

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510089019.9

[51] Int. Cl.

C07J 9/00 (2006.01)

A61K 31/575 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/20 (2006.01)

A61K 9/48 (2006.01)

A61P 1/16 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年7月15日

[11] 授权公告号 CN 100513415C

[22] 申请日 2005.8.3

[21] 申请号 200510089019.9

[73] 专利权人 中国人民解放军军事医学科学院毒物药物研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路27号

[72] 发明人 仲伯华 李宏武 刘河 陈兰福 吴波

[56] 参考文献

WO03095471A2 2003.11.20

CN1142939C 2004.3.24

CN1420891A 2003.5.28

审查员 温国永

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 顾颂迺

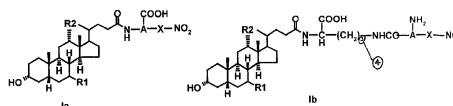
权利要求书2页 说明书19页

[54] 发明名称

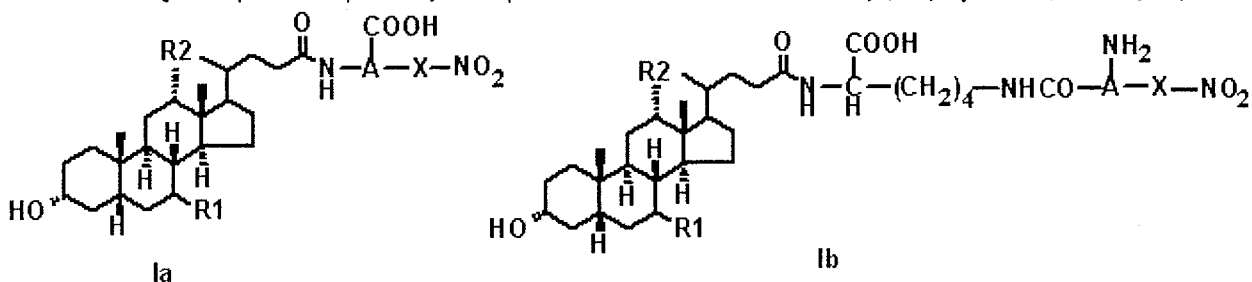
胆汁酸衍生物及其医药用途

[57] 摘要

本发明涉及式 Ia 和 Ib 所示的胆汁酸硝酸酯衍生物，其药学上可接受的盐，含有这些化合物作为活性成分的药物组合物，所述化合物的制备方法及其用于制备治疗肝炎等疾病的药物的用途，其中，R1 代表反式或顺式的 OH；R2 代表 H 或 OH；A 代表 L- 或 D- 型的丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸残基，顺式或反式的 3- 羟脯氨酸或 4- 羟脯氨酸残基；X 为氧或硫。



1、式 Ia 和 Ib 所示的胆汁酸硝酸酯衍生物或其药学上可接受的盐:



其中,

R1 代表反式或顺式的 OH;

R2 代表 H 或 OH;

A 代表 L-或 D-型的丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸残基, 顺式或反式的 3-羟脯氨酸或 4-羟脯氨酸残基;

X 为氧或硫。

2、根据权利要求 1 的胆汁酸硝酸酯衍生物或其药学上可接受的盐, 其中的胆汁酸为胆酸。

3、根据权利要求 1 的胆汁酸硝酸酯衍生物或其药学上可接受的盐, 其中的胆汁酸为熊去氧胆酸。

4、制备权利要求 1-3 任一项所述的胆汁酸硝酸酯衍生物或其药学上可接受的盐的方法, 其中式 Ia 化合物的制备方法包括:

将羧基未经保护的氨基酸分子中的羟基直接硝化制成硝酸酯, 游离的氨基再与胆酸或熊去氧胆酸分子中的羧基缩合。

5、制备权利要求 1-3 任一项所述的胆汁酸硝酸酯衍生物或其药学上可接受的盐的方法, 其中式 Ib 化合物的制备方法包括:

将胆酸或熊去氧胆酸分子中的羧基与末端氨基保护的赖氨酸分子中的 α -氨基缩合并脱保护, 制备胆酸-赖氨酸偶合物, 然后用 BOC

将 O-硝基化氨基酸的氨基保护，再与胆酸-赖氨酸偶合物分子中赖氨酸的末端氨基缩合，最后脱去保护基 BOC。

6. 含有作为活性成分的权利要求 1-3 任一项所述的胆汁酸硝酸酯衍生物或其药学上可接受的盐以及一种或多种药学上可接受的载体或赋型剂的药物组合物。

7. 权利要求 6 的药物组合物，其以溶液剂、片剂、胶囊或注射剂的形式存在。

8. 权利要求 1-3 任一项所述的胆汁酸硝酸酯衍生物或其药学上可接受的盐用于制备治疗肝炎、肝纤维化及肝硬化的肝脏疾病的药物的用途。

胆汁酸衍生物及其医药用途

技术领域

本发明涉及胆汁酸硝酸酯衍生物,其药学上可接受的盐,含有这些化合物作为活性成分的药物组合物,及所述化合物用于制备治疗肝炎等疾病的药物的用途。本发明还涉及胆汁酸硝酸酯衍生物及其药学上可接受盐的制备方法。

背景技术

病毒性肝炎、肝纤维化、肝硬化等肝脏疾病发病率高,治疗难度大。全球5亿多乙肝和丙肝患者中,25%将发展成为肝硬化;各种原因(酒精性、肥胖、糖尿病等)引起的脂肪肝的发展也会导致肝硬化。门静脉高压为硬化的主要并发症之一,患者会出现食管和胃底静脉曲张破裂出血、腹水等症状,是导致肝硬化病人死亡的重要原因。

肝脏疾病的发展是一个由量变到质变的过程。首先,肝脏受到病毒或炎症介质等多种致病因素的作用引起肝损伤,造成以胶原为主的细胞外基质各成分的合成增多,降解减少,沉积在肝内导致肝纤维化;随着肝损伤进一步的发展及胶原组织增生的加剧,凋亡及坏死的肝细胞数量增多,肝脏结构发生变化,导致肝细胞再生,假小叶形成,最终形成肝硬化;肝硬化形成后,出现肝内代谢及免疫等多种功能失常,常伴随出现门静脉高压及肝腹水等并发症,并可能会引起肝癌的发生。

肝纤维化是一切慢性肝病共同病理学基础,是硬化的必经阶段。通过合理的治疗,肝纤维化在进入肝硬化阶段之前尚有逆转的可能;因此,对肝纤维化的治疗非常重要。目前对肝纤维化的治疗主要使用 γ -干扰素(IFN- γ)、秋水仙碱、青霉胺等抑制胶原合成的抗纤维化药物,但其治疗效果并不理想。

由肝纤维化进入肝硬化阶段后,肝组织病变不断发展,坏死性病变

增加，肝组织结构发生改变，导致肝脏多种功能失常，并常会出现门静脉高压、肝腹水等并发症。目前对肝硬化的主要治疗方法是纠正其并发症，并通过增加肝脏对葡萄糖、维生素及氨基酸等营养物质的补充，维持肝脏的功能，防止病情进一步的恶化，对于病情严重的患者需要进行肝移植。现有药物对肝硬化及其并发症门静脉高压、腹水等无确切的疗效。

