammen med karbonatomet til hvilket de er bundet til, danner en karbonylgruppe, R_{10} er R_3 eller SO_3H , m er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5, og n er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvori R_5 er usubstituert alkyl. I et aspekt er R_5 metyl. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er i S-konfigurasjon. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er i S-konfigurasjon, og R_5 er metyl. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_8 og R_9 tatt sammen med karbonet til hvilket de er bundet til, danner en karbonylgruppe. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat

derav, hvor R_{10} er R_3 . I et aspekt er R_3 valgt fra hydroksy, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ og $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. I et aspekt er R_3 hydroksy. I et aspekt er R_3 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$. I et aspekt er R_3 $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$.

[125] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse med formel IIIC:

5

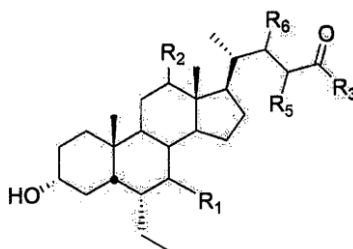


(IIIC) eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_3 er hydroksy, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, eller $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_5 er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl, m er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5, og n er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5. Ett aspekt ved oppfinnelsen
 10 omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_3 er valgt fra hydroksy-, $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$ og $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. I et aspekt er R_3 hydroksy. I et aspekt er R_3 $\text{NH}(\text{CH}_2)_2\text{SO}_3\text{H}$. I et aspekt er R_3 $\text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er usubstituert alkyl. I et aspekt er R_5 metyl.

15 **[126]** Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er i S – konfigurasjon. Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er i S – konfigurasjon og R_5 er metyl.

[127] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse med formel IV:

20



(IV) eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvori: R_1 er hydrogen, hydroksy, eller halogen, R_2 er hydrogen eller α - hydroksy, R_3 er hydroksy, $\text{NH}(\text{CH}_2)_m\text{SO}_3\text{H}$, eller
 25 $\text{NH}(\text{CH}_2)_n\text{CO}_2\text{H}$, R_5 er usubstituert eller substituert alkyl eller aryl, R_6 er hydrogen eller R_5 og R_6 tatt sammen med de karbonatomer til hvilke de er bundet danner en ring av

størrelse 3, 4, 5 eller 6 atomer, m er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5, og n er et helt tall 0, 1, 2, 3, 4 eller 5.

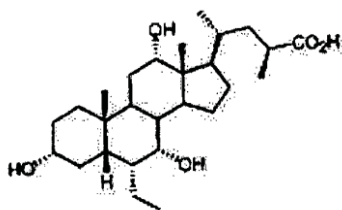
[128] Et aspekt innbefatter en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_1 er hydroksy. I et annet aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_1 er alfa-hydroksy. I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_1 er beta-hydroksy. I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_1 er metyl.

[129] I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvori R_5 er usubstituert alkyl. I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, karakterisert ved at R_5 er metyl. I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er i R - konfigurasjon. I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_5 er i S - konfigurasjon.

[130] I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_6 er hydrogen. I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_2 er hydrogen. I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_2 er alfa - hydroksy. I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse eller et salt, solvat eller hydrat derav, hvor R_3 er hydroksyl.

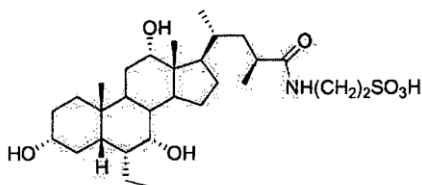
[131] Også beskrevet for informasjon bare, er en forbindelse valgt fra forbindelsene: **lb3e, lc3e, ld3e, le3e, lf3e, lg3e, lh3e, li3e, l13e, lm3e, ln3e, la4e, lb4e, lc4e, ld4e, le4e, lf4e, lg4e, lh4e, li4e, ll4e, lm4e, ln4e, la5e, lb5e, lc5e, ld5e, le5e, lf5e, lg5e, lh5e, li5e, ll5e, lm5e, ln5e, la9e, lb9e, lc9e, ld9e, le9e, lf9e, lg9e, lh9e, li9e, l19e, lm9e, ln9e, la10e, lb10e, lc10e, ld10e, le10e, lf10e, lg10e, lh10e, li10e, ll10e, lm10e, ln10e, la11e, lb11e, lc11e, ld11e, lf11e, lg11e, lh11e, li11e, ll11e, lm11e, ln11e, la15e, lb15e, lc15e, ld15e, le15e, lf15e, lg15e, lh15e, li15e, ll15e, lm15e, ln15e, la16e, lb16e, lc16e, ld16e, le16e, lf16e, lg16e, lh16e, li16e, ll16e, lm16e, ln16e, la17e, lb17e, lc17e, ld17e, le17e, lf17e, lg17e, lh17e, li17e, ll17e, lm17e, og ln17e.**

[132] Oppfinnelsen inkluderer forbindelsen **lh3e**:



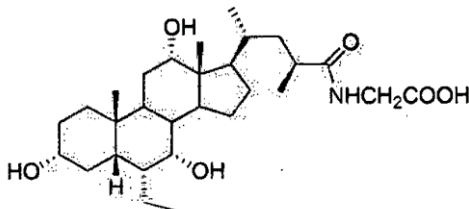
eller et salt, hydrat eller glysin eller taurin deriv.

[133] I et aspekt ved oppfinnelsen omfatter taurin konjugat av forbindelse **lh3e**:



5

eller et salt, solvat eller hydrat deriv. I et aspekt omfatter glysin konjugat av forbindelse **lh3e**:



10 eller et salt, solvat eller hydrat deriv.

[134] Også beskrevet for informasjon bare, er forbindelsene **lb3e, lc3e, ld3e, le3e, lf3e, lg3e, lh3e, li3e, ll3e, lm3e, ln3e, la4e, lb4e, lc4e, ld4e, le4e, lf4e, lg4e, lh4e, li4e, ll4e, lm4e, ln4e, la5e, lb5e, lc5e, ld5e, le5e, lf5e, lg5e, lh5e, li5e, ll5e, lm5e, og ln5e.**

15 **[135]** Også beskrevet for informasjon bare, er forbindelser **la9e, lb9e, lc9e, ld9e, le9e, lf9e, lg9e, lh9e, li9e, ll9e, lm9e, ln9e, la10e, lb10e, lc10e, ld10e, le10e, lf10e, lg10e, lh10e, li10e, ll10e, lm10e, ln10e, la11e, lb11e, lc11e, ld11e, le11e, lf11e, lg11e, lh11e, li11e, ll11e, lm11e, ln11e.**

20 **[136]** Også beskrevet for informasjon bare, er forbindelser **la15e, lb15e, lc15e, ld15e, le15e, lf15e, lg15e, lh15e, li15e, ll15e, lm15e, ln15e, la16e, lb16e, lc16e,**

Id16e, le16e, lfl 6e, lg16e, lh16e, li16e, ll16e, lm16e, ln16e, la17e, lb17e, lc17e, ld17e, le17e, lf17e, lg17e, lh17e, li17e, ll17e, lm17e, og ln17e.

[137] I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en forbindelse ifølge oppfinnelsen, hvori forbindelsen er et farmasøytisk akseptabelt salt.

5 **[138]** Et aspekt av oppfinnelsen innbefatter en blanding som omfatter en forbindelse ifølge oppfinnelsen eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller hydrat derav, og minst ett farmasøytisk akseptabelt hjelpestoff.

[139] Foreliggende oppfinnelse omfatter også radiomerkede forbindelser ifølge oppfinnelsen radiomerkede forbindelser kan fremstilles ved hjelp av konvensjonelle
10 teknikker. For eksempel kan radioaktivt merkede forbindelser ifølge oppfinnelsen fremstilles ved omsetning av forbindelsen ifølge oppfinnelsen med tritium gass i nærvær av en passende katalysator for å gi radioaktivt merkede forbindelser med formlene som beskrives heri. I én utførelsesform er forbindelsene ifølge oppfinnelsen tritiert.

15 **[140]** Bruk. Oppfinnelsen omfatter anvendelse av en forbindelse eller et farmasøytisk akseptabelt salt, solvat eller hydrat derav, i fremstillingen av et medikament for behandling eller forebygging av en sykdom hos et emne. Oppfinnelsen omfatter også enforbindelse ifølge oppfinnelsen, eller et farmasøytisk akseptabelt salt, eller hydrat derav for anvendelse for behandling eller forebygging av sykdom i et emne.

20 **[141]** Ett aspekt ved oppfinnelsen omfatter forbindelsen for anvendelse eller forebygging av sykdom, hvor sykdommen er valgt fra en metabolsk sykdom, inflammatorisk sykdom, leversykdommer, autoimmune sykdommer, hjertesykdommer, nyresykdommer, kreft og gastrointestinal sykdommer.

[142] I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en metabolsk sykdom valgt fra
25 fedme, diabetes, diabeteset, metabolsk syndrom, insulinresistens, inkludert pre-diabetisk insulinresistens, hypertensjon og dyslipidemi. I et aspekt er den metabolske sykdommer fedme. I et annet aspekt, er den metabolske sykdommer diabetes. I et aspekt, er diabetes valgt fra pre-diabetes og type II diabetes. I et aspekt er den metabolske sykdommer et metabolsk syndrom. I et aspekt er den metabolske
30 sykdommen insulinresistens. I et aspekt er den metabolske sykdommer dyslipidemi. I et aspekt er den metabolske sykdommer diabeteset. Betegnelsen "diabeteset" refererer seg til en tilstand hvor emnet har både diabetes og overvekt.

[143] I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en inflammatorisk sykdom valgt fra
allergi, osteoartritt (OA), kronisk obstruktiv pulmonær sykdom (COPD),
35 blindtarmbetennelse, bronkial astma, pankreatitt, allergisk utslett og psoriasis.

- [144]** I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en autoimmun sykdom valgt fra revmatoid artritt, multippel sklerose, og type I diabetes.
- [145]** I et aspekt innbefatter oppfinnelsen en gastrointestinal sykdom valgt fra inflammatorisk tarmsykdom (Crohns sykdom, ulcerøs kolitt), korttarm - syndrom (post-
5 bestrålings kolitt), mikroskopisk kolitt, irritabelt tarm - syndrom (feilabsorpsjon), og bakteriell overvekst.
- [146]** I et aspekt ved oppfinnelsen omfatter nyresykdom valgt fra diabetisk nefropati, kronisk nyresvikt, glomerulær nefritt, hypertensiv nefrosklerose, kronisk glomerulonefritt, kronisk transplantat glomerulopathy, kronisk interstiell nefritt, og
10 polysystemisk nyresykdom.
- [147]** I et aspekt innbefatter oppfinnelsen kreft valgt fra tykktarmskreft, leverkreft, hepatocellulær karsinom, kolangio karsinom, nyrekreft, magekreft, kreft i bukspyttkjertelen, prostatakreft, og insulanoma.
- [148]** I et aspekt innbefatter oppfinnelsen leversykdom valgt fra alkoholisk
15 steatohepatitt, alkoholisk fettleversykdom, kronisk virushepatitt, alkoholisk leversykdom, stoff indusert hepatitt, hemokromatose, primær biliær cirrhose, primær skleroserende kolangitt, portal hypertensjon, galle - desaturasjon, Gauchers sykdom, Wilsons sykdom, α I-antitrypsin-mangel, total parenteral ernæring (TPN), gallestein, TPN-assosiert kolestase og sepsis.
- [149]** I et aspekt ved oppfinnelsen omfatter den autoimmune sykdommen
20 erythematosus.
- [150]** I et aspekt innbefatter oppfinnelsen hjertesykdom valgt fra kongestiv hjertesvikt, myokardialt infarkt, aterosklerose, angina pectoris, arteriosklerose og cerebrovaskulær sykdom (hemorrhage, slag, cerebrovaskulært infarkt).
- [151]** I et aspekt omfatter oppfinnelsen en bruk eller fremgangsmåte,
25 karakterisert ved at forbindelsen ifølge oppfinnelsen er en TGR5 agonist. I et aspekt, er selektivitetens tallforhold for TGR5 EC50 til FXR EC50 mindre enn 0,05.
- [152]** I et aspekt omfatter oppfinnelsen en bruk eller fremgangsmåte, hvor forbindelsen eller preparatet administreres til individet oralt, parenteralt, intravenøst,
30 eller topisk. I et aspekt, er emnet menneske.
- [153]** Et aspekt av oppfinnelsen innbefatter en forbindelse for anvendelse i behandling av sykdom hos et emne, med en terapeutisk effektiv mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen. I et aspekt omfatter oppfinnelsen en forbindelse for anvendelse eller forebygging av sykdom ved å administrere til et emne en profylaktisk
35 effektiv mengde av forbindelsen ifølge oppfinnelsen.

[154] Forbindelsene og sammensetningene i foreliggende oppfinnelse kan bli administrert på forskjellige måter, for eksempel oralt, subkutant, intramuskulært, intravenøst eller intraperitonisk. De refererte ruter for administrering av de farmasøytiske sammensetningene er oralt, subkutant og intravenøst, ved daglige doser på omtrent 0,01 til 5000 mg, fortrinnsvis 5 - 500 mg, av FXR - ligand for et 70 kg voksent menneske per dag. Den passende doseringen kan administreres i en enkelt daglig dose, eller som oppdelte doser som presenteres med passende mellomrom, for eksempel som to, tre, fire eller flere subdoser per dag.

[155] For å fremstille farmasøytiske preparater inneholdende en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse, anvendes inerte og farmasøytisk akseptable bærere. Den farmasøytiske bærer kan enten være faste eller flytende. Preparater i fast form inkluderer, for eksempel, pulvere, tabletter, dispergerbare granuler, kapsler, kassetter og suppositorier. En fast bærer kan være en eller flere substanser som også kan virke som fortynningsmidler, smaksmidler, oppløselighetsmidler, smøremidler, suspensjonsmidler, bindemidler eller tablettoppløsende midler, det kan også være et innkapslingsmateriale.

[156] I pulvere er bæreren generelt et findelt fast stoff som er i en blanding med den fint oppdelte aktive komponent, for eksempel en forbindelse ifølge oppfinnelsen. I tabletter er den aktive bestanddel blandet med bæreren som har de nødvendige bindingsegenskaper i egnede proporsjoner og kompaktert i den ønskede form og størrelse.

[157] For fremstilling av farmasøytiske preparater i form av suppositorier, blir en lavt-smeltende voks slik, så som en blanding av fettsyre-glycider og kakaosmør, først smeltet og den aktive bestanddel dispergeres deri ved for eksempel omrøring. Den smeltede homogene blanding helles deretter i støpeformer med praktisk størrelse, og deretter avkjøles og stivner.

[158] Pulverne og tablettene inneholder fortrinnsvis mellom omtrent 5 % til omtrent 70 vekt % av den aktive bestanddel av forbindelsen ifølge oppfinnelsen. Egnede bærere innbefatter for eksempel magnesium-karbonat, magnesiumstearat, talk, laktose, sukker, pektin, dekstrin, stivelse, tragakant, metylcellulose, natrium-karboksy metylcellulose, en lavt-smeltende voks, kakaosmør og lignende.

[159] De farmasøytiske sammensetningene kan omfatte formuleringen av den aktive forbindelse med innkapslende materiale som en bærer, som gir en kapsel, hvor forbindelsen ifølge oppfinnelsen (med eller uten andre bærere) er omgitt av bærer, slik at transportøren således er knyttet til den forbindelsen. På lignende måte kan kapsler

også inkluderes. Tabletter, pulvere, pulver-kapsler og kapsler kan anvendes som doseringsformer i fast form, egnet for oral administrering.

[160] Flytende farmasøytiske sammensetninger inkluderer, for eksempel, løsninger egnet for oral eller parenteral administrering, suspensjoner og emulsjoner
5 egnet for oral administrering. Sterile vannoppløsninger av den aktive komponent eller sterile oppløsninger av den aktive bestanddel i oppløsningsmidler omfattende vann, bufret vann, saltoppløsning, PBS, etanol eller propylenglykol, er eksempler på flytende preparater egnet for parenteral administrering. Blandingene kan inneholde farmasøytisk akseptable hjelpesubstanser etter behov for å tilnærme fysiologiske
10 betingelser, slik som pH-justering og buffermidler, tonisitet justerende midler, fuktemidler, vaskemidler og lignende.

[161] Sterile løsninger kan fremstilles ved å oppløse den aktive komponenten (for eksempel, en forbindelse ifølge oppfinnelsen) i det ønskede oppløsningsmiddelsystem, og deretter passerer den resulterende oppløsning gjennom
15 et membran-filter for å sterilisere den, eller alternativt, ved å oppløse den sterile forbindelsen i et tidligere sterilisert oppløsningsmiddel under sterile betingelser. De resulterende vandige løsningene kan pakkes for anvendelse som den er, eller lyofilisert, det lyofiliserte preparat blir kombinert med en steril vandig bærer før administrering. pH i preparatene vil typisk være mellom 3 og 11, mer foretrukket fra 5 til
20 9, og mest foretrukket fra 7 til 8.

[162] De farmasøytiske sammensetningene som inneholder forbindelsene ifølge oppfinnelsen kan administreres for profylaktiske og / eller terapeutiske
25 behandlinger. I terapeutisk anvendelse, blir sammensetningene administrert i en mengde tilstrekkelig til å helbrede, omvendt, eller i det minste delvis å redusere eller stanse symptomene på sykdommen og dens komplikasjoner. En mengde tilstrekkelig til å helbrede, omvendt, eller i det minste delvis å redusere eller stanse symptomene av sykdommen og dens komplikasjoner er definert som en "terapeutisk effektiv dose". I profylaktiske anvendelser blir preparatene administrert i en mengde som er tilstrekkelig til å forhindre symptomene på sykdommen og dens komplikasjoner. En mengde
30 tilstrekkelig til å forhindre symptomene på sykdommen og dens komplikasjoner er definert som en "profylaktisk effektiv dose".

[163] Mengder som er effektive for terapeutiske anvendelser vil avhenge av alvorlighetsgraden av sykdommen eller tilstanden, og vekten og den generelle tilstanden til pasienten, men varierer generelt fra ca 0,1 mg til omtrent 2000 mg av

forbindelsen per dag for en pasient på 70 kg, hvor doser på fra omtrent 5 mg til omtrent 500 mg av forbindelsen per dag for en pasient på 70 kg er mer vanlig brukt.

[164] I profylaktiske anvendelser blir farmasøytiske preparater inneholdende forbindelsene ifølge oppfinnelsen administrert til en pasient mottagelig for, eller på
5 annen måte har risiko for, å utvikle sykdommen, i en mengde som er tilstrekkelig til å forsinke eller forhindre igangsetting av sykdomssymptomer. En slik mengde er definert å være en "profylaktisk effektiv dose". Under slikt bruk vil de nøyaktige mengdene av forbindelsen igjen være avhengig av pasientens helsetilstand og vekt, men generelt varierer mengden fra omtrent 0,1 mg til omtrent 2000 mg for en 70 kg pasient pr dag,
10 mer vanlig fra omkring 5 mg til omkring 500 mg for en 70 kg pasient per dag.

[165] Enkelt eller multiple administreringer av preparatene kan utføres der dosenivåer og mønster velges av den behandlende lege. I alle tilfeller bør de farmasøytiske formuleringer gi en mengde av en forbindelse ifølge foreliggende oppfinnelse som er tilstrekkelig til effektivt å behandle eller forebygge sykdom hos
15 pasienten.

[166] Oppfinnelsen tilveiebringer også pakkede sett ("kits") for å hindre eller behandle sykdommer. I et aspekt omfatter oppfinnelsen en en pakke eller kit for behandling eller forebygging av sykdom hos et individ, karakterisert ved at settet omfatter en forbindelse ifølge oppfinnelsen eller et salt, solvat eller hydrat derav.
20 Pakkene omfatter typisk en farmasøytisk sammensetning som inneholder en effektiv mengde av en forbindelse ifølge oppfinnelsen, så vel som informasjonsmateriale som inneholder instruksjoner for hvordan å dispensere det farmasøytiske preparat, inkludert en beskrivelse av den type pasienter som kan behandles, tidsplanen (for eksempel, dose og frekvens), og administrasjonsveien, og lignende.

[167] Noen beskrevne, men ikke krevde, forbindelser er vist nedenfor.

[168] De følgende forbindelser nedenfor, fra **la** til **lh**, hører i det minste til formel I:

la: $R_1 = \alpha - OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = (S, R) Me$, $R_6 = H$

lb: $R_1 = \alpha - OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = (S) Me$, $R_6 = H$

30 **lc:** $R_1 = \alpha - OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = (R) Me$, $R_6 = H$

ld: $R_1 = \beta - OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = (S, R) Me$, $R_6 = H$

le: $R_1 = \beta - OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = (S) Me$, $R_6 = H$

lf: $R_1 = \beta - OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = (R) Me$, $R_6 = H$

lg: $R_1 = \alpha - OH$, $R_2 = \alpha - OH$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = (S, R) Me$, $R_6 = H$

35 **lh:** $R_1 = \alpha - OH$, $R_2 = \alpha - OH$, $R_3 = OH$, $R_4 = H$, $R_5 = (S) Me$, $R_6 = H$

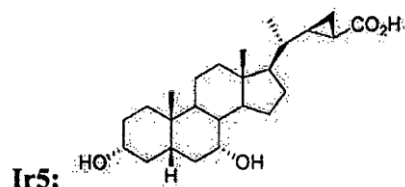
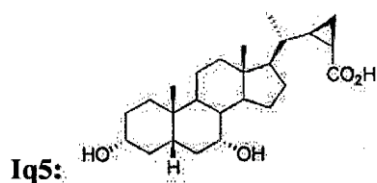
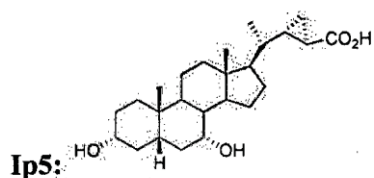
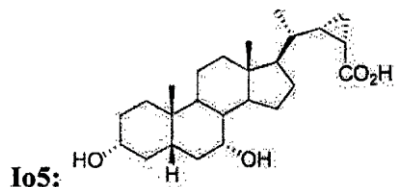
- li:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = H, R_5 = (K) Me, R_6 = H$
ll: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
lm: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
ln: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
 5 **lo:** $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
lp: $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
lq: $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
la1: $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
lb1: $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
 10 **lc1:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
ld1: $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
le1: $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
lf1: $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
lg1: $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
 15 **lh1:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
li1: $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
ll1: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
lm1: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
ln1: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
 20 **lo1:** $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
lp1: $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
lq1: $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
la2: $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
lb2: $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
 25 **lc2:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
ld2: $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
le2: $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
lf2: $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
lg2: $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
 30 **lh2:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
li2: $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
ll2: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
lm2: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
ln2: $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
 35 **lo2:** $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$

- lp2:** $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- lq2:** $R_1 = H, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- la3:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- lb3:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- 5 **lc3:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- ld3:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- le3:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- lf3:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- lg3:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- 10 **lh3:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- li3:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- l13:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- lm3:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- ln3:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- 15 **la4:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- lb4:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- lc4:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- ld4:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- le4:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- 20 **lf4:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- lg4:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- lh4:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- li4:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- l14:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- 25 **lm4:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- ln4:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CH_2SO_3H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- la5:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- lb5:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- lc5:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- 30 **ld5:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- le5:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- lf5:** $R_1 = \beta - OH, R_2 = H, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$
- lg5:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H$
- lh5:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H$
- 35 **li5:** $R_1 = \alpha - OH, R_2 = \alpha - OH, R_3 = NHCH_2CO_2H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H$

Il5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$

Im5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$

In5e: $R_1 = \beta\text{-OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$



5

[169] De følgende forbindelser **In6** – **In11e** hører minst til formel IA:

la6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$

lb6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$

lc6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$

10 **ld6:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$

le6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$

lf6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R)\text{-Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$

lg6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$

lh6: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$

15 **li6:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$

ll6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$

lm6: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$

- II10e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- Im10e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- 5 **In10e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- Ia11e:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
- Ib11e:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
- 10 **Ic11e:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
- Id11e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- Ie11e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- If11e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- Ig11e:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
- 15 **Ih11e:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
- Ii11e:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$
- 20 **II11e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- Im11e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- In11e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_3 = \text{NHCH}_2\text{CO}_2\text{H}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$
- 25 **OH**

[170] De følgende forbindelser **Ia12 – In17e** hører minst til formel II:

- Ia12:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$, $R_8 = \text{H}$
- Ib12:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$, $R_8 = \text{H}$
- 30 **Ic12:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$, $R_8 = \text{H}$ **HId12:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$ **Hle12:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$
- If12:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{H}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$ **Hlg12:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$, $R_8 = \text{H}$ **HIh12:** $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$,

- $R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
li12: $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lil12: $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- Im12:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
lIo12: $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIp12: $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIq12: $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- la13:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIb13: $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIc13: $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lId13: $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
lIe13: $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- If13:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
lIg13: $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIh13: $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIi13: $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIl13: $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- Im13:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
lIo13: $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIp13: $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIq13: $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- la14:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIb14: $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
lIc14: $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- Id14:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
Ie14: $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
If14: $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- Ig14:** $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
Ih14: $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
Ii14: $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
Il14: $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
Im14: $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- In14:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$

- lo14:** $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- lp14:** $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- lq14:** $R_1 = H, R_2 = H, R_4 = H, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- la15:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha, Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- 5 **lb15:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- lc15:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- ld15:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha, Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- le15:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- lf15:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- 10 **lg15:** $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha, Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- lh15:** $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- li15:** $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- ll15:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- lm15:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- 15 **ln15:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) - Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- la16:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- lb16:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- lc16:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- ld16:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- 20 **le16:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- lf16:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$ **lfg16:** $R_1 = OH,$
 $R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha, Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- lh16:** $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha, Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- li16:** $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- 25 **ll16:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- lm16:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- ln16:** $R_1 = Me, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- la17:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- lb17:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- 30 **lc17:** $R_1 = OH, R_2 = H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- ld17:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- le17:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- lf17:** $R_1 = Me, R_2 = H, R_4 = \alpha - Me, R_5 = (R) Me, R_6 = H, R_7 = OH, R_8 = H$
- lg17:** $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S, R) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$
- 35 **lh17:** $R_1 = OH, R_2 = \alpha - OH, R_4 = \alpha Me, R_5 = (S) Me, R_6 = H, R_7 = Me, R_8 = H$

Ig17e: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$, $R_8 = \text{H}$

Ih17e: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$, $R_8 = \text{H}$

Ii17e: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{Me}$, $R_8 = \text{H}$

II17e: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S, R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$

5 **Im17e:** $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (S) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$

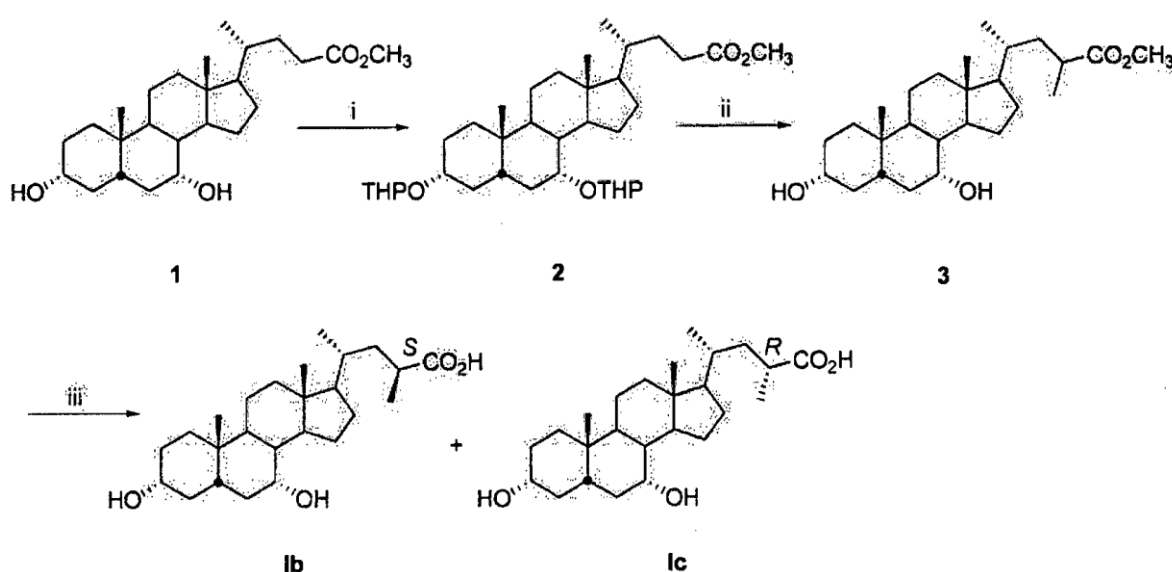
In17e: $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \alpha\text{-OH}$, $R_4 = \alpha\text{-Et}$, $R_5 = (R) \text{Me}$, $R_6 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{H}$

EKSEMPEL 1: Syntese av TGR5 – modulatorer

[171] Forbindelsene ifølge foreliggende oppfinnelse, og beslektede derivater, kan syntetiseres ved fremgangsmåter kjent for en fagmann på området. Detaljerte fremgangsmåter for syntetisering av disse forbindelsene er beskrevet nedenfor. Se også, WO 02/072 598, WO 2004/0007521, EP 1568706 og EP 135782. Med unntak av der et skjema eller eksempel gjelder syntesen eller aktiviteteten for en forbindelse ifølge oppfinnelsen, vil de skjemaene og eksemplene som er vist her kun være for informasjon og / eller sammenligning.

[172] Når det gjelder forbindelsen der R_1 er hydrogen, R_2 og R_3 er hydroksy og R_4 er en lavere alkyl -gruppe, kan forbindelsen med formel (I) erholdes i henhold til følgende skjema:

20 **Skjema 1:**



Skjema 1

- (i) 3,4 - DHP, *p*-TSA, dioksan, r.t.; (ii) a) LDA, CH₃I, -78 °C; b) HCl, CH₃OH, r.t.; iii) NaOH, CH₃OH, reflux.

[173] Metyl kenodeoksykolanoat (**1**) ble beskyttet i 3 - og 7-stilling ved behandling med 3,4 - dihydro- 2H-pyran i dioksan i nærvær av katalytisk mengde av *p* -
 5 toluensulfonsyre (*p*-TSA) for å gi den tilsvarende 3- α , 7 α - tetrahydropyranyloksy analog (**2**). Reaksjon av **2** med metyljodid (eller med en passende alkyl -halogenid), ved -78 °C ved bruk av litium-diisopropylamid som base og tetrahydrofuran (THF) som løsningsmiddel, etterfulgt av behandling med metanolisk HCl ga det korresponderende metyl - 23- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy-5 β -kolan- 24 - oat (**3**). Hydrolyse med alkali
 10 av metylesteren **3** og rensing ved flashkromatografi ga det ønskede 23 (*S*)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (**1b**), og 23 (*S*)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (**1c**).

**Fremstilling av 23 (*R*) - og 23 (*S*)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 -
 15 oisk syre (**1b**, **1c**)**

a) Metyl - 3 α ,7 α - ditetrahydropyranyloksy-5 β -kolan- 24-oat (2**)**

[174] *p*-toluensulfonsyre (78 mg, 0,41 mmol), 3,4 - dihydro- 2H-pyran (20,1 ml, 0,098 mol) ble tilsatt til en oppløsning av metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy-5 β -kolan- 24 - oat (**1**) (2,0 g, 4,9 mmol) i dioksan (6 ml). Reaksjonsblandingen ble omrørt ved romtemperatur i 15 min. H₂O (50 ml) ble deretter tilsatt og blandingen ble delvis konsentrert under vakuum og ekstrahert med EtOAc (3 x 50 ml). De kombinerte organiske fraksjoner ble vasket med saltoppløsning (1 x 50 ml), tørket (Na₂SO₄) og
 25 inndampet under vakuum. Residuet ble rensert ved kromatografi på silikagel-kolonne. Eluering med petroleumseter / etylacetat 80/20 ga 2,5 g med ren forbindelse **2** (90 % utbytte).

¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0,64 (s, 3H, CH₃- 18), 0,89 (s, 3H, CH₃- 19), 0,92 (d, 3H, CH₃- 21), 3,31 til 3,67 (m, 4H, -CH₂OCH-), 3,65 (s, 3H, CO₂CH₃), 3,67 (m, 1H, CH-3), 3,88 (brs, 1H, CH-7), 4,67 (brs, 1H,-O-CH-O-), 4.73 (brs, 1H,-O-CH-O-).
 30

b) Metyl - 23 (*R*, *S*)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oat (3**)**

[175] *n*-Butyllitium (4,3 ml, 2,2 M oppløsning i heksan) ble tilsatt dråpevis ved -78 °C til en oppløsning av diisopropylamin (1,4 ml, 10,1 mmol) i tørr THF (50 ml). Systemet ble holdt på -78 °C i ytterligere 30 min og deretter, metyl - 3- α , 7 α , 12 α -

tetrahydropyranyloksy- 5 - β - kolan- 24 - oat (2) (1,8 g, 3,2 mmol) oppløst i tørr THF (14 ml) ble tilsatt dråpevis til blandingen. Etter 20 min metyljodid (1,4 ml, 22,0 mmol) oppløst i tørr THF (7 ml) ble langsomt tilsatt og blandingen ble oppvarmet til romtemperatur natten over. Oppløsningsmidlene ble fjernet under vakuu og surgjort med 10 % HCl og ekstrahert med EtOAc (5 x 50 ml), vasket med 5 % Na₂S₂O₃-løsning (2 x 50 ml), tørket (over vannfritt Na₂SO₄), filtrert og inndampet under vakuu. Den rå resten ble deretter behandlet med en løsning av 2N HCl i MeOH (50 ml) i 12 timer. Resten ble inndampet under vakuu og tatt opp med EtOAc (100 ml), vasket med en mettet NaHCO₃-løsning (2 x 50 ml), tørket (Na₂SO₄) og inndampet under vakuu.

Resten ble rensset med silikagel - flashkromatografi. Eluering med petroleumseter / etylacetat 70/30 ga 1,1 g (2,7 mmol) av den rene forbindelse 3 (84 % utbytte).
¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0,62 (s, 3H, CH₃- 18), 0,87 (s, 3H, CH₃- 19), 0,92 (d, 3H, CH₃- 21), 2,38 (m, 1H, CH - 23), 3,27 til 3,40 (m, 1H, CH-3), 3,55 (brs, 1H, CH-7), 3,63 (s, 3H, CO₂CH₃).

15

c) 23 (R)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (Ib), og 23 (5)- metyl - 3- α , 7 [a] - dihydroksy-5 β -kolan- 24 - oisk syre (Ic)

[176] Metyl - 23- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oat 0,97 g (2,3 mmol) ble oppløst i MeOH (25 ml) og tilsatt med 10 % NaOH i MeOH (5,7 ml, 14.2.mmol). Blandingen ble tilbakeløpskocht i 16 timer. Blandingen ble surgjort med 3N HCl og ekstrahert med EtOAc (3 x 20 ml). De kombinerte organiske fraksjoner ble vasket med saltoppløsning (1 x 50 ml), tørket (Na₂SO₄) og inndampet under vakuu. Resten ble rensset ved silikagel-flashkromatografi. Eluering med CHCl₃: MeOH (95/5) ga 1,5 g (65%) av 23 (S)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk-syre og 330 mg av 23 (R)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy-5 β -kolan- 24 - oisk-syre. 23 (5)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (Ib): Smp: 125 - 126 °C.
¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 0,44 (s, 3H, CH₃- 18), 0,69 (s, 3H, CH₃- 19), 0,73 til 0,76 (d, 3H CH₃- 21), 0,93 til 0,97 (d, 3H, -CH₃), 2,36 (m, 1H, CH- 23), 3,15 til 3,38 (m, 1H, CH-3), 3,62 (brs, 1H, CH-7). ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 11,55, 18,43, 18,87, 20,49, 22,69, 28,15, 28,57, 30,14, 32,65, 34,43, 34,61, 34,94, 35,23, 37,06, 39,17, 39,60, 40,81, 41,40, 42,57, 46,54, 50,29, 56,63, 68,24, 71,62, 179,99.

[178] 23 (R)- metyl - 3- α , 7 α - di-hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (Ic): Smp: 163- 164 °C ¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 0,43 (s, 3H, CH₃- 18), 0,65 (s, 3H, CH₃- 19), 0,65 til 0,69 (d, 3H CH₃- 21), 0,83 til 0,86 (d, 3H, -CH₃), 2,20 (m, 1H, CH- 23), 3,09 til

35

3,15 (m, 1H, CH-3), 3,58 (brs, 1H, CH-7). ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ: 11,94, 16,40, 18,30, 20,93, 23,06, 23,89, 28,85, 30,52, 33,08, 34,16, 34,91, 35,38, 35,68, 37,14, 39,49, 39,64, 40,04, 40,17, 41,92, 43,05, 50,69, 57,10, 68,51, 72,01, 181,09.

5 **EKSEMPEL 2: Fremstilling av 23 (S) - og 23 (R)- metyl - 6 - α - metyl - 3-α, 7 α - di-hydroksy- 5 -β - kolan- 24 - oisk syre (Ib3, Ic3)**

[179] De følgende forbindelser ble fremstilt ved alkylering av 6 α - metyl - 3- α, 7 α - dihydroksy- 5 -β-kolan- 24 - oisk-syre i henhold til fremgangsmåten i eksempel 1.

10

[180] 23 (5)- metyl - 6 - α - metyl - 3- α, 7 α - di-hydroksy- 5 -β-kolan- 24 - oisk syre (Ib3): Smp: 98- 100 °C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,63 (s, 3H, CH₃- 18), 0,89 (s, 3H, CH₃- 19), 0,92 til 1,00 (m, 6H, CH₃- 21, og CH₃- 6), 1.15- 1.19 (d, 3H, -CH₃), 2,45 til 2,73 (m, 1H, CH- 23), 3,31 til 3,52 (m, 1H, CH-3), 3,58 (brs, 1H, CH- 7). ¹³C-NMR (CDCl₃) δ: 11,76, 15,72, 18,58, 18,88, 20,63, 23,11, 23,65, 28,19, 30,21, 30,47, 32,64, 33,79, 33,97, 34,61, 35,42, 35,66, 37,03, 39,60, 40,01, 40,71, 42,71, 47,35, 50,44, 56,60, 72,34, 72,87, 182,37.

15

[181] 23 (R)- metyl - 3- α, 7 α - di-hydroksy- 5 -β-kolan- 24 - oisk syre (Ic3): Smp: 89-90 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ: 0,65 (s, 3H, CH₃- 18), 0,88 (s, 3H, CH₃- 19), 0,88 til 0,92 (m, 3H, CH₃-6), 0,95 til 0,99 (d, 3H, CH₃- 21), 1,08 til 1,14 (d, 3H, CH₃), 2,35 (m, 1H, CH- 23), 3,29 til 3,48 (m, 1H, CH-3), 3,57 (brs, 1H, CH-7). ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ: 11,70, 15,66, 16,02, 18,00, 20,61, 23,09, 23,60, 28,51, 30,39, 32,61, 33,72, 33,92, 35,38, 35,65, 36,33, 39,57, 39,94, 42,77, 47,30, 50,39, 56,53, 72,22, 72,83, 180,50.

20

25

EKSEMPEL 3: Fremstilling av 23 (R) - og 23 (5)- metyl - 3- α 7 α, 12 α - trihydroksy- 5 -β - kolan- 24 - oisk syre (Ih, li)

[182] De følgende forbindelser ble fremstilt ved alkylering av 3- α, 7 α, 12 α - trihydroksy- 5 -β - kolan- 24 - oisk-syre i henhold til fremgangsmåten i eksempel 1.

30

[183] 23 (5)- metyl - 3- α, 7 α, 12 α - trihydroksy- 5 -β-kolan- 24 - oisk syre (Ih): Smp: 237- 239 °C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ: 0,63 (s, 3H, CH₃- 18), 0,87 (s, 3H, CH₃- 19), 0,96 til 0,98 (m, 3H, CH₃- 21), 1,07 til 1,11 (d, 3H, -CH₃), 2,44 til 2,73 (m, 1H, CH- 23), 3,35 til 3,50 (m, 1H, CH-3), 3,82 (brs, 1H, CH-7) 3,95 (brs, 1H, CH- 12). ¹³C-NMR

(DMSO) δ : 12,72, 17,60, 19,24, 19,24, 23,00, 23,19, 26,59, 27,78, 28,88, 30,72, 34,77, 35,22, 35,66, 37,19, 41,84, 46,19, 47,27, 49,01, 66,69, 70,88, 71,45, 178,25.

[184] 23 (*R*)- metyl - 3- α , 7 α , 12 α - trihydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (II):

Smp: 221 - 223 °C. ¹H-NMR (CDCl₃) δ : 0,63 (s, 3H, CH₃- 18), 0,87 (s, 3H, CH₃- 19),

5 0,96 til 0,98 (m, 3H, CH₃- 21), 1,07 til 1,11 (d, 3H, -CH₃), 2,44 til 2,73 (m, 1H, CH- 23),

3,35 til 3,50 (m, 1H, CH-3), 3,82 (brs, 1H, CH-7) 3,95 (brs, 1H, CH- 12). ¹³C-NMR

(DMSO) δ : 12,76, 16,88, 17,31, 23,04, 23,24, 26,62, 28,12, 28,94, 30,81, 33,97, 34,80,

35,28, 35,71, 37,20, 41,85, 46,29, 47,44, 66,67, 70,86, 71,45, 178,77.

10 **EKSEMPEL 4: Fremstilling av 23 (*R*) - og 23 (*S*)- metyl - 6 - α - metyl - 3- α , 7 α ,
12 α -trihydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (Ih3, li3)**

[185] De følgende forbindelsene ble fremstilt ved alkylering av 6 α - metyl - 3- α ,

7 α , 12 α - trihydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk-syre i henhold til fremgangsmåten ifølge

15 eksempel 1.

