



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102370638 A

(43) 申请公布日 2012. 03. 14

(21) 申请号 201010258545. 4

(22) 申请日 2010. 08. 20

(71) 申请人 南京大学

地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路  
22 号

(72) 发明人 张峻峰 董磊 黄振 张正平

(74) 专利代理机构 南京知识律师事务所 32207

代理人 胡锡瑜

(51) Int. Cl.

A61K 31/404 (2006. 01)

A61P 1/16 (2006. 01)

A61P 31/12 (2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页

(54) 发明名称

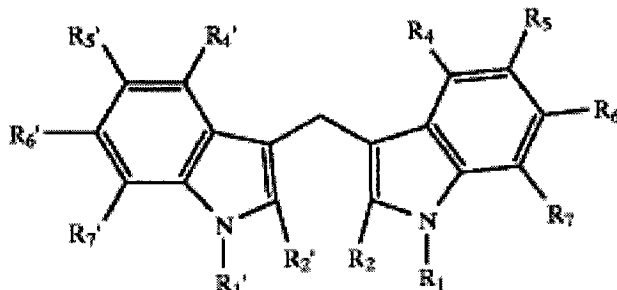
3, 3' - 二吡啶甲烷及衍生物在制备治疗肝脏  
疾病药物中的应用

(57) 摘要

本发明属于生物医药技术领域, 具体涉及二吡啶甲烷和其前体化合物吡啶-3- 甲醇及其衍生物在制备用于治疗肝纤维化, 肝炎和肝硬化相关肝脏疾病的药物中的应用。所述吡啶-3- 甲醇和二吡啶甲烷及其衍生物可以有效保护机体免受自由基损伤, 从而阻止自由基诱导的星状细胞活化以及相关的胶原蛋白表达, 从而降低了肝纤维化程度, 故可用于治疗纤维化相关的肝纤维化, 肝炎和肝硬化疾病。

1. 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物和 3,3'-二吡啶甲烷的前体化合物吡啶-3-甲醇及其衍生物在制备治疗肝纤维化, 肝炎和肝硬化相关肝脏疾病的药物中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物和 3,3'-二吡啶甲烷的前体化合物吡啶-3-甲醇及其衍生物的应用, 其特征在于所述的 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物具有如下化学结构式:

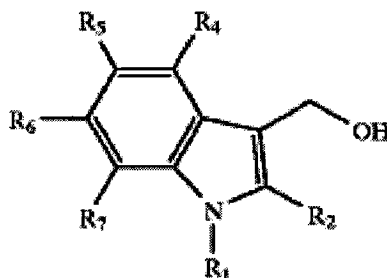


其中  $R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7, R_1', R_2', R_4', R_5', R_6'$  和  $R_7'$  是氢原子, 或卤素, 或硝基, 或主链长为一到十个碳的直链或者支链的烷或烷氧基。

3. 根据权利要求 2 所述 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物和 3,3'-二吡啶甲烷的前体化合物吡啶-3-甲醇及其衍生物的应用, 其特征在于所述的卤素为氯或溴或氟。

4. 根据权利要求 2 所述 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物和 3,3'-二吡啶甲烷的前体化合物吡啶-3-甲醇及其衍生物的应用, 其特征在于所述的 3,3'-二吡啶甲烷的衍生物为 5,5'-二氯-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二溴-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二氟-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二甲基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二乙基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二丙基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二丁基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二戊基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二甲氧基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二乙氧基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二丙氧基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二丁氧基-二吡啶甲烷, 或 5,5'-二戊氧基-二吡啶甲烷, 或 N,N'-二甲基-二吡啶甲烷, 或 N,N'-二乙基-二吡啶甲烷, 或 N,N'-二丙基-二吡啶甲烷, 或 N,N'-二丁基-二吡啶甲烷, 或 N,N'-二戊基-二吡啶甲烷, 或 2,2'-二甲基-二吡啶甲烷, 或 2,2'-二乙基-二吡啶甲烷, 或 2,2'-二丙基-二吡啶甲烷, 或 2,2'-二丁基-二吡啶甲烷, 或 2,2'-二戊基-二吡啶甲烷。

5. 根据权利要求 1 所述 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物和 3,3'-二吡啶甲烷的前体化合物吡啶-3-甲醇及其衍生物的应用, 其特征在于所述的 3,3'-二吡啶甲烷的前体化合物吡啶-3-甲醇及其衍生物具有如下化学结构式:



其中,  $R_1, R_2, R_4, R_5, R_6, R_7$  位是氢原子, 或卤素, 或硝基, 或主链长为一到十个碳原子的直链或者支链的烷或烷氧基。

6. 根据权利要求 5 所述 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物和 3,3'-二吡啶甲烷的前体化

合物吡啶-3-甲醇及其衍生物的应用,其特征在于所述的卤素为氯,或溴,或氟。

7. 根据权利要求5所述3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物和3,3'-二吡啶甲烷的前体化合物吡啶-3-甲醇及其衍生物的应用,其特征在于所述的吡啶-3-甲醇的衍生物为:5-甲基-吡啶-3-甲醇,或5-乙基-吡啶-3-甲醇,或5-丙基-吡啶-3-甲醇,或5-丁基-吡啶-3-甲醇,或5-戊基-吡啶-3-甲醇,或5-甲氧基-吡啶-3-甲醇,或5-乙氧基-吡啶-3-甲醇,或5-丙氧基-吡啶-3-甲醇,或5-丁氧基-吡啶-3-甲醇,或5-戊氧基-吡啶-3-甲醇,或N-甲基-吡啶-3-甲醇,或N-乙基-吡啶-3-甲醇,或N-丙基-吡啶-3-甲醇,或N-丁基-吡啶-3-甲醇,或N-戊基-吡啶-3-甲醇,或2-甲基-吡啶-3-甲醇,或2-乙基-吡啶-3-甲醇,或2-丙基-吡啶-3-甲醇,或2-丁基-吡啶-3-甲醇,或2-戊基-吡啶-3-甲醇。