研究表明适量的一氧化氮能够保护肝细胞，防止肝细胞凋亡，抑制肝内炎症的形成与发展、修复肝损伤、并具有改善肝内血液循环、降低肝内压及改善肝纤维化等多种作用，对肝脏疾病发展的各个阶段均有治疗作用。

一氧化氮在肝内可抑制白细胞介素（IL-1，IL-6，IL-18，IL-1 β ）肿瘤坏死因子- α （TNF- α ）等多种前炎症因子的释放，具有抑制与炎症及细胞凋亡相关的 caspase 活性的作用。研究证明，一氧化氮能够改善多种因素所致的肝损伤，减少肝细胞的坏死，抑制肝内炎症的形成与发展，降低肝内转氨酶的浓度，从而可以防止肝病向纤维化方向发展。

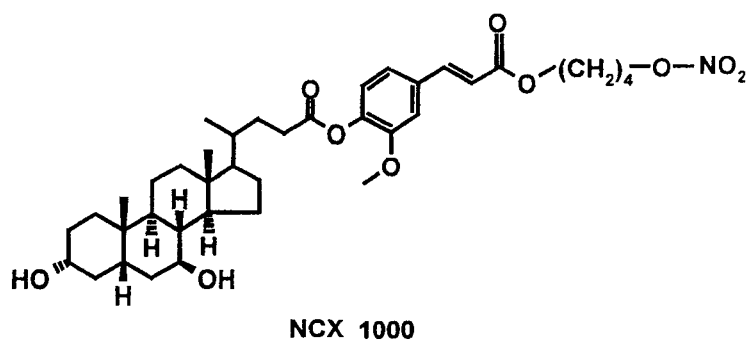
一氧化氮还能够抑制白细胞、血小板、嗜中性粒细胞的聚集及其对血管壁粘附，具有抑制肝内血栓形成及改善微循环等作用。同时一氧化氮能够舒张肝内的星形细胞，增加肝静脉窦处的血流；并可以扩张包括小动脉、小静脉在内的多种血管的管壁，减小血流阻力，从而保证或增加血液对肝脏的灌注，进而产生抗门静脉高压的作用。

研究表明，一氧化氮释放药物可通过释放一氧化氮分子抑制肝脏炎症的发展及肝纤维化的形成、降低门静脉高压，进而产生治疗肝硬化和门静脉高压的疗效。但是目前临床用于治疗肝硬化的有机硝酸酯类的一氧化氮释放药物，由于其体内分布的非特异性，从而产生比较广泛的全身副作用。通过肝靶向给药的途径能够减少或避免常规硝酸酯类药物的副作用。

胆汁酸是目前唯一口服有效的小分子肝靶向载体。胆汁酸在肝细胞中由胆固醇生物合成而来，然后与甘氨酸或牛磺酸结合，随食物糜进

入消化道，超过 95%的胆汁酸在终端回肠被重吸收，然后通过下腔静脉再回到肝脏，如此不断地进行肝肠循环；成人体内肝肠循环每天重复 6 至 15 次，参与循环的胆汁酸总量达到 17-40g，因此胆汁酸具有较高的转运能力；胆汁酸是通过主动转运的途径被吸收，以胆汁酸为靶向载体能够提高药物的生物利用度；作为内源性的天然配基，胆汁酸具有良好的生物兼容性，因而适合于作为靶向药物的载体。体内的胆汁酸由胆酸、熊去氧胆酸、鹅脱氧胆酸、脱氧胆酸及石胆酸组成，其中胆酸 (Cholic acid, CA) 与熊去氧胆酸 (Ursodeoxycholic acid, UDCA) 无其它类型胆汁酸的溶膜作用，体内安全性好，转运能力强，因而常被选择作为肝靶向药物载体。熊去氧胆酸本身还具有保肝利胆等广泛的药理作用，可降低谷丙转氨酶、谷草转氨酶、 γ -谷氨酰转肽酶 (γ -GT)，降低血脂，明显缓解脂肪肝症状，对慢性肝炎也有一定的治疗作用。因而，熊去氧胆酸不仅可作为药物载体，还可与药物产生协同作用。

国际专利 WO 03095471 公开了含有硝酸酯的熊去氧胆酸的偶合物；在这些偶合物的结构中，作为一氧化氮释放组分的硝酸酯是通过酯键与载体胆汁酸连接的。其代表性化合物 NCX1000 的结构如下：



研究表明，NCX1000 能够有效抑制白介素、肿瘤坏死因子等多种炎症因子，对各种原因引起的肝损伤及炎症、门静脉高压、肝硬化及肝纤维化均具有较好的治疗作用。

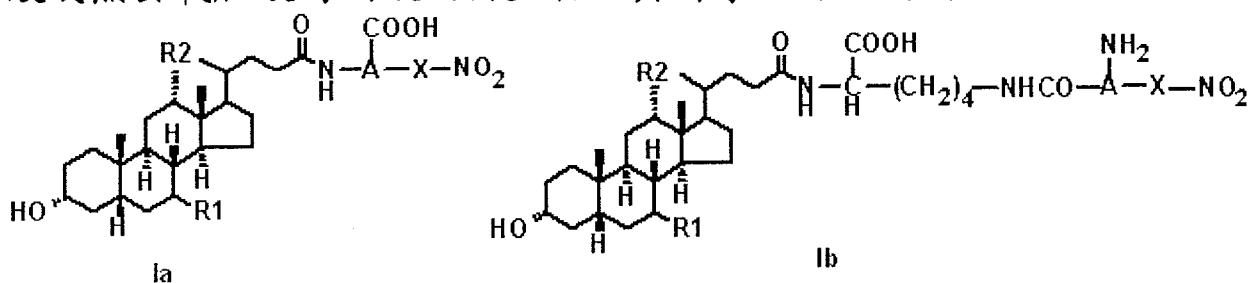
但是，在 NCX1000 的分子中，靶向载体通过两个酯键与硝酸酯成分偶联；由于酯键易水解，载体部分与活性部分解离而失去靶向作用。

药代动力学研究表明, 通过酯键偶联的硝酸酯类释放药物, 口服给药血液中检测不到完整的原性药物。

发明内容

本发明通过提供具有以下式 Ia 和 Ib 所示的胆酸或熊去氧胆酸的硝酸酯衍生物解决了现有技术中存在的因载体胆汁酸与药物之间的酯键易水解导致药物丧失靶向作用的缺点

因此, 本发明的一个方面涉及分别由结构式 Ia 和/或 Ib 所示的胆酸或熊去氧胆酸的硝酸酯衍生物及其药学上可接受的盐:



胆酸衍生物: $R_1 = \cdots\text{OH}$ $R_2 = \text{OH}$

熊去氧胆酸衍生物: $R_1 = \text{—OH}$ $R_2 = \text{H}$

其中,

A 代表 L-或 D-型的丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸残基, 顺式或反式的 3-羟脯氨酸或 4-羟脯氨酸残基;