[186] 23 (*S*)- metyl - 6 - α - metyl - 3- α , 7 α , 12 α - trihydroksy- 5 - β -Kolan- 24 -

oisk syre (Ih3): Smp: 131 - 134 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 0,65 (s, 3H, CH₃- 18),

0,87 (s, 3H, CH₃- 19), 0,97 til 1,00 (m, 3H, CH₃- 21), 1,14 - 1,18 (d, 3H, -CH₃), 1,23 (m,

1H, CH-6), 2,52 (m, 1H, CH- 23), 3,32 til 3,50 (m, 1H, CH-3), 3,55 (brs, 1H, CH-7) 3,94

20 (brs, 1 H, CH- 12). ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 12,43, 145,66, 17,62, 18,92, 22,70,

23,14, 26,21, 27,45, 28,01, 30,03, 33,44, 34,11, 34,42, 35,30, 36,71, 39,97, 40,45,

41,73, 46,45, 47,25, 72,13, 72,76, 73,01,180,53.

[187] 23 (*R*)- metyl - 6 - α - metyl - 3- α , 7 α , 12 α - trihydroksy- 5 - β -Kolan- 24 -

oisk syre (II3): Smp: 109 - 110 °C. ¹H-NMR (CD₃OD) δ : 0,72 (s, 3H, CH₃- 18), 0,91 (s,

25 3H, CH₃- 19), 1,07 til 1,11 (m, 6 H, - CH₃ og CH₃- 21), 2,37 til 2,53 (m, 1H, CH- 23),

3,15 til 3,42 (m, 1H, CH-3), 3,53 (brs, 1H, CH-7) 3,97 (brs, 1 H, CH- 12). ¹³C-NMR

(CD₃OD) δ : 11,61, 15,04, 15,32, 16,15, 22,04, 22,75, 26,27, 27,62, 28,18, 29,61,

32,91, 33,74, 34,31, 35,06, 35,18, 36,56, 39,70, 40,25, 41, 68 , 46,19, 46,31, 71,76,

71,77, 72,62, 180,11.

30

**EKSEMPEL 5: Fremstilling av 23 (*R*) - og 23 (*S*)- metyl - 3- α - hydroksy-5 β -kolan-
24 - oisk syre (Ip, Iq)**

[188] De følgende forbindelser ble fremstilt ved alkylering av 3 α - hydroksy-5 β -

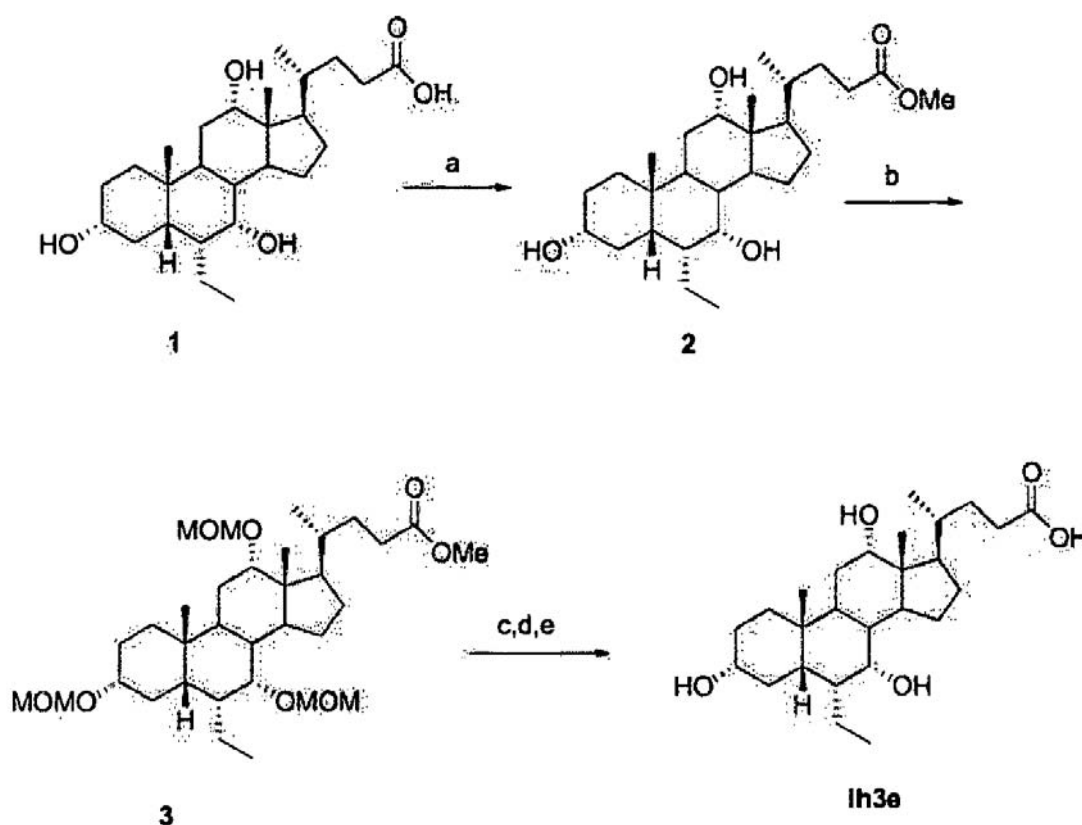
35 Kolan- 24 - oisk-syre i henhold til fremgangsmåten i eksempel 1.

[189] 23 (5)- metyl - 3- α - hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (**lp**): Smp: 161-162 °C. ¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 0,60 (s, 3H, CH₃- 18), 0,88 (s, 3H, CH₃- 19), 0,92 til 1,01 (m, 3H, CH₃- 21), 1,13 – 1,16 (d, 3H, -CH₃), 2,55 (m, 1H, CH- 23), 3,60 (m, 1H, CH-3). ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 11,97, 18,52, 18,87, 20,73, 23,30, 24,14, 26,34, 27,10, 28,15, 30,18, 34,48, 34,50, 35,23, 35,74, 36,06, 37,01, 40,13, 40,34, 40,74, 41,99, 42,68, 56,43, 56,75, 71,70, 181,42.

[190] 23 (R)- metyl - 3- α - hydroksy- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (**lq**): Smp: 152 – 153 °C. ¹H -NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ : 0,63 (s, 3H, CH₃- 18), 0,89 (s, 3H, CH₃- 19), 0,94 til 1,03 (m, 3H, CH₃- 21), 2,45 (m, 1H, CH- 23), 3,59 (m, 1H, CH-3). ¹³C-NMR (CD₃OD) δ : 11,98, 15,97, 18,00, 20,75, 23,31, 24,14, 26,34, 27,11, 28,48, 30,26, 33,68, 34,50, 35,26, 35,77, 36,15, 36,46, 39,59, 40,13, 40,36, 42,01, 42,79, 56,45, 56,76, 71,71,181,02.

EKSEMPEL 6: Fremstilling av 23 (S)- metyl - 3- α , 7 α , 12 α - trihydroksy-6 - α - etyl - 5- β -kolan- 24 - oisk syre (lh3e)

[191]



[192] *Reagenser og vilkår:* a) PTSA, MeOH, ultralyd, kvant. b) $\text{CH}_2(\text{OCH}_3)_2$, P205, CHCl_3 , 97 %. c) LDA, MeI, -78°C . d) MeOH, HCl, 45°C . e) MeOH, NaOH, 45°C , 41 %. Samlet avkastning: 39,7 %.

5 **Syntese av 23 (S)-metyl-3- α ,7 α ,12 α -trihydroksy-6- α -etyl-5- β -kolan-24-oat (2):**

[193] Til en løsning av **1** (2,78 g, 6,37 mmol) i MeOH (120 ml), pTSA (0,12 g, 0,63 mmol) ble tilsatt, og blandingen ble behandlet med ultralyd i 90 minutter.

Blandingen ble deretter konsentrert under redusert trykk, og det resulterende residuum ble fortynnet med AcOEt (120 ml), vasket med H_2O (3x100 ml), saltoppløsning (100 ml), tørket over vannfritt Na_2SO_4 , og konsentrert under redusert trykk for å gi **2** (kvantitativt utbytte) som ble anvendt i neste trinn uten ytterligere rensing.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ 0,63 (3H, s, 18- CH_3), 0,84 til 0,88 (6 H, s, 19- CH_3 + CH_3CH_2), 0,97 (3H, d, $J = 6.62$ Hz, 21- CH_3), 3,30 (1H, m, 3-CH), 3,48 (3-H, s, COOCH_3), 3,62 (1 H, m, 7-CH), 3,97 (1 H, m, 12-CH).

Metyl-3- α ,7 α ,12 α -trihydroksy-6- α -etyl-5- β -24-oat (3):

[194] Til en løsning av **2** (2,50 g, 5,55 mmol) i CHCl_3 (60 ml) og dimetoksymetan (34,10 ml, 166,66 mmol), P_2O_5 (14,18 g, 99.90 mmol) ble tilsatt porsjonsvis, og den resulterende suspensjon ble mekanisk omrørt 45 minutter. Blandingen ble deretter dekantert, og det organiske lag ble behandlet med 10 %

5 NaHCO_3 (50 ml) i 10 minutter. Det organiske laget ble deretter separert, og det vandige lag ble ekstrahert med CHCl_3 (3 x 50 ml). De oppsamlede organiske lagene ble vasket med saltvann (100 ml), tørket over vannfritt Na_2SO_4 , og konsentrert under redusert trykk for å gi **3** (3,14 g, 97 %), som ble anvendt i neste trinn uten ytterligere rensing.

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3) δ : 0,67 (3H, s, 18- CH_3), 0,88 til 1,04 (9H, m, 19- CH_3 CH_3CH_2 + + 21-
10 CH_3), 3,30 (1 H m. 3-C H), 3,30 til 3,40 (7 H, m, 3-CH + 2 x $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{O}$), 3,45 (3H, s, $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{O}$), 3,50 (1H, m, 7-CH), 3,66 (. 3H, s, COOCH_3), 3,79 (1 H, m, 12 - C H), 4,57 til 4,75 (6 H, m, 3 x $\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{O}$).

15 **23 (S)- metyl - 3- α , 7 α , 12 α - trihydroksy-6 - α - etyl - 5- β -Kolan- 24 - oisk syre (Ih3e):**

[195] Til en oppløsning av diisopropylamin (0,56 ml, 4,026 mmol) i nydestillert THF (15 ml) avkjølt ved -78°C og under N_2 - atmosfære, ble $^1\text{BuLi}$ 2,5 N i heksan
20 (1,53 ml, 3,840 mmol) tilsatt dråpevis. Reaksjonen ble omrørt ved -78°C i 30 minutter og deretter ble en oppløsning av **3** (350 mg, 0,601 mmol) ble oppløst i nydestillert THF (7 ml) tilsatt dråpevis. Den resulterende oppløsning ble omrørt ved -78°C i 90 minutter. Jodmetan (0,56 ml, 9,015 mmol) ble tilsatt, reaksjonsblandingen ble omrørt ved -78°C i 60 minutter, og deretter sakte oppvarmet til romtemperatur over natten. Blandingen
25 ble deretter konsentrert under redusert trykk, og det resulterende residuum ble fortynnet med H_2O (30 ml) og ekstrahert med AcOEt (3 x 30 ml). De oppsamlede organiske lagene ble vasket med saltoppløsning (30 ml), tørket over vannfritt Na_2SO_4 , og konsentrert under redusert trykk. Residuet ble deretter behandlet med en oppløsning av MeOH / HCl 37 % (20 ml, 20:01 vol / vol) 45°C i 8 timer. Blandingen ble
30 konsentrert under redusert trykk, og det resulterende residuum ble fortynnet med H_2O (30 ml) og ekstrahert med AcOEt (3 x 30 ml). De kombinerte organiske lagene ble vasket med saltvann (100 ml), tørket over vannfri Na_2SO_4 og konsentrert under redusert trykk. Den resulterende rest ble behandlet med en oppløsning av NaOH 10 % i MeOH (15 ml) ved 45°C i 24t. Blandingen ble deretter konsentrert under redusert
35 trykk, og det resulterende residuum ble fortynnet med H_2O (20 ml), vasket med $^1\text{Pr}_2\text{O}$ (3

x 1.5 ml), surgjort med 3N HCl, og til slutt ekstrahert med CHCl₃ (3 x 20 ml). De organiske lagene ble vasket med saltvann (100 ml), tørket over vannfri Na₂SO₄ og konsentrert. Det resulterende residuum ble renset ved middelstrykk-kromatografi (kolonne: "RP-I 8 Lobar B", MeOH/H₂O 05:05 til 06:04, 50 psi) for å gi 4 (47 mg, 4.1 %).

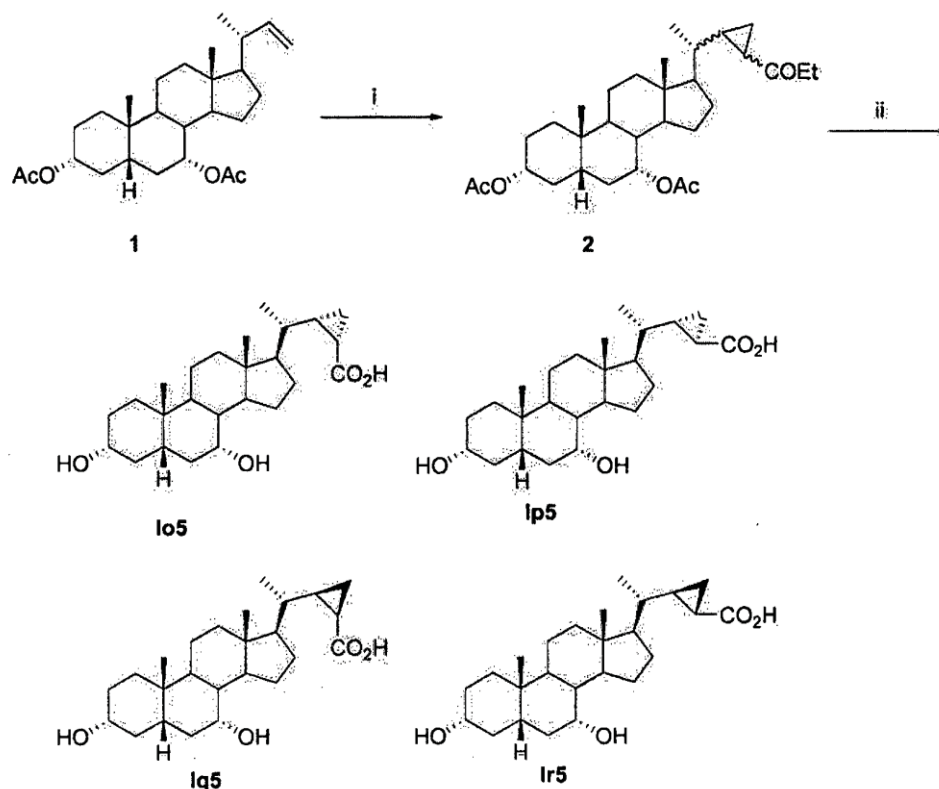
5 Smp: 195 - 197 °C.

¹H-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ: 0,63 (3H, s, 18-CH₃), 0,84 til 0,88 (6H, m, 19-CH₃ + CH₃CH₂), 0,98 (3H, d, J = 6.60 Hz, 21-CH₃), 1,10 (3-H, d, J = 6,80 Hz, CH (CH₃) COOH), 2,61 (m, 1H, CH (CH₃) COOH), 3,3 (1H, m, 3-CH), 3,65 (1 H, m, 7-CH), 3,92 (1 H, m, 12 - CH). ¹³C-NMR (CDCl₃ + CD₃OD) δ: 11,51, 12,34, 17,52, 19,19, 22,09, 22,67, 23,11, 26,65, 27,40, 28,05, 29,83, 33,31, 34,56, 35,06, 35,40, 38,67, 39,90, 41,11, 41,39, 41,69, 45,10, 46,39, 47,32, 70,65, 71,79, 72,90, 182,07.

10

Eksempel 7: Syntese av forbindelser lo5, lp5, lq5, og lr5

15 [196]



(i) EDA, Rh2 (OAc)₄, CH₂Cl₂, rom-temp, (ii) (a) NaOH, EtOH, reflux, (b) MPLC

3 α , 7 α -Dihydroksy- 22, 23- metylen-5 β -kolan- 24 - oiske syrer (I α 5, Ip5, I α 5 og Ir5).

[197] Etyl diazoacetate (0,478 g, 1,19 mmol) i tørr CH₂Cl₂ (15 ml) ble langsomt
 5 tilsatt dråpevis til en omrørt suspensjon av 3 α , 7 α - diacetoksy- 5 -norkolan- 22, 23-en
 (1) (0,6 g, 1,39 mmol) i nærvær av dirodium (II) tetraacetat (9 mg, 0,02 mmol) i tørr
 CH₂Cl₂ (15 ml) under nitrogen ved romtemperatur. Reaksjonsblandingen ble filtrert og
 vasket med H₂O (20 ml), tørket (Na₂SO₄), og inndampet under vakuum, hvilket ga en
 blanding av de fire diastereoisomere estere 2. Estrene **2** ble suksessivt oppløst i EtOH
 10 (15 ml) og behandlet med en oppløsning av 10 N NaOH (10 ml) ved tilbakeløp i 4
 timer, avkjølt, helt over på kald H₂O (50 ml), surgjort med 2N HCl og ekstrahert med
 EtOAc (3 x 15 ml). Den organiske fasen ble vasket med saltoppløsning (10 ml), tørket
 (Na₂SO₄) og konsentrert under vakuum. Resten ble kromatografert på silikagel.
 Eluering med CH₂Cl₂/MeOH 96/4 med 0,1 % AcOH ga 0,087 g (15 % utbytte) av (22S,
 15 23S) - α 3, 7 α - di-hydroksy- 22,23- metylen- 5 - β - kolan- 24 - oisk syre (I α 5) og 0,065
 g (11,5 % utbytte) av (22R, 23R) -3 α , 7 α - dihydroksy- 22, 23 - metylen- 5 - β -kolan- 24
 -oisk syre (I α 5). Eluering med CH₂Cl₂/MeOH 95,5/4,5 med 0,1 % AcOH ga 0,18 g
 (utbytte 32 %) av α (22S, 23R) -3, 7 α - di-hydroksy- 22, 23- metylen- 5 - β - kolan- 24 -
 oisk syre (Ip5) og 0,15 g (utbytte 26,7 %) av (22S, 23R) - 3 α , 7 α - dihydroksy- 22, 23 -
 20 metylen- 5 - β -kolan- 24 - oisk syre (Ir5) som hvite faste stoffer.

[198] I α 5. Smp: 148- 150 °C. C-[α]_D²⁰ +5,16 (c 1, EtOH). ¹H NMR (CD₃OD og
 CDCl₃) δ : 0,67 (s, 3H, 18-CH₃), 0,90 (s, 3H, 19-CH₃), 0,96 (d, J = 6,68 Hz, 3H, 21-CH₃),
 25 3,40 - 3,50 (m, 1H, 3 - CH), 3,85 (m, 1H, 7-CH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 12,20, 16,80, 17,08,
 20,80, 21,00, 23,15, 24,10, 28,30, 30,80, 31,30, 33,30, 34,80, 34,90, 35,40, 35,70,
 39,80, 39,90, 41,80, 43,40, 50,55, 58,20, 68,90, 72,30, 177,00.

[199] I α 5. Smp: > 230 °C. [α]_D²⁰-38,19 (c 1,1, CH₃Cl/MeOH 1: 1). ¹H NMR
 (CD₃OD, og CDCl₃) δ : 0,50 (s, 3H, 18-CH₃), 0,86 (s, 3H, 19-CH₃), 0,96 (d, J = 6,40 Hz,
 30 3H, 21-CH₃), 3,40-3,60 (m, 1H, 3-CH), 3,80 (m, 1H, 7-CH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 12,00,
 12,50, 20,90, 21,00, 21,10, 23,00, 23,80, 27,10, 30,50, 31,00, 32,10, 33,10, 34,80,
 35,30, 35,60, 39,50, 39,70, 39,85, 41,80, 43,00, 50,40, 58,50, 68,60, 72,00, 176,90.

[200] Ip5. Smp: 221- 225 °C. [α]_D²⁰-40,22 (c1, EtOH). ¹H NMR (CD₃OD, og
 CDCl₃) δ : 0,56 (s, 3H, 18-CH₃), 0,86 (s, 3H, 19-CH₃), 1,16 (d, J = 6,60 Hz, 3H, 21-CH₃)
 35), 3,10 – 3,30 (m, 1H, 3-CH), 3,85 (m, 1H, 7-CH). ¹³C NMR (CDCl₃) δ : 12,10, 18,30,

18,55, 20,00, 20,90, 23,10, 24,00, 28,20, 30,70, 31,70, 33,20, 34,80, 35,40, 35,70, 39,80, 40,10, 41,80, 43,15, 50,40, 57,80, 68,90, 72,20, 178,40.

[201] Ir5. Smp: 136 - 140 °C. $[\alpha]^{20}_D$ 13,66 (c 1, EtOH). 1H NMR (CD_3OD , og $CDCl_3$) δ : 0,56 (s, 3H, 18- CH_3), 0,86 (s, 3H, 19- CH_3), 0,96 (d, J = 6,66 Hz, 3H, 21- CH_3), 3,40 - 3,60 (m, 1H, 3 - CH), 3,80 (m, 1H, 7-CH). ^{13}C NMR ($CDCl_3$) δ : 12,00, 13,50, 19,90, 20,90, 22,50, 23,10, 24,00, 28,00, 30,70, 31,60, 33,20, 34,90, 35,40, 35,65, 39,70, 39,73, 41,80, 43,10, 50,40, 58,00, 68,80, 72,20, 177,60.

Eksempel 8: In vitro TGR5 - og FXR - aktivitet

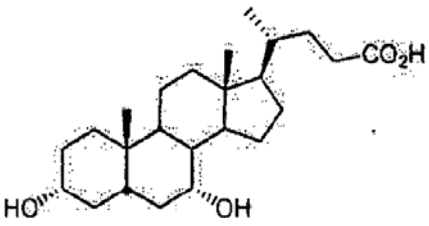
10

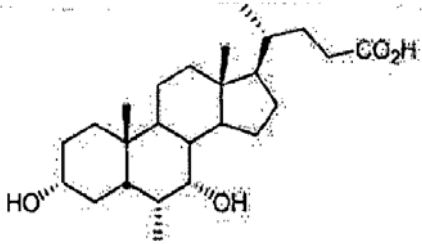
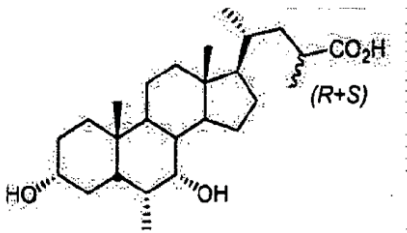
[202] Den kraften og effekten av forbindelsene ifølge oppfinnelsen på TGR5 - reseptoren ble evaluert ved hjelp av in vitro analyser.

[203] Tabell 1 viser at forbindelsene ifølge oppfinnelsen er kraftige og selektive TGR5 - modulatorer. Innføring av en alkylgruppe ved C- 23 stillingen for gallesyre gir selektivitet for TGR5 - reseptoren med hensyn til FXR. Dette er tydelig ved observasjon av de biologiske resultatene erholdt for CDCA, 6 - MeCDCA og 6,23-diMe-CDCA (23- R, S isomerblanding) på FXR og TGR5 som vist i tabell 1. 6,23-diMe-CDCA er 100 ganger mer potent på TGR5 med hensyn til FXR - reseptor For en beskrivelse av TGR5 - reseptorbinding ved bruk av en in vitro-analyse, se, for eksempel, Kawamata, J. Biol. Chem 2003, vol. 278 nr. 11, s. 9435 - 9440). Aktiviteten på FXR ble analysert ved fluorescens resonans energioverføring (FRET) for rekruttering av SRC-I-peptid til humant FXR ved hjelp av et cellefritt ELISA. Se Blanchard et al. WO 00/37077.

15
20

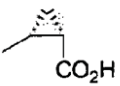


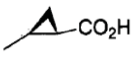
Tabell 1: EC₅₀ (µM) av Eksempelforbindelser på FXR -og TGR5 - Reseptor

Forbindelse	Struktur	FXR - data	TGR5 - data
Kenodeoksykolin syre (CDCA)		EC ₅₀ : 8,6 µM Effisiens: 100 %	EC ₅₀ : 4,0 µM Effisiens: 100 %

6 α - MeCDCA		EC ₅₀ : 0,21 μ M Effisiens: 148 %	EC ₅₀ : 0,37 μ M Effisiens: 119 %
23(R+S) - Me - CDCA (I3a)		EC ₅₀ : 15,62 μ M Effisiens: 60 %	EC ₅₀ : 0,11 μ M Effisiens: 123 %

[204] Tabellene 2 og 3 viser ytterligere forbindelser evaluert for TGR5 - aktivitet. Luciferase aktivitet ble bestemt i CHO celler stabilt uttrykte hTGR5 eller forbigående kotransfekteres med en hTGR5 - ekspresjon vektor og et cAMP-responsive element (CRE) drevet luciferase reporter-gen. Noen av forbindelsene ble videre sendt til et luciferase reporter assay skåring til deres evne til å aktivere den kjernefysiske gallesyre-reseptor FXR.

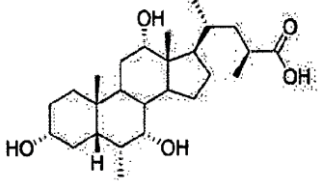
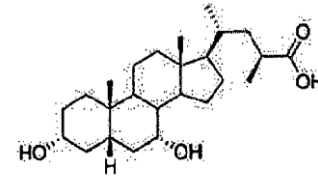
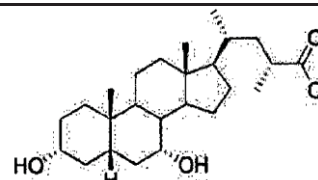
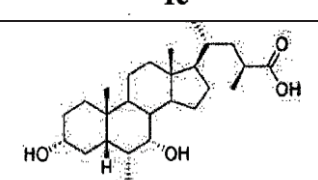
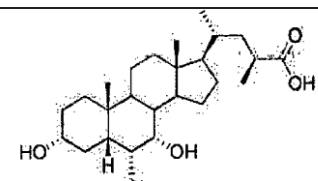
Tabell 2.

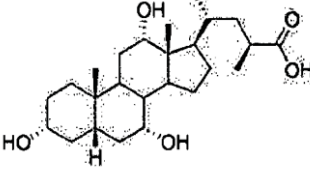
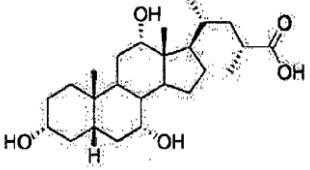
Navn	R ₁	R ₂	R ₃	TGR5 EC ₅₀	TGR5 Effisiens
22S,23S-CCDCA* (I05)	α -OH	-H		1,33	110
22S,23S-CCDCA* (Ip5)	α -OH	-H		2,91	102
22S,23S-CCDCA* (Iq5)	α -OH	-H		75,7	5
22S,23S-CCDCA* (Ir5)	α -OH	-H		> 100	4

* Data representerer gjennomsnittsverdier av minst tre uavhengige eksperimenter av CRE-drevet luciferase reporter-analyser i TGR5-transfektete CHO-celler. Enhetene er μ M for EC₅₀ og % av 10

µM LCA - verdi for effisiens.

Tabell 3. TGR5 - og FXR - aktiviteter^a

Navn	FXR EC ₅₀ µM	FXR Effisiens	TGR5 EC ₅₀ µM	TGR Effisiens	EC ₅₀ forhold (TGR5/FXR)
 <p>Ib3</p>	22,8	0,76	0,8	75,6	0,035
 <p>Ib</p>	> 100	0 ^b	3,58	110	0,036
 <p>Ic</p>	10,5	49	25,5	100	2,4
 <p>Ib3</p>	11,6	23	0,140	105	0,012
 <p>Ib3e</p>	3,97	64,4	0,51	165	0,128

 <p style="text-align: center;">Ih</p>			4,39	105	
 <p style="text-align: center;">Ii</p>			> 51,9	75 ^b	
<p>^a Data representerer gjennomsnittsverdier av minst tre uavhengige eksperimenter. Verdi for effisiens er uttrykt i % av aktiviteten vs 10 μM LCA (TGR5) eller 10 μM 6ECDCA (FXR). ^b Plateau aktiveringsnivå ikke nådd; maksimal konsentrasjon testet var 125 μM for Ib og 100 mM for Ii</p>					

[205] Dataene i tabellene 2 og 3 kan bestemmes ved hjelp av fremgangsmåter som er kjent innen faget, for eksempel, som beskrevet nedenfor.

Plasmider

5

[206] NIH Mammalian Collection kloner MGC: 40597 (også kalt pCMVSPORT6/hTGR5 eller pTGR5) og pcDNA3.1 (+) ble innhentet fra Invitrogen (Carlsbad, California). pCRE-Luc og pCMV β ble innhentet fra Clontech (Palo Alto, CA). pCMX-hFXR og pCMX-mRXR α var vennlige gaver fra Dr. David J. Mangelsdorf (Howard Hughes Medical Institute, University of Texas Southwestern Medical Center).
 10 pEcREx7-Luc var en vennlig gave fra Dr. Richard A. Heyman (X-Cepto Therapeutics, CA).

Cellekultur

15

[207] Kinesisk hamster-ovarier (CHO) celler, NCI-H716 celler, Hep3B celler og COSL celler ble innhentet fra American Type Culture Collection (Manassas, Virginia). Cellekulturmedium, serum og kosttilskudd var fra Invitrogen eller Sigma-Aldrich. Alle CHO-celler ble opprettholdt i minimum essensielt medium α , (α - MEM) supplert med
 20 10 % (volum / volum) føtalt bovint serum (FBS) og 100 μ M unødvendig aminosyrer (NEAA). NCI-H716 - celler ble opprettholdt i suspensjon i RPMI- 1640 supplert med 10 % (volum / volum) FBS, 10mM HEPES og 1mM natrium-pyruvat. Hep3B celler ble opprettholdt i Eagle 's medium supplert med 10 % (volum / volum) FBS og 100 μ M

NEAA. COSL celler ble opprettholdt i Dulbeccos modifiserte Eagles medium (DMEM) supplert med 10 % (volum / volum) FBS. Alle cellekulturmedia ble supplert med 100 enheter/ml penicillin og 100 µg / ml streptomycin-sulfat. Celler ble dyrket ved 37 °C i en atmosfære av 5 % CO₂, passerte hver 2 - 6 dager, og ferskt belagt for hvert

5 eksperiment.

Transiente transfeksjoner

[208] CHO-celler ble plettet i 96-brønn plater med en tetthet på 3,5 x 10⁴ celler/brønn, dyrket i 24 h, og deretter transfektert med 150 ng av human (H) TGR5 ekspresjonsplasmid (pCMVSPORT6/hTGRS) og ng av cAMP-responsive element (CRE) -drevet luciferase reporter-plasmid (pcr-Luc) i hver brønn med Lipofectamine 2000 reagens (Invitrogen) i henhold til produsentens instruksjoner. Etter 6 timers inkubasjon ble cellene vasket en gang med fosfat-bufret saltvann (PBS), og mediet ble

10 byttet ut med DMEM inneholdende 0, 1 % (vekt / volum) bovint serumalbumin (BSA). Etter inkubasjon i ytterligere 18 timer ble cellene behandlet i 5 timer med forskjellige konsentrasjoner av hver forbindelse i frisk DMEM inneholdende 0,1 % (vekt / volum) BSA. Etter behandling ble cellene lysert med 50 µl i lysisbuffer (25 mM Tris-Cl (pH7.6), 2 mM EDTA, 1mM ditiotretitol (DTT), 10 % (volum / volum) glycerol og 1 % (volum /

15 volum) triton X- 100) med en fryse - tine syklus og utsatt for luciferase-analyser som beskrevet nedenfor.

[209] COSL-celler ble plettet i 96-brønn plater i en tetthet på 2,5 x 10⁴ celler/brønn i DMEM supplert med 10 % (volum / volum) trekull-strippet FBS, dyrket i 24 h, og deretter transfektert med 25ng av hFXR ekspresjonsplasmid (PCMX-hFXR),

25 25 ng av mus (m) retinoid X reseptor α (RXR α) uttrykk plasmid (PCMX-mRXRa), 50 ng av reporter plasmid (pEcREx7-Luc) og 50 ng av pCMV β som intern kontroll i hver brønn, ved hjelp av Lipofectamine 2000 reagens. Etter 24 timer ble cellene vasket to ganger med PBS og behandlet med forskjellige konsentrasjoner av hver forbindelse i frisk DMEM supplert med 10 % (volum / volum) trekull-strippet FBS i 24 timer. Etter

30 behandling ble cellene lysert med 50 µl av lyseringsbuffer ved en fryse-tine syklus og underkastes både luciferase og β -galaktosidase-assay som beskrevet nedenfor. Normalisert luciferase verdier ble fastsatt ved å dividere luciferase aktivitet ved β - galaktosidaseaktivitet.

35 *Luciferase - og β -galaktosidase – analyser*

[210] For luciferase analyser, ble 20 µl av cellelysat blandet med 100 µl av luciferase reaksjon buffer [235 µM luciferin, 265 µM ATP og 135 µM koenzym A (CoA)] og luminescens ble bestemt med CentroXS3 LB960 (Berthold Technologies, Bad Wildbad, Tyskland). For β-galaktosidase analyser, ble 10 µl av cellelysat blandet med 100 µl av Buffer Z [60 mM Na₂HPO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-mercaptoetanol og 0.75mg/ml o- nitrofenyl -β-D-galaktopyranosid (ONPG)] og inkubert ved 37 °C i 0,5 – 3 timer. Reaksjonene ble stoppet ved å tilsette 50 µl av Stopp buffer (1M Na₂CO₃) og optisk tetthet på 420 nm ble bestemt.

10

Etablere CHO celler stabilt uttrykkende humane TGR5 (CHO-TGR5 celler)

[211] CHO-celler ble transfektert med 3,8 µg hTGR5 ekspresjonsplasmid (pCMVSPORT6/hTGR5), 3,8 µg CRE-drevet luciferase reporter plasmid (PCRE-Luc) og 0,4 µg neomycin-resistent gen ekspresjonsplasmid [pcDNA3.1 (+)] med Lipofectamine 2000. De transfektanter ble valgt med 400 µg / ml G418 sulfat og enkeltkloner ble dyrket i 96 - brønns plate, uavhengig av hverandre. TGR5-uttrykkende CHO-cellelinjer ble screenet med LCA behandlinger, etterfulgt av luciferase assay.

20 *cAMP produksjon analyse*

[212] NCI-H716 - celler ble plettert i 96-brønn plater belagt med 0,75mg/ml Matrigel (BD Biosciences) i henhold til produsentens instruksjoner like før bruk, i en tetthet på 6 x 10⁴ celler/brønn i DMEM supplert med 10 % (volum / volum) FBS, 100 enheter/ml penicillin og 100 µg/ml streptomycin-sulfat, og dyrket i 24 h, noe som ga anledning til celleadhesjon på bunnen av platen. CHO-TGR5-celler ble sådd ut i 96 - brønns plater ved en densitet på 3,5 x 10⁴ celler/brønn i α - MEM supplert med 10 % (volum / volum) FBS, 100 µM NEAA, 100 enheter / ml penicillin og 100 µg av streptomycin sulfat, og dyrket i 24 timer. Cellene ble vasket to ganger med PBS, og mediet ble byttet ut med cAMP-analysen medium [DMEM inneholdende 0,1 % (vekt / volum) BSA og 0,5 mM 3-isobutyl - 1- metylxantin (IBMX)]. Etter inkubering i 30 minutter ved 37 °C, ble cellene behandlet med hver forbindelse i frisk cAMP analysemedium i 30 minutter. Etter behandling ble mediet forkastet og cAMP mengder ble bestemt ved hjelp av cAMP-Screen kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) i henhold til produsentens instruksjoner.

35

50 % effektiv konsentrasjon (EC50) og effisiens besluttsomhet

[213] Assays ble utført i tre eller fire eksemplarer for hvert forhold. EC50-
 5 verdiene ble bestemt ved probit-analyse. Effekten ble bestemt ved å beregne procenter
 av 10 µM LCA verdi for TGR5 agonist studie og 10 µM 6 α-Et-CDCA verdi for FXR
 agonist studien, henholdsvis. Etter å ha trukket fra den gjennomsnittlige verdien av den
 basale (vehikel-behandlede) tilstanden, ble verdier anvendt på EC50-og / eller effisiens
 - bestemmelser. Beregning av gjennomsnitt EC50 og sammenligning av EC50 mellom
 10 forskjellige forbindelser ble utført etter logaritmen transformasjon.

Statistisk analyse

[214] Statistisk analyse ble utført ved Student t-test, og $p < 0,05$ ble ansett som
 15 statistisk signifikant.

Tabell 3A.

			Alfa-sikt assay	FRET (caMP) NCHH716	Transaktiverings assay	FRET-cAMP på TGR5 som overuttrykker Hek293 celler
Forbindelse (Referansestandard)			hFXR (CDCA = 10 – 20 µM EC ₅₀ (µM)	hTGR5LCA = 4 – 8 µM EC ₅₀ (µM)	hTGR5(LCA = 16 µM) EC ₅₀ (µM)	hTGR5(LCA = 0,35 µM) EC ₅₀ (µM)
1h3e			175	0,9	1,7	0,001
Dataene i tabell 3A ble samlet ved hjelp av fremgangsmåter som er beskrevet nedenfor.						

FRET analysen (Påvisning av intracellulære cAMP nivåer).

[215] Reseptorbindingsanalysen (assayen) ble utført ved å måle nivået av
 cyklisk AMP (cAMP) ved hjelp FRET-assay. Humane tarmcellelinjer (NCI-H716) ble
 5 belagt i 96-brønn plater belagt med 0,75 mg / ml matrigel (BD Biosciences) i henhold til
 produsentens instruksjoner like før bruk, med en tetthet på 12×10^3 celler / brønn i
 DMEM supplert med 10 % (volum / volum) FBS, 100 enheter/ml penicillin og 100 µg /
 ml streptomycin-sulfat, og dyrket i 24 timer, noe som ga celleadhesjon på bunnen av
 platen. Cellene ble vasket to ganger med PBS, og mediet ble byttet ut med cAMP
 10 analysemedium [OPTIMEM inneholdende 0,1 % (vekt / volum) BSA, 1 mM 3-isobutyl -
 1- metylxantin (IBMX)]. Etter inkubering i 60 minutter ved 37 °C, ble cellene behandlet
 med økende konsentrasjoner av forbindelse **Ih3** i stimuleringsbuffer (5 mM HEPES, 0,1
 % BSA i HBSS, pH 7.4) inneholdende europium-chelat - Streptavidin og Alexa Fluor
 647-konjugert anti-cAMP antistoff (Perkin Elmer) i 1 time ved romtemperatur. Nivået av
 15 intracellulær cAMP ble bestemt med Lance kit (PerkinElmer). Litokol syre ble brukt som
 kontroll-ligand. Z'-faktoren ble brukt til å validere analyser. Ikke lineær
 regresjonskurver, uten begrensninger, ble utført ved hjelp av fire parameter ligning og
 GraphPad Prism programvare (GraphPad Inc.), for å få tak i EC50 verdiene.

20 Alpha sikt analyse

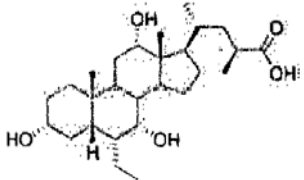
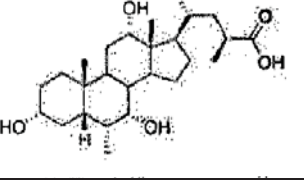
[216] Aktiviteten på FXR ble analysert ved hjelp av alpha sikt -teknologi i en
 rekrutterings ko-aktivator analyse. Alfa - sikt (alphascreen) er en vulst-basert kjemi
 analyse som brukes til å studere biomolekylære interaksjoner. Binding av molekyler
 25 som er tatt på vulstene fører til en energioverføring fra den ene vulsten til den andre,
 for til slutt å produsere et luminescerende signal. Når partnerne kommuniserer, er
 kjemisk energi overføres fra Donor til akseptor-vulster, og et signal blir produsert. Ved
 gallesyre - stimulering vil GST-FXR-LBD reagere med Src-1 peptid. Anti-GST-belagte.
 Akseptor - vulster ble brukt til å fange GST-fusion FXR-LBD mens bitinylert-SRC-I
 30 peptid ble tatt til fange av streptavidin Donor - vulster. Ved belysning på 680 nm
 kjemisk energi overføres fra Donor til akseptor-vulster på tvers av komplekset
 streptavidin-Donor/Src- 1-Biotin/GSTFXR-LBD/Anti-GST-Akseptor og et signal
 produseres. Analysen ble utført i hvite, lav-volum, 384 - brønns Optiplates
 (PerkinElmer) ved hjelp av et sluttvolum på 25 µl inneholdende sluttkonsentrasjoner på
 35 10 nM av rensset GST-merket FXR-LBD protein, 30 nM biotinylert Src- 1-peptid, 20 µg /

ml anti-GST akseptor vulster akseptor vulster og 10 µg / ml streptavidin donor vulsten (PerkinElmer). Analysebufferen inneholdt 50 mM Tris (pH 7,4), 50 mM KCl, 0,1 % BSA og 1 mM DTT. Stimuleringstidene med 1 µl av ligander (oppløst i 100 % DMSO) ble satt til 30 minutter i romtemperatur. Konsentrasjonen av DMSO i hver brønn ble holdt ved en sluttkonsentrasjon på 4 %. Etter tilsetningen av deteksjons blanding (akseptor og donor vulster) platene ble inkubert i mørke i 4 timer ved romtemperatur og deretter ble avlest i en Envision - mikroplate analysator (PerkinElmer). Dose-responskurver ble utført in triplo, og Z²-faktor ble anvendt for å validere assayene. Ikke lineær regresjonskurver, uten begrensninger, ble utført ved hjelp av fire parameter ligning og GraphPad Prism programvare (GraphPad Inc.), for å få tak i de EC₅₀ verdier.

