

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

A61K 31/409

A61P 31/18



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00103545.2

[45] 授权公告日 2004 年 2 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1136848C

[22] 申请日 2000.3.24 [21] 申请号 00103545.2

[71] 专利权人 中国科学院化学研究所

地址 100101 北京市海淀区中关村北一街 2 号

共同专利权人 中国预防医学科学院病毒学研究所

[72] 发明人 马金石 李泽琳 曾毅 叶涛

张驿 王天宇 阎芳

审查员 李钢

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

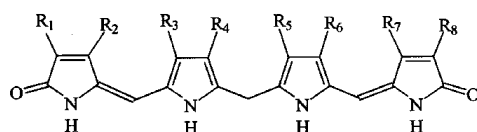
代理人 李柏

权利要求书 3 页 说明书 13 页 附图 1 页

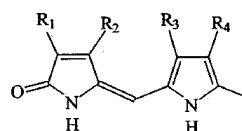
[54] 发明名称 胆红素二牛磺酸钠及其胆红素衍生物作为制备抗艾滋病病毒药物的用途

[57] 摘要

本发明涉及胆红素衍生物尤其是胆红素二牛磺酸钠作为制备抗艾滋病病毒药物的用途，右结构式 (I) 或结构式 (II) 表示的化合物用于制备抗艾滋病病毒药物，其中 R₁, R₂, R₃, R₆, R₇, R₈ 为烷基、乙烯基或烷基羰基；R₄, R₅ 为脂肪酸基、脂肪酸的钠盐、铵盐或药物学上可接受的盐；或含磺酸、磺酸的钠盐、铵盐或药物学上可接受的盐的取代基。体外实验证明它们具有抑制艾滋病病毒的效果，胆红素二牛磺酸钠效果最好，无任何毒性。



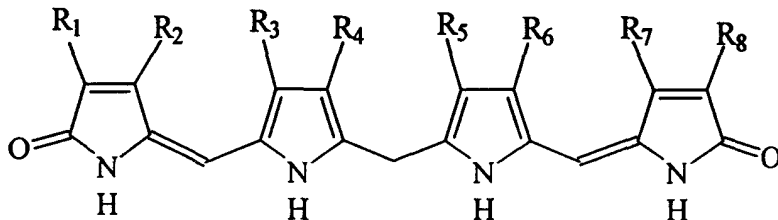
(I)



(II)

ISSN 1008-4274

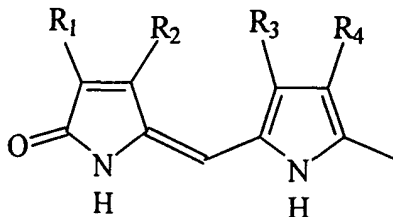
1. 一种胆红素衍生物作为制备抗艾滋病毒药物的用途，其特征在于下述结构式（I）或结构式（II）表示的化合物用于制备抗艾滋病毒药物的应用：



(I)

其中 $R_1, R_2, R_3, R_6, R_7, R_8$ 为烷基、乙烯基或烷基羰基； R_4, R_5 为脂肪酸基、脂肪酸的钠盐、铵盐或药物学上可接受的盐，或含磺酸、磺酸的钠盐、铵盐或药物学上可接受的盐的取代基；

或

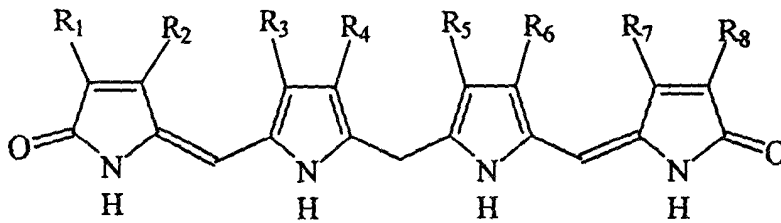


(II)

其中 R_1, R_2, R_3 为烷基、乙烯基或烷基羰基； R_4 脂肪酸的钠盐、脂肪酸的铵盐或药物学上可接受的盐、或含磺酸、磺酸的钠盐、铵盐或药物学上可接受的盐的取代基。

2. 如权利要求1所述的胆红素衍生物作为制备抗艾滋病毒药物的用途，其特征在于所述的结构式（I）表示的化合物的 R_5 为含磺酸、磺酸的钠盐、铵盐或药物学上可接受的盐的取代基时用于制备抗艾滋病毒药物的应用。