X 为氧或硫。

本发明的另一方面涉及式 Ia 或 Ib 所示的胆酸或熊去氧胆酸的硝酸酯衍生物及其药学上可接受盐的制备方法。

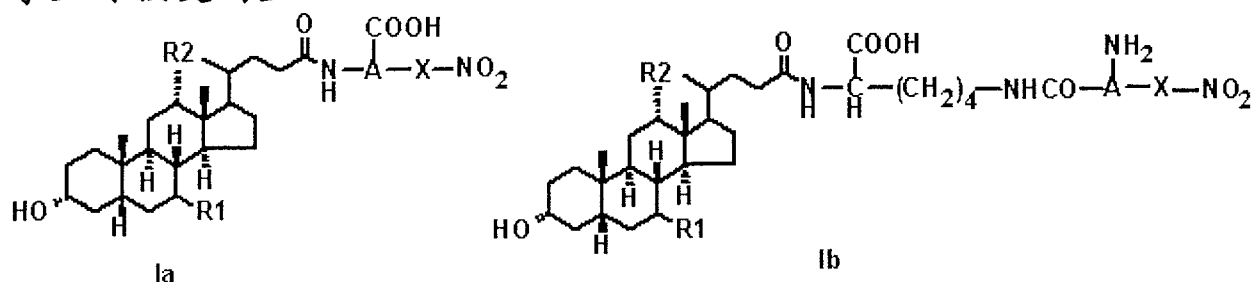
本发明的另一方面涉及含有式 Ia 和/或 Ib 所示的胆酸或熊去氧胆酸的硝酸酯衍生物及其药学上可接受盐作为活性成分以及一种或多种药学上可接受的载体或赋型剂的药物组合物。

本发明的另一方面涉及式 Ia 和/或 Ib 所示的胆酸或熊去氧胆酸的

硝酸酯衍生物及其药学上可接受的盐用于制备治疗肝炎、肝纤维化及肝硬化等肝脏疾病的药物的用途。

本发明的再一方面涉及治疗肝炎、肝纤维化及肝硬化等肝脏疾病的方法，所述方法包括给予有此需要的患者治疗有效量的式 Ia 和/或 Ib 所示的胆酸或熊去氧胆酸的硝酸酯衍生物及其药学上可接受的盐。

具体地，本发明涉及式 Ia 和 Ib 所示的胆汁酸硝酸酯衍生物及其药学上可接受的盐：



其中，

R1 代表反式或顺式的 OH；

R2 代表 H 或 OH；

A 代表 L-或 D-型的丝氨酸、苏氨酸或半胱氨酸残基，顺式或反式的 3-羟脯氨酸或 4-羟脯氨酸残基；

X 为氧或硫。

根据本发明，上述式 Ia 为胆酸或熊去氧胆酸 24-位羧基通过酰胺键与 O-硝基化或 S-硝基化的氨基酸的 α 氨基连接形成的偶合物；上述 Ib 为胆酸或熊去氧胆酸 24-位羧基通过赖氨酸与硝基化的氨基酸连接形成的偶合物，赖氨酸的引入可能更好的控制药物的释放速率。

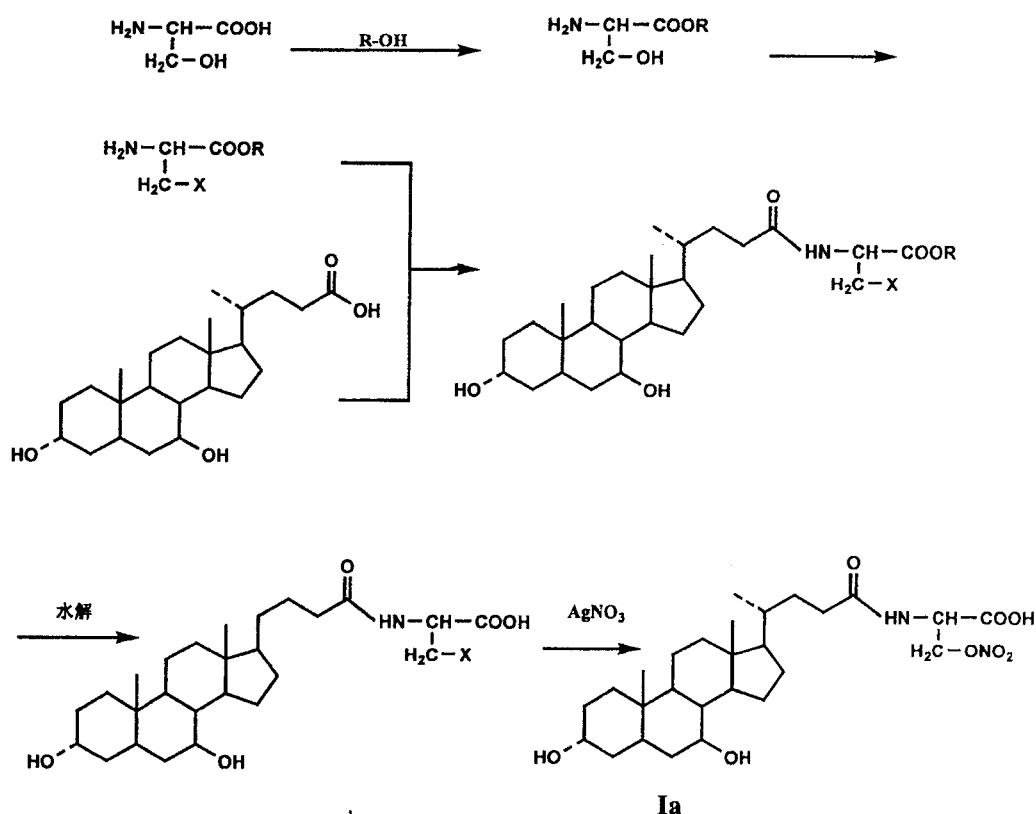
在 Ia 或 Ib 中，硝酸酯成分通过酰胺键连接于胆酸的载体上，保证了其在血浆中的稳定性；而进入肝细胞后，硝酸酯与细胞中的巯基组分形成不稳定的 S-亚硝基硫化物，进一步分解释放出 NO 分子，发挥药理作用。同时，以氨基酸的 α 羧基模拟胆酸或熊去氧胆酸分子 24 位的羧基的负电性，最大限度的保持了胆酸或熊去氧胆酸的结构特征，以保证其肝靶向性；连接子为天然氨基酸，具有良好的生物兼容性。

本发明还提供式 Ia 和 Ib 所示的胆酸或熊去氧胆酸的硝酸酯衍生物药学上可接受的盐，这些盐可以由 Ia 或 Ib 分子中的羧基与各种阳离子如钠离子、钾离子、氨离子、钙离子、锌离子、镁离子或氨离子等形成。