8. 根据权利要求1所述3,3'-二吡啶甲烷及其衍生物和3,3'-二吡啶甲烷的前体化合物吡啶-3-甲醇及其衍生物在制备治疗肝纤维化,肝炎和肝硬化相关肝脏疾病引起的病毒性肝炎,或酒精性肝炎,或药物性肝炎,或脂肪肝,或肝纤维化,或肝硬化药物中的应用。

### 3,3'-二吡啶甲烷及衍生物在制备治疗肝脏疾病药物中的应用

#### 一、技术领域

[0001] 本发明属于生物医药技术领域,具体涉及 3,3'-二吡啶甲烷 (DIM) 和其前体化合物吡啶-3-甲醇 (I3C) 和以及它们的衍生物在制备治疗肝纤维化,肝炎,肝硬化相关的肝脏疾病的药物中的应用。

#### 二、背景技术

[0002] 肝纤维化是指肝脏内弥漫性细胞外基质(特别是胶原)过度沉积。它不是一个独立的疾病,许多慢性肝脏疾病均可引起肝纤维化,其病因大致可分为感染性(慢性乙型、丙型和丁型病毒性肝炎,血吸虫病等),先天性代谢缺陷(肝豆状核变性、血色病、 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶缺乏症等),化学代谢缺陷(慢性酒精性肝病、慢性药物性肝病)以及自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎等。其临床症状主要包括疲乏无力、食欲减退、消化不良、出血等,而且病程迁延不愈,甚至有癌变可能。针对肝纤维化治疗过去主要集中在糖皮质类固醇、秋水仙素、干扰素等,但是传统的治疗存在靶点尚不明确,副作用较大,停药后易复发,成本较高等缺点。

[0003] 近年来研究表明肝纤维化的发生主要是由于肝星状细胞(Hepatic stellate cell, HSC)被激活,激活的HSC可以转化为成肌纤维细胞(myofibroblast),其重要标志之一是开始表达平滑肌 $\alpha$ -肌动蛋白( $\alpha$ -SMA),并大量表达分泌I型胶原,导致胞外基质(extracellular matrix, ECM)的合成与降解失衡,造成大量的胶原在细胞外沉积。自由基主要包括超氧阴离子自由基( $O_2^-$ )、羟自由基(OH $\cdot$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )等,在肝纤维化发生过程中,肝脏中的巨噬细胞大量分泌自由基,自由基的危害在于其一方面可以直接作用于各种信号分子,促使HSC增殖活化,诱导肝纤维化的发生,另一方面还能攻击肝细胞的各种膜相结构,引起脂质过氧化链式反应,形成一系列脂质过氧化物,而脂质过氧化物可通过影响胶原代谢导致肝纤维化的形成。3,3'-二吡啶甲烷(DIM)及其母体化合物吡啶-3-甲醇(I3C)最早被报道具有抗癌作用。吡啶-3-甲醇(I3C)在体内胃酸环境中很不稳定,可发生缩合反应形成低聚物3,3'-二吡啶甲烷。3,3'-二吡啶甲烷虽有文献报道其可以保护机体免受自由基损伤,但尚未有将其用于治疗肝纤维化和相关的肝炎,肝硬化的相关研究结果报道。

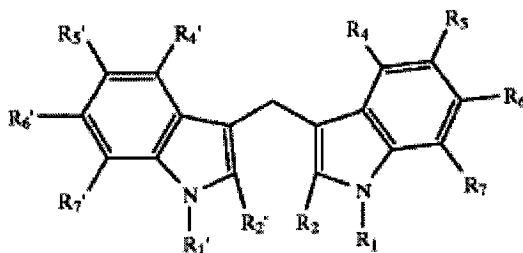
#### 三、发明内容

[0004] 本发明需要解决的问题是公开了一种可以有效降低肝脏内自由基水平,从而阻断肝星状细胞被自由基激活导致肝纤维化发生的小分子化合物,即3,3'-二吡啶甲烷和其前体化合物吡啶-3-甲醇和以及它们的衍生物在制备治疗肝纤维化,肝炎和肝硬化相关的肝脏疾病的药物中的应用。

[0005] 本发明的技术方案为:

[0006] 1. 本发明所述的3,3'-二吡啶甲烷(DIM)及其衍生物的结构式为:

[0007]

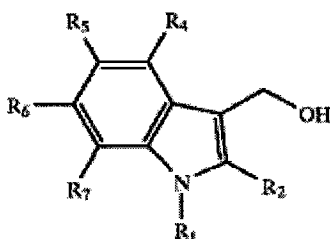


[0008] 这个化合物的 R1, R2, R4, R5, R6, R7, R1', R2', R4', R5', R6' 和 R7' 位可以分别是一个氢原子, 或者是一个选自以下基团组的取代基, 这个基团组包括卤素, 硝基, 和主链长约一到十个碳首选一到五个碳的直链或者支链的烷或烷氧基, 上述的化合物至少有一个取代基。卤素由氯, 溴, 氟的组合中选出。这样的化合物被称作 DIM 衍生物或者 DIM 类似物。