Cell Culture, Transfeksjon og luciferase assay

[217] HepG2 - og HEK293T celler ble dyrket i E-MEM og DMEM henholdsvis enten supplert med 1 % penicillin / streptomycin, 1 % L-glutamin og 10 % føtalt bovint serum. (Høy glukose) (Invitrogen, Carlsbad, California). Celler ble dyrket ved 37 °C i 5 % CO₂. Alle transfeksjonene ble gjort ved hjelp 05:02 Fugene HD Transfection reagens (µl) til DNA (µg) henholdsvis (Roche). Tjuefire timer før transfeksjon HEK293T eller HepG2 - celler ble utsådd på en 96 - brønns plate ved en densitet på henholdsvis 10000 eller 15000 celler / brønn. Forbigående transfections ble utført med 100 ng av reporter vektor pGL4.29 [luc2P/CRE/Hygro] (Promega), 40 ng av pGL4.74 (Renilla), som intern kontroll for transfeksjonseffektivitet, og 10 ng av ekspresjonsplasmid pCMV-SPORT6 - hTGR5 The N1H Mammalian Collection klon MGC: 40597 (Invitrogen). Denne vektoren pGEM ble tilsatt for å normalisere mengdene av DNA transfektert i hver analyse (2 - µg). Tjuefire timer etter transfeksjon ble cellene stimulert med økende konsentrasjoner av forbindelse **lh3e** i 18 timer. Kontrollkulturer mottok vehikelet (0,1 % DMSO) alene. Cellene ble så lysert ved å tilsette 75 µl for Dual-Glo Luciferase-reagens (Promega) til 75 µl av medium inneholdende celler / brønn. Renilla-luciferase - aktivitet ble målt ved å tilsette et volum av Dual-Glo Stop & GIO reagens og opprinnelige kulturmedium. Luciferase - aktiviteter ble uttrykt som forholdet mellom luciferase enhet og Renilla-luciferase-enhet. Hvert datapunkt er gjennomsnittet av tredoble bestemmelser. Hvert eksperiment ble gjentatt minst tre ganger.

Tabell 3A. Direkte sammenligning av 6 - etyl g. 6 - metyl substituert 23- metyl kolsyre.

Forb. nr.	Referanse standard LCA (4,5 +/- 2,4 μ M) CA (69 +/- 24 μ M)	TGR5 I exp (EC50 = μ M)	TGR5 II exp (EC50 = μ M)	FXR I exp (EC50 = μ M)	FXR II exp (EC50 = μ M)
lh3e		0,8	1,1	53	23
lh3		1,73	3	10	7,8
* Resultatene viser i tabell 3A ble generert ved hjelp av de fremgangsmåtene som er beskrevet direkte ovenfor.					

[218] Forbindelser som har en alfa-etyl -gruppe ved C-6 posisjonen på gallesyre ringen er foretrukket. Mer spesielt forbindelser som har en alfa-etyl - gruppen ved C-6 stillingen av 23-metyl kolsyre som er mest foretrukket. Som vist i tabell 3A ovenfor, forbindelser som har en alfa-etyl - gruppen ved C-6 - stillingen er overraskende og uventet mer potent enn det tilsvarende C-6 alfa- metyl - derivatet.

Eksempel 9: Metabolske aktiviteter av oleanolisk syre og 6 - etyl - , 23- metyl - kolsyre (lh3e) i en kost-indusert fedme musemodell

10

[219] Målet med studien er å definere om TGR5 agonister (oleanolisk syre (OA) eller 6 etyl, 23- metyl kolsyre (**lh3e**) korrigerer utviklingen av fedme og tilhørende insulin-resistens in vivo. For å teste denne muligheten, ble OA / **lh3e** administrert via matadministrasjon i 16 uker for mannlige C57BL6J mus som hadde vært gjenstand for et fettriakt kosthold i 10 uker.

15

II-protokoll

[220] I en tidligere studie, ble OA observert som en selektiv TGR5 agonist som ikke forårsaket mat-aversjon. Dyr behandlet med en dose på 100 mg / kg / dag av OA viste imidlertid noen tegn på toksisitet, mens en lavere dose ble godt tolerert. Derfor ble OA administrert ved en dose på 50 mg / kg / d i denne studien.

20

[221] In vitro studier har identifisert **lh3e** som en potent og selektiv TGR5 ligand. Ingen problemer med toksisitet var forventet med **lh3e**, som ble gitt med ~ 50 ganger lavere konsentrasjon.

[222] For denne studien ble 48 hann C57BL6J-mus (5 uker gamle) delt i to grupper: en gruppe på 24 (gruppe 1, 2 & 3) dyr fikk chow - diett, mens den andre 24 mottok et høyt fettinnhold i en periode på 10 uker (gruppe 4,5 og 6). Dyrene ble deretter analysert i løpet av en periode på 16 uker. Fem grupper på 10 dyr ble gitt som følger:

1: chow - diett

10 2: chow - diett + OA 50 mg / kg / dag

3: chow - diett + 6Et23MeCA (**lh3e**) 30 mg / kg / dag

4: høyt-fett diett 5: høyt-fett kosthold + OA 50 mg / kg / dag

6: høyt-fett kosthold + 6Et23MeCA (**lh3e**) 30 mg / kg / dag

15 I løpet av hele studien, kroppsvekt og matinntak ble målt to ganger ukentlig.

[223] Uke- 2: Kroppssammensetning ble analysert, for alle grupper, med dual energi X-ray absorptiometry (dexascan).

[224] Uke- 1: Serumnivåene av transaminaser, glukose, triglyserider, kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-C og insulin ble målt i alle grupper etter en fasteperiode på 12 timer, og musene ble deretter plassert på dietter som angitt (dag 0).

[225] Uke 2: Serumnivåene av transaminaser, glukose, triglyserider, kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-C og insulin ble målt i alle grupper etter en fasteperiode på 12 timer (Dag 14).

25 **[226]** Uke 4: Glukose toleranse ble bestemt ved å la alle dyrene bli gjenstand for en intraperitonisk glukosetoleranse test (IPGTT). Dyr ble fastet i 12 timer før testen. Nattdaglig energiforbruk av gruppene 1, 4, 5 og 6 (chow - diett, høyt fettinnhold og høyt fettinnhold OA / 6Et23MeCDCA (**lh3e**)) ble målt ved indirekte kalorimetri.

[227] Uke 8: Kroppsvekt sammensetning ble igjen analysert med dexascan for alle grupper. Serumnivåene av transaminaser, ble glukose, triglyserider, kolesterol, HDL-kolesterol, LDL-C og insulin målt i alle grupper etter en fasteperiode på 12 timer (dag 56).

[228] Uke 9: circadian aktivitet av gruppene 4, 5 og 6 (mus matet med høyt fettinnhold) ble undersøkt i løpet av et tidsrom på 30 timer.

- [229]** Uke 10: Måling av blodtrykk og hjerterefrekvens ble utført på grupper 4, 5 og 6.
- [230]** Uke 11: Rektal temperatur på alle dyr ble målt ved romtemperatur klokken 10:00. Circadian aktivitetsmåling ble utført på grupper 1, 2, 3 og 4.
- 5 **[231]** Uke 12: Glukosetoleranse ble analysert ved å utføre en intraperitonisk glukosetoleranse test (IPGTT) på grupper 4, 5 og 6. Under IPGTT, ble blodet også samlet inn for å analysere insulin nivåer. Dyrene ble fastet 12 timer før disse testene. Avføring ble oppsamlet i alle gruppene i løpet av en 24 timers periode og innhold av avføringslipider ble målt.
- 10 **[232]** Uke 16: Kald-test ble utført på alle dyrene ved å måle kroppstemperaturen på dyr eksponert for 4 °C
- [233]** Tre dager senere ble dyr ofret. Ved ofring ble blod samlet og analysert for: plasma lipider (TC, TG, HDL-C, FFA), leverfunksjoner (ALAT, ASAT, alkalisk Pase, γ -GT), glukose og insulin, lipoproteinprofiler av utvalgte grupper av plasma
- 15 (størrelse-ekskluderings kromatografi).
- [234]** Lever, tynntarm, fettvev (WAT og BAT), bukspyttkjertel, hjerte og muskler ble samlet, veid og holdt for videre analyser, inkludert: standard histologi (HE - farging, suksinat dehydrogenase flekker, olje-rød O - flekker og cellemorfologi); vevs lipid innhold, elektronmikroskopi på BAT og muskler for å analysere mitokondriene; RNA -
- 20 isolasjon for ekspresjonsstudier av utvalgte gener som er involvert i metabolismen og energihomeostase ved kvantitativ RT-PCR, Protein ekstraksjon for studiet av post-translational modifikasjoner slik som acetylering av proteiner av interesse (for eksempel PGC-1 α).

25 III Detaljerte prosedyrer

A- Dyreprosedyre og – dietter

Dyreoppbevaring og -håndtering

30

[235] Mus ble gruppeplassert (5 dyr / bur) i spesifikke patogen frie forhold med en 12 timer: 12 timer (på ved 07:00) lys-mørke syklus, i en temperatur (20 - 22 °C) og luftfuktighet kontrolleres vivarium, i henhold til EU - spesifikasjoner. Dyrene ble tillatt fri tilgang til vann og mat.

35

Drikkevann

- 5 **[236]** Kjemisk sammensetning for vannet i springen ble regelmessig analysert, ved Institut d'Hydrologie, ULP, Strasbourg, for å bekrefte fravær av potensielle giftige stoffer. Drikkevann ble behandlet med HCl og HClO₄ for å opprettholde en pH på mellom 5 og 5,5, og klorkonsentrasjon på mellom 5 og 6 ppm.

Diett

- 10 **[237]** Standard chow - diett for gnagere ble innhentet fra UAR og diett med høyt fettinnhold ble hentet fra Research Diet. Mus ble matet med standard chow - diett for gnagere (16 % protein, 3 % fett, 5 % fiber, 5 % aske), eller diett med høyt fettinnhold (20 % protein, 20 % karbohydrat, 60 % fett). Oleanolisk syre og 6Et23MeCDCA (**Ih3e**) ble blandet med enten pulverisert chow - diett eller enten pulverisert høyt fettinnhold i
- 15 følgende proporsjoner: 0,5 g OA / kg mat for 50mg/kg/dag behandling og 0,08 g 6Et23MeCA (**Ih3e**) / kg mat for 10 mg / kg / dag behandling. Pellets ble deretter rekonstituert. Kontrollgrupper fikk mat pellets som leveres av selskapet. På grunn av konsistensen av det høye fettinnhold, ble det ikke tilsatt vann i blandingen med OA. I
- 20 tilfelle av chow - dietten, som er vanskeligere å rekonstituere, ble en minimal mengde vann tilsettes til pulveret for å rekonstituere pellets, som så ble lufttørket. Nye grupper av maten ble tilberedt ukentlig.

Blodprøvetaking

- 25 **[238]** Blod ble tatt fra enten retro - orbital bihule under anestesi eller fra halevenen.

Anestesi

- 30 **[239]** For DEXA-skannings eksperimentet ble dyrene anestesisert med en blanding av ketamin (200 mg / kg) / xylasin (10 mg / kg) administrert ved intra - peritonisk injeksjon. For venepunksjon, ble dyrene anestesisert ved inhalering av en blanding av isofluran-O₂.

- 35 B- Biokjemi

[240] Testene ble utført med en Olympus AU-400 automatisert laboratoriearbeid stasjon ved hjelp av kommersielle reagenser (Olympus).

5 *Analyse av lipider og lipoproteiner*

[241] Serum triglyserider, samlet og HDL kolesterol ble bestemt ved enzymatisk assay. Serum HDL kolesterol innhold ble bestemt etter utfelling av apo-B holdige lipoproteiner med fosfor-wolframsyre / Mg (for eksempel, Roche Diagnostics, Mannheim, Tyskland). Nivå av frie fettsyrer ble bestemt med en kit fra Wako (for eksempel, Neuss, Tyskland), slik som angitt av leverandør.

10

[242] *Metabolske og endokrine undersøkelser*

15 Blodsukker konsentrasjon ble målt ved en Precision QID analysator (for eksempel Medisense systemet), ved anvendelse av Medisense Precis elektroder (for eksempel Abbot Laboratories, Medisense produkter, Bedford, USA). Denne fremgangsmåten ble validert, ved å sammenligne Presisjons Q.I.D.-analysator verdier med klassiske glukose målinger. Presisjons Q.I.D.-fremgangsmåten ble valgt siden den krever en

20 minimal blodmengde, og kan derfor bli benyttet for flere målinger, slik som for eksempel under en IPGTT. Plasma-insulin (som Mercodia, Uppsala, Sverige) ble bestemt ved ELISA i henhold til produsentens spesifikasjoner.

C -Metabolsk testing

25

Lipoproteinprofiler

[243] Lipoprotein-profiler ble erholdt ved hurtig protein-væskekromatografi, noe som gir separasjon av de tre hovedklasser lipoproteiner VLDL, LDL og HDL.

30

[244] Intraperitonisk glukosetoleranse test (IPGTT) - Oral glukosetoleransetest IPGTT ble utført på mus som ble fastet over natten (12 timer). Musene ble enten injisert intraperitonisk (IPGTT) med en oppløsning av 20 % glucose i sterilt saltvann (0,9 % NaCl) i en dose på 2 g glukose / kg kroppsvekt. Blod ble oppsamlet fra

35 halevenen, for glukose og insulin overvåking, før og 15, 30, 45, 75, 90, 120, 150, 180

minutter etter administrering av glukose-løsning. Det trinnvise område av glukosekurven ble beregnet som et mål for insulinfølsomhet, mens det tilsvarende insulinivået indikerer insulinsekresjons reserver.

5 *Energiforbruk*

[245] Energiforbruket ble evaluert gjennom indirekte kalorimetri ved å måle oksygenforbruket med Oksymax apparat (for eksempel Columbus Instruments, Columbus, Ohio) i løpet av 12 timer. Dette systemet består av en åpen krets med luft som kommer inn og ut av plastmerder (én mus per bur). Dyrene ble tillatt fri tilgang til mat og vann. En meget nøyaktig CO₂ og O₂ sensor målte forskjellen i O₂ og CO₂ - konsentrasjoner i begge luftmengder, noe som ga mengden oksygen som forbrukes i en viss tid, gitt at luftstrømmen av luft som kommer inn i buret var konstant. Dataene som kommer ut av apparaturen ble behandlet i en tilkoblet datamaskin, analysert og vist i en eksportert Excel-fil. Verdiene ble uttrykt som ml.kg⁻¹.h⁻¹, som er vanlig kjent som VO₂.

Bestemmelse av kroppens fettinnhold med DEXA - skanning

[246] DEXA-analysene ble utført av ultrahøy oppløsning PIXIMUS Series Densitometer (0,18 x 0,18 mm piksler, GE Medical Systems, Madison, WI, USA). Ben - mineraltetthet (BMD i g / cm²) og kroppssammensetning ble bestemt ved hjelp av PIXIMUS programvaren (versjon 1.4x, GE Medical Systems).

25 D- Ikke-invasiv blodtrykksmåling og puls

[247] Visitech BP- 2000 Blodtrykks Analyse System er en datamaskin-automatisert hale-mansjett system som brukes for å ta flere målinger på fire våkne mus samtidig uten inngrep fra operatøren. Musene ble inneholdt i de enkelte mørke kamrene på en oppvarmet plattform med halene tredd gjennom en hale-mansjett. Systemet måler blodtrykket ved å bestemme mansjetttrykket hvorved blodstrømmen til halen ble fjernet. En fotoelektrisk sensor registrerer pulsen på spesimenet. Systemet genererer resultater som har vist seg å samsvare godt med gjennomsnittlig intraarteriell trykkmåling samtidig i halspulsåren. Dette tillater reproducerbare verdier

av det systoliske blodtrykket og den hastigheten på hjerteslaene som skal erholdes. Det krevde trening av dyrene i en uke i systemet.

E- Circadian aktivitet

5

[248] Spontan lokomotorisk aktivitet ble målt ved hjelp av individuelle bokser, hver bestående av et glidende gulv, en avtakbart bur, og utstyrt med infrarøde fangere slik måling av ambulerende den lokomotoriske aktiviteten og bakpartier. Boksene ble koblet til en datamaskin ved hjelp av et elektronisk grensesnitt (for eksempel Imetric, Pessac, Frankrike). Mus ble testet i 32 timer for å måle tilvenning av anordningen så vel som nattlige og døgnlige aktiviteter. Mengden av vann som forbrukes ble målt i løpet av testperioden ved hjelp av en automatisert slikke - måler.

10

[249] Resultatene av undersøkelsen er vist i figurene 1 - 9. Figur 1 viser virkningen av forbindelse **Ih3e** på vektøkning hos mus matet med chow - diett og med mye fett. Vektøkning ble målt over 16 uker. Høyt-fett matet mus behandlet med forbindelse **Ih3e** viste mindre vektøkning enn høyt-fett matet mus behandlet med vehikel. Figur 2 viser at forbindelse **Ih3e** forbedrer metabolsk profil for mus matet med høyt fettinnhold. Resultatene av blodplasma- og pulsanalyse i overvektige mus som var kostholdsinduserte og behandlet med forbindelse **Ih3e** er vist i figur 2, inkludert glukosenivå i blodet, leverenzymen (LDH, ASAT, ALAT) og plasmid og lipider (totalt kolesterol, HDL- kolesterol, LDL- kolesterol, og triglyserider). Høyt-fett matede mus behandlet med forbindelse **Ih3e** viste lavere blodsukker, leverenzymen, og plasma lipider enn høyt-fett matet mus behandlet med vehikelet. Hjerterefrekvensen for mus matet med høyt-fett, og behandlet med forbindelse **Ih3e**, viste også en lavere hjerterefrekvens i sammenligning med høyt-fett matet mus behandlet med vehikelet.

15

20

25

Figur 3 viser at forbindelse **Ih3e** forbedrer glukosetoleransen i høyt-fett matet mus. Etter 10 uker var plasmainsulinnivået øket i både chow-diett-matet og høyt-fett matet mus behandlet med forbindelsen **Ih3e**, sammenlignet med mus behandlet med vehikelet, som vist i figur 3 A. Etter 12 uker ble glukosenivåer vist å være lavere i høyt-fett matet mus behandlet med forbindelsen **Ih3e**, som vist i figur 3B. Figur 4 viser oral glukosetoleranse test (OGTT) resultater som glukosenivåer i løpet av en periode på 200 minutter i chow - diett-matet mus behandlet med forbindelsen **Ih3e**. Figur 5 (grafer AD) viser insulin frigjøring in vivo etter et testmåltid. Figur 5A viser insulin frigjøring over 30 minutter. Figur 5B viser økning i insulin frigjøring i forhold til basale insulin nivåer. Insulinnivået toppet seg til et høyere nivå på - 12 minutter i høyt-fett matet mus

30

35

behandlet med forbindelsen **lh3e**, sammenlignet med mus som ble behandlet med vehikel. Figurene 5C og 5D viser flere gangers økning i insulin frigjøring sammenlignet med de basale insulinivåene. Økning av høyt fett matet mus behandlet med forbindelsen **lh3e** var større på både 15 og 30 minutters tidspunkter, som vist i figur 5D. Figurer 6 (grafer A - D) og 7 (grafer A - C) viser at i forbindelse **lh3e** - behandlet mus er det en økning i respiratorisk bytteforhold (RER) ved HFD (fettrik diett), som kan forklares som knyttet til deres bedre insulinfølsomhet, som opprettholder evnen til å oksidere glukose. Figur 8 (grafer A og B) viser lokomotorisk aktivitet og mat / vann inntak av behandlet høyt-fett matet og behandlet chow - diett matet mus i forhold til vehikel-behandlet. Mat / vanninntaket for mus matet med en høyt-fett diett og behandlet med forbindelse **lh3e** viste en svak økning i inntaket versus mus som blebehandlet med vehikel. Figur 9 (grafer A - C) viser endringer i organvekt. Figurer 9B og 9C viser prosentandelen av endring i kroppsvekt, lever, nyre, hjerte, peri WAT, epi WAT, Sc WAT, og BAT i forhold til vekt i mus matet med chow - diett. I alle organer, viste høyt-fett matede mus behandlet med forbindelse **lh3e** en redusert prosentvis endring.

EKSEMPEL 10: Fysisk-kjemiske egenskaper

20 *Vannoppløselighet*

[251] Fast BA (i protonerte form for forbindelse **lh3e**) ble suspendert i 5 ml av 0,1 M HCl. De mettede løsningene ble, etter inkubasjon i 1 uke, filtrert på et Millipore-filter (0,22 µm), og konsentrasjonen av BA ble målt ved hjelp av HPLC-ESI-MS/MS C18 kolonne (150 mm x 2 mm id, 4 µm) og mobile faser av vann inneholdende 15 mM eddiksyre, pH 5, og acetonitril. Strømningsraten var 150 µl / min. Massespektrometri akkvisisjonen ble gjennomført i en multippel reaksjonsovervåkings modus ved hjelp av ESI - kilde i negativ ionisering. Vannløselighet ble uttrykt som µMol / liter.

[252] Vannløseligheten for forbindelsen **lh3e** er 99 pM, en verdi som er høyere enn tilsvarende dihydroksy BA og ersammenlignbar med den for CA (se Tabell 4).

Tabell 4

Gallesyre	$W_s^{(a)}$ (µM)	CMC ^(b) 0,15 M Na ⁺ (mM)	STC _{CMC} ^(c) Dyne/cm	Log P _A ^(d)	Albumin binding ^(e) (%)
-----------	------------------	--	---	-----------------------------------	------------------------------------

CDCA	32	32	45,5	2,2	93
UDCA	7,5	60	50,5	2,2	94
CA	273*	11*	-	11*	50*
TCDCA	hs	3,0*	-	0,9*	70*
TUDCA	hs	2,2	-	1,1*	67*
6MUDCA	28*	4,2*		1,3*	80*
lh3e	99	14	50,1	1,4	62

^aWs: vannløselighet refererer seg til BA som protonerte arter og derfor ikke evaluert for TCDCA, og TUDCA som er svært løselig (hs).

^bCMC: Kritisk Micellar Konsentrasjon fastsettes i 0,15 M NaCl vann løsning.

^cST CMC: Overflatespenning ved CMC i 0, 15 M NaCl vann løsning.

^dLogPA: 1-oktanol-vann fordelingskoeffisient av de studerte gallesyrer som ioniserte arter.

*: Verdier fra litteraturen.

[253] Tilstedeværelse av en 23- metyl - gruppen i sammensatt **lh3e** gir ikke kompromiss for vannløselighet. Forbindelse **lh3e** viser en løselighet verdi i området av naturlig forekommende BA og tidligere studerte syntetiske analoger. Videre, gitt den relativt gode albuminbindingen for forbindelse lh3e, kan sirkulasjon av forbindelse **lh3e** i blodet gjøres lettere, og dermed favorisere den systemiske målretting av TGR5 i

perifert vev, så som muskel - og brunt fettvev. Eksempler 9, 16 og 17 støtter denne hypotesen videre.

Kritisk Micellar Konsentrasjon (CMC)

5

[254] Detergensen, det vil si den tendensen til å danne miceller ble evaluert for alle de ladede molekyler som er løselige i vann som natriumsalt (2 enheten opp på pKa). Den kritiske micelle-konsentrasjon (CMC) ble bestemt ved overflatespenning (ST) målinger ved bruk av en maksimal bobletrykks - metoden, som gir

10 overflatespenningsverdier som er noe påvirket av eventuelle urenheter, slik som statiske fremgangsmåter er. Tensiometeret var en Sensadyne 6000 (Chem-Dyne Research Corp, Milwaukee, WI) utstyrt med to glass prober på 0,5 og 4,0 mm diameter som er koblet til en kilde av nitrogen. Boblenfrekvensen var en boble / sekund i

15 destillert vann ved 26 °C (P = 2,7 atm), og kalibrerings ble gjort med dobbelt destillert vann og metanol. Overflatespenningen av BA natriumsalter løsninger i NaCl 0,15 M ble målt ved forskjellige konsentrasjoner innenfor området av 0,13 til 50 mM. Overflatespenningen verdier ble plottet mot logaritmen av gallesalt-konsentrasjon, regresjonskurver tilsvarende de to delene av kurven (monomelisk- og micellar- faser) ble beregnet ved hjelp av minste kvadraters metode, og skjæringspunktet for linjene

20 ble tatt som CMC verdien. Fra ST versus konsentrasjonskurver ble verdien av overflatespenningen ved CMC (likevekt mellom monomerer og multimerer arter) også beregnet å gi informasjon om renskraft, som er relatert til størrelsen av miceller med assosiert kapasitet for senking av overflatespenning.

[255] CMC ble evaluert ved overflatespenningsmålinger i ikke-

25 likevektsbetingelser, det vil si at under forhold som urenheter lett påvirke overflatespenningen resultater (fig. 10). Forbindelse **lh3e** presenterer en lav CMC, men en moderat kapasitet for å senke detergens og overflatespenning, slik som vist med overflatespenning verdier ved CMC (lav detergens betyr lav toksisitet for membran eller celler).

30

Oktanol / vann fordelingskoeffisient

[256] Ettersom sulfat og sulfo-analoger er alltid ionisert ved alle pH-verdier, blei

oktanol / vann-fordelingskoeffisient målt for alle molekyler i ionisert form og derfor ble

35 karboksy-analogene studert ved en høy pH. 1 - oktanol/vann fordelingskoeffisient (log

P) ble evaluert ved hjelp av en vanlig ryste-kolbe prosedyre. Forsøkene ble utført på 0,1 mM gallesalt-løsning bufret til pH 8 med 0,1 M fosfatbuffer for å sikre fullstendig ionisering av BA, log P-verdier refererer seg til BA i den ioniserte formen, og ikke til de protonerte artner, og den første konsentrasjonen av hver BA var under sin egen CMC -
5 verdi. Det vandige bufferet ble tidligere forhåndsmettet med 1 - oktanol, 5 ml av 1-
oktanol med forhånd mettet med vann ble deretter tilsatt, og prøvene ble igjen satt til å
komme i likevekt i 2 uker, under kontinuerlig omrøring ved romtemperatur. Etter
sentrifugering ble de to fasene omhyggelig separert. BA-konsentrasjon i vannfasen ble
målt med HPLC-ESI - MS / MS ved hjelp av C18-kolonne (150 mm x 2 mm id, 4 µM),
10 og som mobile faser, vann inneholdende 15 mM eddiksyre pH 5 og acetonitril.
Strømningshastigheten var 150 µ l / min og kolonnen ble holdt på 45 °C.
massespektrometri - akvisisjon ble gjennomført i multippel reaksjonsovervåkings
modus ved hjelp av ESI kilde i negativ ionisering.

[257] Den karboksylerte forbindelsen **lh3e** med tre hydroksylgrupper i 3 α , 7 α
15 og 12 α stilling presenterer en litt høyere lipofilisitet i forhold til den naturlige analoge
CA, 1,4 mot 1,1 som følge av tilstedeværelse av en etyl - i 6 - posisjonen og en metyl i
23-posisjon.

Albuminbinding

20

[258] Omfanget av albumin binding ble evaluert ved likevektsdialyse ved et fast
BA-albumin tallforhold. BA ble oppløst ved en konsentrasjon på 100 µM i 5 % bovint
serum-albumin-saltoppløsning (pH 7,2), og hensatt i 24 timer ved 25 °C. 2 ml av denne
oppløsning ble dialysert i celluloseblærer som har en molekylvekt - avkutting på 12 -
25 14000 mot 25 ml saltoppløsning. Systemet ble bragt til likevekt ved mekanisk forsiktig
risting i 72 timer ved 25 °C. BA konsentrasjoner av den dialyserte løsning (svarende til
den frie ubundne fraksjon) og av utgangsuppløsningen ble bestemt med HPLC-ESI-
MS/MS i samme forhold som den tidligere analyse.

[259] Den prosentvise albuminbinding ble beregnet fra den første BA
30 konsentrasjon og fra den ubundne konsentrasjon i dialyserte fraksjonen. Dataene er
angitt i tabell 4.

[260] Den prosentvise albuminbinding av forbindelse **lh3e** er litt høyere enn
CA, og dette skriver seg fra tilstedeværelsen av 23 metyl - og 6 etylgrupper.

35 **Eksempel 11: In vitro metabolsk stabilitet i human avføringskultur**

*Stabilitet for tarmbakterier*Eksempel 11a: 7 *a*-dehydroksylering

5

[261] Homogenisert friske humane avføringer (500 mg) ble overført til sterile ampuller, til hvilke 5 ml sterilisert hakket kjøtt glukosemedium (Scott Lab., Fiskville, RI) ble tilsatt. BA ble så tilsatt ved en endelig konsentrasjon på 0,05 mM. Ampuller ble inkubert ved 37 °C, og deretter ved 0, 1, 2, 4, 8 og 24 timer etter tilsetningen av BA, ble reaksjonen stoppet med 150 µL av 30 % KOH. Prøvene ble sentrifugert ved 3500 rpm i

10

[262] Tynn-sjikts kromatografi (TLC), ved å benytte silikagel 0,25 mm tykkelse plater (Merck, Darmstat, Tyskland), ble benyttet som den første sikttesten. Det løsningsmiddelsystem som brukes for separering av konjugert BA var sammensatt av propionsyre / isoamyl -acetat / vann / N-propanol (3 : 4 : 1 : 2, volum / volum / volum / volum; oppløsningsmiddel I), og for det ukonjugerte BA var det eddiksyre / karbontetraklorid / isopropyleter / isoamyl -acetat / vann / N-propanol / benzen (1 : 4 : 6 : 8 : 2 : 2, volum / volum / volum / volum/ volum / volum; løsningsmiddel II). Separert

15

20

[263] Forbindelsen **Ih3e** var meget stabil når den ble inkubert i humane avføringskulturer, og selv etter 24 timer ble mer enn 85 % av forbindelsen gjenvunnet umodifisert. På den annen side, referansene med naturlige analoge CDCA presenterte en halveringstid på nesten en time, og ble etter 8 timers inkubasjon nesten fullstendig metabolisert (7-dehydroksylert) til å danne litokolin syre.

25

[264] Etter lang tids inkubasjon for **Ih3e**, var 7-dehydroksyleringen og den mellomliggende dannelsen av et 7-okso - derivatet praktisk talt opphevet.

Eksempel 11b:

30

[265] Det er kjent at tarmbakterier hydrolyserer C24 – amidbindingen i taurin- og glysin- konjugerte BA'er og fjerner 7 α - hydroksylgruppen i CA, som fører til dannelse av giftige sekundære lipofile BA'er, så som deoksykol syre (DCA) (Ridlon, J.M., et al., J. Lipid Res. 2006, 47, 241 - 259). For å bestemme følsomheten for

35

forbindelsen **Ih3e** overfor tarmflora-mediert 7-dehydroksylering, ble den metabolske

stabilitet vurdert i en kultur av human avføringssuppe, slik som beskrevet i Roda, A., et al., J. Lipid Res. 1994, 35, 2268 - 2279. Forbindelse **lh3e** synes ikke å være følsomme for denne prosessen, og ble vist å være meget stabil med mer enn 95 % av forbindelsen umodifisert etter 12 timers inkubering. Til sammenligning, ble mer enn 50 % av CA (kolsyre) metabolisert etter 1 time, og opp til 90 % i løpet av 8 timer (figur 15). Det er sannsynlig at den utvidede stabiliteten av forbindelse **lh3e** er relatert til alkylering av C6 stilling, som gir sterisk hindring for den bakterielle 7 α - dehydroksylerings prosessen.

10 *Sidekjede – stabilitet*

[266] Ifølge disse resultatene sidekjeden av forbindelse **lh3e** ikke ble endret av tarmbakteriers enzymatiske aktiviteter.

[267] Disse dataene tyder på at tilstedeværelse av etyl - gruppen i C-6 stillingen beskytter 7-hydroksylgruppen mot oksidasjon eller fjerning ved sterisk hindring. I tillegg er forbindelsen **lh3e** meget stabil, også for sidekjede - metabolisme. Ingen mindre metabolitter har blitt funnet med HPLC-ES-MS/MS. Disse dataene tyder på at, i det nedre intestinale innholdet, er disse analogene stabile i nærvær av anaerobe bakterier.

20 **EKSEMPEL 12: Galle sekresjon og metabolisme for forbindelse lh3e i galle-fistula - rotte etter duodenal (id) og femural (iv) administrasjon**

Eksempel 12 A: Mål og rasjonale

[268] Strukturelle modifikasjoner av gallesyrer kan påvirke deres lever-opptak, lever - transport og sekresjon og intestinal absorpsjon. Derfor er kunnskap om gallesekresjon etter både iv og id administrasjon, sammen den metabolisme, et sentralt punkt i valg av forbindelse for ytterligere studier.

[269] For å evaluere modusen og effisiensen av intestinal absorpsjon for forbindelse **lh3e** ble forbindelsen administrert både intravenøst (femoral infusjon) og oralt (duodenal infusjon) ved samme dose og dens hastighet for galle - sekresjon ble evaluert i galle - fistula rottemodell.

[270] Forskjellene i området under kurven av gallesekresjon vs tid mellom iv og id administrasjon forklarer dens intestinale absorpsjon og gir informasjon om dens biotilgjengelighet. Videre kan lever- og tarmmetabolismen også være ganske

forskjellige, og derfor ble gallesekresjonen av forbindelse **lh3e** og dens viktigste hepatiske metabolitter bestemt.

Koleretisk effekt-

5 *-Duodenal infusjon*

[271] Galle - fistula rottemodellen ble utviklet ved University of Bologna Lab Facilities. Forbindelse **lh3e** ble administrert i en dose på 1 $\mu\text{Mol} / \text{kg} / \text{min}$ (en times infusjon) på en rottegruppe via duodenal infusjon (id). Rotter hadde en galle - fistula for å samle inn galleprøver på forskjellige tidspunkter før, under og etter infusjon. For
10 duodenal infusjonseksperiment ble 6 rotter (250 +/- 10 g) behandlet. Galleprøver ble samlet inn hvert 15. minutt i fire timer. I tillegg ble tre kontrollrotter behandlet med saltopløsning under de samme betingelser av tidtaking og prøvetaking (duodenale kontrollrotter).

[272] Duodenal infusjon av forbindelse **lh3e** ga betydelig økt galle
15 strømningshastighet, som nådde maksimal verdi på ca 120 $\mu\text{l} / \text{min} / \text{kg}$. Dette fenomenet startet under infusjonsperioden, og fortsatte i minst 3 timer.

[273] Forbindelse **lh3e** presenterte en potent koleretisk effekt, og dette er antatt å være relatert til dens struktur, en metyl - gruppe i C- 23 posisjon som delvis forhindrer konjugering, og dette molekylet kan gjennomgå en kolhepatisk shunt-bane. Til
20 sammenligning ga den duodenale infusjonen av CDCA noe økt galleflyt, som ikke oversteg 80 $\mu\text{l} / \text{min} / \text{kg}$.

-Intravenøs infusjon

25 [274] For femoralt infusjonsforsøk ble seks rotter behandlet. Figur 12 viser galleflyt i løpet av studien. Femoral infusjon startet etter 75 minutter med stasjonær tilstand og fortsatte i 60 min. Galleprøver ble samlet inn hvert 15. minutt for fire timer. I tillegg ble tre rotter behandlet med 3 % BSA-saltløsning under de samme betingelser av tid og prøvetaking (femorale kontrollrotter). Gallestrøm ved intravenøs infusjon av 3
30 % BSA-saltløsningsbærer (kontroll, n = 1) opprettholdt en verdi varierende fra 40 til 80 $\mu\text{l} / \text{min} / \text{kg}$ for hele forsøksperioden.

[275] Den iv - infusjon for forbindelsen **lh3e** ga betydelig økt galle - strømningshastighet og fenomenet startet 15 minutter etter begynnelsen av infusjonen,

og fortsatte i minst to timer. Den koleretisk effekten var ganske lik den som erholdes i id infusjonseksperiment.

Gallesekresjon

5

[276] Galleprøver som tatt i løpet av de iv- og id- eksperimentene ble analysert for å fastslå gallesekresjon av forbindelse **lh3e** og dets metabolitter.

HPLC-ES-MS/MS analyse

10

[277] Rent krystallinsk pulver av forbindelse **lh3e** ble skaffet fra R. Pellicciari laboratoriet i Perugia. Lagerførte løsninger av metanol på 1 mmol / l ble fremstilt og arbeidsløsninger ble fremstilt ved fortykning av egnede mengder av den primære oppløsning. Metanol og acetonitril var av HPLC-gradert renhet. Ammoniakk var 30 %
15 %, og eddiksyre var 99,8 %. Alle reagenser ble skaffet fra Carlo Erba Reagenser. HPLC-gradert vann ble utarbeidet med et Milli-Q-system.

Prøvepreparering

[278] Rotte - galleprøvene ble brakt til romtemperatur, kort omrørt og fortynnet 1: 100 volum / volum (galleprøver fra duodenal orinfusjon) og 1: 100 eller 1: 200 volum / volum (galleprøver fra femoral infusjon) med 15 mM ammoniumacetat buffer (pH = 5,0): acetonitril = 70 : 30 (volum / volum). Den endelige oppløsning ble overført i en autoprøvetakings ampulle, og 10 µl ble injisert inn i den kromatografiske kolonnen.

25

HPLC-ESI-MS/MS metode

[279] Galle - rotteprøver ble analysert med væske-kromatografi-tandem massespektrometri (HPLC-MS / MS) ved hjelp av elektropray (ESI) kilde i negativ ioniseringsmodus. For væskrokromatografi ble det brukt en Waters Alliance 2695 separasjonsmodul sammen med autosamplers. Autosamplers ble opprettholdt på 7 °C. Separasjon ble utført på en Synergi Hydro-RP C18 kolonne (150 x 2.0mm id, 4 µM partikkelstørrelse), beskyttet av en SecurityGuard ODS 4 x 2,0 mm id forkolonne, begge levert fra Phenomenex. Analytt ble eluert ved anvendelse av 15 mM
35 ammoniumacetat buffer (pH = 5,00) som mobil fase A og acetonitril som mobil fase B.

Mobil fase B ble øket fra 30 % til 64 % i løpet av 10 minutter, deretter til 100 % i løpet 10 minutter, og holdt konstant i 10 min. Strømningshastighet var 150 µl / min og kolonnen ble holdt på 45 °C. Kolonnens avløpsvann ble introdusert i ESI kilde knyttet til et trippelt kvadruppelt massespektrometer (Quattro-LC, Micro) som opererer i Multiple
 5 Reaction Monitoring (MRM) akkvisisjonssmodus. Nitrogen ble anvendt som forstøvergass ved 100 liter / time strømningshastighet, og som desolveringsgass på 930 liter / time. Ionekilde blokkerings- og desolveringstemperaturer ble satt til henholdsvis 80 °C og 180 °C. Kapillær - spenningen var 3,0 kV. MassLynx
 10 programvare versjon 4.0 ble brukt for datainnsamling og bearbeiding. I tillegg ble det ved hjelp av massespektrometri både i single MS eller tandem MS / MS konfigurasjons eksperimenter utført for å identifisere metabolitter.

Kvantifisering

15 **[280]** En 5-punkts kalibreringskurve ble utarbeidet daglig og injisert i dublikat. Kalibreringsprøver ble erholdt i 0,1 til 20 µMol / l konsentrasjonsområde fremstilt i mobil fase. Lineære kalibreringskurveparametere ble erholdt fra plottet av analyttens toppareal sammenlignet med analyttens-konsentrasjon ved bruk av en minste kvadraters regresjonsanalyse (vekt = 1 / x²). Korrelasjonskoeffisienter var ≥ 0,981.
 20 **[281]** De taurin konjugerte metabolittene av forbindelse **lh3e** ble også estimert. Korrigerende faktorer, for å ta hensyn til de ulike responsene i ES-MS/MS mellom frie og taurin - konjugerte arter, ble estimert og brukt på de områdeverdiene som ble hentet fra kromatogrammene fra HPLC - MRM datasett. Til slutt ble det brukt
 25 kalibreringskurver innhentet for de frie gallesyree, for å beregne de taurin konjugerte metabolittene.

Farmakokinetiske (gallesekresjon) av administrert analoger: iv versus id sammenligning

30 **[282]** Dataene referer seg til sekresjonsraten for forbindelsen gjenvunnet i gallen som sådan etter duodenal og femoral infusjon i en dose på 1 µmol / kg / min.
[283] Tabell 5 viser konsentrasjons- og sekresjons-verdiene for forbindelsen **lh3e** erholdt fra rotte galleprøver tatt i duodenal infusjon (1 time som spenner seg over fra 75 til 135 min).

Tabell 5. Forbindelse lh3e konsentrasjon og sekresjonsverdier hentet fra rottegalle - prøver tatt i duodenal infusjon (1 time, som spenner over 75 - 135 minutter)

Tid (min)	lh3e (n = 4)	
	Kons. (mmol/l)	Sekresjon ($\mu\text{mol} / \text{kg} / \text{min}$)
90	0,007	0,0003
120	0,69	0,057
150	1,88	0,167
180	1,29	0,150
210	0,79	0,077
240	0,39	0,033
270	0,27	0,026
300	0,20	0,015

- 5 **[284]** Tabell 6 viser konsentrasjons-og sekresjons - verdier erholdt fra rotte galleprøver tatt i femoral infusjon (1 h som strekker seg fra 75 til 135 min).

Tabell 6. Forbindelse lh3e konsentrasjons- og sekresjonsverdier hentet fra rottegalleprøver tatt i lårbens infusjon (1 time spenner over 75- 135 minutter).