3. 如权利要求1所述的胆红素衍生物作为制备抗艾滋病毒药物的用途，其特征在于所述结构式（I）或结构式（II）表示的化合物当取代基为如下基团时用于制备抗艾滋病毒药物的应用：

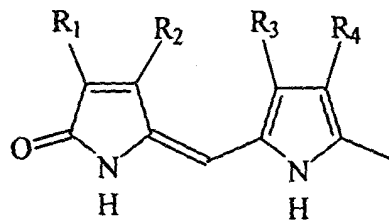


(I)

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
胆红素二牛磺酸钠	M	V	M	PS	PS	M	M	V
中胆红素 XIII α	M	E	M	P	P	M	E	M
中胆红素 XIII α 磺酸衍生物	M	E	M	S	S	M	E	M
胆红素侧基衍生物	M	V	M	P	P	M	M	ES

其中, M=CH₃, V=乙烯基, PS=CH₂CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐; E=CH₂CH₃, P=CH₂CH₂COOH、它的钠盐、铵盐、药理学上可接受的盐或二牛磺酸衍生物; S=(CH₂)_nSO₃H、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐, 其中 n=1-3; ES=CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂SO₃H、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐;

或



(II)

当取代基为如下基团时, 为下述化合物:

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
黄胆红酸	M	E	M	P
黄胆红酸的牛磺酸衍生物	M	E	M	PS

其中 M=CH₃, E=CH₂CH₃, P=CH₂CH₂COOH 的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐; PS=CH₂CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐。

4. 如权利要求 1-3 任一项所述的胆红素衍生物作为制备抗艾滋病毒药物的用途, 其特征在于制备成胶囊、片剂、注射剂为抗艾滋病药物的应用。

5. 如权利要求 1-3 任一项所述的胆红素衍生物作为制备抗艾滋病毒药物的用

途，其特征在于与叠氮脱氧胸苷配伍用作为抗艾滋病药物的应用。

6. 如权利要求 5 所述的胆红素衍生物作为制备抗艾滋病毒药物的用途，其特征在于制备成胶囊、片剂、注射剂为抗艾滋病药物的应用。

胆红素二牛磺酸钠及其胆红素衍生物 作为制备抗艾滋病药物的用途

本发明属于胆红素衍生物在医药领域中的应用，特别是涉及胆红素衍生物，尤其是胆红素二牛磺酸钠（Ditaurobilirubin, DTB）作为制备抗艾滋病药物的用途。

艾滋病（AIDS）即获得性免疫缺陷综合症（Acquire immunodeficiency syndrome），是当前世界上威胁人类健康十分严重的一种传染病。截止 1999 年底，全球累计共有艾滋病毒感染者和 AIDS 患者为 4990 万，其中仍存活的为 3360 万，已死去的 AIDS 病人为 1630 万。HIV 开始传入我国是通过进口国外的血液制品（1982—1984 年），到 1999 年上半年我国政府报告有 13619 人感染，我国专家估计感染人数超过 40 万人，而世界卫生组织估计我国 1998 年感染者有 60 万人，1999 年将达 80 万人，2000 年将达 120 万人。

1981 年在美国发现了第一个病例，1983 年法国巴斯德研究所 Montagnier 教授首先从病人的淋巴结培养的细胞中分离出病毒，以后被命名为艾滋病毒（Human immunodeficiency virus, HIV），从而证明艾滋病是以后天获得性免疫缺陷为特征的病毒性传染病。由于 HIV 亲嗜 CD₄ 淋巴细胞，它一方面在该细胞内不断繁殖、释放，释放出的病毒又侵犯新的淋巴细胞；另一方面被病毒侵犯的 CD₄ 淋巴细胞可与其它的 CD₄ 细胞融合形成巨型核合胞体，合胞体本身不稳定易引起细胞死亡。病毒繁殖、释放，合胞体形成、死亡，如此反复进行而造成机体深度的细胞免疫缺损，最终摧毁人体免疫功能导致病人死亡。HIV 除侵犯 CD₄ 细胞外，还可侵犯巨嗜细胞、B 淋巴细胞等，特别是它在巨嗜细胞内形成慢性感染，HIV 可长期存在体内。本病发展可分为急性感染期、无症状感染期、艾滋病前期和 AIDS 病四个阶段，感染者一旦发展到 AIDS 病期，各种病原都可以引起机会性感染，以及出现不同的肿瘤，导致病人最后因衰竭死亡。