[0009] 在首选的 DIM 衍生物中, R1, R2, R4, R6, R7, R1', R2', R4', R6' 和 R7' 位是氢原子, R5 和 R5' 是一个由氯, 溴, 氟的组合中选出的卤素。相应的, 首选的 DIM 衍生物包括 5,5'-二氯-二吲哚甲烷; 5,5'-二溴-二吲哚甲烷; 5,5'-二氟-二吲哚甲烷。其他的首选 DIM 衍生物包括 R1, R2, R4, R6, R7, R1', R2', R4', R6' 和 R7' 位是氢原子, R5 和 R5' 是一到十个碳原子首选一到五个碳原子的烷或烷氧基的化合物。这些化合物包括但是不限于: 5,5'-二甲基-二吲哚甲烷; 5,5'-二乙基-二吲哚甲烷; 5,5'-二丙基-二吲哚甲烷; 5,5'-二丁基-二吲哚甲烷; 5,5'-二戊基-二吲哚甲烷。其他首选的 DIM 衍生物包括 R2, R4, R5, R6, R7, R2', R4', R5', R6' 和 R7' 位是氢原子, R1 和 R1' 是一到十个碳原子首选一到五个碳原子的烷或烷氧基的化合物。这些化合物包括但是不限于: N,N'-二甲基-二吲哚甲烷; N,N'-二乙基-二吲哚甲烷; N,N'-二丙基-二吲哚甲烷; N,N'-二丁基-二吲哚甲烷; N,N'-二戊基-二吲哚甲烷。另一种首选的 DIM 衍生物包括 R1, R4, R5, R6, R7, R1', R4', R5', R6' 和 R7' 位是氢原子, R2 和 R2' 是一到十个碳原子首选一到五个碳原子的烷或烷氧基的化合物。这些化合物包括但是不限于: 2,2'-二甲基-二吲哚甲烷; 2,2'-二乙基-二吲哚甲烷; 2,2'-二丙基-二吲哚甲烷; 2,2'-二丁基-二吲哚甲烷; 2,2'-二戊基-二吲哚甲烷。在另一种结构中, R1, R2, R4, R6, R7, R1', R2', R4', R6' 和 R7' 位是氢原子, R5 和 R5' 是硝基。

[0010] 2. 本发明所述的 3,3'-二吲哚甲烷的前体化合物吲哚-3-甲醇 (I3C) 及其衍生物的结构式如下:

[0011]



[0012] 这种化合物的 R1, R2, R4, R5, R6, R7 位可以分别是一个氢原子, 或者是一个选自以下基团组的取代基, 这个基团组包括卤素, 硝基, 和主链长约一到十个碳原子首选一到五个碳原子的直链或者支链的烷或烷氧基, 上述的化合物至少有一个取代基。

[0013] 在首选的 I3C 衍生物中, R1, R2, R4, R6, R7 上是氢原子, R5 是一个选自氯, 溴, 氟的

卤素。相应的,首选的 I3C 衍生物包括 5- 氯 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 溴 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 氟 - 吡啶 -3- 甲醇。其他的首选 I3C 衍生物包括 R1, R2, R4, R6, R7 上是氢原子, R5 为一到十个碳原子首选一到五个碳原子的烷或烷氧基的化合物。这些化合物包括但是不限于: 5- 甲基 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 乙基 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 丙基 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 丁基 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 戊基 - 吡啶 -3- 甲醇。这些化合物还包括但是不限于: 5- 甲氧基 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 乙氧基 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 丙氧基 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 丁氧基 - 吡啶 -3- 甲醇, 5- 戊氧基 - 吡啶 -3- 甲醇。其他的首选 I3C 衍生物包括 R2, R4, R5, R6, R7 上是氢原子, R1 为一到十个碳原子首选一到五个碳原子的烷或烷氧基的化合物。这些化合物包括但是不限于: N- 甲基 - 吡啶 -3- 甲醇, N- 乙基 - 吡啶 -3- 甲醇, N- 丙基 - 吡啶 -3- 甲醇, N- 丁基 - 吡啶 -3- 甲醇, N- 戊基 - 吡啶 -3- 甲醇。还有一类 I3C 的衍生物包括 R1, R4, R5, R6, R7 上是氢原子, R2 为一到十个碳原子首选一到五个碳原子的烷或烷氧基的化合物。这些化合物包括但是不限于: 2- 甲基 - 吡啶 -3- 甲醇, 2- 乙基 - 吡啶 -3- 甲醇, 2- 丙基 - 吡啶 -3- 甲醇, 2- 丁基 - 吡啶 -3- 甲醇, 2- 戊基 - 吡啶 -3- 甲醇。在另一种结构中, R1, R2, R4, R6, R7 上是氢原子, R5 是硝基。

[0014] 3. 本发明中的药物可以通过口腔, 静脉, 鼻腔, 直肠或其他任何可以输送有效剂量的活性物质的方式给药。合适的剂量是那些能得到所需要的最终量的剂量。而治疗不同的疾病也可能需要不同的剂量。该试剂的有效量是能导致肝纤维化程度明显降低的量。

[0015] 具有常规技术的研究人员将能够确定本发明中的药物的最有效的给药剂量和时间考虑给药方式, 药物代谢, 以及其他一些药代动力学参数例如药物分布, 清除率等。

[0016] 该类药物可以通过一个药物载体或者稀释液给药。这项发明所提供的试剂还可以和其他试剂例如化疗或者免疫激活药物或者治疗药物联合给药。对这项发明适用的药物载体或者稀释液的实例包括任何溶有水溶性有机载体的生理缓冲液, 例如环糊精磷酸盐缓冲液以及 pH7.0 到 7.4 的含有合适的水溶性有机载体其它缓冲液。合适的水溶性有机载体包括但是不限于环糊精, 玉米油, DMSO, 胶囊等。