Tid (min)	lh3e (n = 5)	
	Kons. (mmol/l)	Sekresjon ($\mu\text{mol} / \text{kg} / \text{min}$)
75	n. a.	a-
90	1,9	0,1
120	3,1	0,23
150	3,4	0,31
180	2,3	0,2
210	1,06	0,105
240	0,55	0,049

270	0,27	0,018
-a: ikke beregnet		

Tabell 6A. Tauro-lh3e konsentrasjons- og sekresjonsverdier estimert fra rotte galleprøver tatt i duodenal infusjon (1 time spenner over 75 til 135 minutter).

Tid (min)	lh3e (n = 4)	
	Kons. (mmol/l)	Sekresjon ($\mu\text{mol} / \text{kg} / \text{min}$)
90	0,017	0,001
120	0,63	0,051
150	0,68	0,053
180	0,75	0,091
210	0,68	0,063
240	0,60	0,054
270	0,64	0,074
300	0,74	0,053

5 Tabell 6B. Tauro-lh3e konsentrasjons- og sekresjonsverdier estimert fra rotte galleprøver tatt i lårbens infusjon (1 time spenner over 75 til 135 minutter)

Tid (min)	lh3e (n = 5)	
	Kons. (mmol/l)	Sekresjon ($\mu\text{mol} / \text{kg} / \text{min}$)
90	0,29	0,0101

120	0,50	0,044
150	0,43	0,043
180	0,51	0,045
210	0,33	0,031
240	0,21	0,019
270	0,059	0,0039

[285] Den biliære sekresjonen av forbindelse **lh3e** etter iv - administrering var effektiv, og forbindelsen ble gjenvunnet i galle med en relativt høy prosentandel. Den kinetiske profilen indikerte at forbindelsen ble effektivt tatt opp av leveren og ble skilt ut i gallen, delvis som sådan, og dessuten i mindre grad, metabolisert til for mer polare forbindelser (fig. 13, 14a og 14b). Uten ønske om å være bundet av noen spesiell teori, er det antatt at nærværet av metylgruppen i C- 23 posisjon hindrer konjugeringsprosessen med taurin og glysin, som delvis vil være relevant for en effektiv utskillelse av nesten alle naturlig forekommende karboksylert BA; dette er grunnleggende for dihydroksy BA og til en mindre grad for trihydroksy BA. Omfanget av gjenvinningen i galle er også relatert til den administrert dosen. Etter id – administrasjon, var gjenvinningen i galle noe lavere enn gjenvinningen etter iv – administrasjon, som tyder på at forbindelsen ikke blir effektivt absorbert av tarmen (fig. 13, 14c og 14d) Med tanke på fysisk-kjemiske egenskaper, forventet vi at denne forbindelse kunne bli absorbert ved passiv diffusjonsmekanisme ($\log P = 1,44$) og en aktiv mekanisme synes ikke å være involvert. Tilstedeværelse av tre hydroksylgrupper tillater at molekylet på den ene side å bli effektivt tatt opp av leveren og delvis bli utskilt i gallen. Det hindrer også molekylet fra å bli absorbert av tarmen.

20 Eksempel 12B

[286] Resultatene i tabellen nedenfor viser at forbindelse **Ih3e** har en potent koleretisk effekt, med en maksimal galle - sekresjonsrate (SVO) som er betydelig høyere enn de for CDCA og CA.

5

Tabell. Galle - lipid sekresjonsparametere etter iv- og id- infusjon med en dose av 1 ($\mu\text{mol} / \text{min}$) / kg kroppsvekt over 1 time av BA'er^a

Forb.	SV ₀ id(iv)	S _{BA} id(iv)	% fritt id(iv)	% konj. Id(iv)
CDCA	57+/- 7 (51+/- 9)	0,7+/- 0,2 (0,8+/- 0,1)	3+/- 1 (4+/- 1)	96+/- 8 (98+/- 5)
CA	64 +/- 6 (78 +/- 8)	1,0+/- 0,4 (1,3+/- 0,2)	12+/- 2 (8+/- 3)	90+/- 4 (92+/- 6)
Ih3e	112 +/- 12 (131 +/- 11)	0,5+/- 0,2 (0,7+/- 0,3)	94+/- 6 (93+/- 5)	10+/- 5 (7+/- 3)
R-EMCA	81 +/- 8 (90 +/- 5)	0,4+/- 0,2 (0,5+/- 0,1)	68+/- 8 (65+/- 4)	32+/- 7 (26+/- 6)
Saltløs n.	46 +/- 4 (48 +/- 4)	0,4+/- 0,1 (0,4+/- 0,1)		

^aData representerer gjennomsnittsverdier og standardavvik av seks uavhengige eksperimenter. Vehikelet som brukes for id administrasjon ble saltoppløsning. Vehikelet som ble brukt til for id - administrasjon var 3 % BSA saltoppløsning, pH 7,2. SV₀: maksimal galle sekresjon rate (($\alpha \text{ L} / \text{min}$) / kg kroppsvekt). S_{BA}: maksimal BA sekresjonsrate (($\mu\text{mol} / \text{min}$) / kg kroppsvekt). % Fri:tt prosentandel av administrert dose gjenfunnet i galle av molekylene som sådan. % - Konjugert: prosentandel av administrert dose gjenfunnet som konjugert BA.

[287] Følgelig, resultatene i tabellen ovenfor viser at forbindelsen **Ih3e** er motstandsdyktig mot konjugasjon, der mer enn 90 % av forbindelsen som blir utskilt i gallen i sin ukonjugert formen etter intravenøs eller intraduodenal infusjon. I motsetning til dette kan CDCA og CA skilles ut i gallen som sådan, hvilket krever konjugeringstrinnet. Således er det forutsatt at den C23 (S)- metyl - gruppen i forbindelse **Ih3e** forhindrer karboksyl CoA - aktivering og påfølgende konjugering, for

10

derved å begunstige dens kolhepatiske shunt-bane med en duktulær absorpsjon og en potent koleretisk virkning.

[288] For ytterligere å studere innflytelsen av konfigurasjonen til C23 - metylgruppen i sidekjedens amidering og den koleretiske virkningen av forbindelsen, ble tilsvarende analyser også utført på den annen epimer, nemlig 6 α - etyl - 23 (R) - metylkol syre (R-EMCA i tabellen ovenfor). Inspeksjonen av maksimal galle sekresjon rate (SV0) viser at koleretisk effekten av R-EMCA fortsatt er høyere enn CA, men lavere enn forbindelse **lh3e**. Som et resultat av disse dataene, antydes det at orienteringen av C- 23 metyl -gruppen er viktig for konjugering av karboksylgruppen, med en metyl - rest som passer dårlig i den katalytiske lommen for konjugering av enzymet i tilfelle av C23 (S) epimer. Alt i alt viser disse resultatene at forbindelse **lh3e** blir effektivt absorbert og gjennomgår det enterohepatiske kretsløpet, om enn med forholdsvis liten lever - konjugering. Den lave hastigheten for konjugering kan også gi anledning til at forbindelse **lh3e** unnslipper hepatisk første passeringsklarering og når frem til den systemiske blodsirkulasjonen.

Hepatisk metabolisme

[289] For en preliminær sikting, ble søket etter de mulige metabolittene utført på grunnlag av de forventede forbindelsene i henhold til tidligere forsøk og data, og dessuten strukturen og fysisk-kjemiske egenskapene for forbindelsen **lh3e**.

[290] Forbindelsen **lh3e** blir hovedsakelig utskilt som moderforbindelse (umodifisert), og ble bare litt metabolisert av leveren. Den viktigste metabolitten var taurin - konjugatet, og mono glukuronid var til stede i en lav mengde. Metabolismen er tilsvarende for både iv- og id- administrasjon. Tatt i betraktning gjenvinningen i galle, forventet vi å identifisere andre metabolitter. Tilstedeværelse av metylgruppen i C- 23 posisjon hindrer konjugeringsprosessen med taurin og glysin, som er delvis krevet for en effektiv utskillelse av nesten alle naturlig forekommende karboksylerte BA'er, og dette er grunnleggende for dihydroksy BA, og i mindre grad for trihydroksy BA, siden de allerede er nokså polare. Dannelse av glukuronider vil kunne være aktuelt hvis det ble administrert høyere doser.

[291] Figur 14a viser forbindelse **lh3e** og dens viktigste metabolitter identifisert i galle ved hjelp av massespektrometri i iv – eksperimentet. Data blir rapportert som absolutte arealverdier (n = 5). Figur 14b er en zoom - visning av Figur 14a. Figur 14c viser forbindelse **lh3e** og dens viktigste metabolitter identifisert i galle ved hjelp av

massespektrometri i di - eksperimentet. Data blir rapportert som absolutte arealverdier. Figur 14d er en zoom - visning av figur 14c.

[292] Oppsummert, forbindelse **Ih3e** er moderat hydrofil og har en mild renseseffekt. Dens hepatiske opptak synes å virke effektivt. Gallesekresjonen er også effektiv, med tanke på at forbindelsen utskilles hovedsakelig umodifisert, og, i begrenset utstrekning, konjugert med taurin. Den intestinale absorpsjonen er også effektiv, selv om den ikke er fullstendig, og molekylet krever ikke omfattende hepatisk metabolisme ved den administrerte dosen for å bli utskilt til galle. Tilstedeværelse av metyl - gruppen i C- 23 posisjon forhindrer utstrakt konjugering med taurin for gallesekresjon. Derfor er det en økning av hepatisk resonanstid av molekylet som gjennomgår en kolhepatisk shunt-bane, hvilket er ansvarlig for dets potente koleretiske virkning.

EKSEMPEL 13: In vitro toksisitet på HepG2 celler

[293] Forbindelser ifølge oppfinnelsen ble evaluert for in vitro toksisitet ved hjelp av en HepG2 celle assay. HepG2 celle cytotoxiskitet ble bestemt ved å overvåke ATP reduksjon, og HepG2 celler apoptosis ble bestemt ved overvåking av kaspase-3 aktivering. Resultatene er vist i tabell 7.

Cytotoxiskitet

[294] Cell levedyktighet ble målt ved hjelp av PerkinElmer ATP-Lite 1 STEP. ATP er en markør for cellelevedyktighet, fordi den er tilstedeværende i alle metabolsk aktive celler og konsentrasjonen avtar meget hurtig når cellene gjennomgår nekrose eller apoptose. HepG2 - celler (1×10^4) ble utsådd i 96 brønners plate og stimulert med 10 - gangers fortykning fra 1 nM til 300 μ M av forbindelsen **Ih3e** i 4 timer ved 37 °C. Platene var i likevekt ved romtemperatur i 10 minutter og 100 μ l av ATP-Lite 1 STEP-reagens ble tilsatt til 100 μ l av kulturmedium inneholdende celler. Luminescens ble lest med Victor Light (PerkinElmer). Det eksperimentelle signalet ble subtrahert fra bakgrunn. Tamoksifen ble brukt som positiv kontroll av cellulær cytotoxiskitet, mens negativ kontroll var de ikke-behandlede cellene.

Apoptose

[295] Kaspaser deltar i den molekylære styringen av apoptose, og TruPoint Caspase-3 Substrat gjør det mulig med en sensitiv, robust og homogen tidsoppløst fluorescens-analyse av kaspase -3 aktivitet. Humane hepatocyt celler (HepG2) ble sådd (1×10^4) i 96 brønners plate med HepG2 medium uten natrium pyruvat. Cellene ble stimulert i 4 timer ved 37°C med serielle fortyninger av testforbindelsen **Ih3e** fra 1 nM til $300 \mu\text{M}$ i triplikat. Staurosporin ble brukt som positiv kontroll av apoptotiske celler. Negative kontroller var: 1. Ustimulerte celler; 2. Medium alene, uten celler; 3. Celler inkubert uten kaspase - substratet. Lyserings - buffer og kaspase-3 substrat ble tilsatt cellene, og etter 1 time og 24 timer ble fluorescensen målt med EnVision.

Nekrose

[296] 'Den cellulære nekrosen ble analysert ved å måle utslipp av Lactato DeHydroxegenase (LDH) fra nekrotiske celler ved hjelp Promega's CytoTox ONE Homogen Membran Integrity analyse. HepG2 - celler (1×10^4) ble utsådd på en 96 brønners plate. Etter 18 timer med inkubasjon, ble friskt medium uten Sodium Pyruvate og Serum fri erstattet og forbindelse **Ih3e** ble lagt til i doserespons fra $0,1 \mu\text{M}$ til $500 \mu\text{M}$. Triton 1 % ble anvendt som maksimal LDH - frigjøringskontroll. Tamoksifen ble brukt som middel for nekrose - induisering. De pletterte cellene ble plassert tilbake i inkubatoren i ytterligere 4 timer. Supernatanten ble overført i en ny plate, og det samme volum av CytoTox-ONE-reagens ble tilsatt platen. Etter 1 times inkubering, ble fluorescensen avlest med EnVision multilabel plateleser med en eksitasjonsbølgelengde på 560 nm og en emisjon på 590 nm.

Tabell 7

<i>In vitro</i> toksisitet på HepG2 - celler			
Forbindelse	CYTOTOKSISITET ATP	APOPTOSE Kaspase-3 Aktivering EC_{50} (μM)	NEKROSE - LDH frigjøring EC_{50} (μM)
	reduksjon EC_{50} (μM)		

Staurosporin ^(apoptose)	15	3	n. d.
Tamoksifen ^(nekrose)	47	4	35
LCA	84	65	105
CDCA	650	890	> 1000
UDCA	> 1000	n. d.	n. d.
CA	> 1000	n. d.	n. d.
Forbindels Ih3e	> 1000	n. d.	n. d.

Eksempel 14: NR - selektivetsanalyser

[297] Selektiviteten for forbindelsene ifølge oppfinnelsen ble evaluert ved hjelp av analysefremgangsmåter kjent innenfor fagområdet. Spesielt ble følgende analysemetoder brukt:

- FXR og LXR: Ko-aktivator Rekruttering (alfa - sikt);
 - TGR5: cAMP nivå på menneskelig tarmcellelinje (NCI-H716);
 - PXR: Ligander Competition analysen (Binding Assay) CAR:
 - Ko-aktivator rekruttering (Lantha – sikt)
- Tabell 8 viser resultatene av disse analysene.

TR – FRET ko.aktivator analyse

[298] Lantha sikt assay (Invitrogen) ble anvendt i reseptor nukleær selektivets assay. Settet («kit») benytter et terbium-merket anti-GST-antistoff, en fluorescein-merket peptid ko-aktivator, og et NR-ligandbindende domene som er merket med glutathion-S-transferase (GST) i en homogen blanding-og-les assay-format. Assayene ble utført i 384 mikrobørnns plate (PerkinElmer). En 20 µl samlet analysereaksjon hadde inkludert 5 nM GST-merkede NR'er, 125 nM av ko-regulator peptid, 5 nM av TB-anti - GST merket antistoff (terbium-anti-glutathion S-transferase merket), 5 mM DTT og varierende konsentrasjon av forbindelse **Ih3e** i analysebuffer levert av Invitrogen. Den negative kontrollen var blottet for forbindelsen **Ih3e**, men inneholdt alt annet som befinner seg i agonist-brønnen. Etter 1 times inkubering i mørket, ble TR-FRET målinger gjort i Envision. Utslippsforholdet 520/495 ble plottet mot varierende ligandkonsentrasjoner. Dataene ble analysert ved hjelp GraphPad Prism, ved bruk av den sigmoidale kurveligningen med variabel helning for å få EC₅₀ verdier.

Tabell 8.

NR - selektivetsanalyser							
Forbindelse (Referanse standard)	FXR aktivering (CDCA = 10-20 μM) EC_{50} (μM)	TGR5 aktivering (LCA = 4- 8 μM) EC_{50} (μM)	LXR? aktivering (T090131 7 =) EC_{50} (μM)	PXR binding (SR- 12183 =0,013 μM) IC_{50} (μM)	CAR aktivering (CITCO = 0,005 μM) EC_{50} (μM)	PPAR δ aktivering (GW0742 = 0,004 μM) EC_{50} (μM)	VDR aktivering (Di- hydroksyVit D3 = 0,005 μM) EC_{50} (μM)
CDCA	20	30	Ingen aktivitet	> 250	> 250	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet
LCA	Ingen aktivitet	4 - 8	Ingen aktivitet	23	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet
CA	Ingen aktivitet	30	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet
UDCA	> 150	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet	> 250	> 250	Ingen aktivitet	Ingen aktivitet
Forbindelse	175	0,9	Ingen	110	> 250	Ingen	Ingen

Ih3e			aktivitet			aktivitet	aktivitet
FXR, LXR, PPAR δ , VDR: ko.aktivator analyse, TGR-5: cCAMP - nivå på human intestinal celle - linje, NCHH716; PXR: Ligand – konkurranse analyse							

EKSEMPEL 15: Forbindelsesstabilitet

- [299]** Stabiliteten for forbindelsen **Ih3e** ble bestemt ved anvendelse av fremgangsmåter kjent innenfor fagområdet. Den cellulære fraksjonskonsentrasjonen var 1 mg / ml i over et tidsforløp på 0 - 15 – 30 - 60 – 120 – 240 - 360 - 1440 minutter. Positive kontroller var testosteron (1000 ng / ml), 7-hydroksy-coumarin (1296 ng / ml), benzosyre (2440 ng / ml) i løpet av et tidsforløp på 0 – 10 – 20 – 40 – 60 - 120. Analysemetoden som ble brukt var LC / MS separasjon på C 18 kolonne ved gradient polaritet; akkvisisjon utført i Single Ion Monitoring. Resultatene er vist nedenfor i tabell 9.

Tabell 9.

	Ih3e	Positive kontroller		
		Testosteron	7-hydroksy coumarin	Benzosyre
<i>T ½ (uttrykt i minutter)</i>				
Human lever, S9 fraksjon	725	39	8,5	236
Humane lever - mikrosomer	1942	8 - 20	---	---

Eksempel 16 Frigjøring av GLP-1 ex vivo

- [300]** Figur 16 viser at forbindelse **Ih3e** dramatisk, og doseavhengig, induserer frigjøring av GLP - 1 ex vivo. Figur 16 viser at virkningen av 1 times eksponering for angitte konsentrasjon av forbindelse **Ih3e** på GLP - 1 frigjør ex vivo i ileale eksplantater, som har vært isolert i 18 – uker, av HF-matet TGR5-Tg hann-mus (n = 4). Dataene er representert som gjennomsnitt + SE: Student's unpaired t-test, (*) P <0,05, forbindelse **Ih3e** behandlete ileale eksplantater versus vehikel behandlete.
- [301]** De følgende eksperimentelle prosedyrene benyttes i Eksempler 17 - 21.

Kjemikalier og reagenser

[302] Alle biokjemiske reagenser ble kjøpt fra Sigma-Aldrich, med mindre annet er angitt. DPP4 - inhibitoren (DPP4i) sitagliptin var en vennlig gave fra Dr. C. Ullmer (Hoffmann-La Roche). Forbindelse **Ih3e** ble syntetisert slik som beskrevet tidligere (Macchiarulo et. al, 2008;. Pellicciari et al, 2007.).

Cellekultur

[303] In vitro forsøk ble utført i STC-1 eller NCI-H716 - celler som var behandlet med vehikelet (DMSO) eller forbindelse **Ih3e**. Forbindelse **Ih3e** ble undersøkt for sin agonistiske aktivitet på TGR5, slik som tidligere beskrevet (Macchiarulo et al., 2008, J. Chem. Inf. Model. 48, 1792;. Pellicciari et al, 2007, J. Med. Chem. 50, 4265-4268). cAMP-produksjonen ble utført som beskrevet (Sato et al., 2008, J. Med. Chem. 51, 1831, Watanabe et al, 2006, Nature 439, 484). Cox aktivitet ble evaluert ved å følge oksydasjonen av fullt redusert cytochrom c (Sigma) ved 550 nm (Feige et al. 2008b, Cell Metab. 8, 347). ATP / ADP ratio og GLP-1 frigjøring ble målt i henhold til produsentens instruksjoner (henholdsvis BioVision og Millipore). Primære brune adipocytter ble fremstilt slik som tidligere beskrevet (Watanabe et al. 2006, Nature 439, 484), og ileale eksplantater ble fremstilt i henhold til en etablert fremgangsmåte (Cima et al, 2004, J. Exp. Med. 200, 1635- 1646).

Intracellulær kalsium – kvantifisering

[304] NCI-H716 - celler (40000 celler) ble utsådd i 96 - brønners sorte plater belagt med Matrigel (BD Biosciences). Sytti-to timer etter transfeksjon, ble cellene vasket to ganger i analysebuffer (HBSSix, 20 mM HEPES [pH 7,4]) og analysert for intracellulært kalsium med Fluo-4 AM i henhold til produsentens protokoll (Invitrogen). **Biokjemi og histokjemi** Plasmaparametre og fettinnhold fra lever og avføring ble målt slik som beskrevet (Mataki et al., 2007, Mol. Cell. Biol. 27, 8330 - 8339). Hematoksylin og eosin (H & E), ble Sirius- rød, og oljerød O-farging ble utført slik som beskrevet (Mark al., 2007, Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 29, Unit 29B, 24), og mikrografer ble tatt med et mikroskopbasert CCD-kamera med bredt felt (Leica). For bukspyttkjertelsseksjoner, ble områder skalert og telt opp fra fire HE-fargede alternerte seksjoner fordelt på 150 µM ved anvendelse av ImageJ programvare (fem dyr per gruppe). Immunofluorescerende farging av insulin ble utført slik som beskrevet (Fajas

et al., 2004, J. Clin. Invest. 113, 1288). I tillegg ble bukspyttkjertelområder isolert med kollagenase - fordøyelse av bukspyttkjertelen fra HF-matet TGR5-Tg mus i henhold til tilgjengelig prosedyrer online- (for eksempel, se nettsiden til JOVE (Journal of Visualized Experiments)). Insulin ble hentet etter O / N - inkubasjon ved -20°C i syre
5 etanol og målt med ELISA på PBS - fortynnede prøver i henhold til produsentens instruksjoner (Mercodia). GLP-1-frigjøring ble målt in vitro, ex vivo og in vivo, i henhold til fremgangsmåter som er kjent innen faget.

Måling av oksygenforbruk

10

[306] Cellulært oksygenforbruk ble målt ved hjelp av en Seahorse Bioscience XF24 analysator med ti biologiske gjentak per tilstand (Feige et al., 2008b, Cell Metab. 8, 347).

15 Dyreforsøk

[307] Dyrene ble plassert og avlet i henhold til standardiserte prosedyrer (Argmann og Auwerx, 2006b). Alderstilpassede hannmus ble benyttet for alle eksperimentene. Genmanipulerte mus modeller (GEMM'er), det vil si TGR5-Tg og
20 TGR5^{-/-} mus ble generert slik som beskrevet i Supplementære data. DIO i GEMM'er eller C57BL/6J mus (Charles River) ble indusert ved å mate 8 uker gamle mus med et HF - kosthold (60 % kal / fett, D 12492; Forskningsdietter) i minst åtte uker, slik som nevnt i tegnforklaringer for tekst- og figurer. I kostintervensjonens eksperimenter, ble Forbindelse lh3e blandet med diett (Feige et al. 2008a, Curr. Protoc. Mol. Biol. kapittel
25 29, Enhet 29B, 25) i en dose som er tilstrekkelig til å erholde en in vivo-dosering på 30 mg / kg / d. Fenotyping eksperimenter på musene ble utført i henhold til Empress - protokoller (se, for eksempel, nettsidene til Empress (European Mouse Phenotyping Resource of Standardised Screening)), og har som mål å vurdere mat-og vanninntak, kroppssammensetning (Argmann et al., 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol., Kapittel 29,
30 Enhet 29A, 23), energiforbruk (Argmann et al., 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Chapter 29, Unit 29A, 23), glukose-og lipid homeostase (Argmann et al. 2006b, Curr. Protoc. Mol. Biol. Kapittel 29, Enhet 29A, 22); Heikkinen et al, 2007, Curr.. Protoc. Mol. Kapittel 29, Unit 29B, 23;. Mataka et al, 2007, Mol. Cell Biol. 27, 8330), og plasma biokjemi (Argmann og Auwerx, 2006a, Curr. Protoc. Mol. Biol. Kapittel 29, Enhet 29A, 22). Vev
35 og blod ble samlet inn og behandlet for histopatologi, blodkjemi, og gen - ekspresjon i

henhold til standardiserte prosedyrer (Argmann og Auwerx, 2006a; Feige et al, 2008b; Mark et al, 2007; Watanabe et al, 2006). Hyperinsulinemisk euglykemisk klemme-studier ble utført slik som beskrevet (Feige et al. 2008b), med mindre modifikasjoner, inkludert en endring i den innledende insulinbolusen(30 mU / kg) og insulin

5 infusjonshastighet (10 mU / min / kg). Plasma GLP-1 nivået ble målt ved ELISA (Millipore) på blod innsamlet med retro-orbital punktering. Forsøk med db / db-mus (Charles River) ble utført på 14 uker gamle dyr foret med en CD uten eller med forbindelsen **Ih3e** (30 mg / kg / d) i 6 uker (Feige et al. 2008a).

10 Gen - ekspresjons profilering

[308] Geneuttrykks profilering ble utført med sanntids kvantitativ PCR (Feige et al, 2008b;. Watanabe et al, 2006). Primer - sekvenser som ble brukt har blitt publisert tidligere, bortsett fra de som brukes for Kir6.2 genet: R-5 'AGATGCT

15 AAAGTTGGGCTTG (SEKVENS ID NR. 1.), F-5' TAAAGTGCCCACACCACTC (SEKVENS ID NR. 2.).

Statistikk

20 **[309]** Statistiske analyser ble utført ved hjelp av uparet Student's t-test. Dataene er uttrykt som midlere +/- SEM, og p-verdier mindre enn 0,05 ble ansett som statistisk signifikante.

Eksempel 17: TGR5 mRNA - ekspresjon

25

[310] En forbindelse mellom BAs og energiforbruk in vivo (Watanabe et al., 2006, Nature, 439, 484 - 489) har tidligere blitt etablert, og dermed har det blitt spekulert om at aktivering av TGR5 signaler vil kunne påvirke mitokondrie - aktivitet på en mer generell måte. For å finne innledende støtte for denne hypotesen, ble TGR5

30 mRNA - ekspresjon analysert via GeneNetwork lever - mRNA database i en B x D genetisk referansegruppe, som finnes på nettsiden til GeneNetwork, University of Tennessee. Et bredt spekter for variasjon av TGR5 mRNA - ekspresjon var tydelig blant de forskjellige B x D musestammene. Interessant nok, TGR5 mRNA -

35 ekspresjonen var sterkt signifikant korrelert med uttrykket for flere gener som koder for underenheter av komplekser involvert i oksidativ fosforylering, slik som cytokrom c -

oksydase (Cox) (for eksempel CoxVIIa, Fig. 17A) og ATP syntase (Atp6vOb, ATPase H⁺ som transporterer V0 subenhet B; Atpaf2, ATP syntase mitokondriell F1 kompleks sammenstillingsfaktor 2; ATPL a3, ATPase Na⁺/K⁺ som transporterer alfa 3-polypeptid; Atp6vl b2, ATPase H⁺ som transporterer V1 underenhet B isoform 2). I samsvar med denne observasjon, resulterte behandling av STC-1 celler med forbindelse **Ih3e** i en cAMP-avhengig økning av Cox-aktivitet (figur 17B), som ble forbundet med en økning i det cellulære oksygenforbruket (figur 17C), og en økning i ATP / ADP forholdet (Figur 17D). Dette resultatet ble bekreftet i den humane enteroendokrine cellelinjen NCI-H716, i hvilken behandling med forbindelse **Ih3e** økte ATP produksjonen på en cAMP-avhengig måte. Interessant nok ble TGR5 - ekspresjon også sterkt korrelert med det for Kir6.2, en komponent av den ATP-avhengige kaliumkanalen (K_{ATP}) (figur 17E). Disse sammenhengene ble ytterligere bekreftet av TG R5 RNA interferens i STC-1 celler, som resulterte i et samtidig fall i uttrykket for CoxFV og Kir6.2 mRNA (Figur 17F).

15

Eksempel 18. Aktivering av TGR5 signaliseringsvei gir høyere intracellulære kalsiumnivåer og stimulerer GLP-1 frigjøring i enteroendokrine L-Celler

[311] I bukspyttkjertelens β - celler er det godt etablert at en økning i ATP / ADP-forhold avledet fra glukose metabolisme lukker K_{ATP} - kanalene, som fører til depolarisering av plasmamembranen. Denne membran - depolariseringen åpner i sin tur kalsium-slusede spenningskanaler (Ca_v), som forårsaker kalsium - innfluks. Den påfølgende økning av intracellulært kalsium utløser deretter direkte vekselvirkning mellom exocytotiske proteiner som ligger i den insulinholdige granulat - membranen og de som befinner seg i plasmamembranen (Yang og Berggren, 2006, Endocr. Rev 27, 621 - 676), som fører til den påfølgende frigjøringen av insulin (Nichols, 2006, Nature, 440, 470 - 476). Nyere funn støtter hypotesen om at K_{ATP} - og Ca_v - kanaler også spiller en sentral rolle i GLP-1 frigjøringen fra enteroendokrine L - celler (Reimann og Gribble, 2002, Diabetes 51, 2757 - 2763;. Reimann et al, 2008, Cell Metab. 8, 532 - 539). Det er fascinerende at, i B x D referansegruppen, har vi også funnet ut at TGR5 - ekspresjonen korrelerte med uttrykket for Ca_v2.2 (figur 18A), hvilket uttrykk tidligere ble beskrevet i enteroendokrine celler (Reimann et al., 2005, J. Physiol. 563, 161 - 175), og som deltar i kalsiumstimulert insulinfrigjøring i bukspyttkjertelens β - celler (Yang og Berggren, 2006, Endocr. Rev. 27, 621 - 676). Sammen med dette, får forbindelse **Ih3e** på en robust måte øket kalsiuminnstrømmingen i den den humane enteroendokrine

35

cellelinjen NCI-H716, en effekt som ble potensiert av TGR5 - overekspresjon og, i motsetning til dette, avstumpet med TGR5 RNA interferens (figurene 18B og 18C), eller ved tilsetning av adenylatsyklase inhibitor MDL-1 2330A (MDL) (fig. 18D). I tillegg vil tilstedeværelse av glukose ha forsterket den TGR5 - avhengige økning av

5 intracellulært kalsium (figur 18E). Denne effekten ble korrelert med en økning av GLP-1 - frigjøring fra NCI-H716 celler (Figur 18F), som ble hemmet av MDL- 12 - 330A.

[312] Den TGR5-mediert GLP-1 frigjøringen utløst av forbindelse **Ih3e** ble

ytterligere bekreftet i mus enteroendokrine STC-1-celler, i hvilke virkningen av

forbindelsen **Ih3e** på GLP - 1 - frigivelse ble forsterket av TGR5 overekspresjon,

10 samtidig med at den blir forhindret av enten RNA - interferens (figur 18G) eller med

MDL- 12 - 330A, og understreker ytterligere en cAMP - avhengighet av TGR5-mediert

GLP - 1 frigjøring (figur 18H). Samlet viser disse dataene at TGR5 regulerer en viktig

bane som styrer frigjøringen av GLP - 1 fra enteroendokrine L - celler.

15

Eksempel 19. TGR5 - overekspresjons modulator GLP-1 sekresjon in vivo

[313] For ytterligere å evaluere den metabolske rollen til forbedret TGR5 -

signalisering, vurderte vi virkningen av transgenisk overekspresjon av TGR5 in vivo i

20 forbindelse med DIO i mus. TGR5 transgene mus (TGR5-TG) ble generert av eggcelle

- injeksjon av bakterielt kunstig kromosom (BAC) RP23- 278N1. Ved kvantitativ

sanntids PCR, ble TGR5-Tg mus vist å ha integrert seks eksemplarer av RP23- 278N1

1 BAC kloner, som fører til en robust TGR5 mRNA - ekspresjon, begrenset til de fleste

vev som normalt har ekspresjon for TGR5. Glukosetoleranse ble markert forbedret i

25 TGR5-Tg-mus som ble satt i 10 uker med en fettrik (HF) diett sammenlignet med

kontrollgruppen HF matede kull-kamerater (figur 19A), mens ingen forskjell ble notert i

mus på chow - diett (CD) (data ikke vist). I motsetning til våre forventninger, var ingen

forskjeller observert i vektøkning mellom villtype og TGR5-Tg mus på CD - eller HF -

kosthold, viser at forbedring av glukosetoleranse i TGR5-Tg mus ikke kunne tilskrives

30 konfunderende effekter av vekttap. Fraværet av vektøkning i TGR5-Tg mus, i

kjølvannet av en økning av energiforbruk, ble forklart med en reduksjon av den

lokomotoriske aktiviteten. Siden GLP - 1 - reseptor - knockout mus viser en markert

hyperaktivitet (Hansotia et al., 2007, J. Clin. Invest. 117, 143 - 152), administrerte vi

GLP-1 reseptor agonisten Ex-4 på villtype mus for å vurdere om nedgangen i den

35 lokomotoriske aktiviteten i TGR5-Tg mus kunne være knyttet til GLP-1 sekresjonen.

Ex-4 ga en redusert lokomotorisk aktivitet i mus på en effektiv og doseavhengig måte. Interessant nok, ved 1 nmol / kg, la vi merke til en betydelig reduksjon i den lokomotoriske aktiviteten mens musene fremdeles spiste riktig.

[314] Interessant nok, og i henhold til våre forventninger, var glukose toleranse i TGR5-Tg-mus assosiert med en robust GLP – 1 - sekresjon og insulinfrigivelse som reaksjon på en oral glukosebelastning (figur 19B). Betydningen av den forbedrede GLP - 1-sekresjonen ble understreket ved det faktum at målinger av plasma GLP - 1-nivåer ble utført uten forhåndsvis oral administrering av en dipeptidyl -peptidase-4 (DPP4) inhibitor til musene. Denne forbedrede GLP - 1 frigjøringen i TGR5-Tg mus bidrar til å forklare den reduserte lokomotoriske aktiviteten i disse musene. For ytterligere å undersøke virkningen av TGR5 overekspressjon på GLP - 1 sekresjon, ble HF - matede mus deretter utfordret med et testmåltid å stimulere BA frigjøring fra galleblæren. Interessant nok ble virkningen av TGR5 overekspressjon på insulin og GLP - 1 sekresjon mer uttalt postprandialt enn etter den enkle glukose utfordringen (Figur 19C). Det er spekulert på om denne er på grunn av den økte BA - fluksen utløst av testmåltidet, sammenlignet med glukose utfordringen. I tråd med denne hypotesen, bekreftet en behandling av ileale eksplantater fra TGR5-Tg og kontrollmus med litokolinsyre (LCA) at BA'er gir et utmerket signal for å indusere GLP - 1 frigjøring i sammenheng med høy TGR5 - ekspressjon (Figur 19D). Disse dataene er dessuten i samsvar med resultatene som er erholdt i mTGR5-transfektete STC - 1 celler der GLP - 1 frigjøringen også ble styrket av økt ekspressjon av TGR5 (figur 19G). Vi spekulerer i at i sammenheng med villtype ileale eksplantater, vil en rask nedbrytning av GLP - 1 ved DPP4 enzym kunne maskere moderat økning av GLP - 1 frigjøring utløst av LCA.

[315] Virkningen av GLP - 1 på bukspyttkjertelfunksjon har blitt grundig dokumentert i løpet av det siste tiåret, og spenner fra insulin-sekretoriske effekter til å fremme bukspyttkjertelens område-overlevelse og -spredning (Drucker, 2006, Cell Metab. 3, 153 - 165). I denne sammenheng viste immunofluorescerende farging av insulin på pankreatiske seksjoner at, i motsetning til hypertrofiske områder med lavt insulininnhold, slikt som observert i HF-matet kontrollmus, var områder for HF - matede TGR5-Tg-mus ikke hypertrofiske og mer intenst farget for insulin (figur 19E). I tråd med disse dataene, bekreftet telling og dimensjonering av bukspyttkjertelområder at TGR5 - ekspressjon gir opprettholdelsen av et vanlig område - fordelingsprofil (Figur 19F), sannsynligvis på grunn av nivåer med økt plasma GLP - 1. I tillegg var insulininnholdet i isolerte områder av bukspyttkjertelen signifikant høyere i HF - matede TGR5-Tg-mus enn i kontrollgruppen (Figur 19G).

[316] For ytterligere å etablere en rolle for TGR5 signaliseringen ved opprettholdelse av glukose homeostase, vurderte vi glukosetoleransen for germline TGR5-defekte mus ($TGR5^{-/-}$), generert av avlsmus der TGR5-allelet ble floxet med CMV-Cre transgene mus. I direkte motsetning til det som ble observert i TGR5-Tg-mus, ble glukosetoleransen svekket i $TGR5^{-/-}$ - mus utfordret med en HF - dietten i 8 uker (figur 19h), mens ingen forskjell ble observert i CD - matet mus (data ikke vist). GLP - 1 - sekresjon ble deretter testet ved å utfordre $TGR5^{+/+}$ og $TGR5^{-/-}$ -mus med en oral glukosebelastning 30 minutter etter administrasjon av saltløsning eller forbindelsen **Ih3e** alene, eller i kombinasjon med DPP4 - inhibatoren (DPP4i) sitagliptin. Forhånds - administrasjon av forbindelse **Ih3e** ga moderat økning av GLP-1 frigjøring etter en glukoseutfordring i $TGR5^{+/+}$ mus (Figur 19I). Denne effekten var imidlertid betydelig mer uttalt når DPP4i ble ko - administrert som følge av dens evne til å forlenge halveringstiden i plasma GLP - 1 (Drucker og Nauck, 2006, Lancet, 368, 1696 - 1705) (fig. 19I). I motsetning til dette, ble effekten av forbindelse **Ih3e** på plasma GLP-1 nivået avstumpet i $TGR5^{-/-}$ mus (figur 19J). Sammen vil disse dataene understreke den kritiske rollen for TGR5 signalisering i kontroll av GLP - 1 frigjøring og ytterligere demonstrere spesifisiteten av semisyntetiske agonist forbindelsen **Ih3e** in vivo.

Eksempel 20. TGR5 - agonist forbindelsen Ih3e øker energiforbruk og reduserer lever - steatose og fedme ved mating med høyt fettinnhold

[317] I lys av den forbedrede glukose- og insulinprofilen i TGR5-Tg-mus, vurderte vi deretter det terapeutiske potensialet for forbindelse **Ih3e** blandet i en dose på 30 mg / kg / dag (mkd) med dietten, i en intervensjonsstudie i C57BL/6J - mus hvori diabetesitet ble induisert ved HF - foring i 14 uker. Som forventet, HPLC - profilen for plasma - BA'er bekreftet tilstedeværelse av forbindelse **Ih3e** i bare de behandlede musene (figur 20A). Plasmanivåene for forbindelsen **Ih3e** var innenfor området av de for CA- og 3-murikol syre. Det er verdt å merke seg at forbindelse **Ih3e** behandling hverken påvirket plasma BA - sammensetning eller ekspresjonsprofilen for de enzymerne som er involvert i BA - syntesen, hvilken ekspresjon i hovedsak er kontrollert av nukleære reseptorer. Det fullstendige fraværet av endringer i ekspresjonsnivå for klassiske målgener av FXR i leveren, slik som kolesterol 7 α - hydroksylase (CYP7A1), og gallesalt - eksportpumpe (BSEP) (Thomas et al., 2008, Nat. Rev Drug Discovery 7, 678 - 693), bekreftet ytterligere spesifisiteten for forbindelse **Ih3e** mot TGR5.

[318] Etter 10 ukers behandling med forbindelse **lh3e**, ble en betydelig demping av kroppsvekt gevinst på ca 15 %, i tilknytning til en kraftig reduksjon i fettmasse, observert i HF-matede **lh3e**-behandlede mus i forhold til de HF-matede kontrollene (Figurer 20B og 20C). Økningen i lever - og fettpute masse ble også svekket i HF-matede **lh3e**-behandlede mus (Figur 20D). Som bemerket i vår tidligere studie med CA (Watanabe et al., 2006, Nature, 439, 484 - 489), var nedgangen i BAT masse relatert til en reduksjon av hvitt fettvev (WAT) i det interscapulære området (Figur 20D og data ikke vist). De metabolske endringer mellom kontroll-, HF - matede, og **lh3e** behandlede HF-matede mus ble ikke forårsaket av et redusert kaloriinntak (figur 20E) eller fekal energi tap, men var en konsekvens av økt energiforbruk, slik som vist ved måling av O₂ - forbruk og CO₂ - produksjon i løpet av indirekte kalorimetri (Figur 20F). I løpet av den mørke perioden ble respiratorisk kvotient av **lh3e**-behandlede mus betydelig redusert, i samsvar med økt fett brenning (figur 20F). Gen - ekspresjon profilering av BAT bekreftet at aktivering av TGR5 - signaliseringsbanen utløser en økning av flere mitokondrielle gener som er involvert i energiforbruket sammen med en induksjon av type 2 deiodinase gen - ekspresjon (Figur 20G). Aktiveringen av den mitokondrie - respiratoriske kjeden for forbindelse **lh3e** ble ytterligere dokumentert ved å måle O₂ forbruket i primær brune fettceller isolert fra C57BL/6J - mus behandlet i 12 timer med forbindelse **lh3e**. Tilsetning av frakoplingsmiddelet, karbonylcyanid - p-trifluormetoksyfenylhydrazon (FCCP), økte det basale O₂ - forbruket under alle forhold, men var betydelig mer uttalt hos de som ble behandlet med forbindelse **lh3e** (figur 20H). I tillegg til det forbedrede energiforbruket, ble leverfunksjonen også forbedret, slik som vist ved reduksjon i lever - steatose, som ble vurdert med olje - rød O farging (figur 20I) og kvantifisering av biokjemiske leverfett - innhold (fig. 20J). Videre ble plasmanivået for leverenzymene kraftig redusert i forhold til de HF-matede kontrollene, som korrelerer med fravær av leverfibrose i leverpartier av **lh3e**-behandlede mus, farget med Sirius rød (figurer 20I og 20K). Forbedringen av leverfunksjonen ble også gjenspeilet i det betydelige fallet i plasma triglyserider og ikke-esterifiserte fettsyrer (NEFA'er) i HF - matede mus behandlet med forbindelse **lh3e** (figur 20L).