根据本发明，目标化合物 Ia 的合成路线主要有三条。

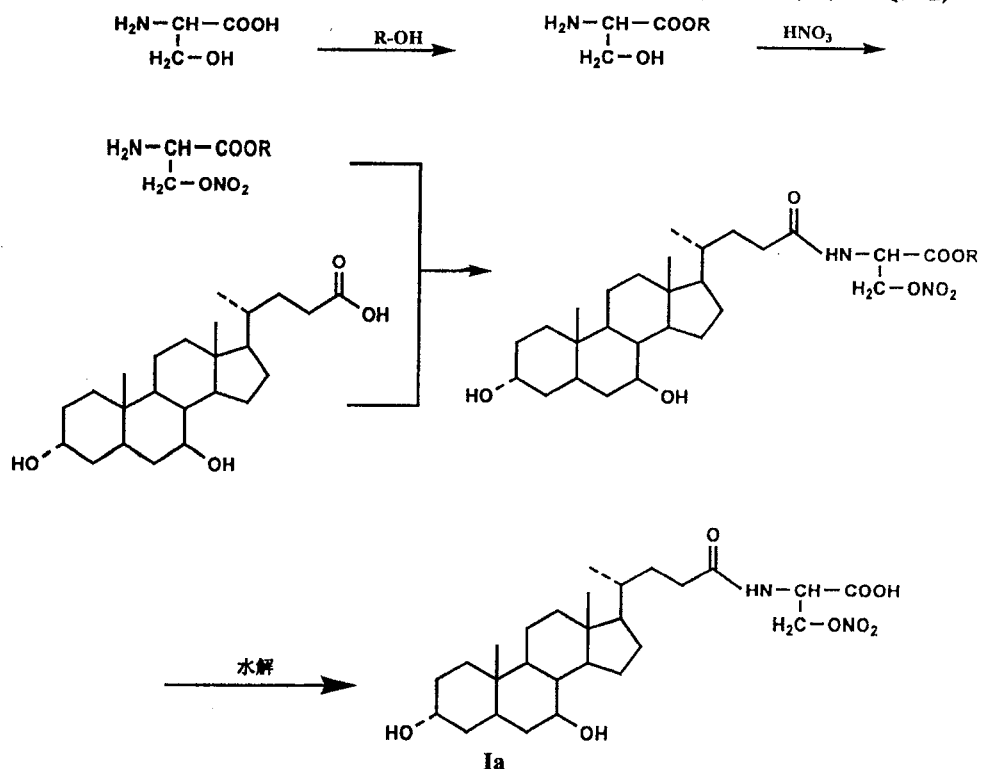
第一条合成路线为在氯化氢的醇溶液中，通过酯化先对氨基酸的羧基进行保护，羧基保护的氨基酸分子中的羟基与五氯化磷反应，制备卤代的氨基酸；在 DCC 等缩合剂的作用下，游离的氨基再与胆酸或熊去氧胆酸分子中的羧基缩合，将缩合产物皂化脱去保护基，最后与硝酸银反应，得到目标化合物。

以熊去氧胆酸 - O-硝基丝氨酸的偶合物为例，具体合成反应如下：



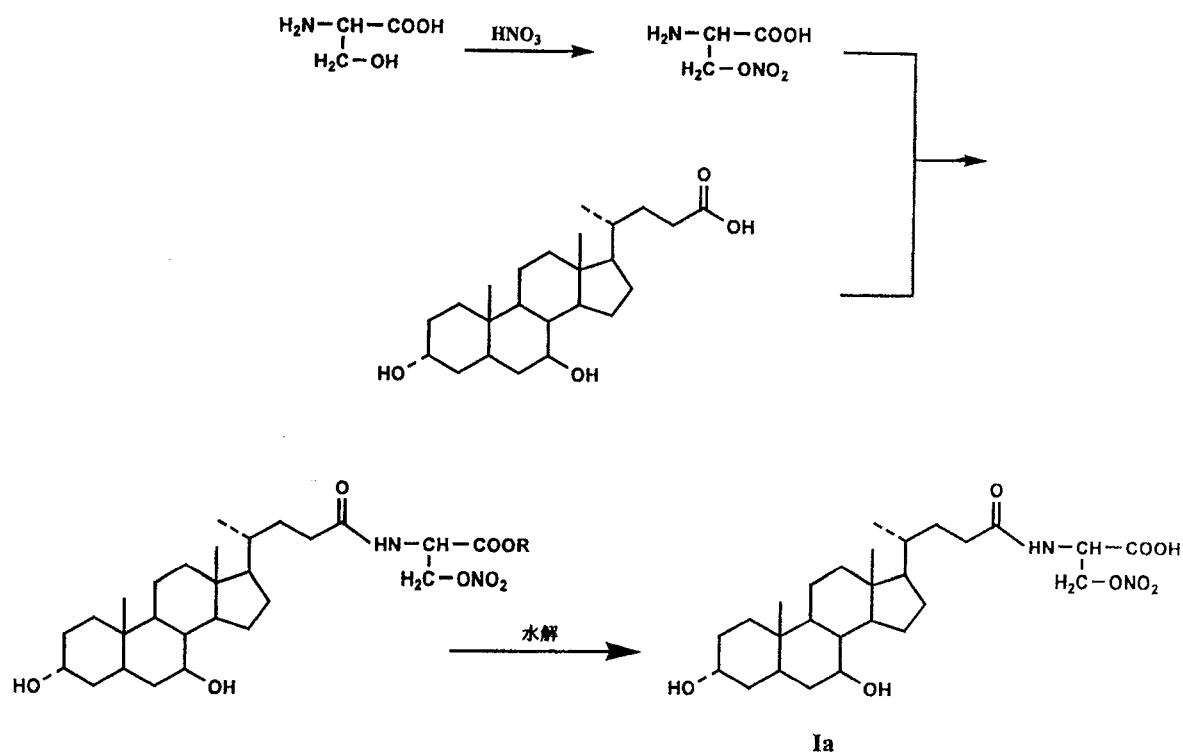
第二条合成路线为羧基酯化保护的氨基酸分子中的羟基与硝酸反应，制备硝酸酯；在 DCC 等缩合剂的作用下，游离的氨基再与胆酸或熊去氧胆酸分子中的羧基缩合，将缩合产物皂化脱去保护基，得到目标化合物。

以熊去氧胆酸-O-硝基丝氨酸的偶合物为例,具体合成反应如下:



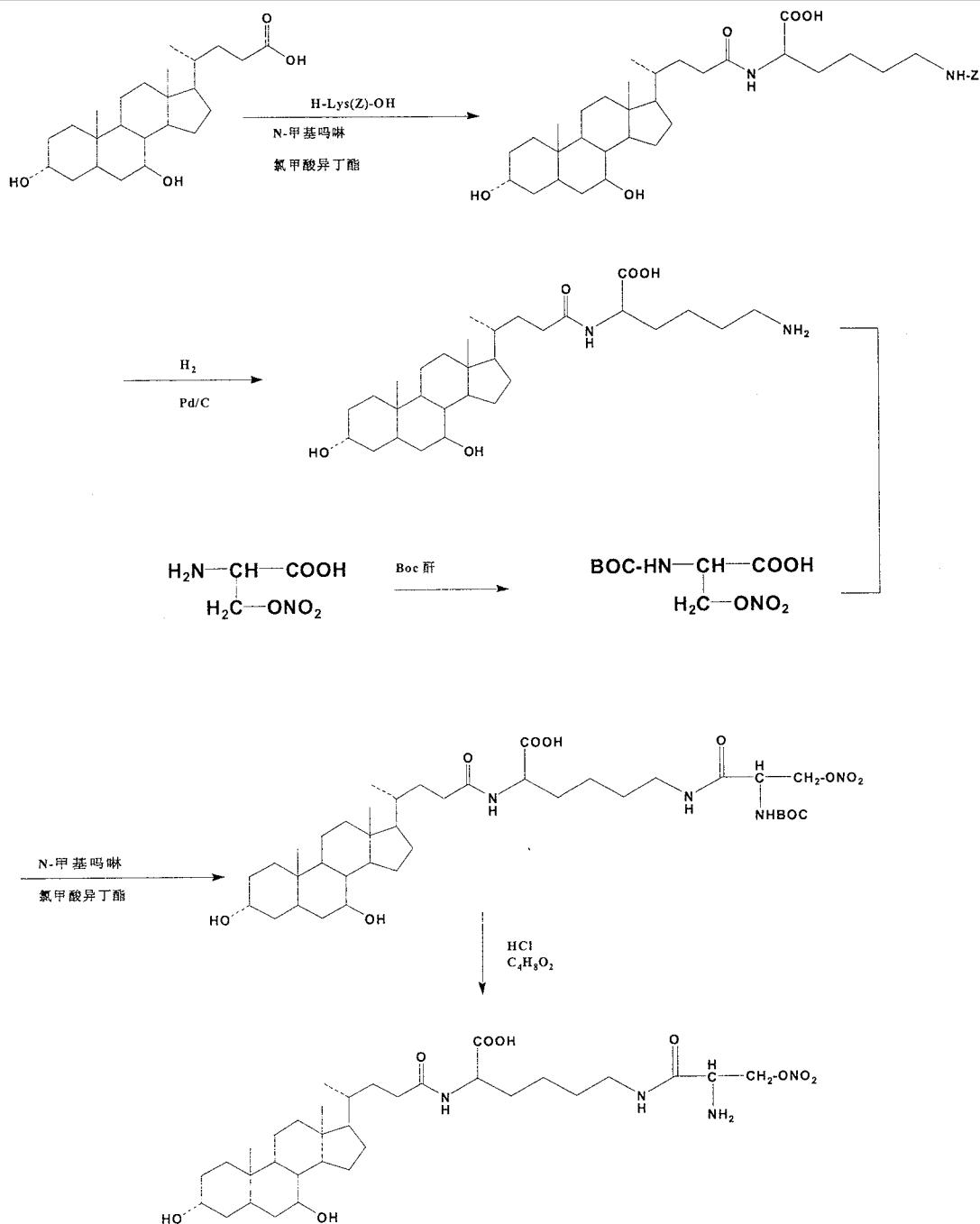
第三条合成路线为将羧基未经保护的氨基酸分子中的羟基直接硝化制成硝酸酯,游离的氨基再与胆酸或熊去氧胆酸分子中的羧基缩合,得到目标化合物。

仍以熊去氧胆酸-O-硝基丝氨酸的偶合物为例,具体合成反应如下:



根据本发明,目标化合物 Ib 的合成路线为先将胆酸或熊去氧胆酸分子中的羧基与末端氨基保护的赖氨酸分子中的 α -氨基缩合,脱保护,制备胆酸-赖氨酸偶合物。用 BOC 将 O-硝基化氨基酸的氨基保护,再与胆酸-赖氨酸偶合物分子中赖氨酸的末端氨基缩合,最后将保护基 BOC 脱去,得到目标分子。

以 N^α -熊去氧胆酰-[N^ω -(3-O-硝基-L-丝氨酰基)-赖氨酸]为例,具体合成反应如下:



Ib

本发明中的术语“药学上可接受的盐”可以是药用无机或有机盐。本发明式Ia和式Ib中具有碱性基团的化合物可以与无机酸形成药用盐，例如硫酸盐、盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐；也可与有机酸形成药用盐，例如乙酸盐、草酸盐、柠檬酸盐、葡萄糖酸盐、琥珀酸盐、酒石酸盐、对甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、苯甲酸盐、乳酸盐、马来酸盐等。本发明式Ia和式Ib中具有酸性基团的化合物可以与碱金属或碱土金属形成药用盐，优选但不限于钠盐、钾盐、镁盐或钙盐。

本发明化合物可以单独或以药物组合物的形式给药。给药途径可以是口服、非肠道或局部给药，优选口服和注射形式给药。药物组合物可根据给药途径配成各种适宜的剂型。

当口服用药时，本发明化合物可制成任意口服可接受的制剂形式，包括但不限于片剂、胶囊、水溶液或水悬浮液。其中，片剂使用的载体一般包括乳糖和玉米淀粉，另外也可加入润滑剂如硬脂酸镁。胶囊制剂使用的稀释剂一般包括乳糖和干燥玉米淀粉。水悬浮液制剂则通常是将活性成分与适宜的乳化剂和悬浮剂混合使用。任选地，以上口服制剂形式中还可加入一些甜味剂、芳香剂或着色剂。

当皮肤局部施用，本发明化合物可制成适当的软膏、洗剂或霜剂制剂形式，其中将活性成分悬浮或溶解于一种或多种载体中。软膏制剂可使用的载体包括但不限于：矿物油、液体凡士林、白凡士林、丙二醇、聚氧化乙烯、聚氧化丙烯、乳化蜡和水；洗剂或霜剂可使用的载体包括但不限于：矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、吐温60、十六烷酯蜡、十六碳烯芳醇、2-辛基十二烷醇、苜醇和水。

本发明化合物还可以无菌注射制剂形式用药，包括无菌注射水或油悬浮液或无菌注射溶液。其中，可使用的载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外，灭菌的非挥发油也可用作溶剂或悬浮介质，如单甘油酯或二甘油酯。

另外需要指出，本发明化合物使用剂量和使用方法取决于诸多因素，包括患者的年龄、体重、性别、自然健康状况、营养状况、化合物的活性强度、服用时间、代谢速率、病症的严重程度以及诊治医师的主观判断。优选的使用剂量介于0.01-100mg/kg体重/天。

具体实施方式

通过下面的实施例可以对本发明进行进一步的描述，然而，本发明的范围并不限于下述实施例。本领域的专业人员能够理解，在不背离本发明的精神和范围的前提下，可以对本发明进行各种变化和修饰。

本发明所用的所有起始原料均市售可得。

实施例 1. N^{α} -熊去氧胆酰-(3-O-硝基-L-丝氨酸)(Ia-1)的制备

1.1 3-O-硝基-L-丝氨酸硝酸盐的合成

取发烟硝酸 25 毫升投入三口瓶中, 冰盐浴冷却至 -10°C ; 将 5 克丝氨酸分批加入至反应液中, 控制反应液温度低于 0°C , 搅拌下反应 30 分钟。反应毕, 将反应液滴入到 100 毫升乙醚中, 析出沉淀, 滤取沉淀, 乙醚充分洗涤, 干燥后得 7.9 克白色固体, 熔点: $85-88^{\circ}\text{C}$, 收率 78%。IR (film, cm^{-1}): 3398, 3005, 1648, 1570, 1384, 1285, 985, 845, 757, 643. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 8.53 (br s, 3H); 4.98 (q, 1H); 4.85 (q, 1H); 4.50 (br s, 1H)。MS (FAB m/e): 211.9 ($\text{M}+\text{HNO}_3-1$), 299.1 (2M-1)。