[0017] 4. 本发明通过体内对肝纤维化, 肝炎和肝硬化模型进行例证。本发明所采用的的肝纤维, 肝炎和肝硬化模型, 被该领域的技术人员公认为用于模拟人类相关的肝纤维化, 病毒性肝炎, 酒精性肝炎, 药物性肝炎, 脂肪肝, 肝硬化等肝脏疾病的主要病理过程。此处的动物包括但是不限于: 小鼠, 大鼠, 驯养动物包括但是不限于猫, 狗, 以及其它一些动物例如但是不限于牛, 羊, 猪, 马, 灵长类动物例如但是不限于猴子和人。小鼠肝纤维化模型的体内检测是被广泛认可和接受的体内药物活性检测的模型, 同时也可以为其它生物例如人, 但是不仅限于人提供参考。

[0018] 下面的例子用以解释这项发明的具体细节, 但是不应被视作对这项发明的功能范围的限定。

[0019] 本发明所述的二吡啶甲烷和吡啶 -3- 甲醇及其衍生物在肝纤维化治疗中的应用:

[0020] 1. 使用硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) 的磷酸缓冲溶液于 ICR 小鼠腹腔注射, 建立 TAA 型肝纤维化模型。

[0021] 2. 将吡啶 -3- 甲醇和 3,3'- 二吡啶甲烷及其衍生物溶解到玉米油中, 在建立 TAA 型肝纤维化模型同时进行灌胃, 对肝纤维化进行治疗。

[0022] 3. TAA 与吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物每周给药 2 次, 给药 4 周后处死小鼠, 取出肝脏分别做羟脯氨酸测定以及谷丙转氨酶测定。

[0023] 本发明所述的二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物的水溶液注射制剂在肝纤维化模型治疗中的应用:

[0024] 1. 使用硫代乙酰胺 (thioacetamide, TAA) 的磷酸缓冲溶液于 ICR 小鼠腹腔注射, 建立 TAA 型肝纤维化模型。

[0025] 2. 将配制好的吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物的水溶液注射制剂在建立 TAA 型纤维化模型同时进行注射, 对肝纤维化进行治疗。

[0026] 3. TAA 与吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物每周给药 2 次, 给药 4

[0027] 周后处死小鼠, 取出肝脏分别做羟脯氨酸测定以及谷丙转氨酶测定。本发明所述的二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物在肝炎治疗中的应用:

[0028] 1. 使用四氯化碳 (CC14) 的植物油溶液于 ICR 小鼠腹腔注射, 建立 CC14 型急性中毒性肝炎模型。

[0029] 2. 将吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物溶解到玉米油中, 在建立 CC14 型急性中毒性肝炎模型同时进行灌胃, 对肝炎进行治疗。

[0030] 3. CC14 与吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物同时给药, 给药 24h 后处死小鼠, 取出血清做谷丙转氨酶测定以及谷草转氨酶测定。

[0031] 本发明所述的二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物的水溶液注射制剂在肝炎模型治疗中的应用:

[0032] 1. 使用 CC14 的植物油溶液于 ICR 小鼠腹腔注射, 建立 CC14 型急性中毒性肝炎模型。

[0033] 2. 将配制好的吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物的水溶液注射制剂, 在建立 CC14 型急性中毒性肝炎模型同时进行注射, 对肝炎进行治疗。

[0034] 3. CC14 与吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物同时给药, 给药 24h 后处死小鼠, 取出血清做谷丙转氨酶测定以及谷草转氨酶测定。

[0035] 本发明所述的二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物在肝硬化模型治疗中的应用:

[0036] 1. 使用 D-氨基半乳糖 (DGA) 的生理盐水溶液于 ICR 小鼠腹腔注射, 建立 DGA 型肝硬化模型。

[0037] 2. 将吡啶-3-甲醇和二吡啶甲烷及其衍生化合物溶解到玉米油中, 在建立 DGA 型肝硬化模型同时进行灌胃, 对肝硬化进行治疗。

[0038] 3. DGA 与吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物同时给药, 每周给药 6 次, 给药 6 个月后处死小鼠, 取出血清做谷丙转氨酶测定以及谷草转氨酶测定。

[0039] 本发明所述的二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物的水溶液注射制剂在肝硬化模型治疗中的应用:

[0040] 1. 使用 D-氨基半乳糖 (DGA) 的生理盐水溶液于 ICR 小鼠腹腔注射, 在建立 DGA 型肝硬化模型。

[0041] 2. 将配制好的吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物的水溶液注射

制剂,在建立 DGA 型肝硬化模型同时进行注射,对肝硬化进行治疗。

[0042] 3. DGA 与吡啶-3-甲醇和 3,3'-二吡啶甲烷及其衍生化合物同时给药,每周给药 6 次,给药 6 个月后处死小鼠,取出血清做谷丙转氨酶测定以及谷草转氨酶测定。

[0043] 本发明与现有技术相比,其有益效果是提供一种新的治疗肝纤维化的方法,通过给予 3,3'-二吡啶甲烷、其前体化合物吡啶-3-甲醇,以及它们的衍生化合物以及相关的水溶液注射制剂来保护机体免受自由基损伤,从而抑制和阻断肝纤维化的发作。同时,本发明所使用的小分子药物易于获取,价格低廉,性质稳定,便于保存和运输,可以制备成治疗肝纤维化,肝炎和肝硬化相关的肝脏疾病的药物。

#### 四、具体实施方式

[0044] 1. 3,3'-二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物的准备

[0045] 本发明所述的 3,3'-二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物的制备,采用已经公开的常规的合成策略,具体实验条件参考已公开的发明专利 (US00594880A, US007348352B2)。