Eksempel 21. TGR5 agonist forbindelse lh3e forbedrer insulinfølsomheten for overvektige mus

[319] Evnen for forbindelsen **lh3e** å forbedre glukose-homeostase ble bestemt. I både DIO og db / db mus, henholdsvis en miljømessig og genetisk modell av diabetesitet, førte en behandling med forbindelse **lh3e** (30 mkd) blandet med dietten til en robust forbedret glukosetoleranse etter en oral utfordring med glukose (Figur 21 A og 21 C), sammen med en forbedring av den glukose-stimulerte profilen for insulin - sekresjon (fig. 21B og 21D, nedre panel). Dette trekket er i samsvar med en GLP – 1 - formidlet forbedring av bukspyttkjertelens funksjon. Videre, fastende glukose- og insulin nivåer ble redusert i både DIO og db / db mus som ble behandlet med forbindelse **lh3e** (Figurer 21B og 21D topp - panel). For ytterligere å karakterisere virkningen av forbindelse **lh3e** på glukose homeostase og insulinfølsomhet, ble en hyperinsulinemisk euglykemisk glukose - klemme utført på disse DIO - musene. I samsvar med den forbedret glukosetoleranse, var den nødvendige glukose – infusjonshastigheten, for å opprettholde euglykemia i DIO - mus behandlet med forbindelse **lh3e**, tilnærmet identisk med den som ble observert i CD-matedet kontroll mus (Figur 21E). Mens insulin-resistente HF-matede mus viste en øket endogen produksjon av hepatisk glukose, sammen med en reduksjon av både glukoseomsetning frekvensen og undertrykkelse av produksjon av glukose med insulin, var det med forbindelse **lh3e** behandling av HF - matede mus en normalisering av disse parameterne til de målte verdiene i CD - matet mus (Figur 21E). Måling av insulin-stimulert ¹⁴C-deoksyglukose opptak, under hyperinsulinemisk euglykemisk glukose - klemme, indikerte at bedringen av glukose - homeostase med forbindelse **lh3e** kan i hovedsak tilskrives redusert insulinresistens i lever og muskler (figur 21F). Disse effektene korrelerte med normalisering av ekspresjon for viktige gener som er involvert i lever glukose homeostase (Figur 21G).

[320] For å adressere spesifisiteten for forbindelse **lh3e** med hensyn til TGR5 in vivo, ble virkningen av fire ukers behandling med forbindelse **lh3e** på 30 mkd på glukosetoleranse sammenlignet i TGR5^{-/-} og TGR5^{+/+} mus, primet ved HF - føring i 9 uker. Selv i løpet av denne korte tidsperioden, hadde forbindelse **lh3e** en betydelig forbedret glukosetoleranse i TGR5^{+/+} matet med en HF-diett (figur 6A), sammen med en normalisering av insulin – sekresjon ved oral glukose - utfordring (figur 6B). Disse effektene ble avstumpet hos TGR5^{-/-} mus, og gir dermed ytterligere argumenter for å støtte spesifisiteten for forbindelse **lh3e** for TGR5 (Figurer 22A og 22B).

Eksempel 22. Farmakokinetikk og metabolisme i rotte galle - fistula etter IV - administrasjon for forbindelser lh3e og ll3e

[321] Forskjellen mellom de to rene diastereoisomerene, **lh3e** og **li3e**, er at C-23 metyl - gruppen er orientert på en annen måte, og genererer dermed 23S - og 23R – formen³. Denne strukturen - modifikasjon vil delvis kunne endre de fysiske-kjemiske egenskapene, metabolisme og farmakokinetikk for de to forbindelsene. Innføringen av en C-23 metylgruppe, i to produserte isomerer med forskjellig orienterte sidekjeder, hvor også karboksygruppen er orientert på en annen måte, og dens reaktivitet i amidierungsprosessen eller i dekonjugeringen av den amiderte formen, kan være forskjellig for de to diastereoisomerene. Den forskjellige karboksygruppe - orienteringen er også ansvarlig for en annen hydrofob / hydrofil balanse for de to molekyler, som kan føre til forskjellige biologiske egenskaper og metabolisme. For å klargjøre dette punktet, ble de to rene isomerene administrert ved femoral infusjon (iv) til en gallefistula rottemodell med en enkelt dose på 1 µMol / min / kg kroppsvekt i 1 time, og galleprøver ble samlet opp i 3 timer. Virkningen på gallestrøm, på gallestrøms - sekresjonen for moderforbindelsen og på hovedmetabolitten, ble også evaluert.

Gallestrøm. Koleretisk effekt

Metoder

20 [322] Denne undersøkelse ble utført ved administrering av de to forbindelsene via femoral infusjon (iv), 6 rotter (kroppsvekt 267 +/- 12 g) ble behandlet med hver diastereoisomer i en dose på 1 µMol / min / kg. Femoral infusjon startet etter 75 minutter med stasjonær tilstand og fortsatte i 60 minutter. Galleprøver ble samlet inn hvert 15. 25 minutt i to timer. I tillegg ble tre rotter behandlet med 3 % BSA-saltløsning under de samme betingelsene av tid og prøvetaking (femorale kontroll - rotter).

Resultater

30 [323] Gallestrømmen ved iv - infusjon av kontrollen med 3 % BSA - saltløsningsvehikel opprettholdt en verdi varierende fra 40 til 60 µl / min / kg for hele perioden av forsøkene. Iv - infusjonen av forbindelsen **lh3e** ga betydelig økt gallestrømningshastighet, og dette fenomen startet 15 minutter etter begynnelsen av infusjonsperioden, og fortsatte i minst 2 timer etter slutten av infusjonen (figur 23). Den 35 iv - infusjon for forbindelsen **li3e** økt også gallestrømningshastigheten, men denne

effekten er betydelig lavere enn den som ble observert for isomer forbindelsen **lh3e** (figur 23).

5 **Farmakokinetikk (gallesekresjon) for de administrerte isomerene etter iv – infusjon**

[324] Galleprøver tatt på ulike tidspunkt i løpet av iv - eksperimentene ble analysert for å bestemme galle sekret av de administrerte isomerer og deres viktigste metabolitter som gjenvinnes i gallen.

10

Materialer

[325] Rent krystallinsk pulver fra hver forbindelse ble innhentet fra R. Pellicciari laboratorium ved Universitetet i Perugia. Lagerførte løsninger ble fremstilt i metanol ved 1 mmol / l og arbeidsløsninger ble fremstilt ved fortytning av egnede mengder av den primære løsningen. Metanol og acetonitril var av HPLC-gradert renhet. Ammoniakk var 30 % rent og eddiksyre var 99,8 % rent. Alle reagenser ble beholdt fra Carlo Erba Reagenser. HPLC-grade vann ble utarbeidet av et Milli-Q-system.

20

Prøvepreparering

[326] Rotte galleprøvene ble brakt til romtemperatur, omrørt kort og fortynt til 1 : 100 eller 1 : 200 volum / volum med 15 mM ammoniumacetat buffer (pH = 5,0): acetonitril (70 : 30, volum / volum). Den endelige oppløsning ble overført i en autosamler – ampulle, og 10 µl ble injisert på den kromatografiske kolonnen. Da prøvene ble funnet ut av linearitetsområde, ble de fortynt og analysert på nytt.

25

HPLC-ESI-MS/MS Metode

[327] Rotte galleprøvene ble analysert ved hjelp av HPLC-ESI-MS/MS ved anvendelse av ESI kilden i negativ ioniseringsmodus. For væskechromatografi ble en Waters Alliance 2695 separasjonsmodul sammen med autosamler brukt. Autosamler ble holdt ved 7 °C. Separasjon ble utført på en Synergi Hydro-RP C 18 kolonne (150 x 2,0 mm id, 4 µm partikkelstørrelse), beskyttet av SecurityGuard ODS 4 x 2,0 mm i.d. forkolonne, begge levert fra Phenomenex. Analytten ble eluert ved anvendelse av 15

35

mM ammoniumacetat buffer (pH = 5,0) som mobil fase A og acetonitril som mobil fase B. Mobil fase B ble øket fra 30 % til 64 % i 10 minutter, deretter til 100 % på 10 minutter, og holdt konstant i 10 minutter. Strømningshastighet var 150 µl / min og kolonnen ble holdt på 45 °C. Kolonnens avløpsvann ble introdusert i ESI kilde knyttet til en trippel kvadrupel MS (Quattro-LC, Micro) som opererer i multiplere reaksjonsovervåking (MRM) akvisisjonsmodus. Nitrogen ble anvendt som forstøvergass ved 100 l / time strømningshastighet, og som desolveringsgass på 930 liter / time. Ionekilde blokk- og desolveringstemperaturer ble satt til henholdsvis 80 °C og 180 °C. Kapillær spenningen var 3,0 kV. MassLynx programvare versjon 4.0 ble brukt for datainnsamling og bearbeiding. I tillegg, ved hjelp av massespektrometri både i enkelt-og MS tandem MS / MS-konfigurasjoner, ble eksperimenter utført for å identifisere metabolitter.

Kvantifisering

15
[328] En 5-punkts kalibreringskurve ble utarbeidet daglig og injisert i dublikat. Kalibreringsprøver ble tatt i området av i 0,1 til 20 µMol / l fremstilt i den mobile fasen. Parametere for lineær kalibreringskurve ble beholdt fra plottet av analyttens toppareal versus analyttens konsentrasjonen med bruk av en minste kvadraters regresjonsanalyse (vekt = $1/x^2$). Korrelasjonskoeffisienter var $\geq 0,994$. De taurin - konjugerte metabolittene av forbindelsene **lh3e** og **li3e** ble også beregnet selv om standarder ikke var tilgjengelig for oss. A A korrigerende faktor, for å ta hensyn til de ulike reaksjoner i ES-MS/MS mellom frie og taurin - konjugerte arter, tidligere estimert, ble brukt på de områdeverdiene hentet fra HPLC, MRM datasett kromatogrammene. Til slutt ble kalibreringskurver som ble beholdt for den frie BA brukt til å estimere taurin - konjugerte metabolitter.

Resultater- Gallesekresjonsforbindelse lh3e

30
[329] Gallesekresjonen av forbindelse **lh3e** etter iv - administrasjon var effektiv, og forbindelsen ble gjenfunnet i galle med en relativt høy andel av den administrerte dosen. Den farmakokinetiske profilen viser at forbindelse **lh3e** ble effektivt tatt opp i leveren og ble utskilt i gallen hovedsakelig uendret og dessuten, i mindre grad, konjugert med taurin (Fig. 24); andre mindre metabolitter, inkludert glukuronid, har blitt
35 identifisert i galle i spormengder (Figurene 26 og 27).

[330] Tilstedeværelse av metyl - gruppen i C- 23 posisjon hindrer den fysiologiske konjugeringsprosessen med taurin og glysin, som er relevant for effektiv sekresjon av nesten all naturlig forekommende karboksylert BA; dette er avgjørende for dihydroksy - BA, og i mindre grad for trihydroksy - BA. Omfanget av dens utvinning i galle er også relatert til administrert dose, slik som det har blitt observert for kolsyre (Roda A. et al. Hepatology. 8, 1571-6, 1988).

[331] Tatt i betraktning de fysiske-kjemiske egenskapene for forbindelse **lh3e**, forventet vi at denne forbindelsen vil bli absorbert av en passiv diffusjon mekanisme (Log P = 1,44) og en aktiv mekanisme ikke synes å være involvert. Tilstedeværelsen av tre hydroksylgrupper tillater at molekylet blir effektivt tatt opp av leveren og blir skilt ut i gallen. 6 - etyl - gruppen forhindrer også en 7-dehydroksylering av de intestinale bakteriene, slik som vist i den tidlige rapporten.

Resultater – gallesekresjon - forbindelse **li3e**

[332] Galle sekresjon av forbindelse **li3e** etter iv - infusjon er rapportert om i figur 25. Den kinetiske profilen viser at forbindelsen ikke blir metabolisert av leveren i større grad enn forbindelse **lh3e**. Den opprinnelige forbindelsen utskilles i gallen som sådan, og i mindre grad som taurin - konjugat: Med hensyn til dens diastereoisomere forbindelse **lh3e**, er prosentandelen av konjugering høyere, og den maksimale sekresjonshastigheten for den ukonjugerte formen er lavere. Dette tyder på at C- 23 (*R*)-isomeren viser en sidekjede geometri og en orientering som er mer egnet for amidierungsprosessen med hensyn til isomeren (*S*), som skilles ut som ukonjugert form ved høyere prosentandel. Konjugering med taurin bidrar til å bedre gjenvinning av forbindelse **li3e** i galle, som er ca. 70 – 80 % av administrert dose. Andre mindre metabolitter inkludert glukuronider, har blitt identifisert i galle i spormengde (Fig. 28-29).

Levermetabolisme

30

Fremgangsmåter

[333] Ved hjelp av data erholdt fra foregående forsøk, så vel som de strukturelle og fysiokjemiske egenskapene for de studerte analogene, ble en preliminær sondering utført for å søke etter mulige metabolitter.

35

Forbindelse lh3e

5 [334] Dette molekylet ble hovedsakelig utskilt som moderforbindelse (uendret), og ble bare svakt metabolisert i leveren. Den viktigste metabolitten var de taurin - konjugerte spesiene og, ved svært lave nivåer, ble mono - glukuronid spesier oppdaget (fig. 26 - 27).

10 [335] Tilstedeværelse av metylgruppen i C- 23 posisjon hindrer konjugeringsprosessen med taurin og glysin, som er nødvendig for en effektiv utskillelse av nesten alle naturlig forekommende karboksylerte BA'er; dette er avgjørende for dihydroksy - BA, og i mindre grad for trihydroksy – BA, siden de er allerede ganske polare. Dannelse av glukuronider vil kunne være aktuelt hvis de administreres ved høyere doser.

15 Forbindelse li3e

[336] Dette molekylet ble hovedsakelig utskilt som moderforbindelse (uendret), og ble også metabolisert i leveren til å danne den taurin - konjugerte spesien og, ved svært lave nivåer, mono - glukuronid specien. (Fig. 27 - 29).

20 [337] Tilstedeværelse av metylgruppen i C- 23 posisjon hindrer konjugeringsprosessen med taurin og glysin, som er nødvendig for en effektiv utskillelse av nesten alle naturlig forekommende karboksylerte BA'er; dette er avgjørende for dihydroksy - BA, og i mindre grad for trihydroksy - BA, ettersom de er allerede ganske polare. Dannelse av glukuronider kan være aktuelt dersom molekylet 25 administreres ved høyere doser.

[338] Forbindelse li3e utskilles i gallen ved høyere prosentandel enn den diastereoisomere forbindelsen lh3e som taurin konjugert form, 20 – 30 % vs 5 – 10 %, og dette redegjør for den forskjellige sidekjede - geometrien og for en noe høyere lipofilitet for forbindelse li3e.

30 [339] Forbindelse lh3e er moderat hydrofil og har en mild renseeffekt. Dens hepatiske opptak synes å virke effektivt. Gallesekresjonen er også effektiv, med tanke på at forbindelsen utskilles hovedsakelig uendret, og i begrenset utstrekning er konjugert med taurin. Den intestinale absorpsjonen skjer via en passiv mekanisme, slik som naturlig forekommende ikke-konjugert BA, og kinetikken er tilsvarende den for

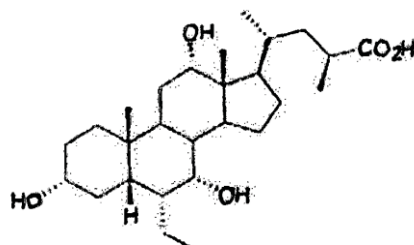
kolsyre noe lavere enn dihydroksy gallesyrer (Aldini R. et al. Steroider 61, 590-7, 1996).

5 **[340]** Forbindelse **lh3e** krever ikke omfattende hepatisk metabolisme ved den administrerte dosen for å bli utskilt i gallen. Tilstedeværelse av metyl - gruppen i C- 23 (S) stilling forhindrer utstrakt konjugering med taurin, og molekylet kan effektivt utskilles uendret. En øket hepatisk oppholdstid for molekylet kommer fra en duktulær absorpsjon ettersom dette molekylet gjenngår en kolhepatisk shunt-bane, som er ansvarlig for dens potente koleretiske effekt.

10 **[341]** Forbindelse **li3e** er diasteroisomeren av forbindelse **lh3e**. Forbindelse **li3e** er særpreget ved at den har en noe lavere hydrofilitet, som en følge av den forskjellige sidekjede - geometrien. Av denne grunn er C- 23 karboksygruppe annerldes orientert, og dette forklarer den forskjellige hydrofil - hydrofob balansen for molekylet. Som en følge av dens høyere lipofilisitet krever molekylet en mer omfattende konjugering med taurin med hensyn til forbindelse **lh3e**. Sidekjede -
15 geometrien for den siste forbindelsen produserer sannsynligvis en BA med et lavere substrat - spesifisitet overfor enzymet som er ansvarlig for konjugeringen mediert av CoA - aktiveringsprosessen. Det endelige resultatet er at forbindelse **li3e** blir utskilt i galle med en høyere konjugert prosentandel enn forbindelse **lh3e**.

PATENTKRAV

1. En forbindelse **1h3e** som har den kjemiske strukturen:



5

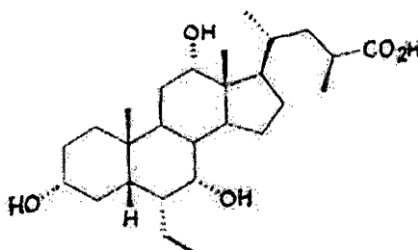
eller et farmasøytisk akseptabelt salt, hydrat eller glysin- eller taurin - aminosyre konjugat derav.

2. Forbindelse i henhold til krav 1, hvori forbindelsen er et glysin - aminosyre konjugat.

10

3. Forbindelse i henhold til krav 1, hvori forbindelsen er et taurin - aminosyre konjugat.

4. Forbindelse i henhold til krav 1, hvori forbindelsen er



15

5. Forbindelse i henhold til krav 1, hvori forbindelsen er et farmasøytisk akseptabelt salt.

6. En farmasøytisk akseptabel sammensetning omfattende en forbindelse i henhold til krav 1, 4 eller 5, eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller hydrat derav, og minst en farmasøytisk akseptabel eksipiens.

20

7. Forbindelse i henhold til krav 1, 4 eller 5, eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller hydrat derav for anvendelse i behandling eller forebygging av sykdom i et emne, hvor

sykdommen velges ut fra metabolisk sykdom, inflammatorisk sykdom, leversykdom, autoimmun sykdom, hjertesykdom, nyresykdom, kreft- og gastrointestinal sykdom.

8. Forbindelse for anvendelse i henhold til krav 7, hvor sykdommen er diabetes.

5

9. Forbindelse for anvendelse i henhold til krav 7, hvor sykdommen er fedme.

10. Forbindelse for anvendelse i henhold til krav 7, hvor sykdommen er diabetes.

10 11. Et sett (kit) for behandling eller forebygging av sykdom i et emne, hvori pakken omfatter en forbindelse i henhold til krav 1, 4 eller 5, eller et farmasøytisk akseptabelt salt eller hydrat derav.

- A Chow diett + bærer
- B Chow diett + forbindelse lh3e
- C HF diett + bærer
- D HF diett + forbindelse lh3e

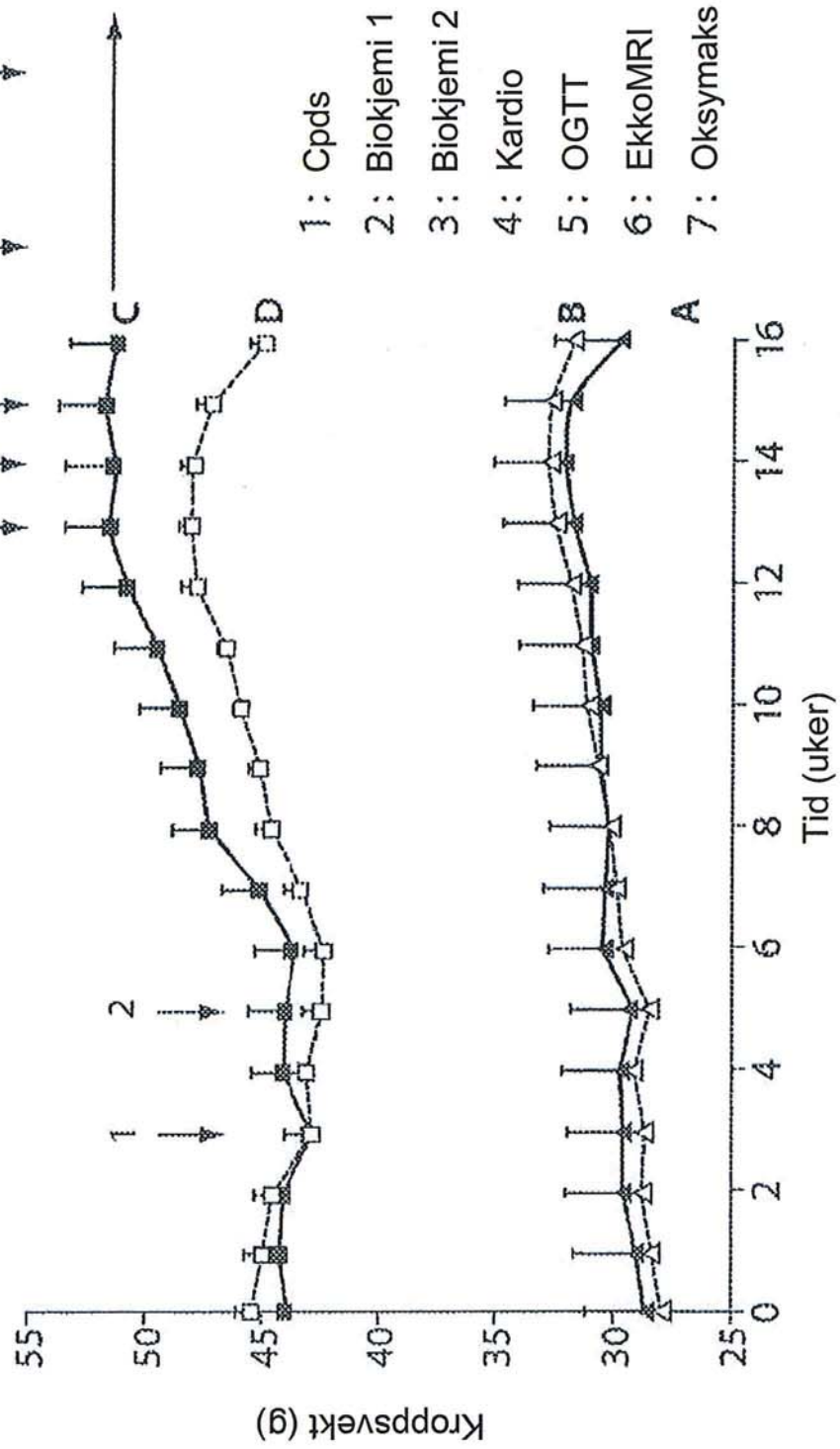


Fig. 1

2/48

- A  Chow diett + bærer C  HF diett + bærer
- B  Chow diett + 6-Et,23(s)-MeCA D  HF diett + 6-Et,23(s)-MeCA