1985 年发现叠氮脱氧胸苷（AZT, 3'-Azidothymidine）具有体外抑制逆转录酶的活性，1986 年进行了临床研究，1987 年 AZT 被美国食品和药物管理局（FDA）第一个批准上市，用于 AIDS 的治疗，使用情况说明可抑制 HIV 的复制延长患者存活的时间半年至一年，还存在骨髓抑制的严重毒副作用，并极易产生耐药性，不能消除隐患，且价格昂贵，一般病人往往负担不起，限制了其长期普遍应用。

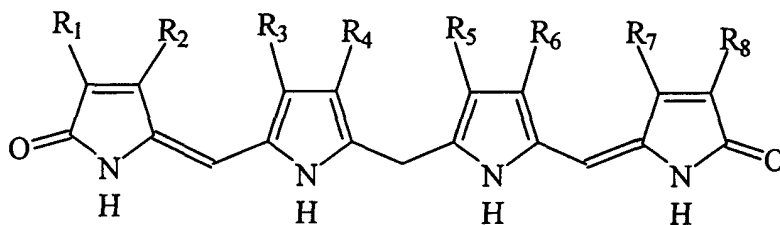
随后美国 FDA 相继又批准了 AZT 同类药双脱氧胞苷 (ddC, 2', 3' -Dideoxycytidine)、双脱氧肌苷 (ddl, 2', 3' -Dideoxyinosine) 和双脱氧硫代胞苷 (3-TC, 2' 3' -Dideoxy-3' -thiacytidine), 在临床上采用几个药物轮流使用, 但仍不能完全解决毒性和耐药性的问题, 延长生命二三年。1995 年以来, 美国的何大一博士领导的 AIDS 研究小组在研究蛋白酶抑制剂的基础上, 采用数种药物联合治疗, 称高效抗逆转录病毒治疗 (HAART), 该数种药物是由于作用于病毒生活史中的逆转录酶和蛋白酶部位, 相互配伍应用可使 2/3 病人寿命延长至 4-5 年, 有可望更长。虽然这种方法可明显延长病人生命, 但它依然存在三个缺点: ①仍然会出现耐药的艾滋病毒株, 有毒副作用; ②价格昂贵, 用此方法一个病人一年要花费 1.5-2 万美元; ③服用不方便、量多 (每天数十粒胶囊), 而且需医生随时指导按次序服用。另外, 该方法研究时间尚短, 它的长期效果还有待进一步评价。

因此, 从多种途径寻找新的抗 HIV 药物的研究工作仍然十分重要。日本人曾在 1991 年报道了胆绿素具有抗 HIV 的作用, 参见《日本癌症研究杂志》1991 年 82 卷 755-757 的文章 (H.Mari et. al., Jpn. J. Cancer Res. **82**, 755-757, 1991); 美国加州大学旧金山分校在《生物化学杂志》1996 年 320 卷 681-686 页 (F. McPhee et, al., Biochem. J. **320**, 681-686, 1996) 的文章认为胆红素是很有前途的艾滋病毒蛋白酶抑制剂。中国科学院感光化学研究所已经多年进行胆红素的研究, 并合成多种衍生物。中国预防医学科学院病毒学研究所自 1988 年开始开展抗 HIV 药物的实验研究。

本发明的目的旨在表明胆红素二牛磺酸钠 (DTB) 和其它胆红素衍生物抑制艾滋病毒, 并可提供一种用来制备治疗艾滋病的药物的用途。

本发明的目的是这样实现的:

本发明的技术方案中所用胆红素衍生物的结构如式 (I) 所示:



(I)

其中 $R_1, R_2, R_3, R_6, R_7, R_8$ 为烷基、乙烯基或烷基羰基; R_4, R_5 为脂肪酸基、脂肪酸的钠盐、铵盐或药物学上可接受的盐; 或含磺酸、磺酸的钠盐、铵盐或药物学上可接受的盐的取代基; R_8 还可以为含磺酸、磺酸的钠盐、铵盐或药物学上可接

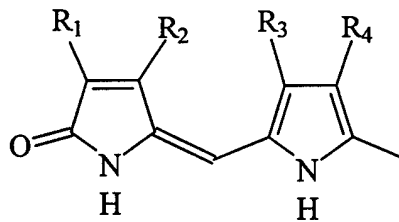
受的盐的取代基：

当取代基为如下基团时，为下述化合物：

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
胆红素二牛磺酸钠 (DTB)	M	V	M	PS	PS	M	M	V
中胆红素 XIII α (MBR)	M	E	M	P	P	M	E	M
中胆红素 XIII α 磺酸衍生物	M	E	M	S	S	M	E	M
胆红素侧基衍生物	M	V	M	P	P	M	M	ES