[0046] 吡啶类衍生物(比如,5-甲氧基,5-氯,5-溴,5-氟,5'-甲基,5-硝基,N-甲基和 2-甲基吡啶)可以通过商业购买获得(南京锐马精细化工有限公司),被取代的吡啶-3-乙醛产物通过使用一种合适的醇比如甲醇以及硼氢化钠来还原醛基得到 I3C 的取代衍生物。通过冰盐浴将 2.9ml 二甲基甲酰胺冷却至 0°C,然后缓慢加入 0.86ml 磷酰氯(时间大于 30min)。将 8.6mmol 吡啶类衍生物溶解在 1.0ml 的二甲基甲酰胺,然后将其缓慢加入到前面已经冷却的磷酰氯溶液中(时间大于 10min),所形成的悬浮液,37°C 加热 60min-90min,直至澄清的黄色溶液变成微黄色的糊状物。然后向此糊状物中加入 1ml 的冰水,再缓慢加入 10ml 含有 3.75gKOH 的水溶液(时间大于 30min)。将此混合物加热至沸点后冷却。过滤得到吡啶-3-乙醛衍生物,水洗,空气中干燥。所得的产物用于准备 I3C 的衍生物。

[0047] 1.0g 吡啶-3-乙醛衍生物溶于 5.0ml 的甲醇,持续加入固体硼氢化钠,直至所有的醛基均被还原。然后向反应物中加入 50mlH<sub>2</sub>O,冷却至 0°C,过滤得到 I3C 衍生物,暗处真空干燥。

[0048] 1g I3C 衍生物加入到 pH5.5 磷酸盐缓冲液,室温搅拌 6h,整个反应过程通过薄层层析(TLC)加以检测。过滤得到 DIM 衍生物,真空干燥,放置于暗处(得率 80%-90%),得率经气相色谱,液相色谱以及薄层层析加以确认。

[0049] 2. 口服 3,3'-二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物对 TAA 导致的小鼠肝纤维化模型的治疗

[0050] 将 I3C、DIM、和其衍生化合物 5-氯吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C),5,5'-氯二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM),2-戊基吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C),2,2'-戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM),5-硝基吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C),5,5'-硝基二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM),N-甲氧基吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)及 N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)用玉米油溶解,配成 2.0mg/ml 储液备用。按照文献报道方法建立小鼠 TAA 型肝纤维化模型,即取雄性 ICR 小鼠,体重 16-18g,将小鼠随机分成 TAA 模型组、和 DIM 和 I3C 以及它们的衍生物 5-氯吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C),5,5'-氯二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM),2-戊基吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C),2,2'-戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM),5-硝基吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C),



5,5'-硝基二吲哚甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吲哚-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吲哚甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 的治疗组, 每组 10 只小鼠。每组小鼠腹腔注射 TAA 的磷酸缓冲液 (200mg/kg), 每周给药两次。建立模型当周开始治疗, I3C 治疗组、DIM 治疗组、5-甲氧基 DIM 治疗组按 20mg/kg 灌胃给药, TAA 模型组给相应量的玉米油, 每周给药两次。模型建立四周后处死, 取病变肝脏组织, 做羟脯氨酸测定和谷丙转氨酶测定。

[0051] (1) 肝脏羟脯氨酸测定

[0052] 取病变肝脏组织匀浆后取上清, 采用碱水解法测定羟脯氨酸含量。

[0053] (2) 肝脏谷丙转氨酶结果

[0054] 取小鼠血清, 测定谷丙转氨酶含量。

[0055] 肝纤维化时, 肝内主要增加的成分为胶原纤维, 羟脯氨酸为胶原纤维所特有, 为此肝羟脯氨酸的含量在一定程度上反应了肝纤维化的程度。由表 1 可以发现口服 I3C 和 DIM 及其衍生化合物可以有效缓解小鼠肝纤维化发作, 治疗组的羟脯氨酸值明显低于 TAA 模型组。谷丙转氨酶主要存在于肝细胞浆内, 其细胞内浓度高于血清中 1000-3000 倍, 当肝细胞坏死时, 血清中谷丙转氨酶含量会大幅上升, 而肝纤维化发展到后期肝细胞大量坏死, 所以也可以作为衡量肝纤维化的指标。由表 1 可见, 经过治疗, 治疗组的谷丙转氨酶值明显低于 TAA 模型组。由此可见, I3C 和 DIM 及其衍生化合物可以显著减少肝细胞坏死, 延缓肝纤维化发作, 减轻疾病损害。

[0056] 表 1 肝脏羟脯氨酸以及血清中谷丙转氨酶活力测定

[0057]

组别	羟脯氨酸 ( $\mu\text{g/g liver}$ )	谷丙转氨酶 (U/mg protein)
模型组	356 $\pm$ 43	372 $\pm$ 24
I3C	237 $\pm$ 11*	245 $\pm$ 32*
DIM	176 $\pm$ 21*	204 $\pm$ 37*
5-C1-I3C	220 $\pm$ 35*	250 $\pm$ 23*
5,5'-C1-DIM	177 $\pm$ 28*	182 $\pm$ 13*
2-C5-I3C	266 $\pm$ 44*	298 $\pm$ 37*
2,2'-C5-DIM	191 $\pm$ 30*	205 $\pm$ 27*
5-NO-I3C	217 $\pm$ 12*	220 $\pm$ 17*
5,5'-NO-DIM	146 $\pm$ 19*	162 $\pm$ 29*
N-MOE-I3C	189 $\pm$ 23*	200 $\pm$ 16*
N,N'-MOE-DIM	163 $\pm$ 19*	190 $\pm$ 21*