Fig. 2

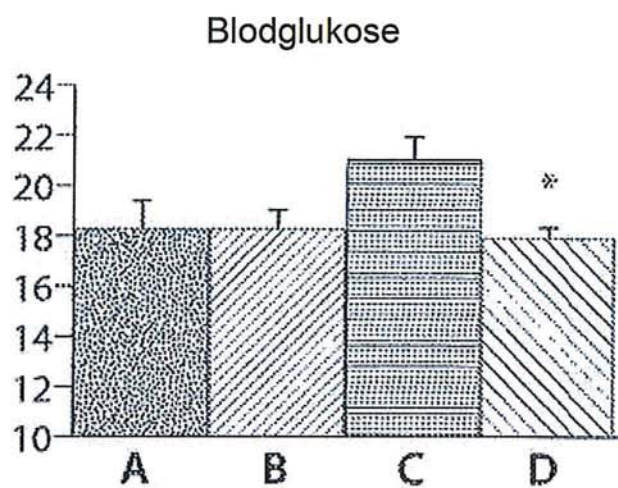


Fig. 2A

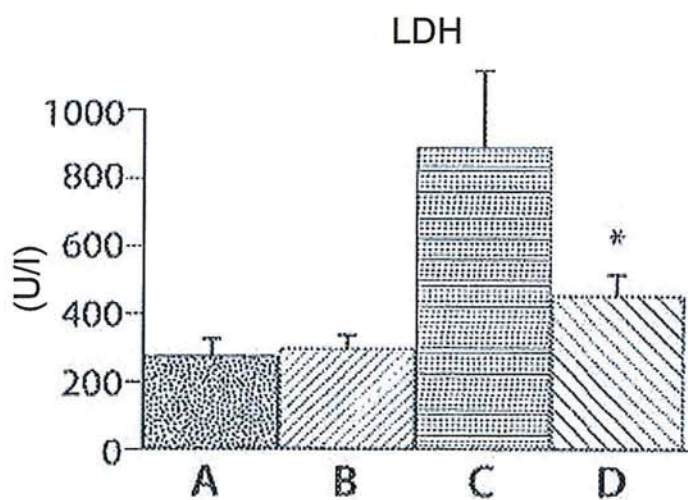


Fig. 2B

3/48

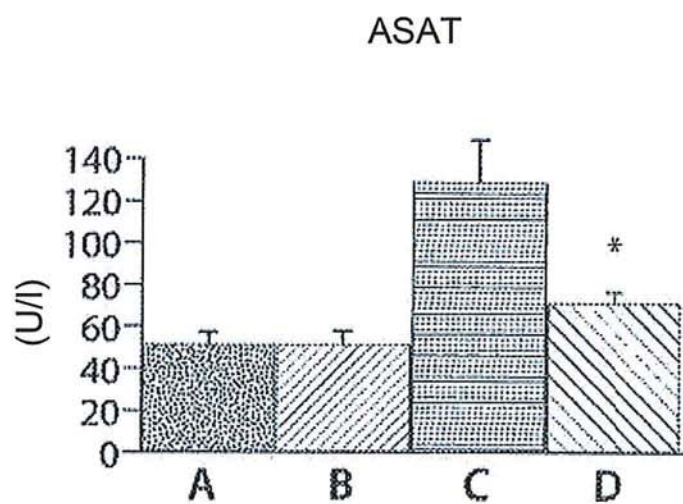


Fig. 2C

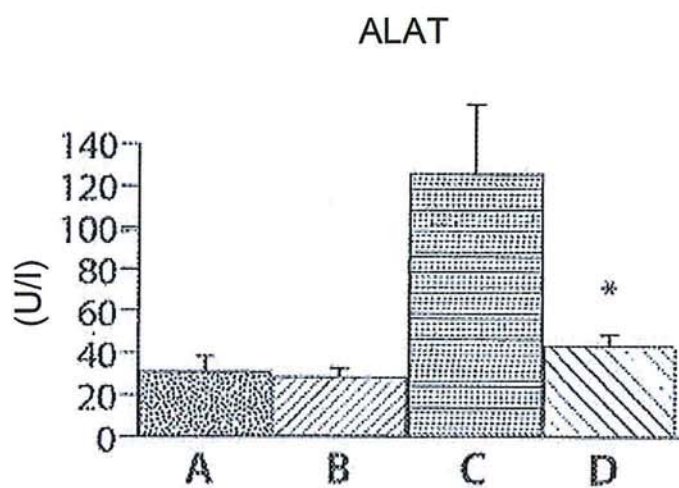


Fig. 2D

4/48

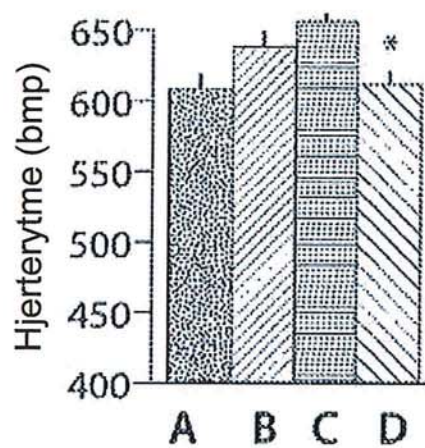


Fig. 2E

TOTAL KOLESTEROL

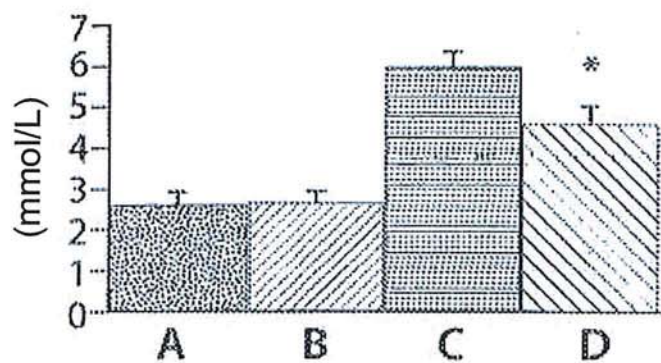


Fig. 2F

5/48

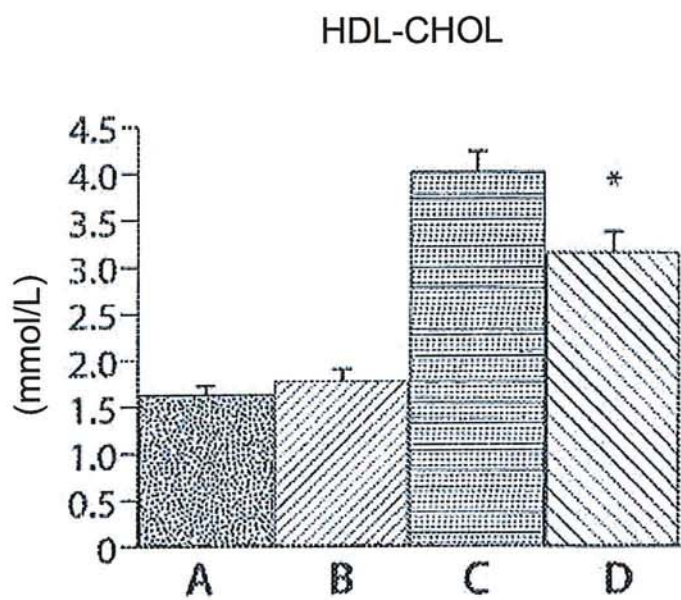


Fig. 2G

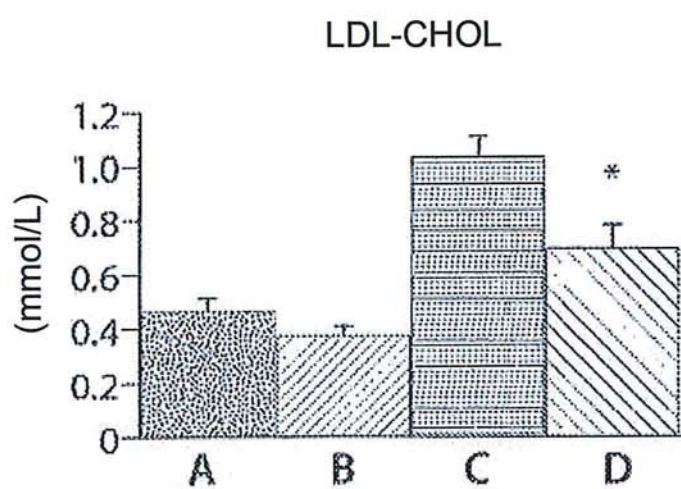


Fig. 2H

6/48

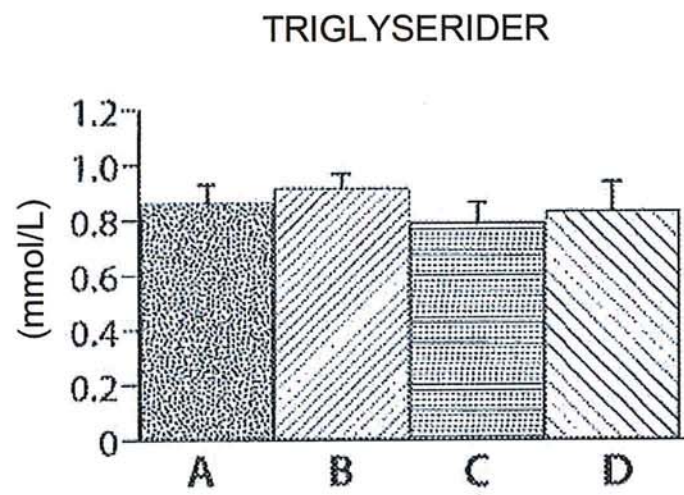


Fig. 2I

7/48

PLASMA INSULIN OPPFØLGING

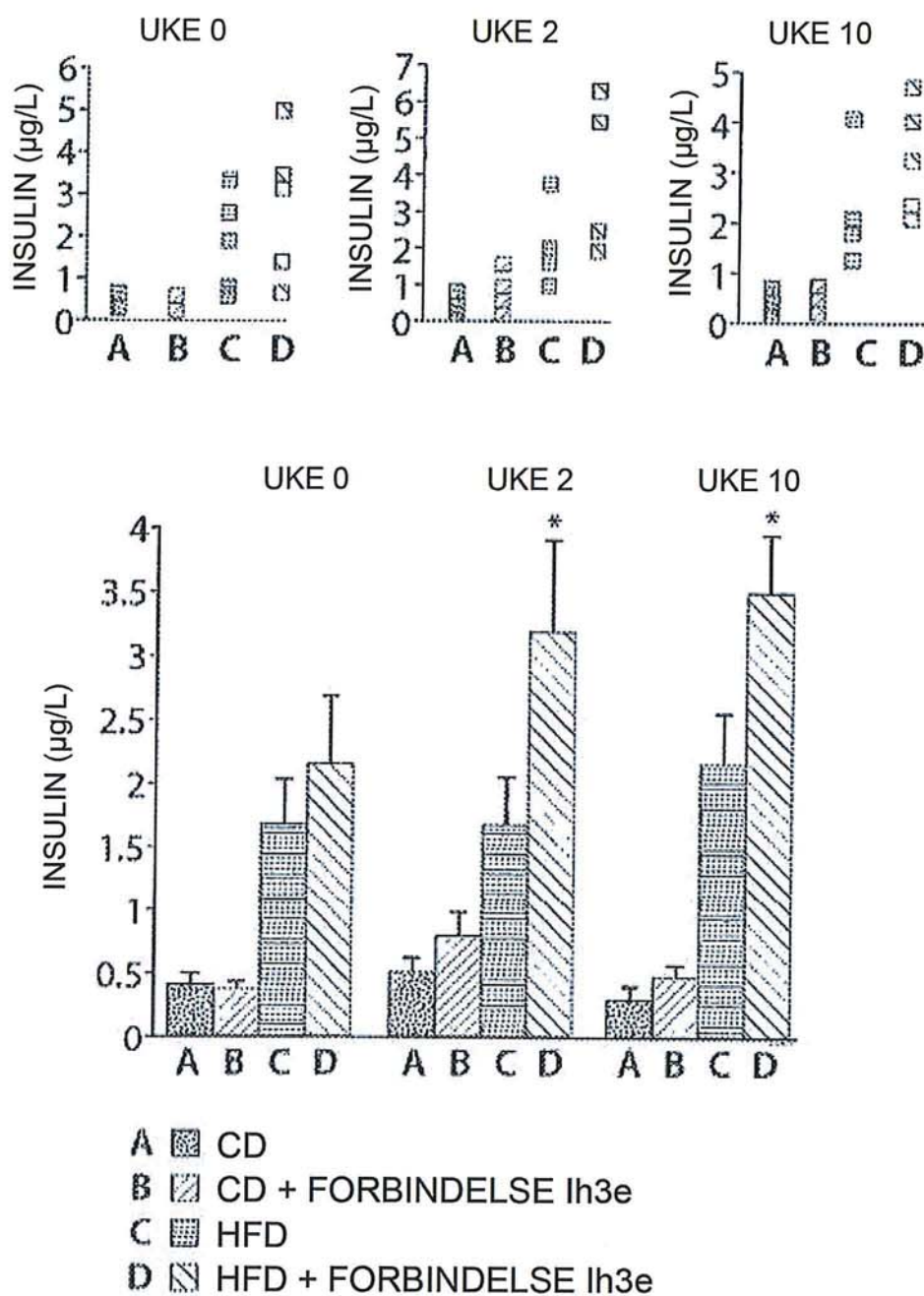


Fig. 3A

8/48

ORAL GLYKOSETOLERANSE TEST

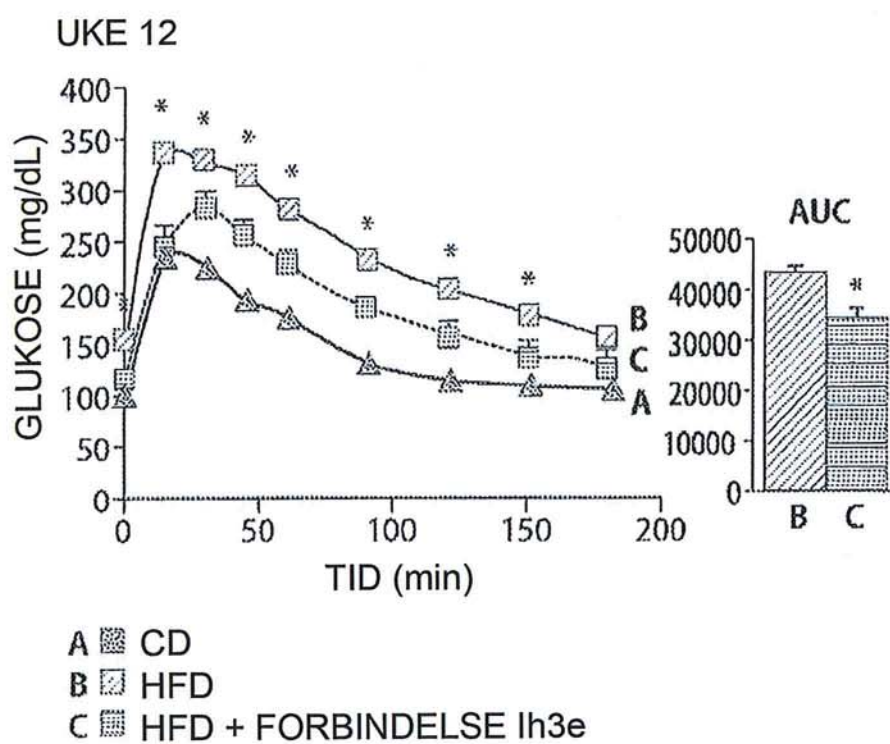


Fig. 3B

9/48

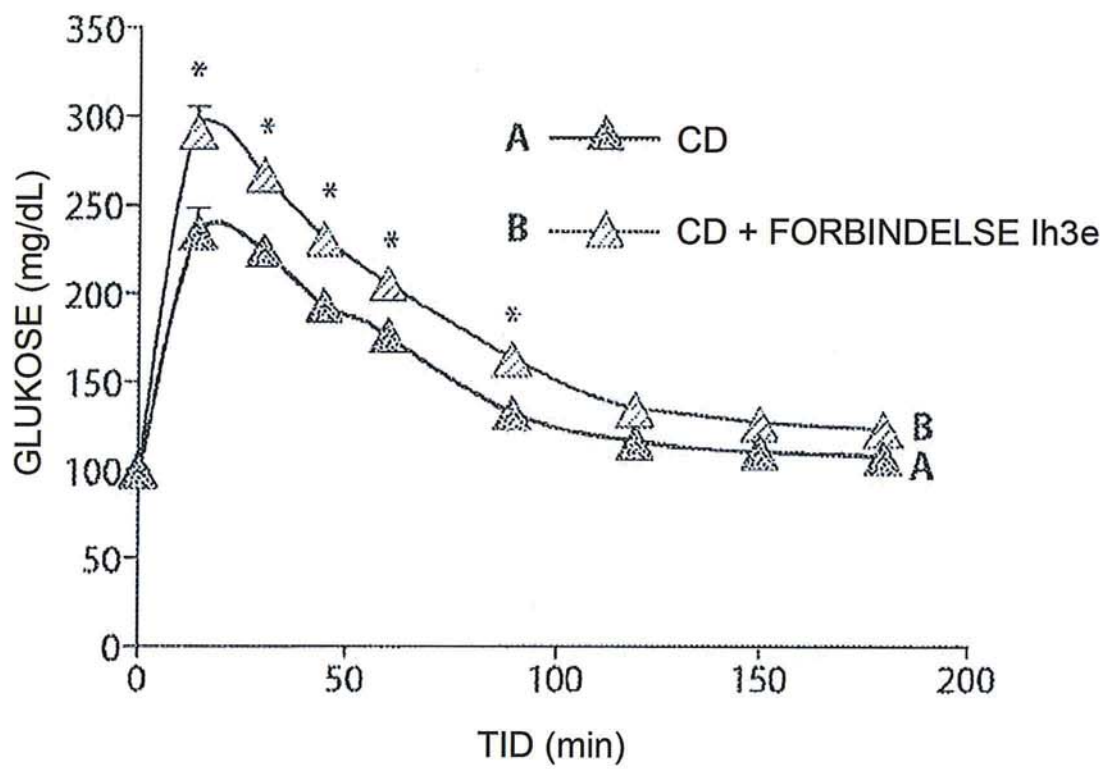


Fig. 4

10/48

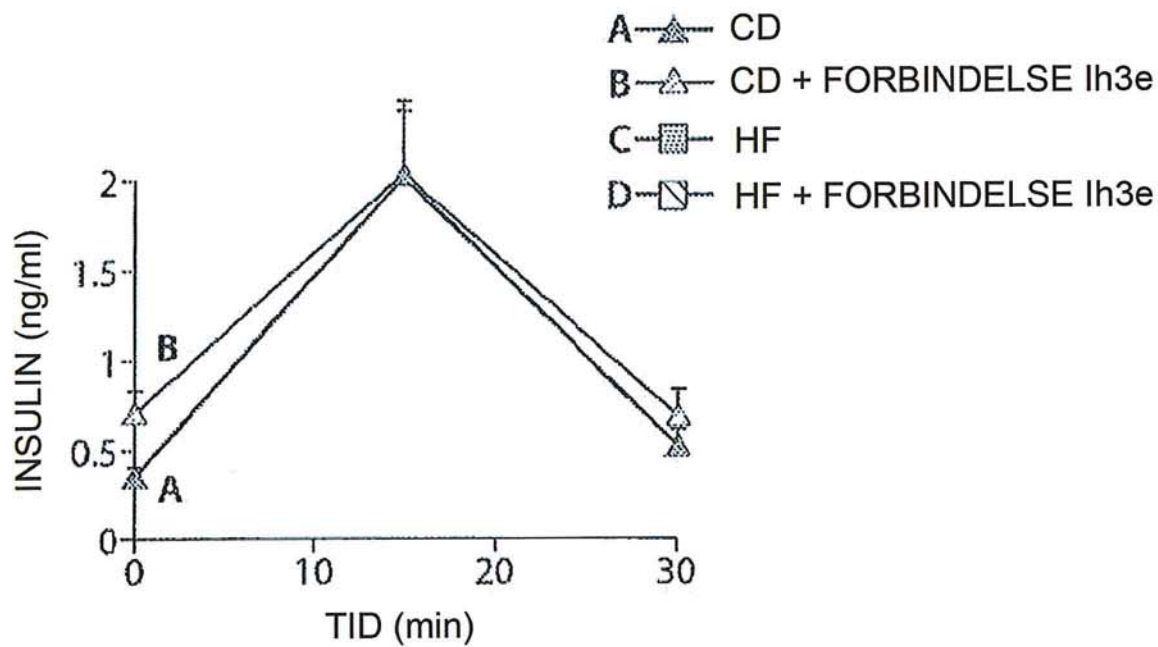


Fig. 5A

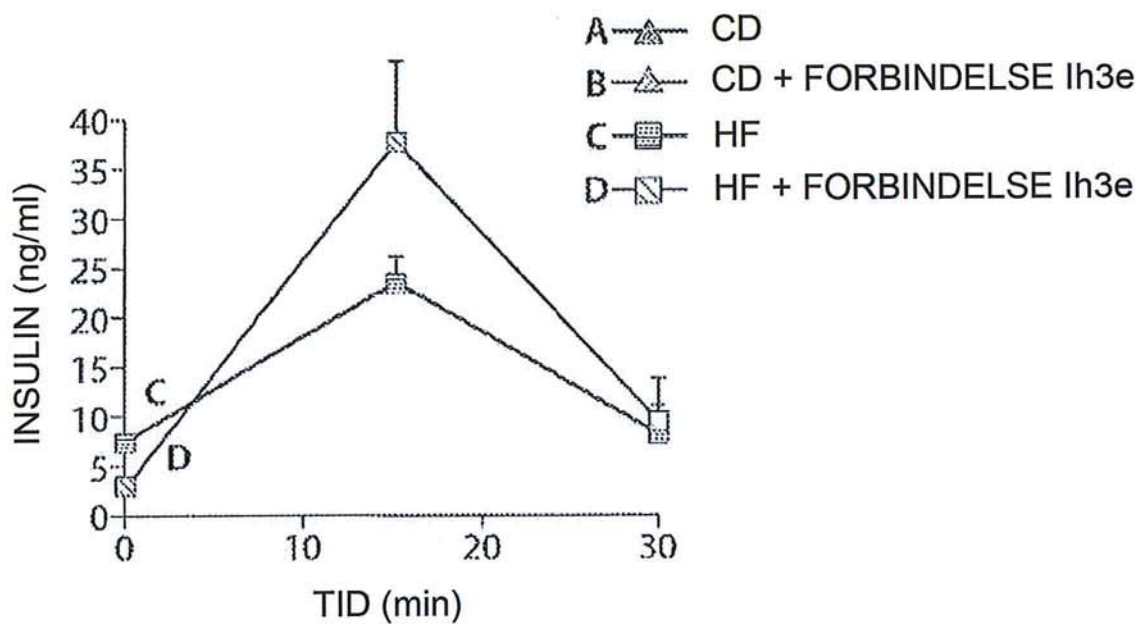


Fig. 5B

11/48

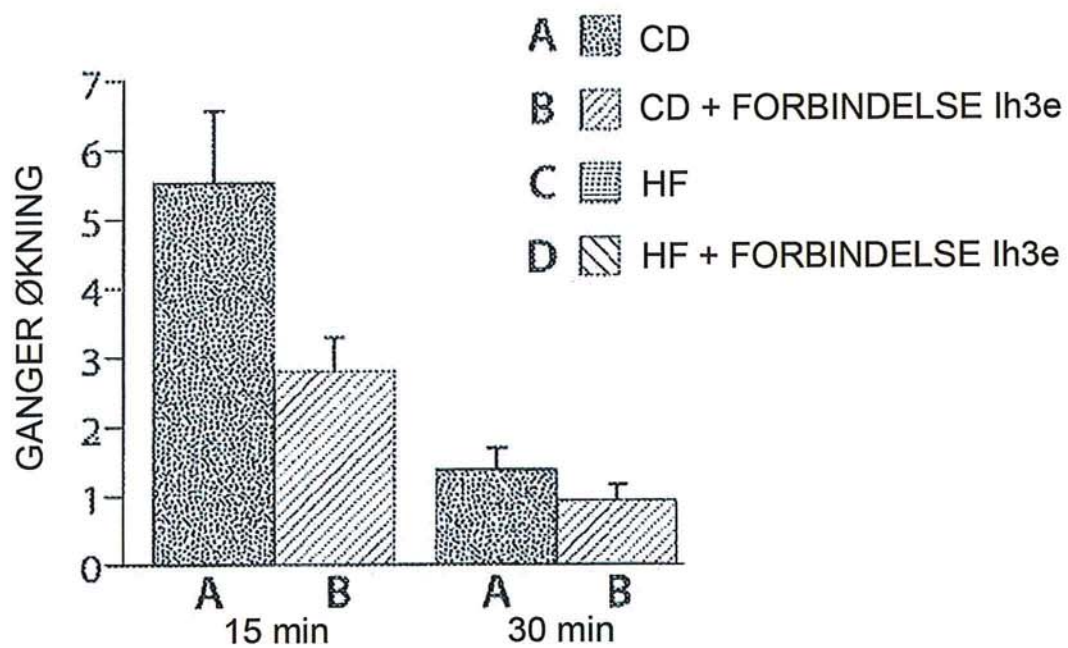


Fig. 5C

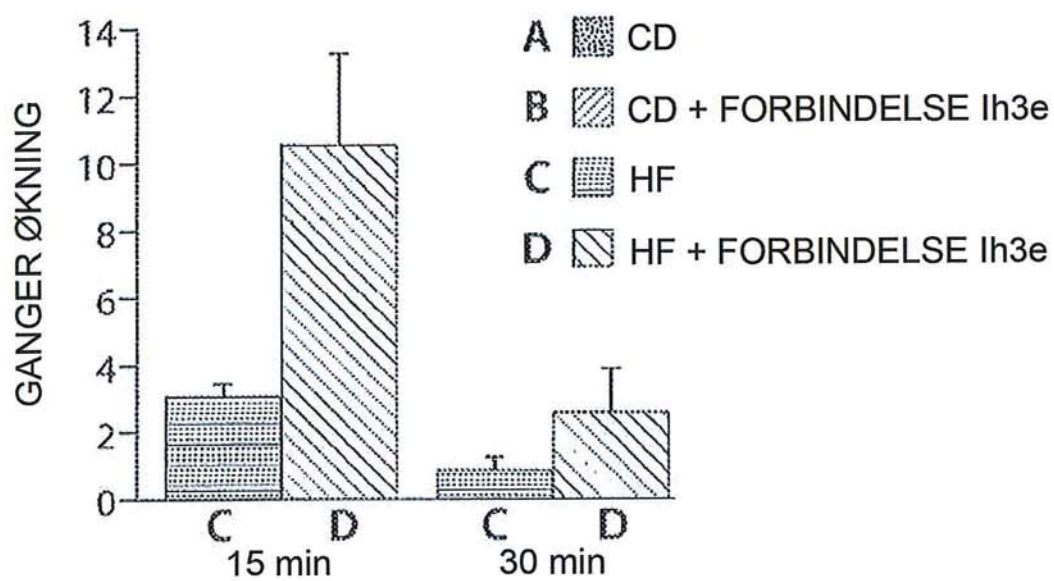


Fig. 5D

12/48





- A  CD C  HF
- B  CD + FORBINDELSE lh3e D  HF + FORBINDELSE lh3e

Fig. 6

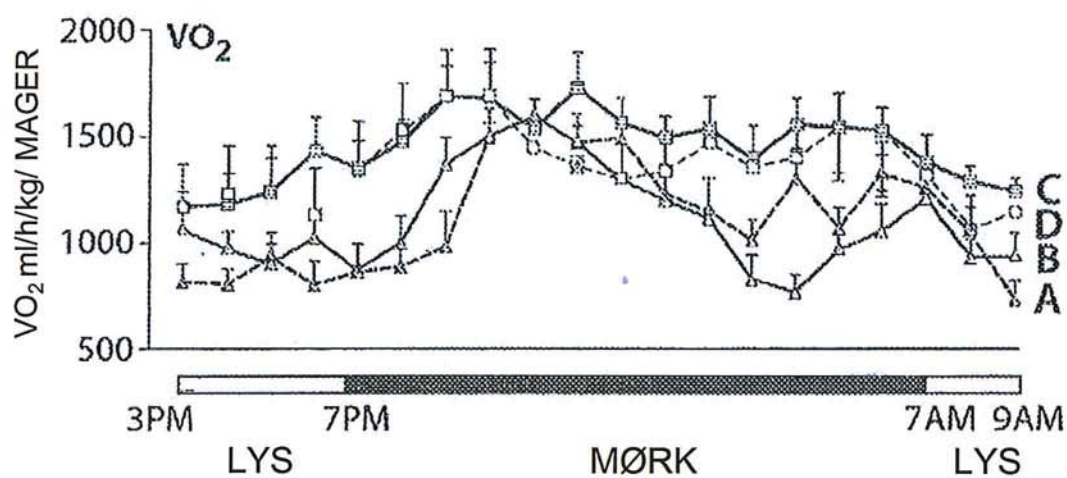


Fig. 6A

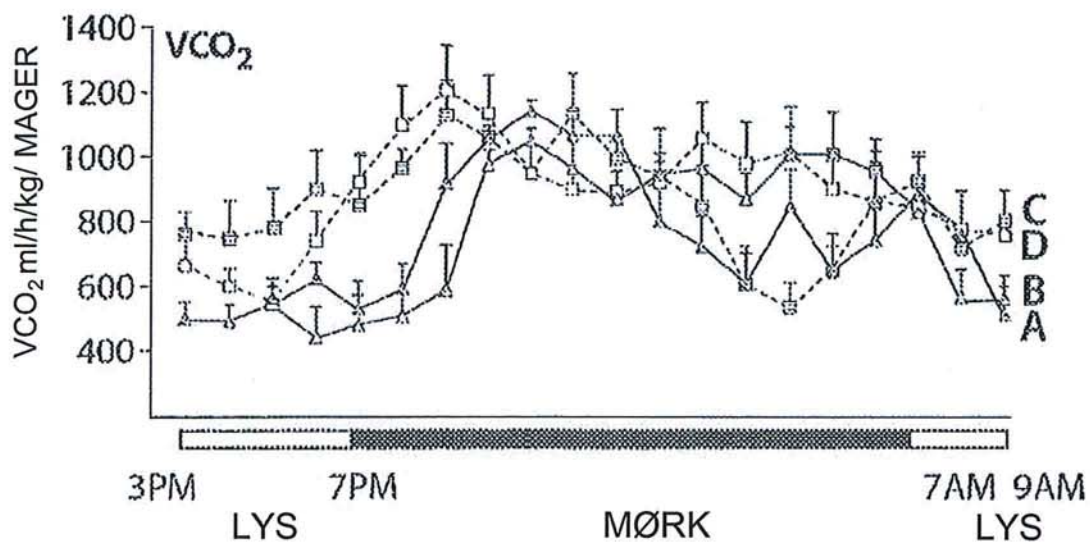


Fig. 6B

13/48

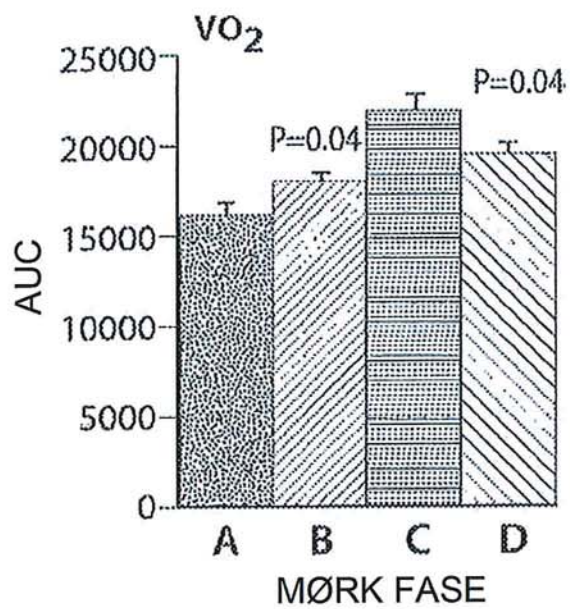


Fig. 6C

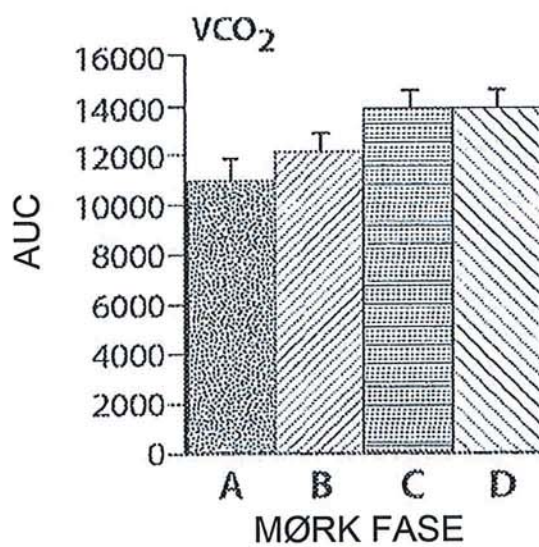


Fig. 6D

14/48

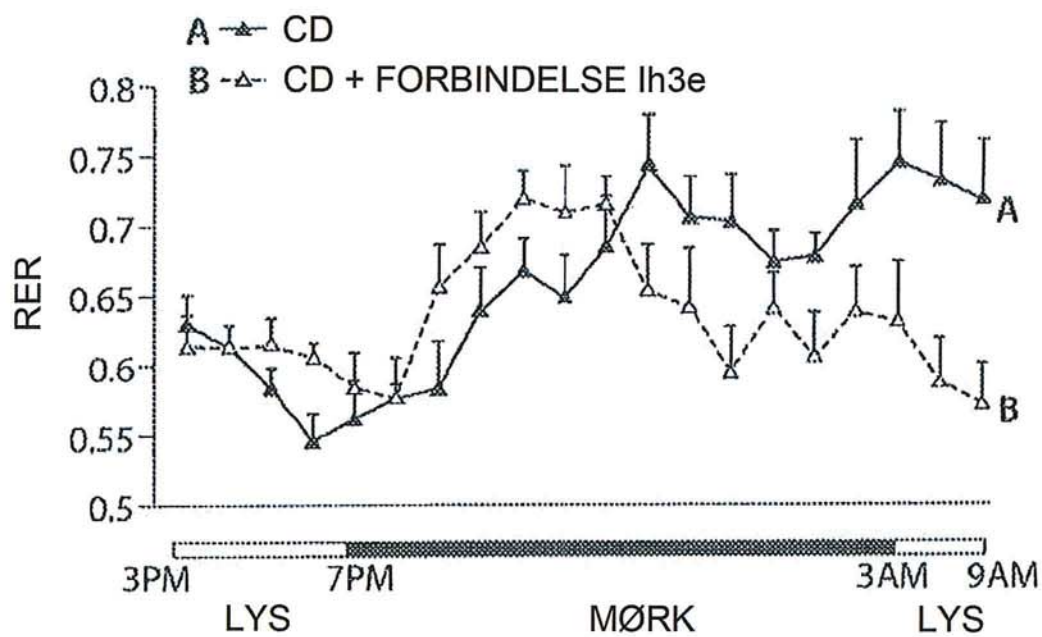


Fig. 7A

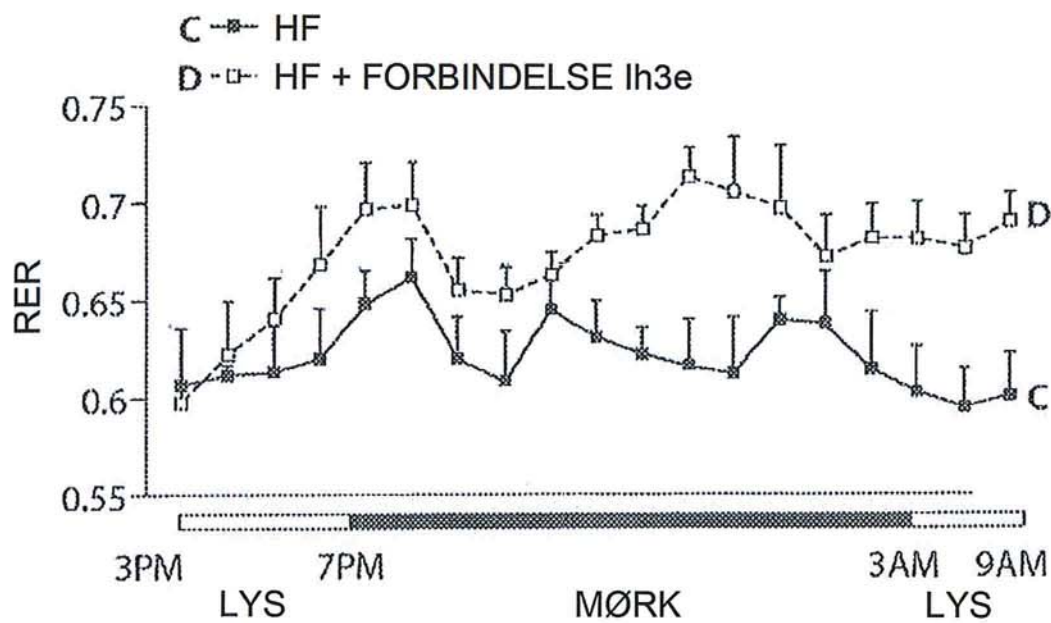


Fig. 7B

15/48

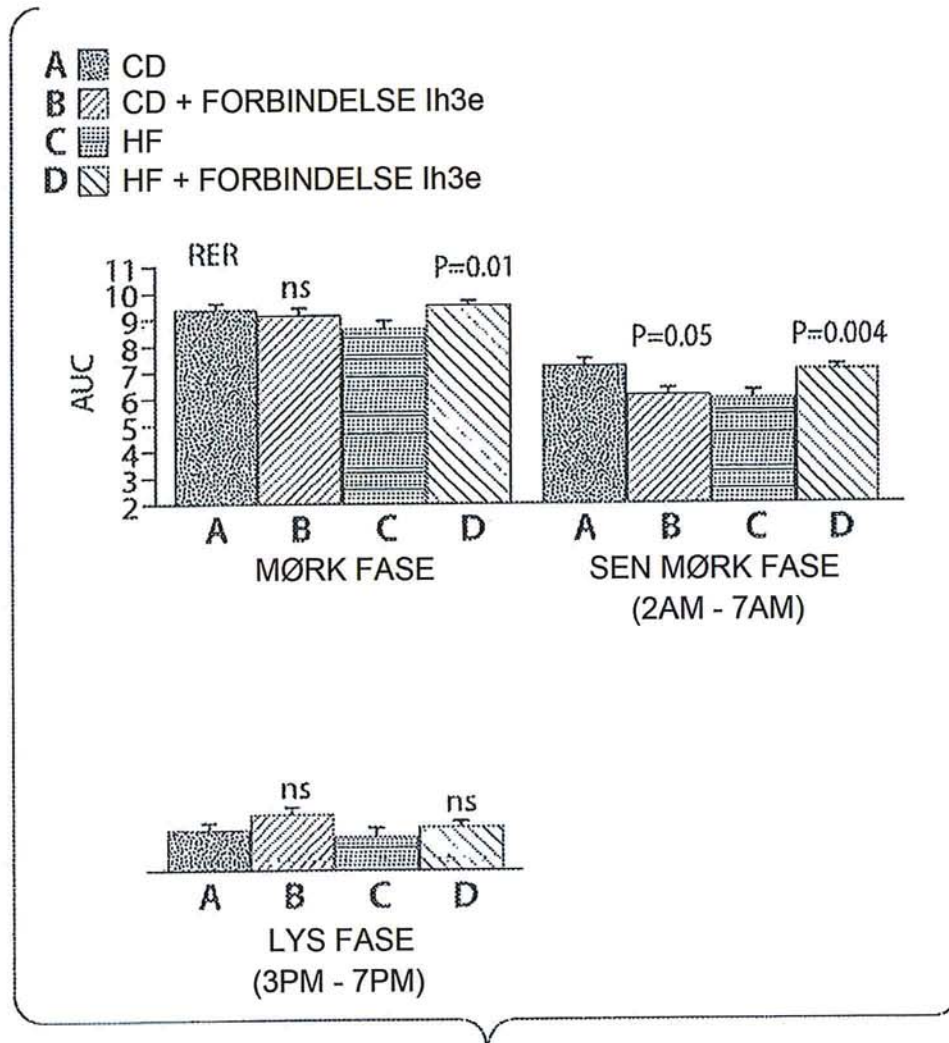


Fig. 7C

16/48

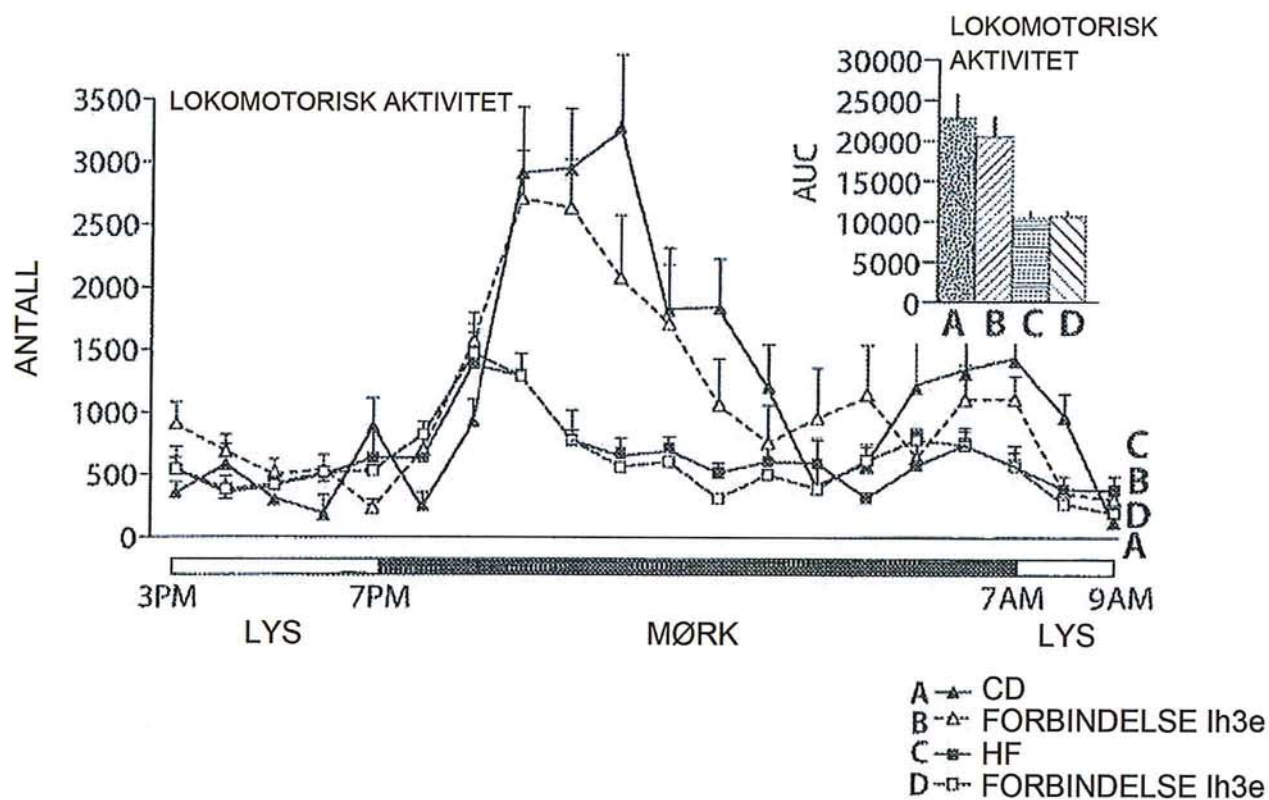


Fig. 8A

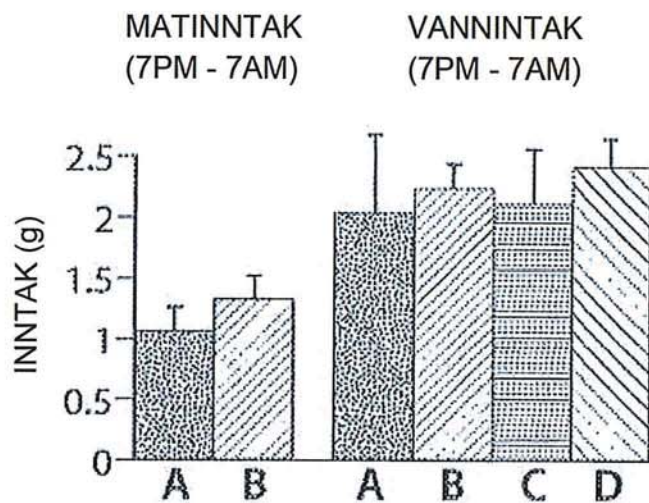


Fig. 8B

17/48

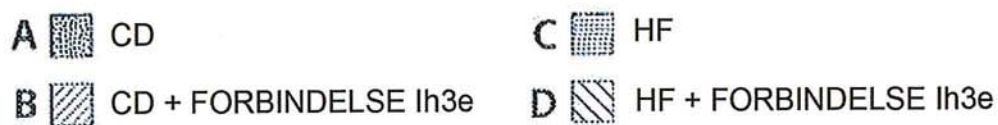


Fig. 9

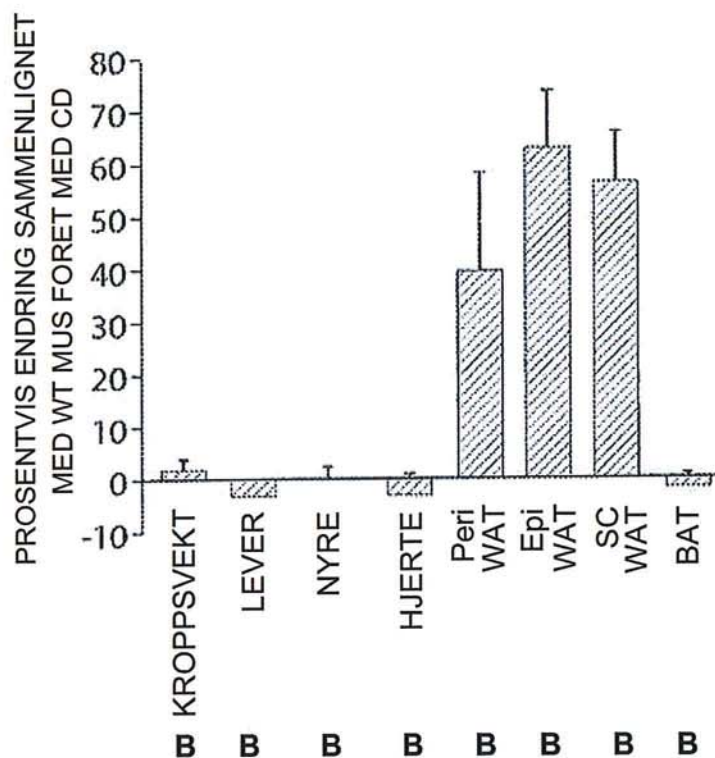


Fig. 9A

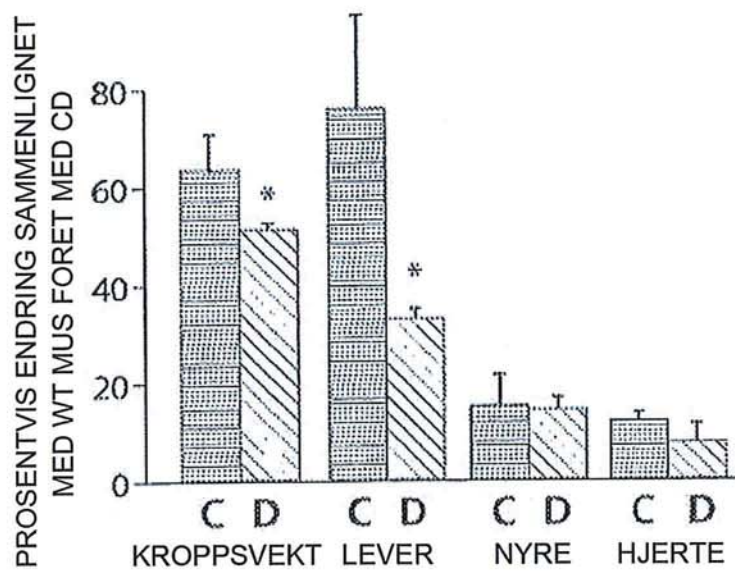


Fig. 9B

18/48