1.2 N^{α} -熊去氧胆酰-(3-O-硝基-L-丝氨酸)(Ia-1)的合成

将 1.9 克 (8.9 毫摩尔) 3-O-硝基-L-丝氨酸硝酸盐在冰浴下溶解于 17.8 毫升 1N 氢氧化钠溶液中, 并将混合液冷却至 0°C 。取熊去氧胆酸 3.5 克 (8.9 毫摩尔) 溶解于 45 毫升四氢呋喃中, 在冰盐浴下冷却至 -15°C ; 依次加入 1.06 毫升 N-甲基吗啡啉、1.29 毫升氯甲酸异丁酯, 在冰盐浴下反应 8-10 分钟。将丝氨酸硝酸酯混合液加入到反应液中, 冰浴下搅拌 1.5 小时。反应毕, 用 5% 的柠檬酸调节 PH 值至 3-4, 用乙酸乙酯提取 3 次, 合并乙酸乙酯层, 依次用 5% 柠檬酸、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥过夜。过滤, 减压除去溶剂, 柱层析分离 (石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇=4: 4: 1), 得白色固体 3.8 克, 熔点: $130-134^{\circ}\text{C}$, 收率 81%。TLC: $R_f = 0.4-0.5$, 石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 冰醋酸=4: 4: 1: 2. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 12.09 (br m, 1H); 8.08 (br s, 1H); 5.58 (m, 1H); 4.57 (m, 2H); 2.24 (br m, 2H); 1.99 (s, 3H); 1.95-0.84 (br m, 甾环 CH_2 和 CH); 0.89 (d, 3H, $J=8.1\text{Hz}$); 0.61 (s, 3H)。MS (FAB m/e): 523.6 (M-1) 1047.9 (2M-1)。

实施例 2. N^{α} -熊去氧胆酰-(3-O-硝基-D-丝氨酸)(Ia-2)的制备

以 D-丝氨酸代替 L-丝氨酸, 参照实施例 1.1 的方法, 得到 3-O-硝基-D-丝氨酸硝酸盐, 收率: 72%, 熔点: $87-91^{\circ}\text{C}$ 。 $^1\text{H-NMR}$ (DMSO-d_6): 8.49 (br

s, 3H) 5.01 (br m, 2H) 4.68 (br m, 1H)。MS (FAB m/e): 151.1 (M+1) 301.0.1 (2M+1)。

用 3-O-硝基-D-丝氨酸硝酸盐代替 3-O-硝基-L-丝氨酸硝酸盐, 参照实施例 1.2 的方法得到目标化合物 Ia-2。收率: 74%, 熔点: 133-136°C。¹H-NMR (DMSO-d₆): 13.16 (br m, 1H); 8.38 (d, 1H, J=7.0Hz); 4.84 (m, 1H); 4.68 (m, 2H); 2.16 (br m, 2H); 1.99 (s, 3H); 1.95-0.84 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 0.89 (d, 3H, J = 8.1Hz); 0.61 (s, 3H)。

实施例 3. N^α-胆酰-(3-O-硝基-L-丝氨酸) (Ia-3) 的制备

以胆酸代替熊去氧胆酸, 参照实施例 1.2 的方法, 得到目标化合物 Ia-3。收率: 71%, 熔点: 133-136°C。¹H-NMR (DMSO-d₆): 13.11 (br m, 1H); 8.38 (d, 1H, J=7.2Hz); 4.81 (brd, 1H); 4.69 (m, 2H); 3.78 (s, 1H); 3.61 (s, 1H); 3.39 (q, 2H); 3.18 (br m, 1H); 2.23-1.07 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 0.93 (d, 3H, J=5.9Hz); 0.81 (s, 3H); 0.58 (s, 3H)。

实施例 4. N^α-胆酰-(3-O-硝基-D-丝氨酸) (Ia-4) 的制备

以 D-丝氨酸代替 L-丝氨酸, 胆酸代替熊去氧胆酸, 参照实施例 1 的方法, 得到目标化合物 Ia-4。收率: 79%, 熔点: 134-136°C。MS (FAB m/e): 542.7 (M-1)。¹H-NMR (DMSO-d₆): 13.19 (br m, 1H); 8.39 (d, 1H, J=7.6Hz); 4.84 (m, 1H); 4.68 (m, 2H); 3.78 (s, 1H); 3.62 (s, 1H); 3.39 (q, 2H); 3.19 (br m, 1H); 2.23-1.08 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 0.94 (d, 3H, J=6.4Hz); 0.81 (s, 3H); 0.58 (s, 3H)。

实施例 5. N^α-熊去氧胆酰-(3-O-硝基-L-苏氨酸) (Ia-5) 的制备

以 L-苏氨酸代替 L-丝氨酸, 参照实施例 1.1 的方法, 得到 3-O-硝基-L-苏氨酸硝酸盐, 收率: 81%, 熔点: 125-127 °C。¹H-NMR (DMSO-d₆): 8.91 (br s, 3H) 5.59 (m, 1H,) 4.33 (br s, 1H,) 1.46 (d, 1H, J=6.7)。

用 3-O-硝基-L-苏氨酸硝酸盐代替 3-O-硝基-L-丝氨酸硝酸盐, 参

照实施例 1.2 的方法得到目标化合物 Ia-5。收率：83%，熔点：138-142°C。¹H-NMR (DMSO-d₆): 13.16 (br m, 1H); 8.38 (d, 1H, J=9.0Hz); 5.59 (br m, 1H, J=3.9 和 6.7Hz); 4.74 (dd, 1H, J=9.0 和 3.9Hz); 4.02 (q, 2H); 2.21 (br m, 2H); 1.99 (s, 3H); 1.95-0.82 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 1.27 (d, 3H, J=6.7Hz); 0.89 (d, 3H, J=6.7Hz); 0.61 (s, 3H)。

实施例 6. N^α-熊去氧胆酰-(3-O-硝基-D-苏氨酸) (Ia-6) 的制备

以 D-苏氨酸代替 L-丝氨酸, 参照实施例 1.1 的方法, 得到 3-O-硝基-D-苏氨酸硝酸盐, 收率: 71%, 熔点: 126-128°C。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 8.89 (br s, 3H) 5.56 (m, 1H,) 4.31 (br s, 1H,) 1.42 (d, 1H, J=6.7)。

用 3-O-硝基-D-苏氨酸硝酸盐代替 3-O-硝基-L-丝氨酸硝酸盐, 参照实施例 1.2 的方法得到目标化合物 Ia-6。收率: 85%, 熔点: 135-139°C。¹H-NMR (DMSO-d₆): 13.16 (br m, 1H); 8.37 (d, 1H, J=9.0Hz); 5.60 (br m, 1H, J=3.9 和 6.4Hz); 4.78 (dd, 1H, J=9.0 和 3.9Hz); 4.02 (q, 1H); 2.21 (br s, 2H); 1.99 (s, 3H); 1.95-0.84 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 1.28 (d, 3H, J=6.4Hz); 0.89 (d, 3H, J=6.4Hz); 0.60 (s, 3H)。