[0058] 数据均以平均值  $\pm$  标准差的形式加以显示, 显著性差异通过 ANOVA 检验加以确定。

[0059] \* 代表  $P \leq 0.05$

[0060] 3,3,3'-二吲哚甲烷和吲哚-3-甲醇及其衍生化合物的水溶液注射制剂对 TAA 导致的小鼠肝纤维化模型的治疗

[0061] 参考已公开的专利 (申请号:2008102435568) 将 I3C、DIM、和其衍生化合物 5-氯吲哚-3-甲醇 (5-C1-I3C), 5,5'-氯二吲哚甲烷 (5,5'-C1-DIM), 2-戊基吲哚-3-甲醇 (2-C5-I3C), 2,2'-戊基-二吲哚甲烷 (2,2'-C5-DIM), 5-硝基吲哚-3-甲醇 (5-NO-I3C), 5,5'-硝基二吲哚甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吲哚-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吲哚甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 用环糊精和生理盐水配制成 1.0mg/kg 的储液备用。按照文献报道方法建立小鼠 TAA 型肝纤维化模型, 即取雄性 ICR 小鼠, 体重 16-18g, 将小鼠随机

分成TAA模型组、和DIM和I3C以及它们的衍生物5-氯吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C),5,5'-氯二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM),2-戊基吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C),2,2'-戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM),5-硝基吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C),5,5'-硝基二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM),N-甲氧基吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)及N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)的治疗组,每组10只小鼠。每组小鼠腹腔注射TAA的磷酸缓冲液(200mg/kg),每周给药两次。按20mg/kg注射给DIM,TAA模型组给同等量的生理盐水,每周给药两次。模型建立四周后处死,取病变肝脏组织,做羟脯氨酸测定和谷丙转氨酶测定。羟脯氨酸测定和谷丙转氨酶测定见实施1。如表2所示,腹腔注射I3C和DIM及其衍生物的水溶液注射制剂同样可以减缓小鼠肝纤维化发作。

[0062] 表2 肝脏羟脯氨酸以及血清中谷丙转氨酶活力测定

[0063]

组别	羟脯氨酸 ( $\mu\text{g/g liver}$ )	谷丙转氨酶 (U/mg protein)
模型组	366 $\pm$ 33	384 $\pm$ 42
I3C	216 $\pm$ 12*	221 $\pm$ 22*
DIM	136 $\pm$ 24*	134 $\pm$ 27*
5-Cl-I3C	213 $\pm$ 24*	230 $\pm$ 31*
5,5'-Cl-DIM	167 $\pm$ 16*	172 $\pm$ 24*
2-C5-I3C	246 $\pm$ 42*	268 $\pm$ 28*
2,2'-C5-DIM	172 $\pm$ 33*	189 $\pm$ 17*
5-NO-I3C	205 $\pm$ 22*	200 $\pm$ 23*
5,5'-NO-DIM	136 $\pm$ 29*	142 $\pm$ 18*
N-MOE-I3C	169 $\pm$ 32*	187 $\pm$ 26*
N,N'-MOE-DIM	153 $\pm$ 25*	171 $\pm$ 11*

[0064]

[0065] 数据均以平均值 $\pm$ 标准差的形式加以显示,显著性差异通过ANOVA检验加以确定。

[0066] \*代表 $P \leq 0.05$

[0067] 上述实例用以解释这项发明的具体细节,但是不应被视作对这项发明的功能范围的限定。

[0068] 4. 口服3,3'-二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生物对 $\text{CCl}_4$ 导致的小鼠急性中毒性肝炎模型的治疗

[0069] 将I3C、DIM、和其衍生物5-氯吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C),5,5'-氯二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM),2-戊基吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C),2,2'-戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM),5-硝基吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C),5,5'-硝基二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM),N-甲氧基吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)及N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)用玉米油溶解,配成2.0mg/ml储液备用。按照文献报道方法建立小鼠 $\text{CCl}_4$ 型肝炎模型,即取雄性ICR小鼠,体重16-18g,将小鼠随机分组,即模型组、和DIM和I3C以及它们的衍生物5-氯吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C),5,5'-氯二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM),2-戊基吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C),2,2'-戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM),5-硝基吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C),5,5'-硝基二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM),N-甲氧基吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)及N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)的治疗组,每组10只小鼠。每组小鼠腹腔注射0.12% $\text{CCl}_4$ 的花生油溶液(10ml/kg)。建立模型的同时开始治疗,DIM和I3C以及它们的衍生物

5-氯吡啶-3-甲醇 (5-Cl-I3C), 5,5'-氯二吡啶甲烷 (5,5'-Cl-DIM), 2-戊基吡啶-3-甲醇 (2-C5-I3C), 2,2'-戊基-二吡啶甲烷 (2,2'-C5-DIM), 5-硝基吡啶-3-甲醇 (5-NO-I3C), 5,5'-硝基二吡啶甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吡啶-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 的治疗组按 20mg/kg 灌胃给药, CCl<sub>4</sub> 模型组给相应量的玉米油。模型建立 24h 后处死, 取小鼠血清, 测定谷丙转氨酶以及谷草转氨酶。

[0070] 谷丙转氨酶以及谷草转氨酶主要存在于肝细胞中, 其细胞内浓度高于血清中 1000-3000 倍, 当肝细胞坏死时, 血清中谷丙转氨酶以及谷草转氨酶含量会大幅上升。而 CCl<sub>4</sub> 诱导的小鼠急性中毒性肝炎模型中肝细胞大量坏死, 所以可以作为衡量肝炎严重程度的指标。由表 3 可见, 经过治疗, 治疗组的谷丙转氨酶以及谷草转氨酶值明显低于 CCl<sub>4</sub> 模型组。由此可见, I3C 和 DIM 及其衍生化合物可以显著减少肝细胞坏死, 缓解肝炎, 减轻疾病损害。

[0071] 表 3 血清中谷丙转氨酶以及谷草转氨酶活力测定

[0072]