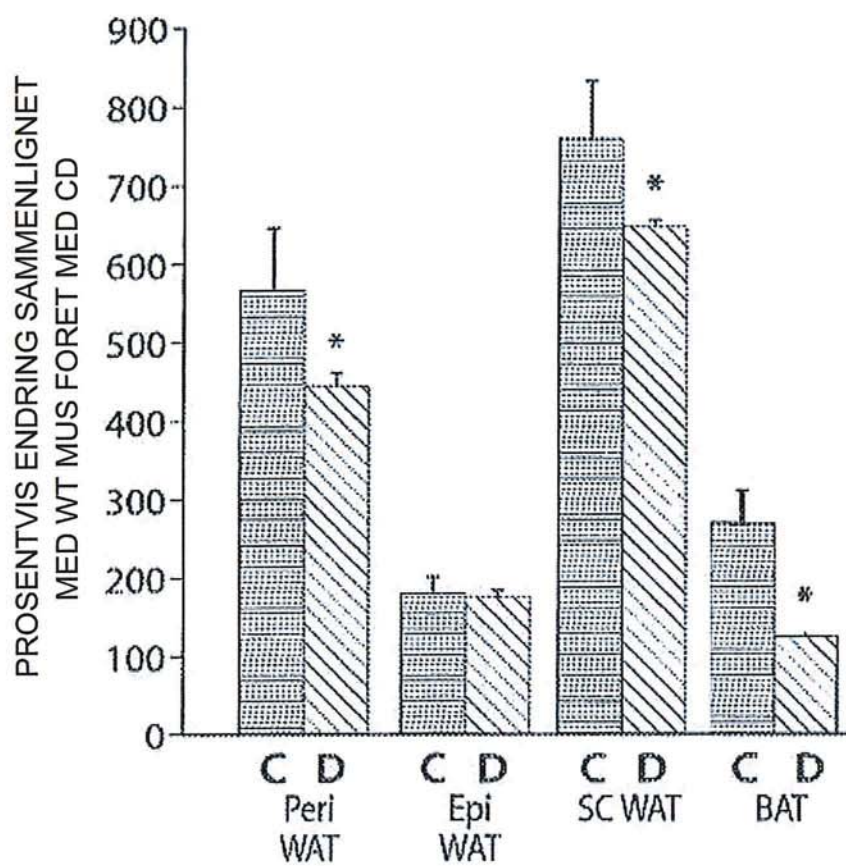


Fig. 9C

19/48

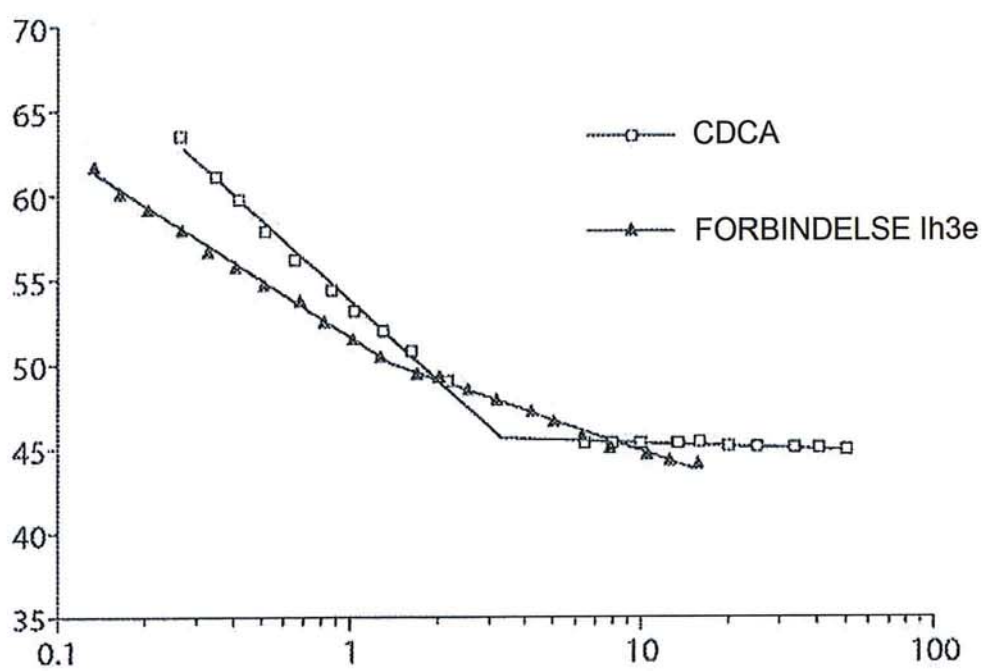


Fig. 10

20/48

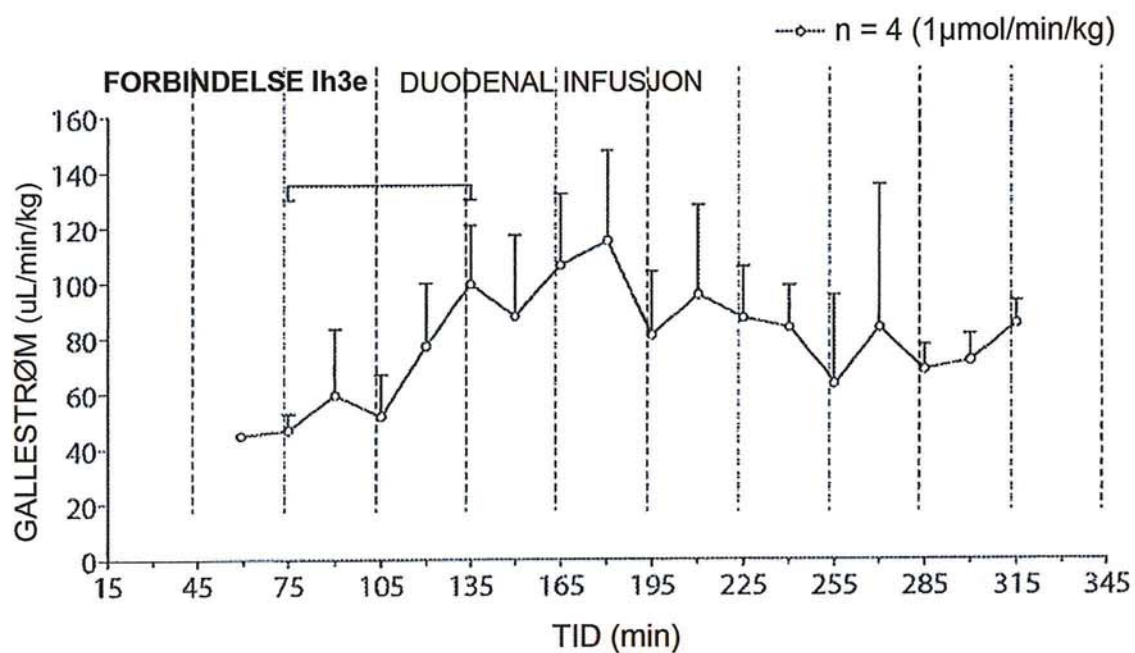


Fig. 11

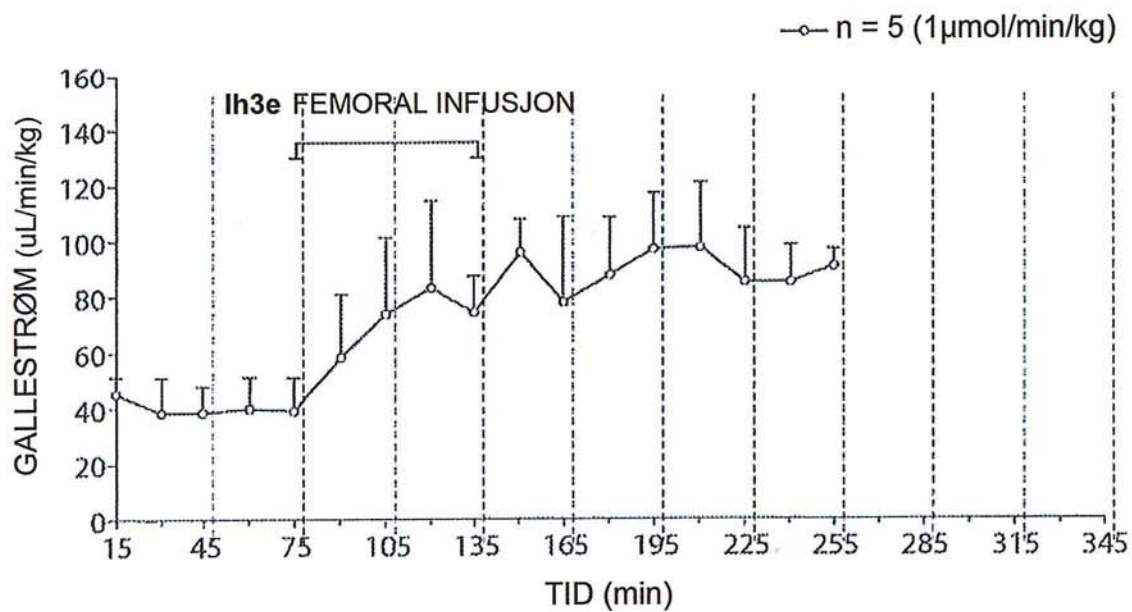


Fig. 12

21/48

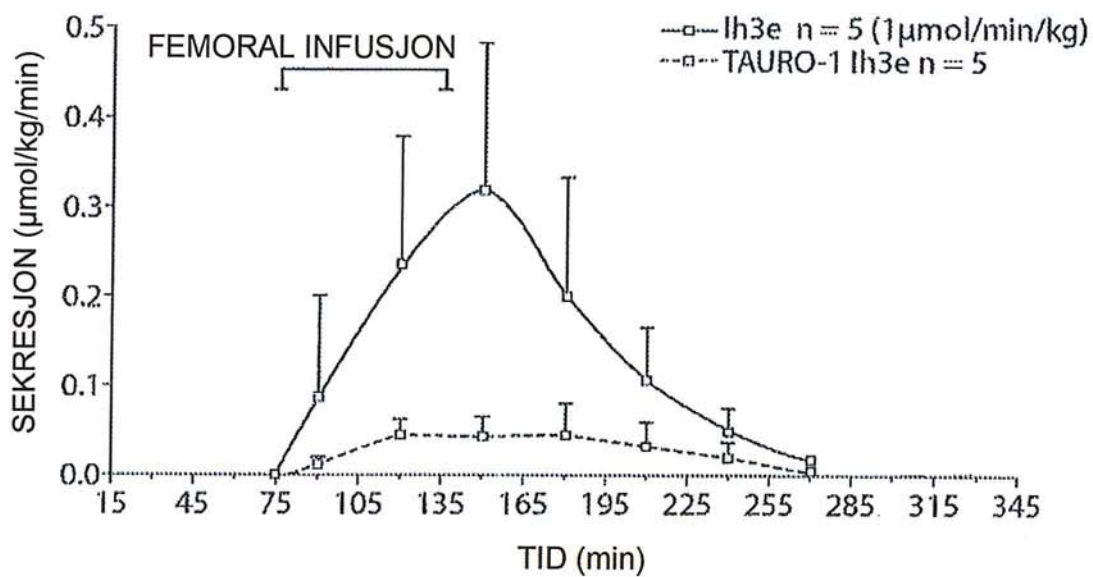


Fig. 13

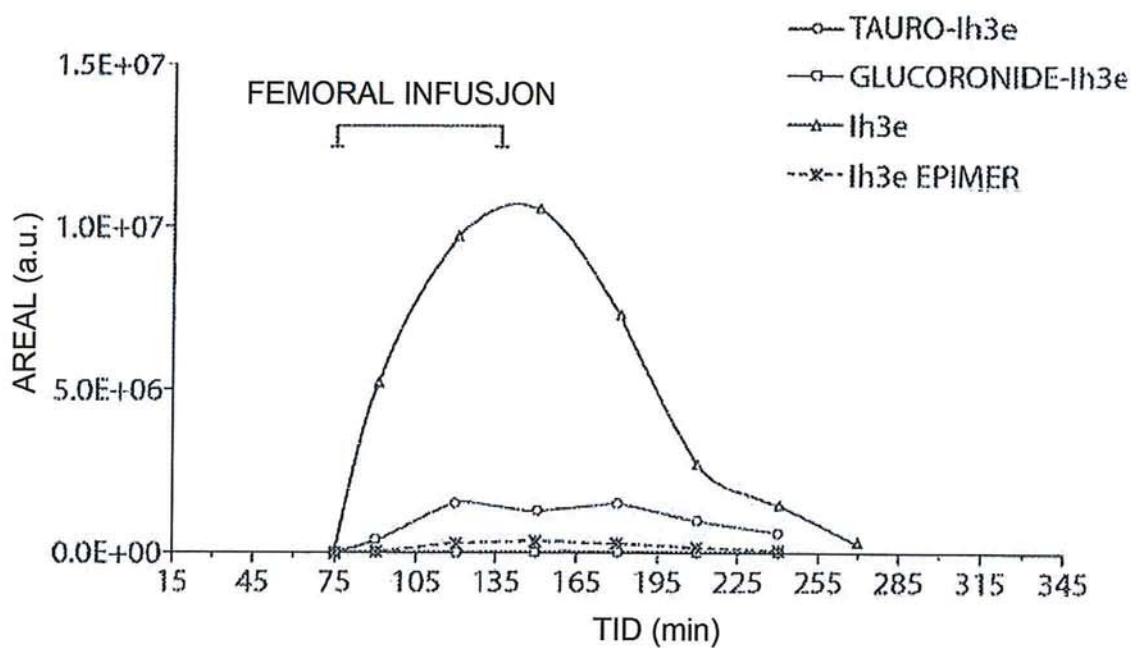


Fig. 14A

22/48

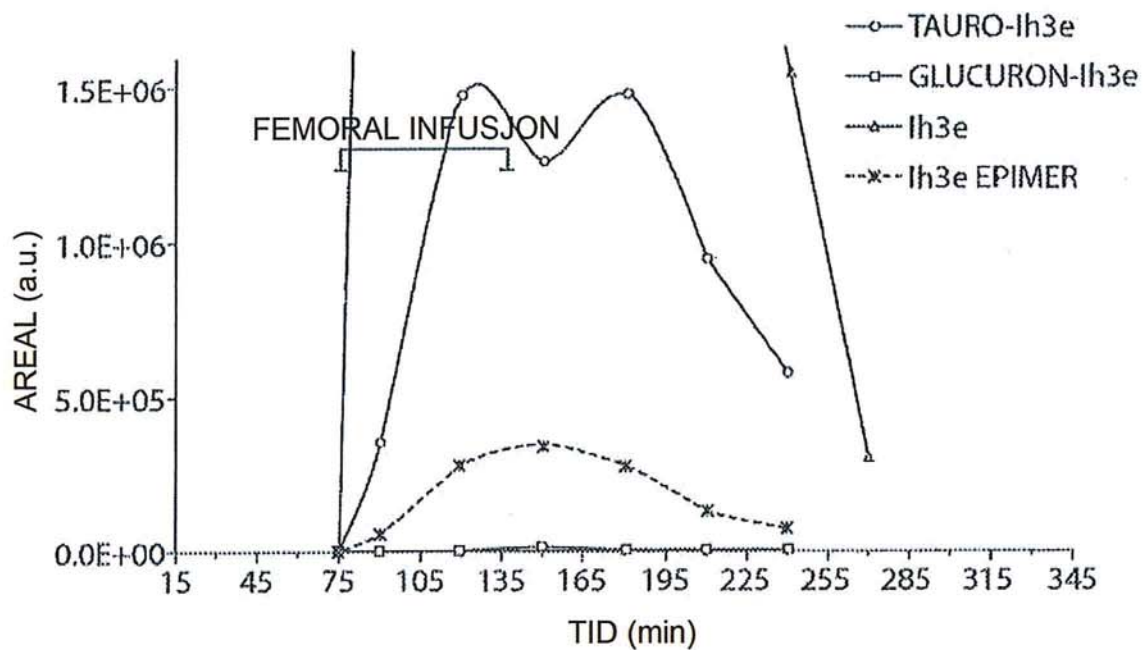


Fig. 14B

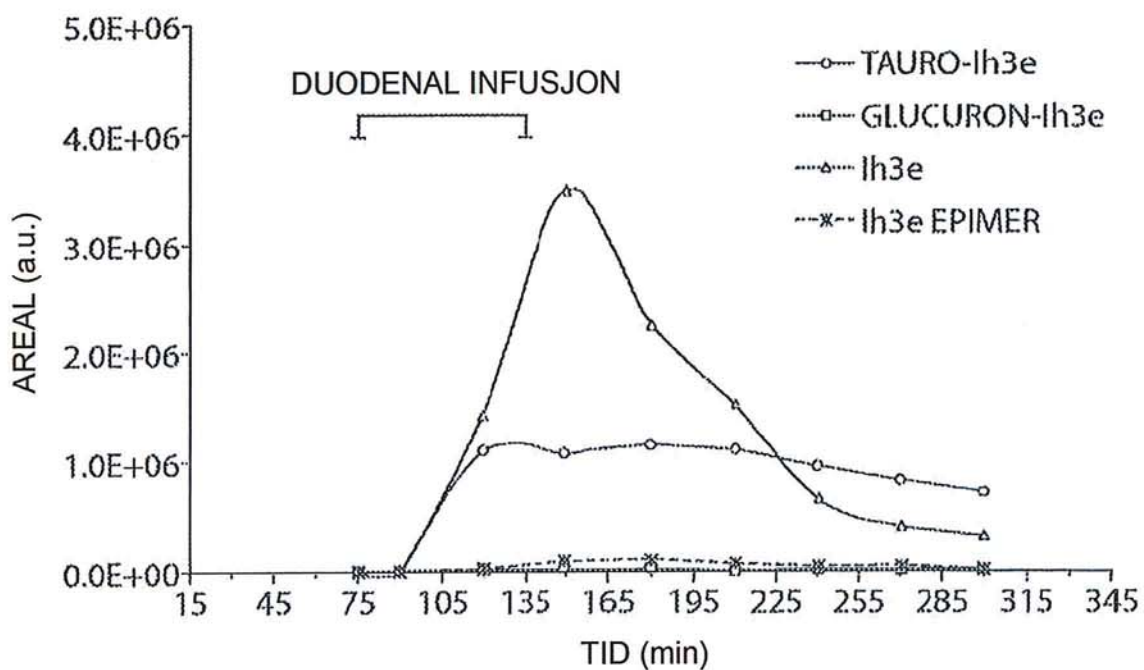


Fig. 14C

23/48

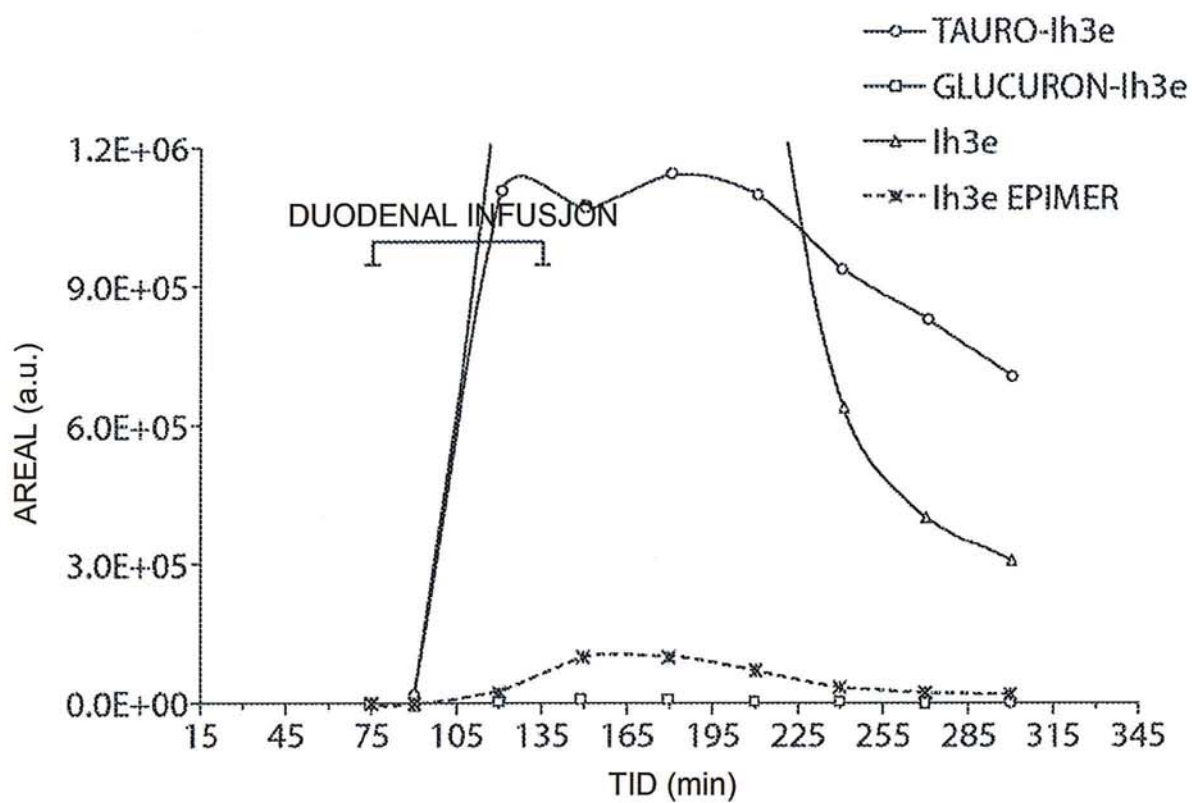


Fig. 14D

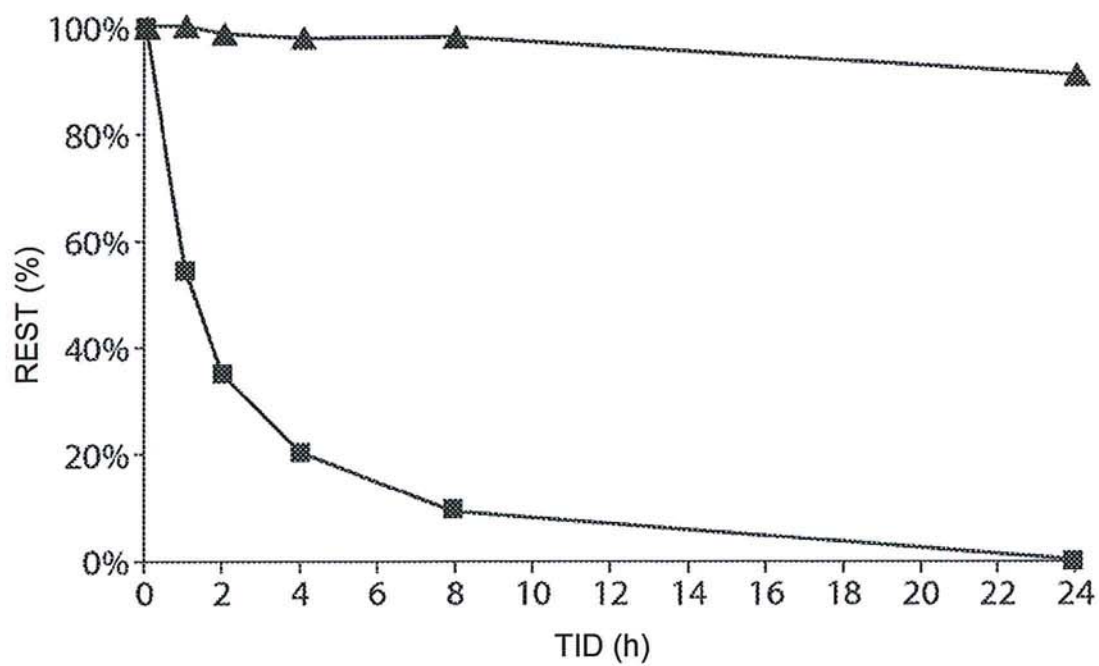


Fig. 15

24/48

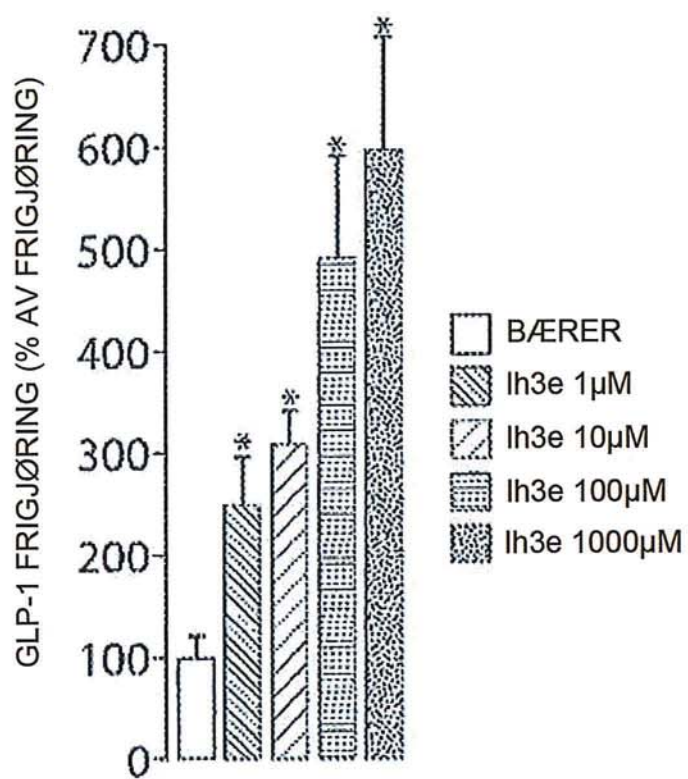


Fig. 16

25/48

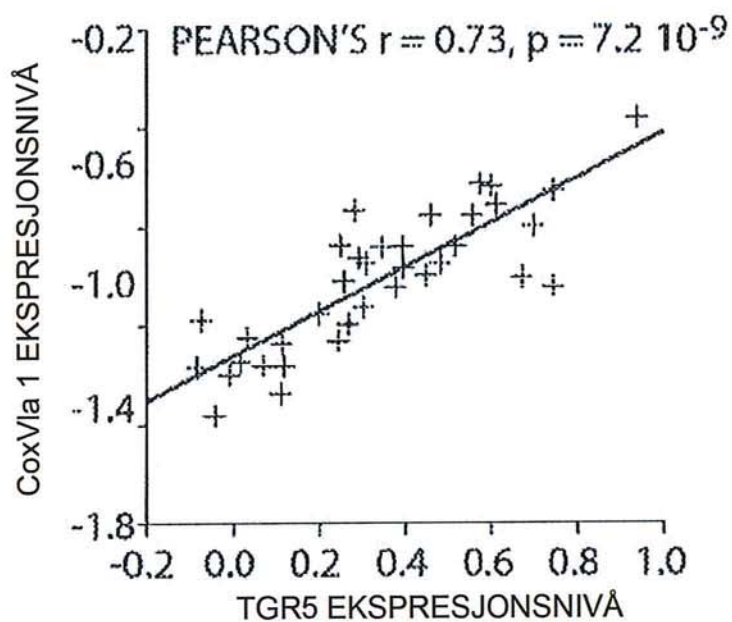


Fig. 17A

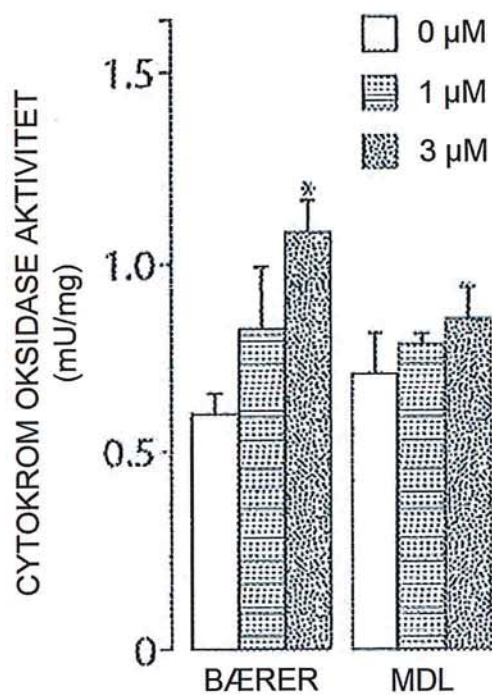


Fig. 17B

26/48

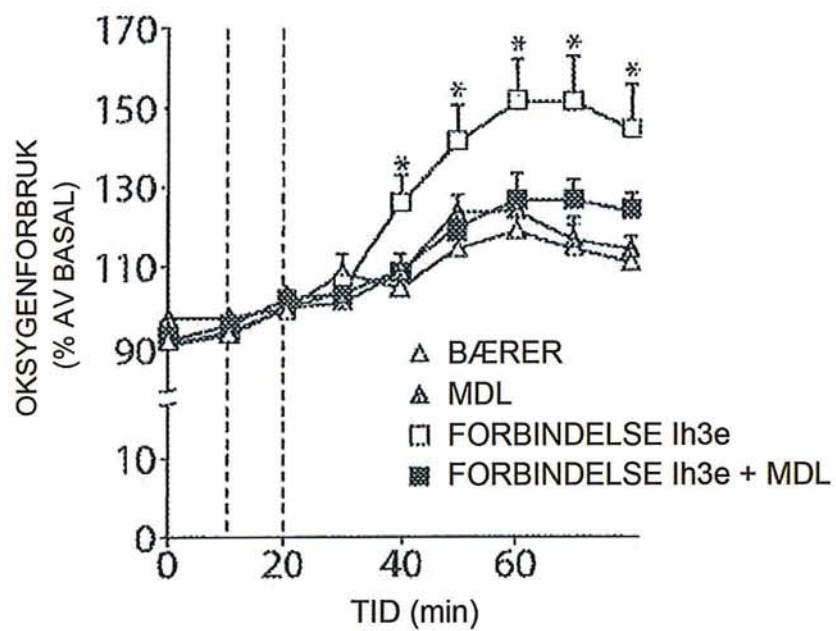


Fig. 17C

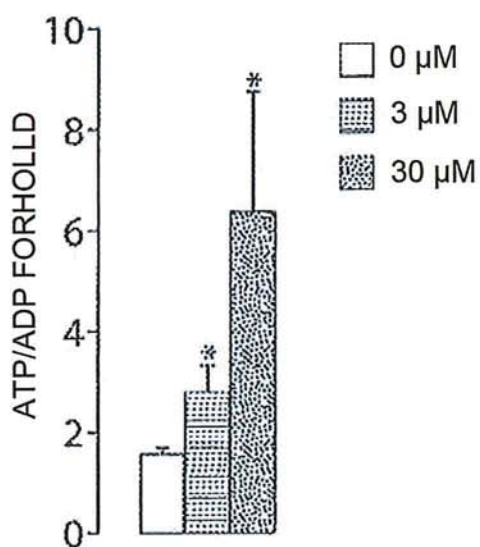


Fig. 17D

27/48

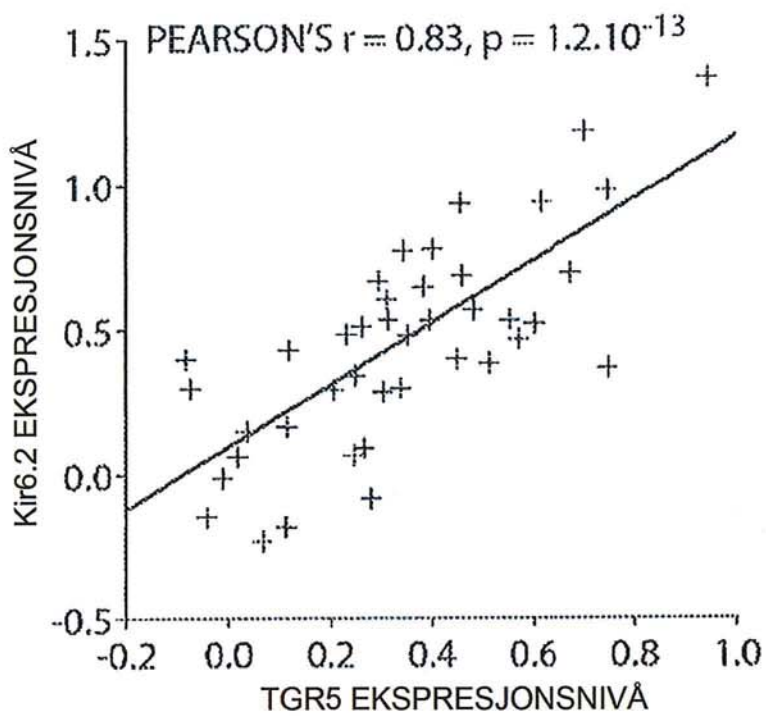


Fig. 17E

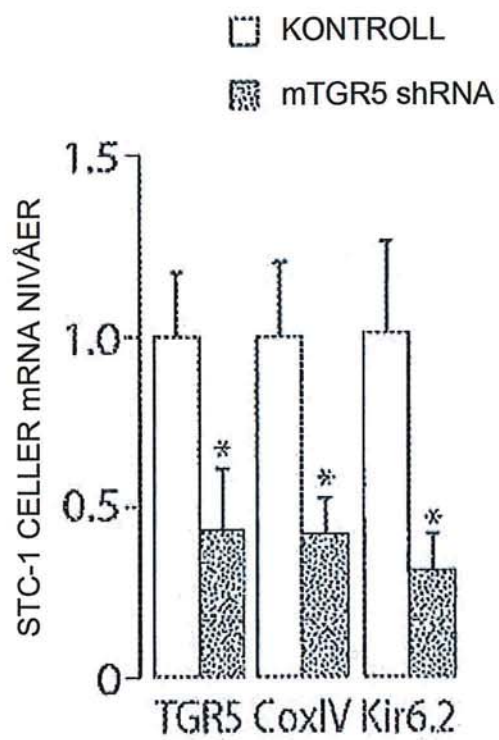


Fig. 17F

28/48

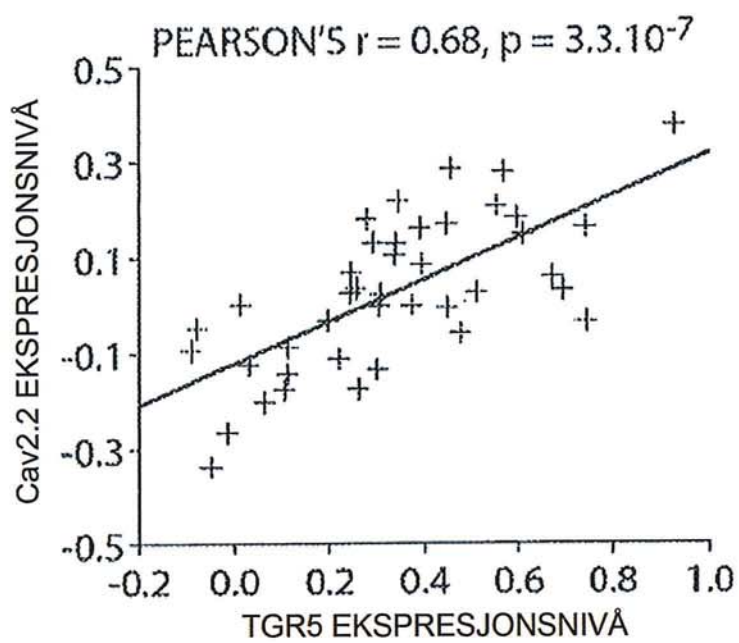


Fig. 18A

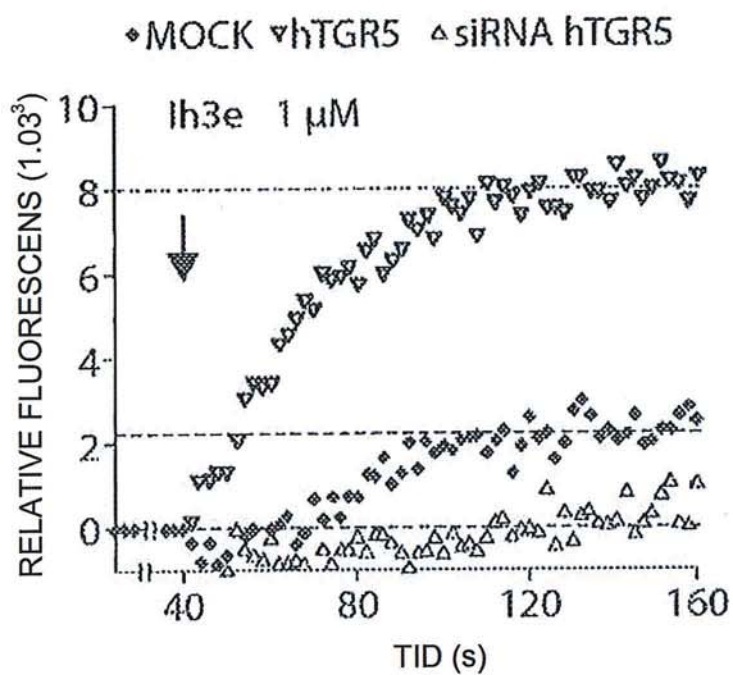


Fig. 18B

29/48

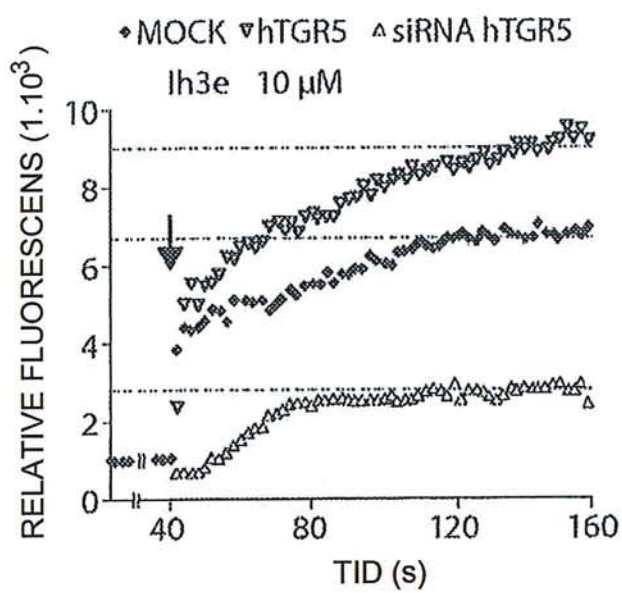


Fig. 18C

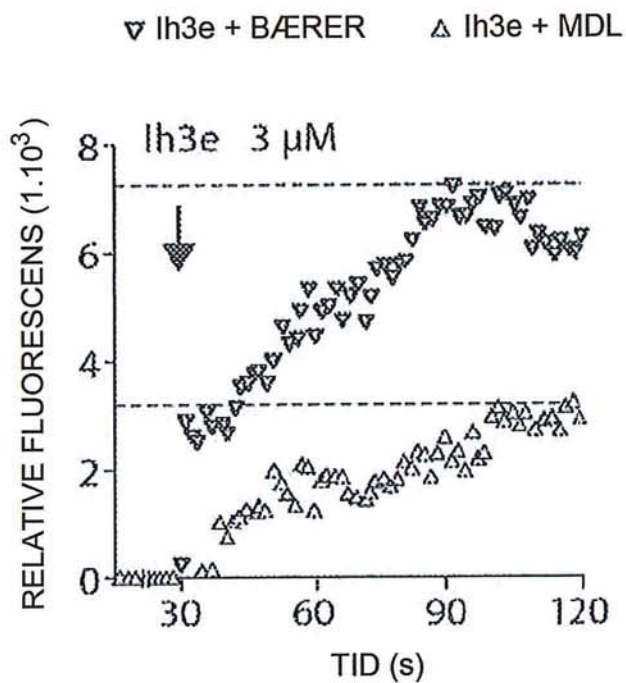


Fig. 18D

30/48

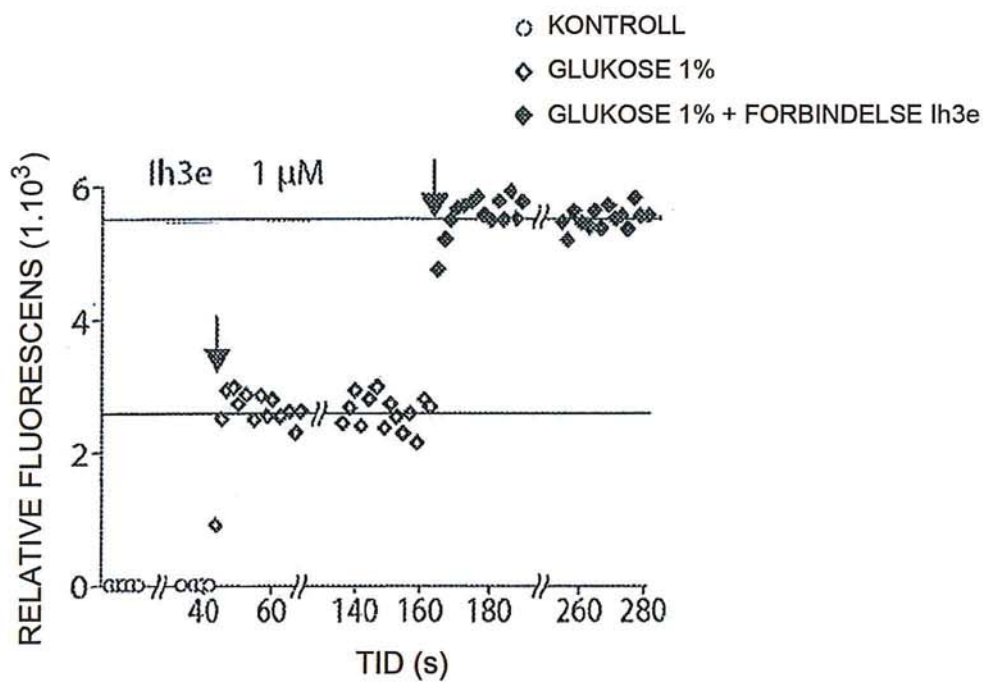


Fig. 18E

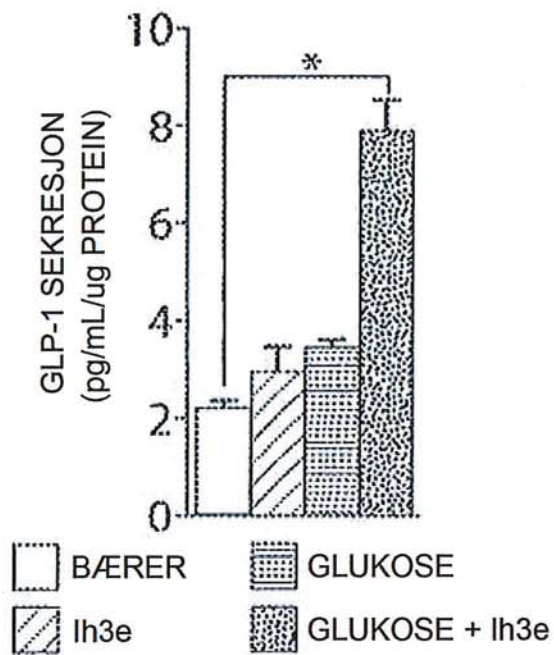


Fig. 18F

31/48

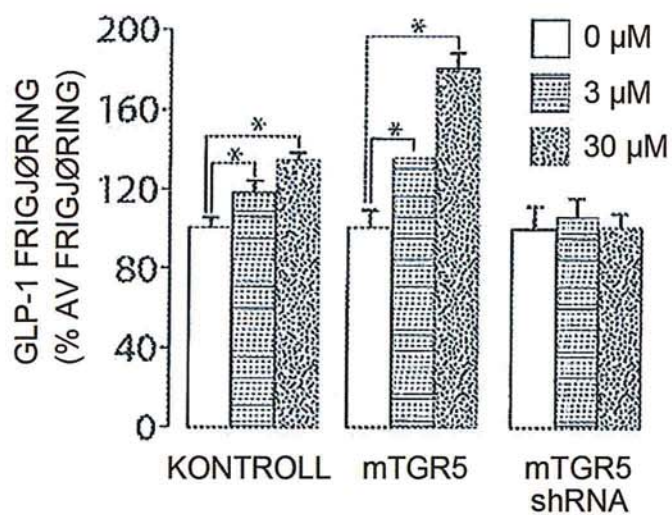


Fig. 18G

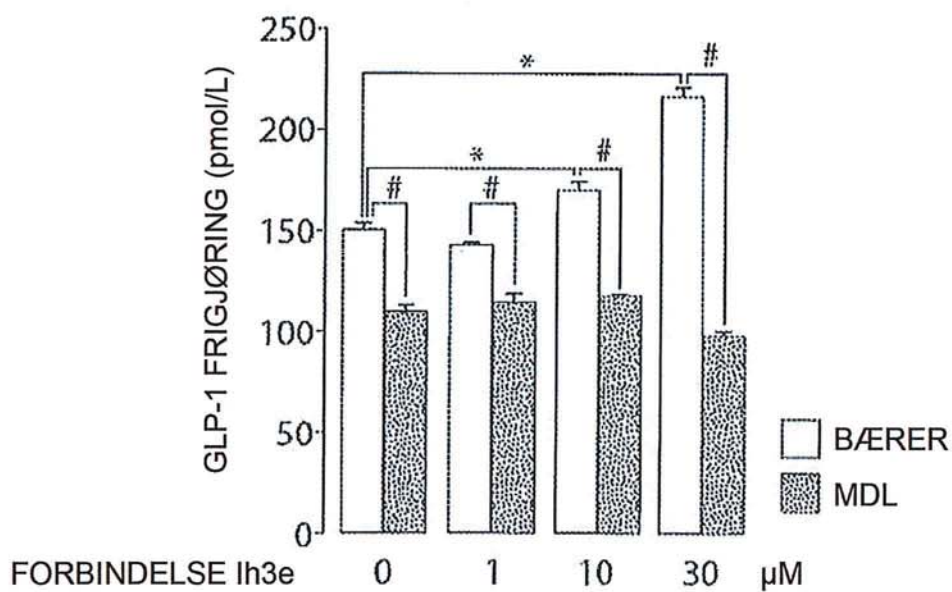


Fig. 18H

32/48

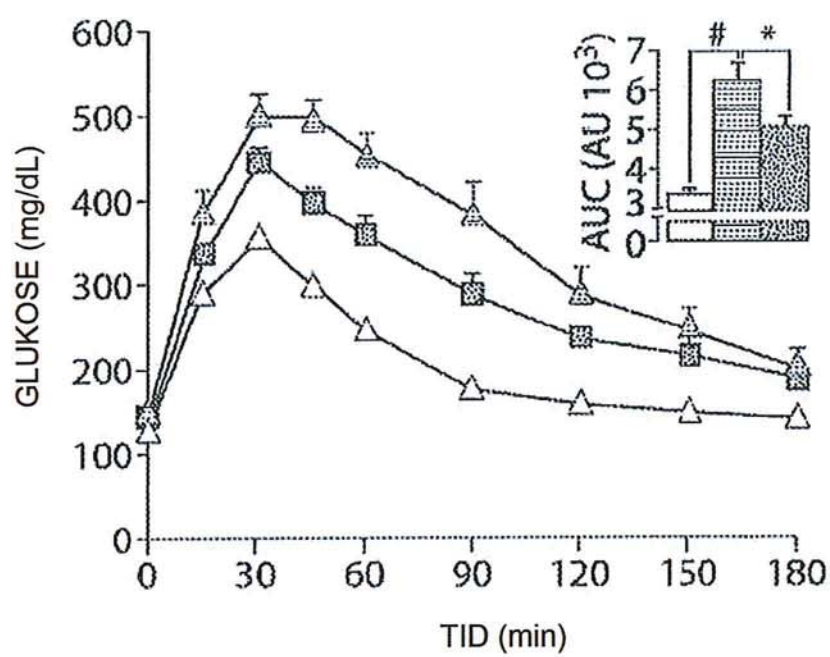


Fig. 19A

33/48

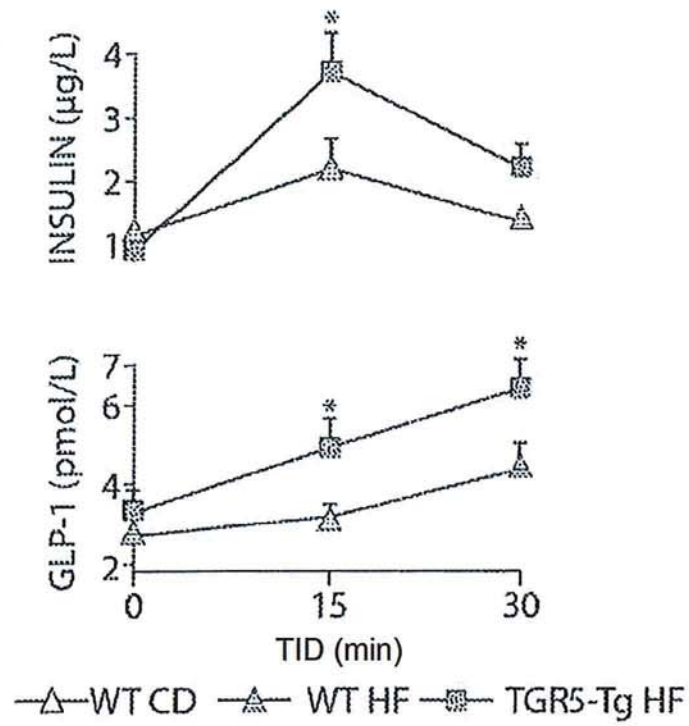


Fig. 19B

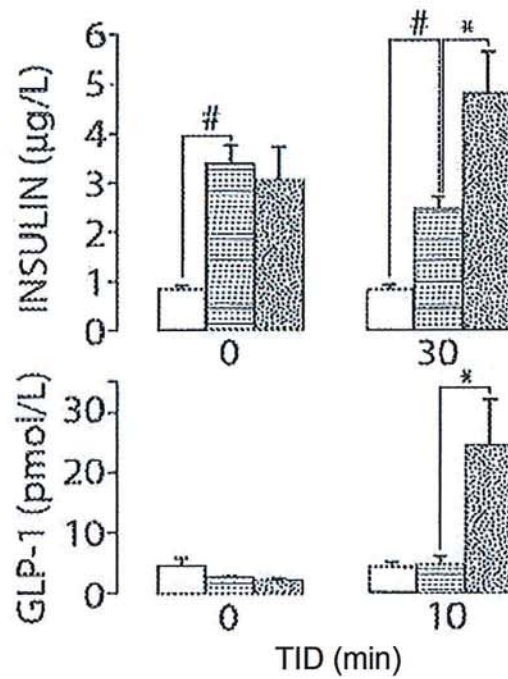


Fig. 19C

34/48

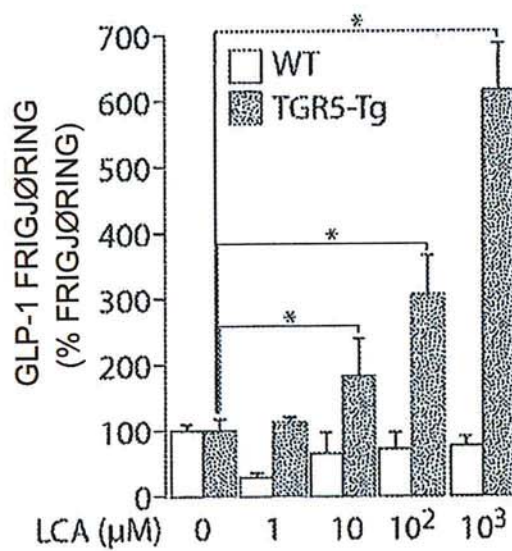


Fig. 19D

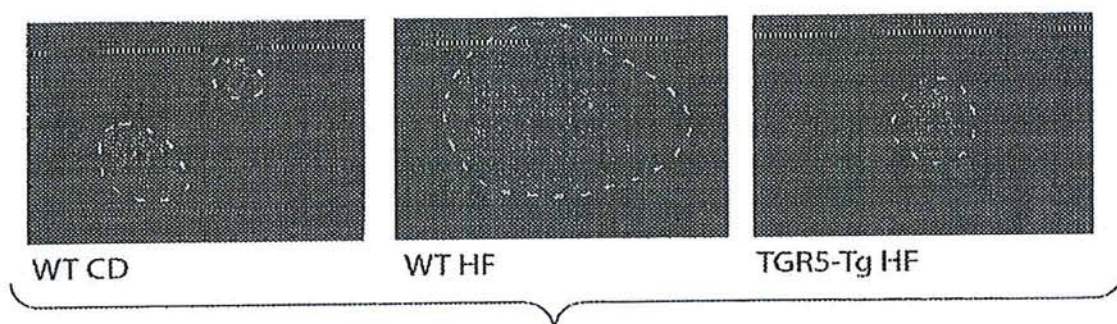


Fig. 19E

35/48