实施例 7. N^α-胆酰-(3-O-硝基-L-苏氨酸) (Ia-7) 的制备

以胆酸代替熊去氧胆酸, 3-O-硝基-L-苏氨酸硝酸盐代替 3-O-硝基-L-丝氨酸硝酸盐, 参照实施例 1.2 的方法得到目标化合物 Ia-7。收率: 75%, 熔点: 140-142°C。¹H-NMR (DMSO-d₆): 13.17 (br m, 1H); 8.41 (d, 1H, J=9.0Hz); 5.60 (br m, 1H); 4.76 (dd, 1H, J=9.0 和 3.9Hz); 4.34 (br s, 1H); 4.12 (br s, 1H); 4.04 (br s, 1H); 3.79 (br s, 1H); 3.61 (br s, 1H); 3.39 (q, 2H); 3.18 (br m, 1H); 2.26-1.11 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 0.95 (d, 3H, J=6.2Hz); 0.81 (s, 3H) 0.58 (s, 3H)。

实施例 8. N^α-胆酰-(3-O-硝基-D-苏氨酸) (Ia-8) 的制备

以胆酸代替熊去氧胆酸, 3-O-硝基-D-苏氨酸硝酸盐代替 3-O-硝

基-L-丝氨酸硝酸盐, 参照实施例 1.2 的方法, 得到目标化合物 Ia-8。收率: 81%, 熔点: 139-143°C。¹H-NMR (DMSO-d₆): 13.09 (br m, 1H); 8.34 (d, 1H, J=9.0 Hz); 5.56 (br m, 1H); 4.74 (dd, 1H, J=9.0 和 3.9 Hz); 4.26 (br s, 1H); 4.04 (br s, 1H); 3.94 (br s, 1H); 3.75 (br s, 1H); 3.57 (br s, 1H); 3.35 (q, 2H); 3.14 (br m, 1H); 2.16-1.05 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 0.91 (d, 3H, J=6.1 Hz); 0.77 (s, 3H); 0.53 (s, 3H)。

实施例 9. N^α-熊去氧胆酰-(反式-4-O-硝基-羟基-L-脯氨酸) (Ia-9) 的制备

以反式-4-羟基-L-脯氨酸代替 L-丝氨酸, 参照实施例 1.1 的方法, 得到反式-4-O-硝基-羟基-L-脯氨酸硝酸盐。收率: 76%, 熔点: 129-131°C。

用反式-4-O-硝基-羟基-L-脯氨酸硝酸盐代替 3-O-硝基-L-丝氨酸硝酸盐, 参照实施例 1.2 的方法得到目标化合物 Ia-9。收率: 77%, 熔点: 133-136°C。¹H-NMR (DMSO-d₆): 12.69 (br m, 1H); 5.65 (s, 1H); 5.57 (br s, 0.5H); 4.65 (t, 0.5H); 4.46 (t, 1H); 4.04 (q, 1H); 3.93 (br m, 4H); 2.36 (br m, 1H); 2.26 (br m, 1H); 2.15 (br m, 1H); 1.99 (s, 3H); 1.95-0.84 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 0.90 (d, 3H, J=6.4 Hz); 0.62 (s, 3H)。

实施例 10. N^α-胆酰-(反式-4-O-硝基-羟基-L-脯氨酸) (Ia-10) 的制备

用胆酸代替熊去氧胆酸, 反式-4-O-硝基-羟基-L-脯氨酸硝酸盐代替 3-O-硝基-L-丝氨酸硝酸盐, 参照实施例 1.2 的方法得到目标化合物 Ia-10。收率: 83%, 熔点: 131-134°C。¹H-NMR (DMSO-d₆) δ: 12.83 (br m, 1H); 5.65 (s, 1H); 5.57 (br s, 0.5H); 4.64 (t, 0.5H); 4.24 (t, 1H); 4.11 (br s, 1H); 4.03 (q, 1H); 3.93 (br m, 2H); 3.79 (br s, 1H); 3.39 (q, 1H); 3.21 (br m, 1H); 2.65-0.81 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 0.95 (d, 3H, J=6.2 Hz); 0.81 (s, 3H); 0.59 (s, 3H)。

实施例 11. N^α-熊去氧胆酰-[N^ω-(3-O-硝基-L-丝氨酸基)-赖氨酸](Ib-1) 的制备

11.1 N^α-叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-丝氨酸的合成

取 5.8 克 (22.6 毫摩尔, 1.2 倍量) BOC 酸酐溶解于 20 毫升的二氧六环中, 制成 BOC 溶液。将 44 毫升 1N 的氢氧化钠与 20 毫升二氧六环的混合溶液用冰浴冷却至 0℃, 加入 4.7 克 (22.1 毫摩尔) 3-O-硝基-L-丝氨酸; 冰浴下交替加入 BOC 酸酐溶液与 22 毫升 1N 氢氧化钠溶液, 冰浴下搅拌 1 小时。反应毕, 将反应液加至 100 毫升冰水中, 用 30 毫升乙醚提取三次, 水层中加入 50 毫升乙酸乙酯, 搅拌下以 5% 柠檬酸酸化 PH 值至 3, 分出乙酸乙酯层, 水层用 50 毫升乙酸乙酯提取二次; 合并乙酸乙酯层, 饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥, 减压除去溶剂, 得无色粘稠液体 4.8 克。收率 87%。TLC: R_f=0.7, 展开剂=石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 冰醋酸=4: 4: 1: 0.03。

11.2 N^α-熊去氧胆酰-(N^ω-苄氧羰基赖氨酸) 的合成

将 11.8 克 (42.1 毫摩尔) N^ω-苄氧羰基赖氨酸溶于 160 毫升 1N 氢氧化钠溶液中, 并将混合液冷却至 0℃。取熊去氧胆酸 15 克 (38.2 毫摩尔) 溶解于 110 毫升四氢呋喃中, 在冰盐浴下冷却至 -15℃; 依次加入 4.20 毫升 N-甲基吗啡啉、5.02 毫升氯甲酸异丁酯, 在冰盐浴下反应 8-10 分钟。将 N^ω-苄氧羰基赖氨酸的溶液加入到反应液中, 冰浴下搅拌 1.5 小时, 除去冰浴, 在室温下搅拌 2 小时。反应毕, 以 5% 的柠檬酸酸化 PH 值至 3, 用乙酸乙酯提取 3 次, 合并乙酸乙酯层, 依次用 5% 柠檬酸、饱和食盐水洗涤, 无水硫酸镁干燥。减压除去溶剂, 柱层析分离 (展开剂=石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇=4: 4: 0.3), 得白色固体 18.1 克, 收率 91%。TLC: R_f=0.3-0.4, 展开剂=石油醚: 乙酸乙酯: 甲醇: 冰醋酸=4: 4: 1: 2。

11.3 2.2.3 N^α-熊去氧胆酰-赖氨酸的合成

取 N^α-熊去氧胆酰-(N^ω-苄氧羰基赖氨酸) 4.1 克 (6.26 毫摩尔)

溶于 40 毫升甲醇，加入 1 克 10%Pd-C，室温下通入氢气，搅拌下反应 36 小时。反应毕，将反应液过滤，回收催化剂；滤液减压除去溶剂，得白色固体 3.3 克，熔点：215-220°C，收率 99%。