组别	谷丙转氨酶 (U/mg protein)	谷草转氨酶(U/mg protein)
模型组	261±25	307±15
I3C	206±20*	211±25*
DIM	166±43*	174±38*
5-Cl-I3C	213±24*	230±31*
5,5'-Cl-DIM	157±26*	175±18*
2-C5-I3C	226±31*	238±34*
2,2'-C5-DIM	162±33*	179±27*
5-NO-I3C	195±28*	210±33*
5,5'-NO-DIM	156±19*	162±28*
N-MOE-I3C	177±12*	169±27*
N,N'-MOE-DIM	143±22*	181±22*

[0073] 数据均以平均值 ± 标准差的形式加以显示, 显著性差异通过 ANOVA 检验加以确定。

[0074] \* 代表  $P \leq 0.05$

[0075] 5,3,3'-二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物的水溶液注射制剂对 CCl<sub>4</sub> 导致的小鼠急性中毒性肝炎模型的治疗

[0076] 参考已公开的专利 (申请号: 2008102435568) 将 I3C、DIM、和其衍生化合物 5-氯吡啶-3-甲醇 (5-Cl-I3C), 5,5'-氯二吡啶甲烷 (5,5'-Cl-DIM), 2-戊基吡啶-3-甲醇 (2-C5-I3C), 2,2'-戊基-二吡啶甲烷 (2,2'-C5-DIM), 5-硝基吡啶-3-甲醇 (5-NO-I3C),

5,5'-硝基二吲哚甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吲哚-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吲哚甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 用环糊精和生理盐水配制成 1.0mg/kg 的储液备用。小鼠 CCl<sub>4</sub> 肝纤维化模型建立参照实施 4, 建模当日, 将小鼠随机分组, 即模型组、和 DIM 和 I3C 以及它们的衍生物 5-氯吲哚-3-甲醇 (5-Cl-I3C), 5,5'-氯二吲哚甲烷 (5,5'-Cl-DIM), 2-戊基吲哚-3-甲醇 (2-C5-I3C), 2,2'-戊基-二吲哚甲烷 (2,2'-C5-DIM), 5-硝基吲哚-3-甲醇 (5-NO-I3C), 5,5'-硝基二吲哚甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吲哚-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吲哚甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 的治疗组, 每组 10 只小鼠。建立模型的同时开始治疗, I3C、DIM、和其衍生物 5-氯吲哚-3-甲醇 (5-Cl-I3C), 5,5'-氯二吲哚甲烷 (5,5'-Cl-DIM), 2-戊基吲哚-3-甲醇 (2-C5-I3C), 2,2'-戊基-二吲哚甲烷 (2,2'-C5-DIM), 5-硝基吲哚-3-甲醇 (5-NO-I3C), 5,5'-硝基二吲哚甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吲哚-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吲哚甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 治疗组按按 20mg/kg 注射给 DIM, CCl<sub>4</sub> 模型组给相应量的生理盐水。模型建立 24h 后处死, 取小鼠血清, 测定谷丙转氨酶以及谷草转氨酶。谷丙转氨酶和谷草转氨酶测定见

[0077] 实施 4

[0078] 如表 3 所示, 腹腔注射 I3C 和 DIM 及其衍生物的水溶液注射制剂同样可以减轻小鼠肝炎发作程度。

[0079] 表 4 血清中谷丙转氨酶以及谷草转氨酶活力测定

[0080]

组别	谷丙转氨酶 (U/mg protein)	谷草转氨酶(U/mg protein)
模型组	267±22	397±19
I3C	196±25*	202±29*
DIM	155±23*	162±31*
5-Cl-I3C	187±14*	220±51*
5,5'-Cl-DIM	148±22*	179±26*
2-C5-I3C	216±23*	227±24*
2,2'-C5-DIM	167±13*	165±19*
5-NO-I3C	174±26*	203±23*
5,5'-NO-DIM	166±24*	152±18*
N-MOE-I3C	153±30*	149±17*
N,N'-MOE-DIM	133±26*	151±31*

[0081]

[0082] 数据均以平均值 ± 标准差的形式加以显示, 显著性差异通过 ANOVA 检验加以确

定。

[0083] \*代表  $P \leq 0.05$

[0084] 6. 3,3'-二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物对 DGA 导致的小鼠肝硬化模型的治疗

[0085] 将 I3C、DIM、和其衍生化合物 5-氯吡啶-3-甲醇 (5-Cl-I3C), 5,5'-氯二吡啶甲烷 (5,5'-Cl-DIM), 2-戊基吡啶-3-甲醇 (2-C5-I3C), 2,2'-戊基-二吡啶甲烷 (2,2'-C5-DIM), 5-硝基吡啶-3-甲醇 (5-NO-I3C), 5,5'-硝基二吡啶甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吡啶-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 用玉米油溶解, 配成 2.0mg/ml 储液备用。按照文献报道方法建立小鼠 DGA 型肝硬化模型, 即取雄性 ICR 小鼠体重 16-18g, 将小鼠随机分成组, 即模型组、和 DIM 和 I3C 以及它们的衍生物 5-氯吡啶-3-甲醇 (5-Cl-I3C), 5,5'-氯二吡啶甲烷 (5,5'-Cl-DIM), 2-戊基吡啶-3-甲醇 (2-C5-I3C), 2,2'-戊基-二吡啶甲烷 (2,2'-C5-DIM), 5-硝基吡啶-3-甲醇 (5-NO-I3C), 5,5'-硝基二吡啶甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吡啶-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 的治疗组, 每组 10 只小鼠。每组小鼠腹腔注射 10% DGA 的生理盐水溶液 (250mg/kg)。建立模型的同时开始治疗, I3C、DIM、和其衍生化合物 5-氯吡啶-3-甲醇 (5-Cl-I3C), 5,5'-氯二吡啶甲烷 (5,5'-Cl-DIM), 2-戊基吡啶-3-甲醇 (2-C5-I3C), 2,2'-戊基-二吡啶甲烷 (2,2'-C5-DIM), 5-硝基吡啶-3-甲醇 (5-NO-I3C), 5,5'-硝基二吡啶甲烷 (5,5'-NO-DIM), N-甲氧基吡啶-3-甲醇 (N-MOE-I3C) 及 N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷 (N,N'-MOE-DIM) 治疗组按 20mg/kg 灌胃给药, DGA 模型组给相应量的玉米油, 每周给药 6 次。模型建立 6 个月后处死, 取小鼠血清, 测定谷丙转氨酶以及谷草转氨酶。