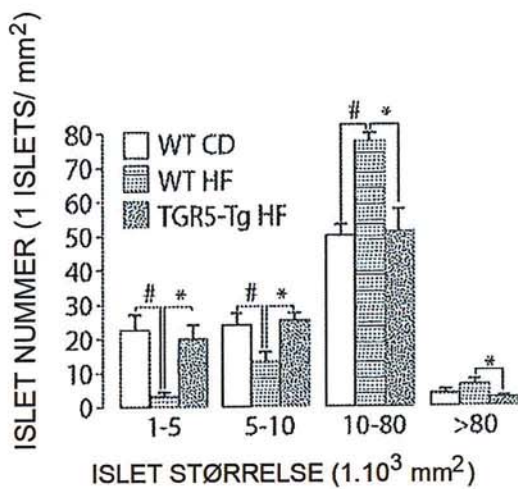


Fig. 19F

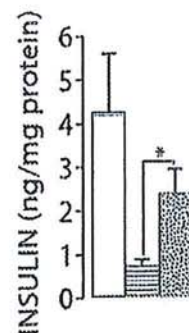


Fig. 19G

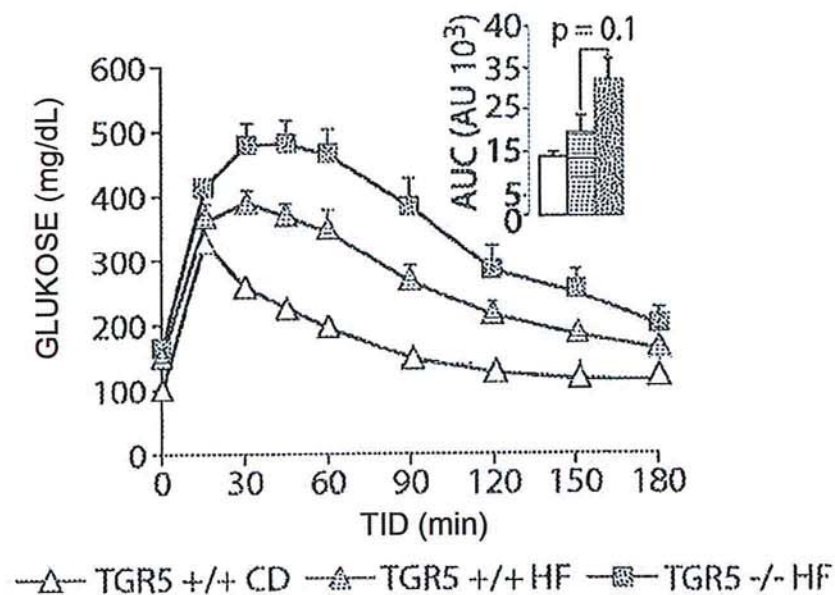


Fig. 19H

36/48

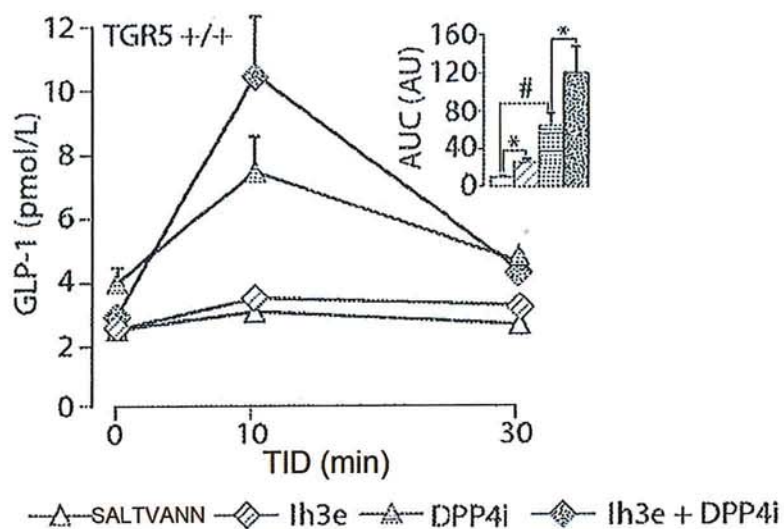


Fig. 19I

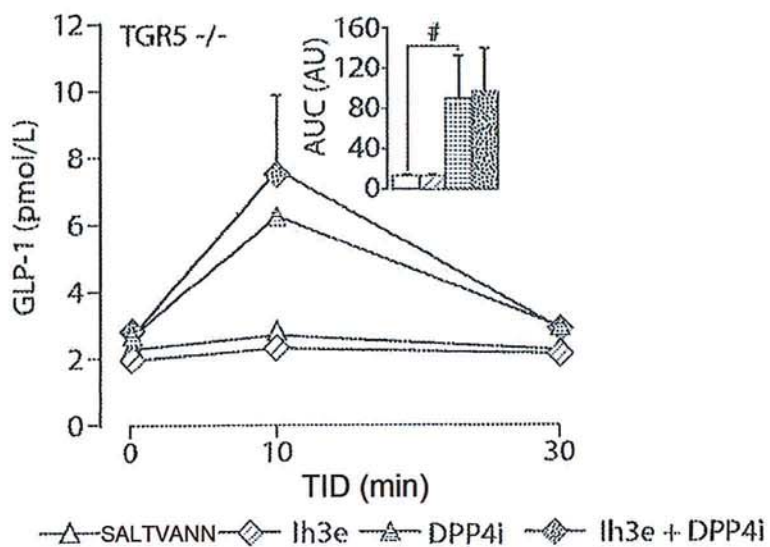


Fig. 19J

37/48

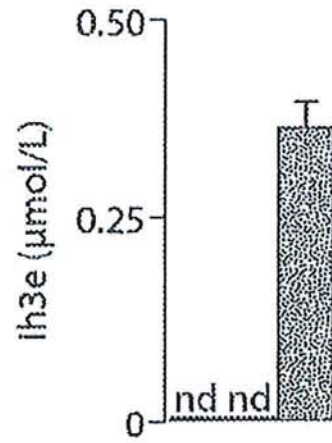


Fig. 20A

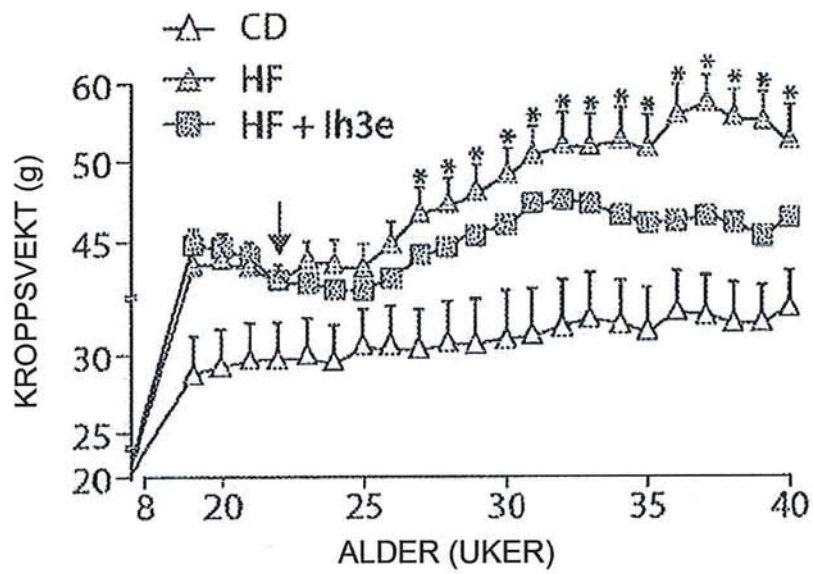


Fig. 20B

38/48

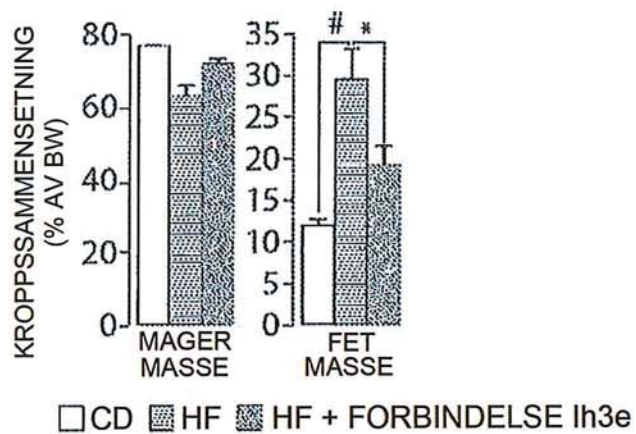


Fig. 20C

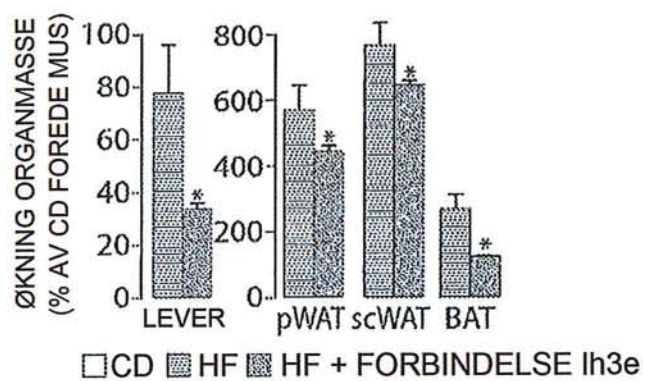


Fig. 20D

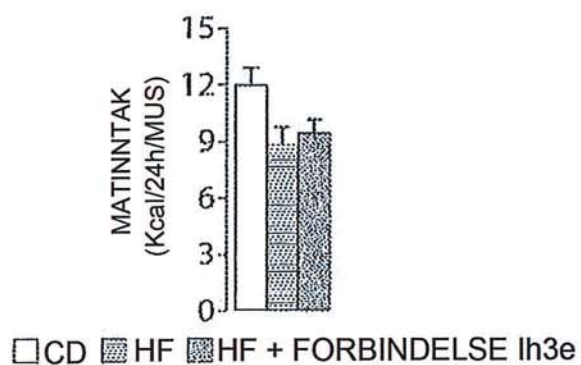


Fig. 20E

39/48

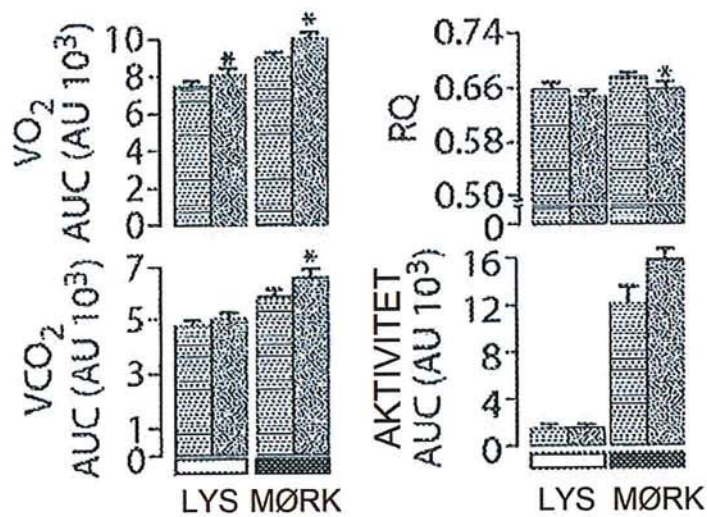


Fig. 20F

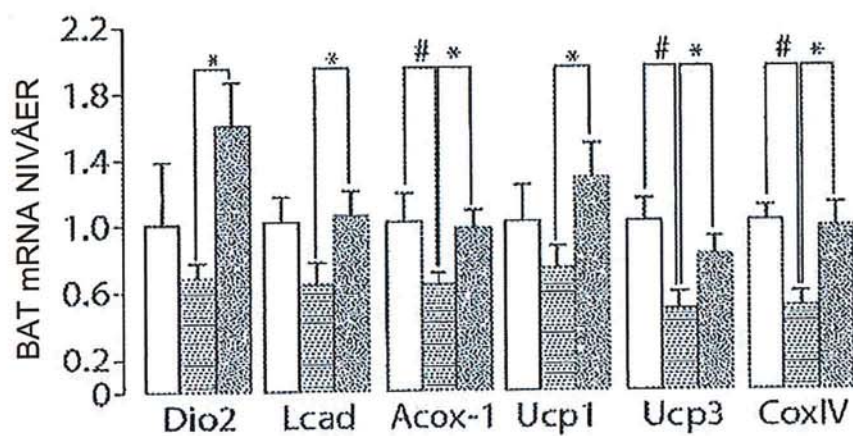


Fig. 20G

40/48

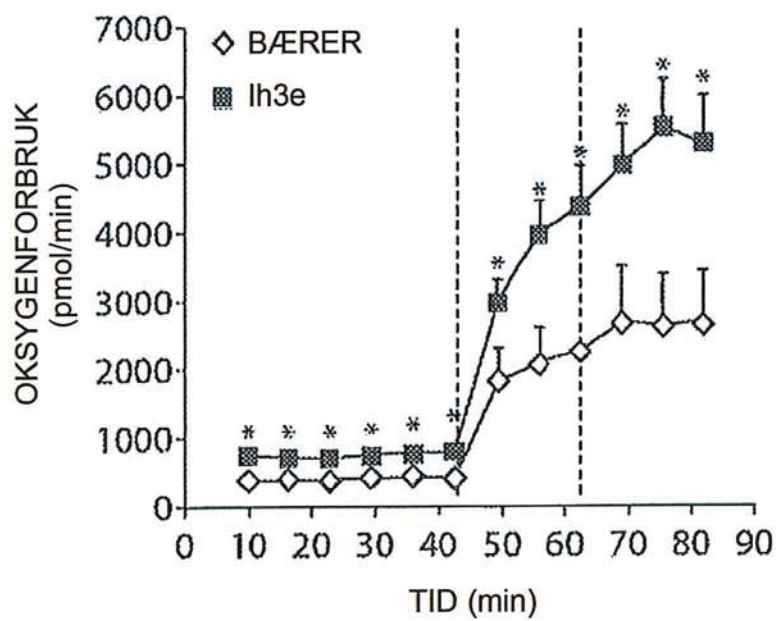


Fig. 20H

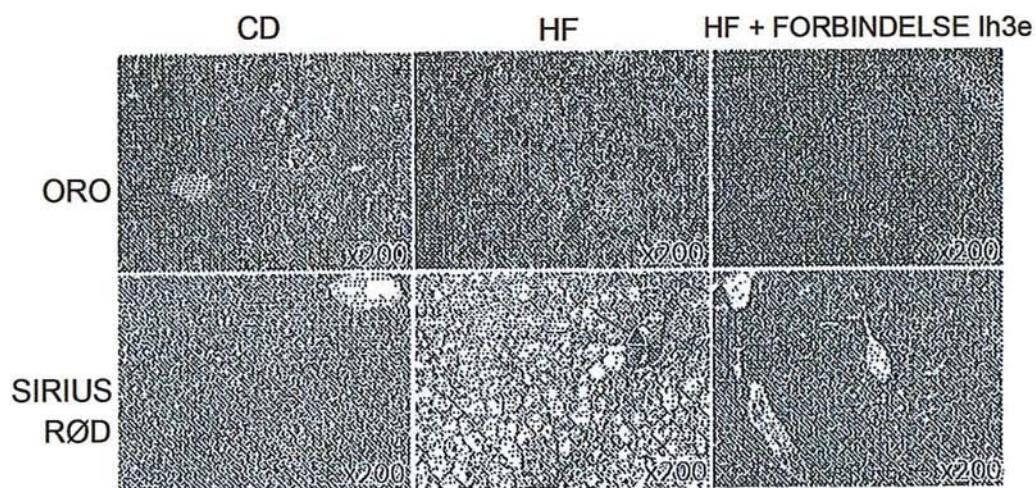


Fig. 20I

41/48

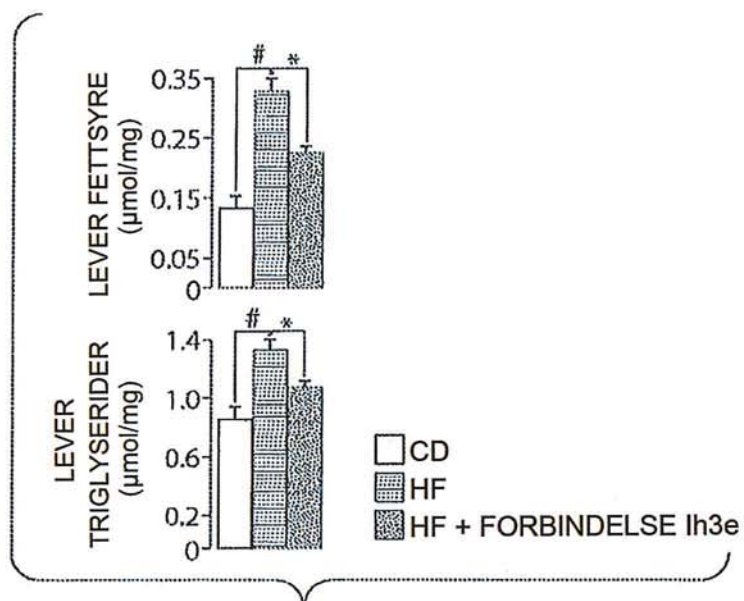


Fig. 20J

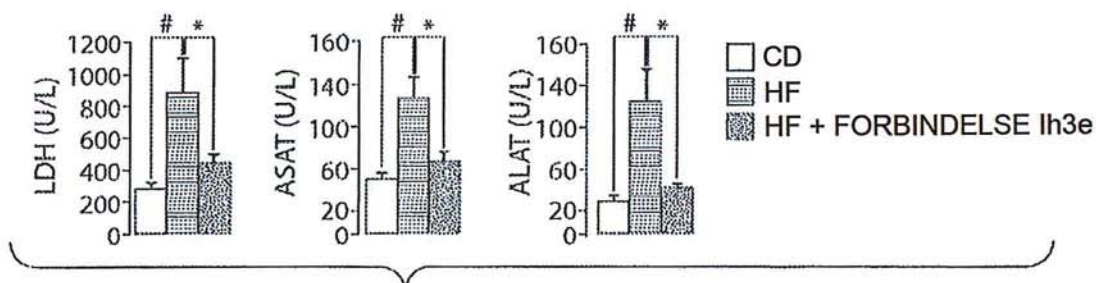


Fig. 20K

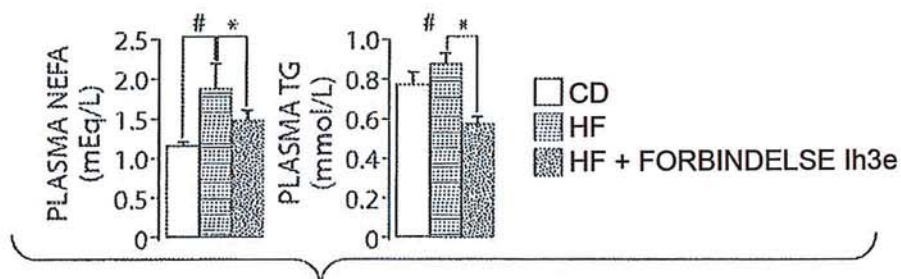


Fig. 20L

42/48

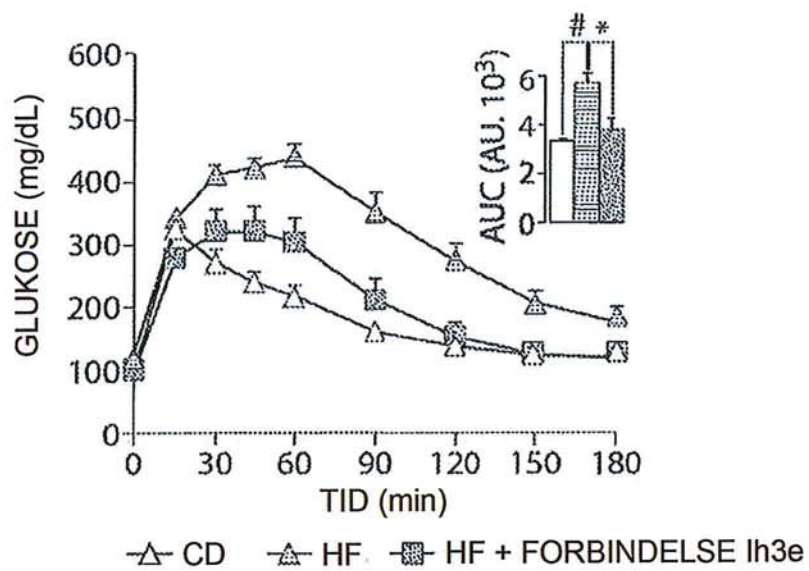


Fig. 21A

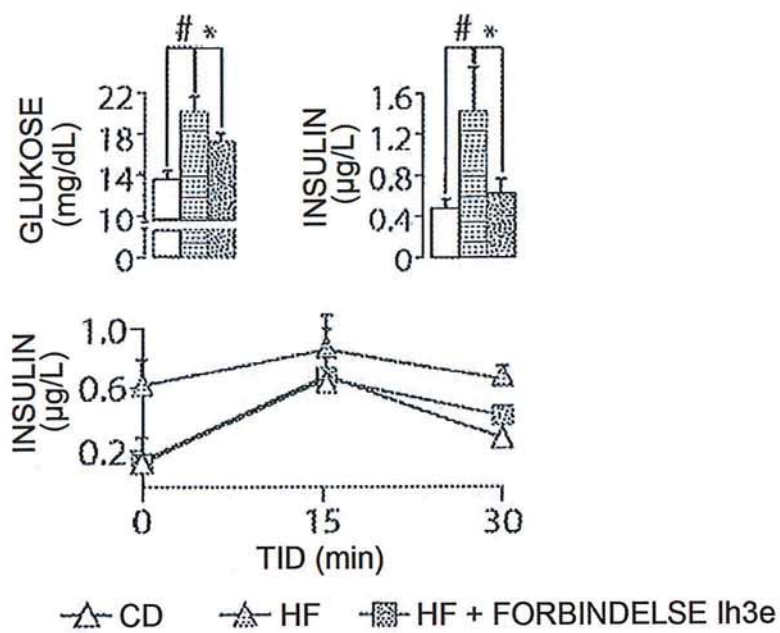


Fig. 21B

43/48

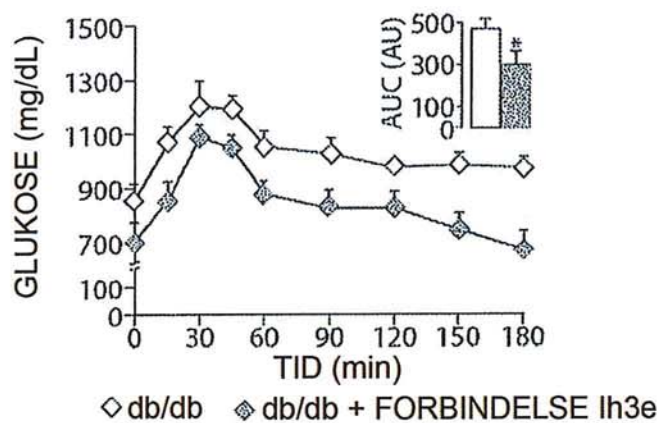


Fig. 21C

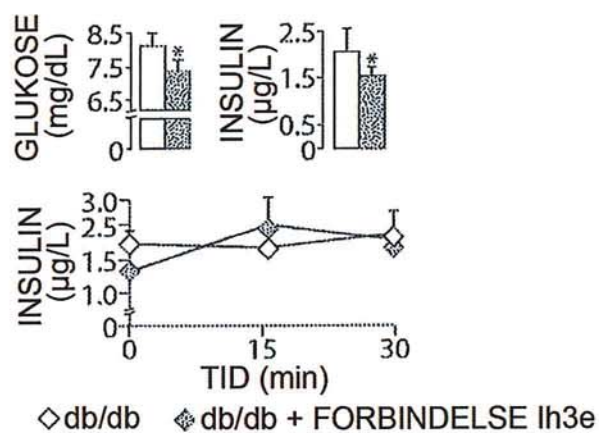


Fig. 21D

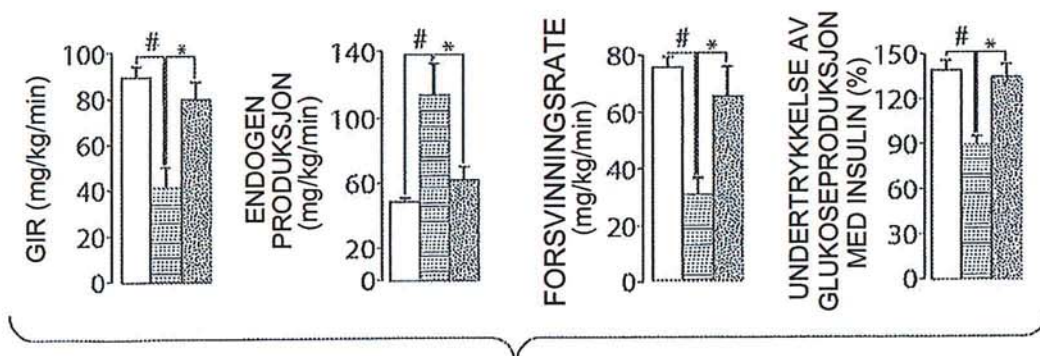


Fig. 21E

44/48

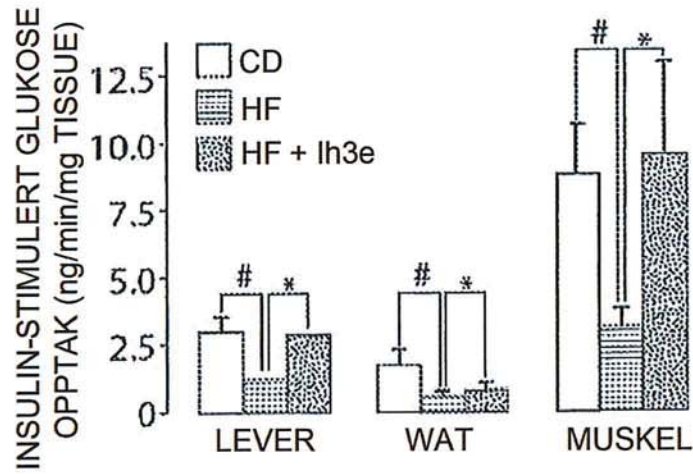


Fig. 21F

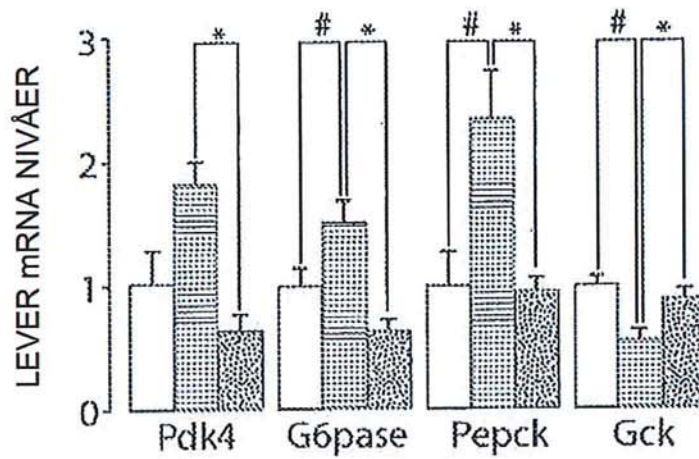


Fig. 21G

45/48

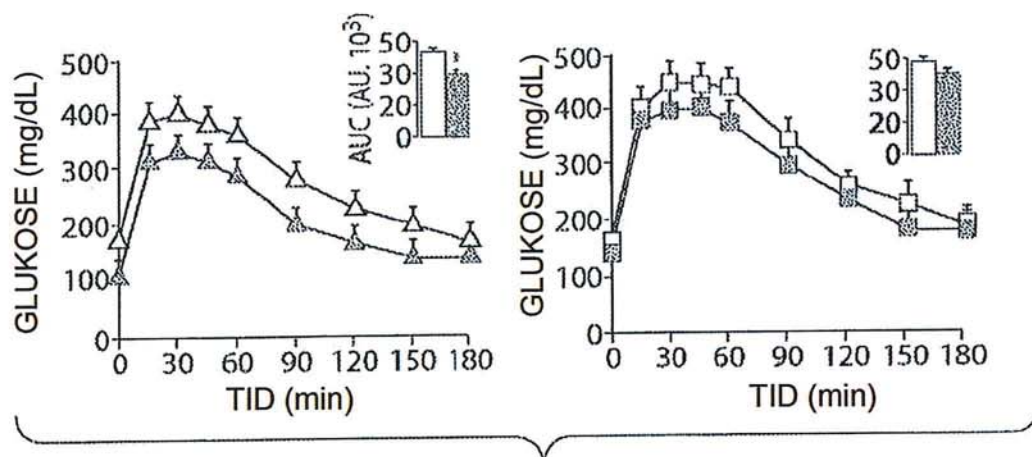


Fig. 22A

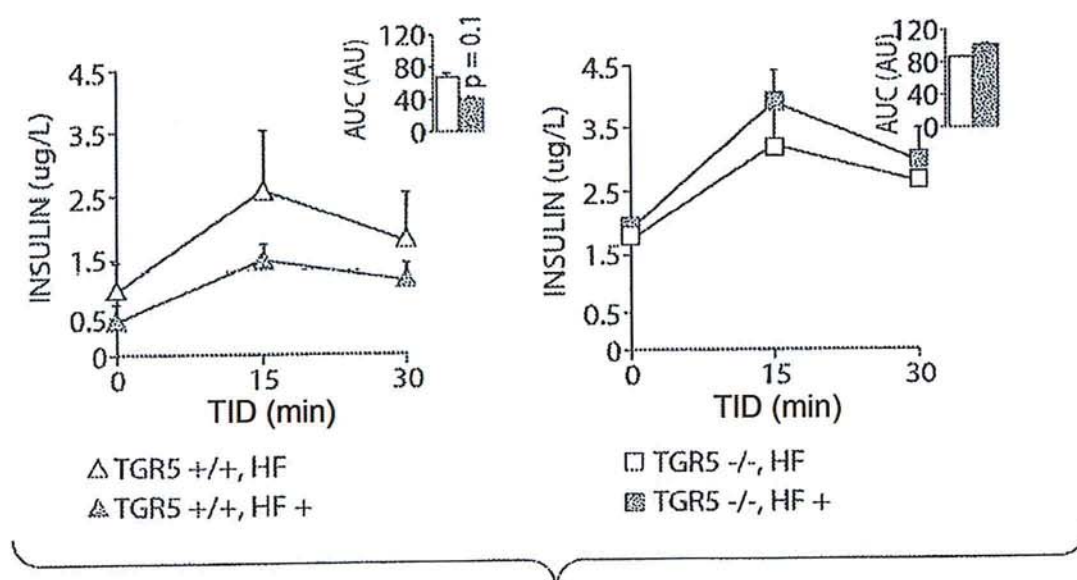


Fig. 22B

46/48

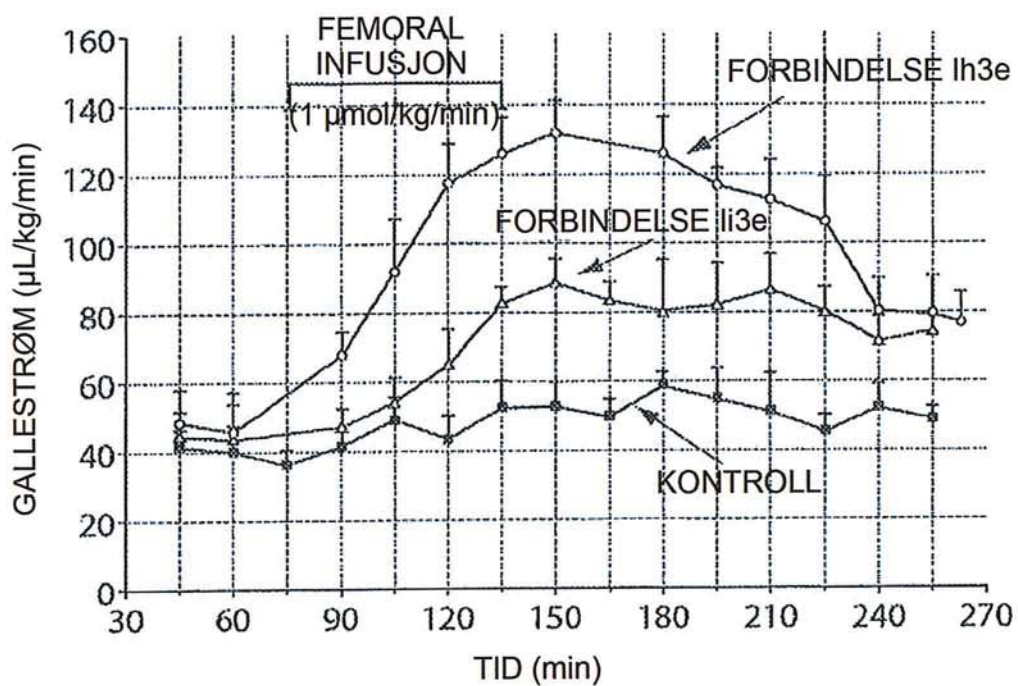


Fig. 23

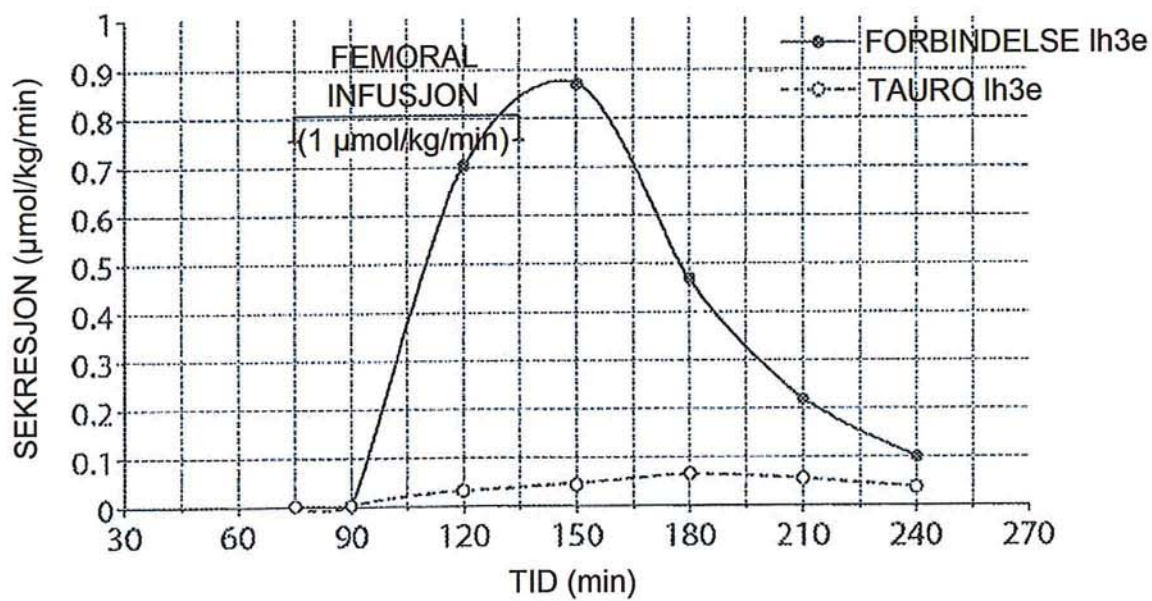


Fig. 24

47/48

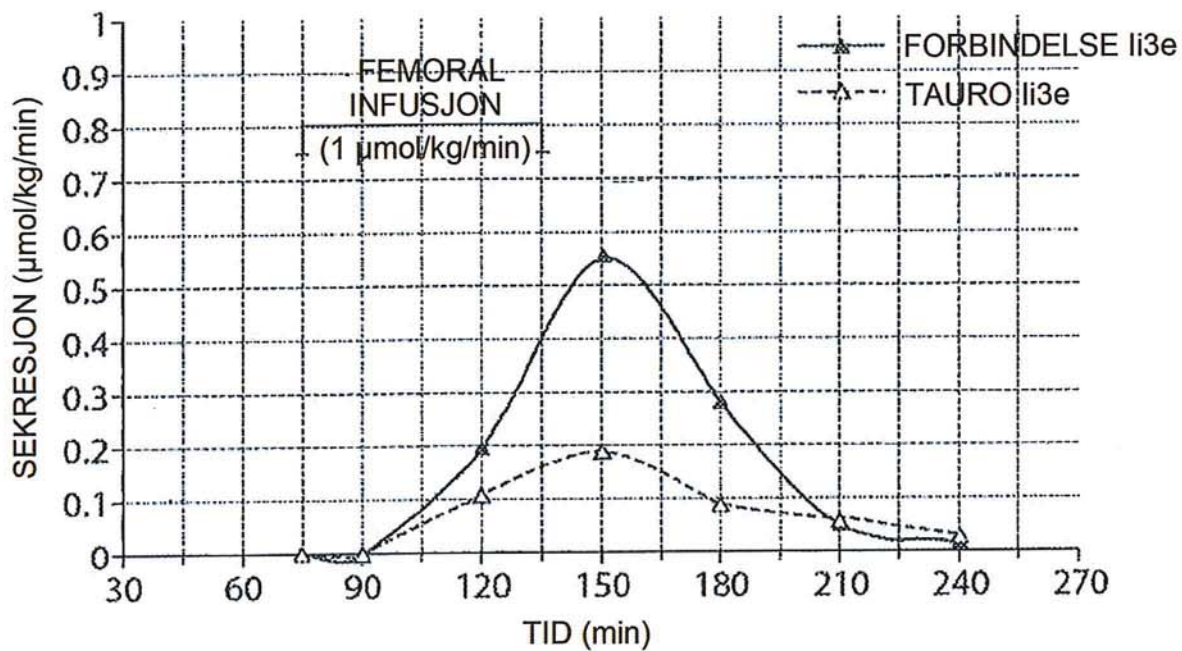


Fig. 25

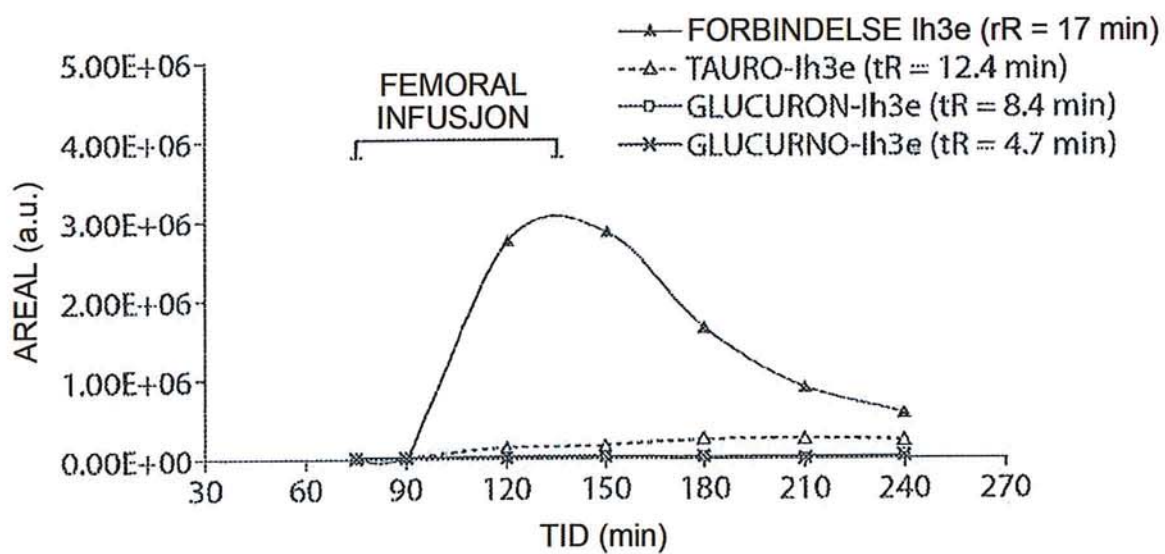


Fig. 26

48/48

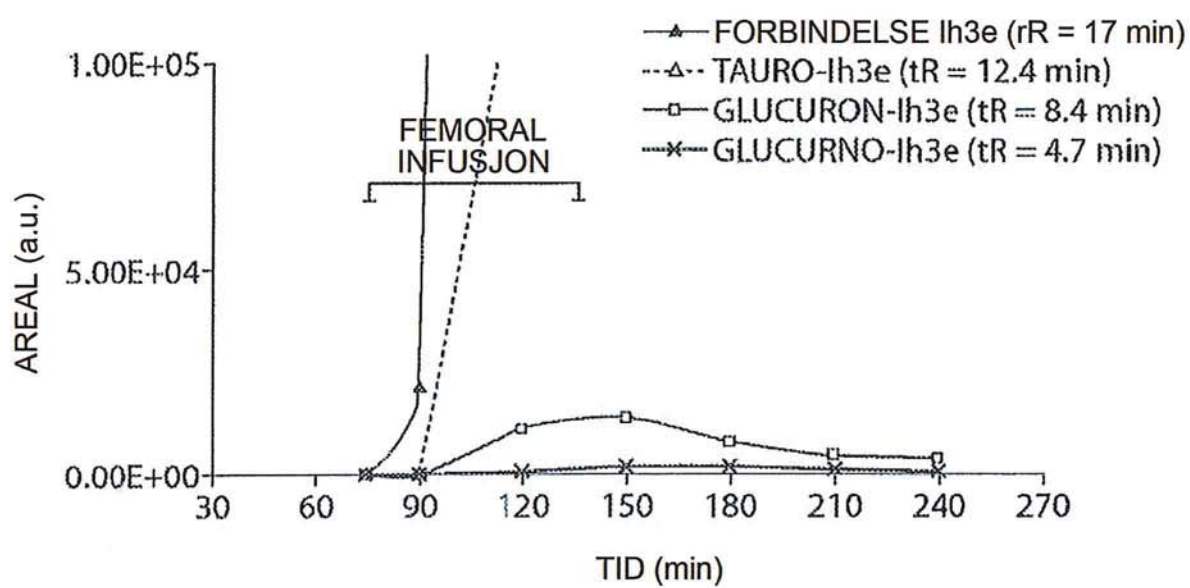


Fig. 27