11.4 N^α-熊去氧胆酰-[N^ω-(N^α-叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-丝氨酸酰基)-赖氨酸] 的合成

将 2.4 克 (4.6 毫摩尔) N^α-熊去氧胆酰-赖氨酸溶于含 4.6 毫摩尔氢氧化钠的 25 毫升水溶液中，并将混合液冷却至 5°C。取 2.1 克 (8.4 毫摩尔) N^α-叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-丝氨酸溶解于 40 毫升四氢呋喃中，在冰盐浴下冷却至 -15°C；依次加入 0.92 毫升 (8.4 毫摩尔) N-甲基吗啡啉、1.10 毫升 (8.4 毫摩尔) 氯甲酸异丁酯，在冰盐浴下反应 8-10 分钟。将 N^α-熊去氧胆酰-赖氨酸溶液加入到反应液中，冰浴下搅拌 1.5 小时。反应毕，以 5%的柠檬酸酸化至 PH 3，用乙酸乙酯提取 3 次，合并乙酸乙酯层，依次用 5%柠檬酸、饱和食盐水洗涤，无水硫酸镁干燥。减压除去溶剂，柱层析分离 (石油醚：乙酸乙酯：甲醇=4：4：1)，得白色固体 2.53 克，产物 144-151°C 分解，收率 73%。TLC: R_f=0.7-0.8，展开剂=石油醚：乙酸乙酯：甲醇：冰醋酸=4：4：1：2。

11.5 N^α-熊去氧胆酰-[N^ω-(3-O-硝基-L-丝氨酸酰基)-赖氨酸] (Ib-1) 的制备

取 0.5 克 (0.66 毫摩尔) N^α-熊去氧胆酰-[N^ω-(N^α-叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-丝氨酸酰基)-赖氨酸]溶于 25 毫升二氧六环中，室温下加入干燥 4N 盐酸二氧六环 10 毫升，搅拌下反应 30 分钟，滤取沉淀，乙醚充分洗涤，充分干燥，得白色固体 0.53 克，熔点：162-167°C，收率 77%。TLC: R_f = 0.5，展开剂：异丙醇：甲醇：氨水=8：2：0.1。
¹H-NMR (DMSO-d₆): 7.46 (br s, 1H) 4.12 (br m, 2H) 3.90 (m, 1H) 3.72 (m, 1H) 3.71 (br s, 1H) 3.65 (br m, 2H) 1.83-0.25 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH)。

实施例 12. N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(3-O-硝基-L-苏氨酸酰基)-赖氨酸](Ib-2) 的制备

以 3-O-硝基-L-苏氨酸代替 3-O-硝基-L-丝氨酸, 参照实施例 11.1 的方法, 得到 N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-苏氨酸。

用 N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-苏氨酸代替 N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-丝氨酸, 参照实施例 11.4 的方法, 得到 N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-苏氨酸酰基)-赖氨酸]。

用 N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-苏氨酸酰基)-赖氨酸]代替 N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-丝氨酸酰基)-赖氨酸], 参照实施例 11.5 的方法, 得到 N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(3-O-硝基-L-苏氨酸酰基)-赖氨酸](Ib-2), 熔点: 172-178 °C。MS (FABm/e): 667.6 (M+1); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): 8.13 (d, 1H, J=5.9Hz); 7.20 (br d, 1H); 5.32 (m, 2H); 4.42 (d, 1H, J=3.9Hz); 3.87 (d, 1H, J=6.7); 3.71 (br s, 1H); 3.03 (br m, 2H); 2.02-0.84 (br m, 甾环 CH_2 和 CH); 1.24 (s, 3H); 0.89 (d, 3H, J=7.6Hz); 0.61 (s, 3H)。

实施例 13. N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(3-O-硝基羟脯氨酸酰基)-赖氨酸](Ib-3) 的合成

以 3-O-硝基-羟脯氨酸代替 3-O-硝基-L-丝氨酸, 参照实施例 11.1 的方法, 得到 N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-羟脯氨酸。

用 N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-羟脯氨酸代替 N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-丝氨酸, 参照实施例 11.4 的方法, 得到 N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-羟脯氨酸酰基)-赖氨酸]。

用 N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-羟脯氨酸酰基)-赖氨酸]代替 N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(N^{α} -叔丁氧羰基-3-O-硝基-L-丝氨酸酰基)-赖氨酸], 参照实施例 11.5 的方法, 得到 N^{α} -熊去氧胆酰-[N^{ω} -(3-O-硝基-羟脯氨酸酰基)-赖氨酸](Ib-3), 熔点: 164-168 °C。MS (FAB m/e): 677.9 (M-1) 713.9 (M+HCl-1); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6): 10.16 (br m, 1H); 8.99 (br s, 1H); 8.58 (br s, 1H); 8.07 (m, 1H); 5.71 (t, 1H);

4.15-3.57 (m, 6H); 3.41 (q, 1H); 3.37 (br m, 2H); 3.12 (br m, 2H);
2.25-0.90 (br m, 甾环 CH₂ 和 CH); 1.09 (s, 3H); 0.88 (d, 3H, J=6.5Hz);
0.61 (s, 3H) .

实施例 14. 抗 CC1₄ 中毒所致小鼠肝损伤的药效学评价

取质量大约 20-25 g 的 Baclb/c 小鼠, 随机分组, 每组 5 只小鼠。通过口服给予不同剂量的待测化合物; 1 h 后, 按照 10 mL/kg 的剂量, 皮下注射 100 mL/L% 的 CC1₄, 制备肝损伤模型; 皮下注射生理盐水作为正常对照组。造模后 12 小时后, 再次口服给予不同剂量的待测化合物。第二次给药后 24 小时, 处死动物, 留取血清标本, 统一用全自动生化仪对于血清中的 ALT, AST 水平进行检测。评价结果见表 1。

表 1. 本发明化合物抗 CC1₄ 中毒所致小鼠肝损伤的治疗作用

化合物	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常对照		34	129
生理盐水		3430	2050
熊去氧胆酸	100	2890	1530
Ia-1	100	640	807
Ia-2	100	924	635
Ia-3	100	961	824
Ia-4	100	805	934
Ib-1	100	528	669
Ib-2	100	729	815
Ib-3	100	493	950

实施例 15. 抗对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤的药效学评价

取质量大约 20-25 g 的 Baclb/c 小鼠, 随机分组, 每组 5 只小鼠。通过口服给予不同剂量的待测化合物; 1 h 后, 用 100 mL/kg 的对乙酰氨基酚皮下注射制备肝损伤模型, 皮下注射生理盐水作为正常对照组。造模 1 h 后, 通过口服再次给予不同剂量的待测化合物。第二次给药后 24 小时, 处死动物, 留取血清标本, 统一用全自动生化仪对于

血清中的 ALT, AST 水平进行检测。评价结果见表 2。

表 2. 本发明化合物抗对乙酰氨基酚所致小鼠肝损伤的治疗作用

化合物	剂量 (mg/kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)
正常对照		34	129
生理盐水		1839	1952
熊去氧胆酸	100	1625	1780
Ia-1	100	934	605
Ia-2	100	946	680
Ia-3	100	816	756
Ia-4	100	732	606
Ib-1	100	634	736
Ib-2	100	876	642
Ib-3	100	824	696

由表 1 和表 2 所列四氯化碳和对乙酰氨基酚诱导的小鼠急性损伤的药效学评价结果显示, 化合物 Ia1-4、Ib1-3 对血清 ALT、AST 水平有明显的降低作用。