[0086] 谷丙转氨酶以及谷草转氨酶主要存在于肝细胞中, 其细胞内浓度高于血清中 1000-3000 倍, 当肝细胞坏死时, 血清中谷丙转氨酶以及谷草转氨酶含量会大幅上升。而 DGA 进入体内后, 可造成肝内鸟苷三磷酸夺获, 糖原、RNA、糖蛋白合成障碍, 谷胱甘肽的耗竭, 肝巨噬细胞的激活, TNF- $\alpha$  的大量释放、导致肝脏细胞功能性和结构性损伤, 并诱发肝组织坏死和肝细胞凋亡, 所以谷丙转氨酶以及谷草转氨酶可以作为衡量肝硬化严重程度的指标。由表 5 可见, 经过治疗, 治疗组的谷丙转氨酶以及谷草转氨酶值明显低于 DGA 模型组。由此可见, I3C 和 DIM 及其衍生化合物可以显著减少肝细胞坏死, 延缓肝硬化发作, 减轻疾病损害。

[0087] 表 5 血清中谷丙转氨酶以及谷草转氨酶活力测定

[0088]

组别	谷丙转氨酶 (U/mg protein)	谷草转氨酶(U/mg protein)
模型组	274±42	274±35
I3C	132±25*	142±29*
DIM	116±29*	187±32*
5-Cl-I3C	157±24*	180±32*
5,5'-Cl-DIM	137±25*	159±28*
2-C5-I3C	186±32*	197±34*
2,2'-C5-DIM	147±23*	155±26*
5-NO-I3C	154±26*	163±13*
5,5'-NO-DIM	169±22*	153±28*
N-MOE-I3C	157±32*	159±27*
N,N'-MOE-DIM	143±16*	152±32*

[0089] 数据均以平均值 ± 标准差的形式加以显示,显著性差异通过 ANOVA 检验加以确定。

[0090] \*代表  $P \leq 0.05$

[0091] 7. 3,3'-二吡啶甲烷和吡啶-3-甲醇及其衍生化合物的水溶液注射制剂对 DGA 导致的小鼠肝硬化模型的治疗

[0092] 参考已公开的专利(申请号:2008102435568)将 I3C、DIM、和其衍生化合物 5-氯吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C),5,5'-氯二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM),2-戊基吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C),2,2'-戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM),5-硝基吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C),5,5'-硝基二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM),N-甲氧基吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)及N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)用环糊精和生理盐水配制成 1.0mg/kg 的储液备用。小鼠 DGA 肝硬化模型建立参照实施 6,建模当日,将小鼠随机分组,即模型组、和 DIM 和 I3C 以及它们的衍生物 5-氯吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C),5,5'-氯二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM),2-戊基吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C),2,2'-戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM),5-硝基吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C),5,5'-硝基二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM),N-甲氧基吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)及N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)的治疗组,每组 10 只小鼠。建立模型的同时开始治疗,DIM 和 I3C 以及它们的衍生物 5-氯吡啶-3-甲醇(5-Cl-I3C),5,5'-氯二吡啶甲烷(5,5'-Cl-DIM),2-戊基吡啶-3-甲醇(2-C5-I3C),2,2'-戊基-二吡啶甲烷(2,2'-C5-DIM),5-硝基吡啶-3-甲醇(5-NO-I3C),5,5'-硝基二吡啶甲烷(5,5'-NO-DIM),N-甲氧基吡啶-3-甲醇(N-MOE-I3C)及N,N'-甲氧基-二吡啶甲烷(N,N'-MOE-DIM)治疗组按 20mg/kg 注射给 DIM, DGA 模型组给相应量的生理盐水,每周给药 6 次。模型建立 6 个月后处死,取小鼠血清,测定谷丙转氨酶以及谷草转氨酶。谷丙转氨酶和谷草转氨酶测定

见实施 4

[0093] 如表 6 所示,腹腔注射 I3C 和 DIM 及其衍生物的水溶液注射制剂同样可以延缓小鼠肝硬化发作。

[0094] 表 6 血清中谷丙转氨酶以及谷草转氨酶活力测定

[0095]

组别	谷丙转氨酶 (U/mg protein)	谷草转氨酶(U/mg protein)
模型组	231±25	307±19
I3C	172±11*	145±22*
DIM	89±29*	171±25*
5-Cl-I3C	135±23*	153±22*
5,5'-Cl-DIM	112±15*	139±23*
2-C5-I3C	136±22*	157±14*
2,2'-C5-DIM	137±33*	165±36*
5-NO-I3C	164±36*	173±18*
5,5'-NO-DIM	167±23*	163±48*
N-MOE-I3C	150±12*	169±37*
N,N'-MOE-DIM	113±26*	122±25*

[0096]

[0097] 数据均以平均值 ± 标准差的形式加以显示,显著性差异通过 ANOVA 检验加以确定。

[0098] \* 代表  $P \leq 0.05$ 。