其中，M=CH₃，V=CH:CH₂，PS=CH₂CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐；E=CH₂CH₃，P=CH₂CH₂COOH、它的钠盐、铵盐、药理学上可接受的盐或二牛磺酸衍生物；S=(CH₂)_nSO₃H、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐，其中 n=1-3；ES=CH₂CH(CH₃)CH₂CH₂SO₃H、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐。

本发明的技术方案中所用另一类胆红素衍生物的结构如式 (II) 所示：



(II)

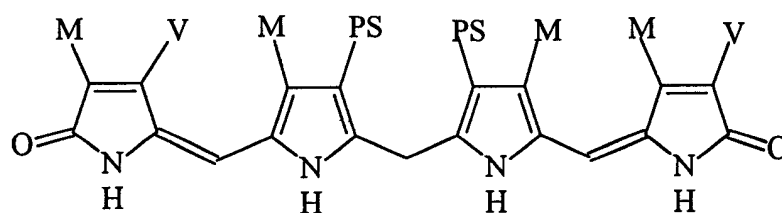
其中 R₁, R₂, R₃ 为烷基、乙烯基或烷基羰基；R₄ 为脂肪酸、脂肪酸的钠盐、脂肪酸的铵盐或药理学上可接受的盐、或含磺酸、磺酸的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐的取代基。

当取代基为如下基团时，为下述化合物：

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
黄胆红酸 (XBR)	M	E	M	P
黄胆红酸的牛磺酸衍生物	M	E	M	PS

其中 M=CH₃，E=CH₂CH₃，P=CH₂CH₂COOH、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐；PS=CH₂CH₂CONHCH₂CH₂SO₃H、它的钠盐、铵盐或药理学上可接受的盐。

本发明的技术方案中所用胆红素二牛磺酸钠 (DTB) 的结构如式 (III) 所示：



(III)

其中 $M=CH_3$; $V=CH:CH_2$; $PS=CH_2CH_2CONHCH_2CH_2SO_3Na$

胆红素二牛磺酸钠盐 (DTB) 物理化学性质: 分子量 798,9 (不含 Na), 黄色固体, 溶于水, 二甲基亚砷, 微溶于醇, 不溶于非极性有机溶剂。处于固态时或在碱性溶液中是稳定的, 酸性溶液中易氧化。

文献报道过它在蛋白缓冲液中的最大吸收和克分子吸光系数 ϵ , 见表 1。参见《临床化学》1985 年 31 卷 1677-1682 页 (B. T. Doumas et. al., Clin. Chem. **31**, 1677-1682, 1985)。

表 1 DTB 的最大吸收和克分子吸光系数

	$\epsilon \times 10^{-3} \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$		
	三羟甲基氨基甲烷(pH8.5) (460nm)	磷酸缓冲液(pH7.4) (422nm)	磷酸缓冲液(pH7.4) (460nm)
BSA (牛血清蛋白)	56.7	50.4	43.2
HSA (人血清蛋白)	55.3	--	55.9
Human serum (人血清)	57.2	--	58.9
Bovine serum (牛血清)	57.5	47.9	45.7
H ₂ O(450nm)	--	--	49.5

胆红素二牛磺酸钠 (DTB) 的制备:

1. 胆红素 (胆红素 IX α)

胆红素来自市场购买的, 因纯度太低, 必须经过提纯、重结晶。提纯方法参考文献《生物化学杂志》1972 年 129 卷 797-800 页 (A. F. McDonagh and F. Assisi, Biochem. J., **129** 797-800, 1972) 并做改进。具体方法如下: 将市场购得的胆红

素 500mg 加入 500mL 脱去稳定剂的氯仿中，在氮气流下加热回流半小时，然后冷却至室温。过滤溶液，用 0.1M NaHCO_3 洗氯仿溶液(3X100mL)。然后通过双层滤纸过滤，以除去氯仿中水。在 30°C 下真空旋转蒸发浓缩氯仿溶液。然后往浓缩的氯仿溶液中加入甲醇，至出现混浊，放入冰箱，至出现结晶，过滤。用含少量氯仿的甲醇洗，然后在真空下干燥。根据原料来源不同，回收率为 50—90%，纯度为 98%以上(以克分子消光系数为 65000 计)，整个操作要在暗处进行。所有溶剂预先通氮气半小时。

2. 胆红素二牛磺酸钠 (DTB) 的合成

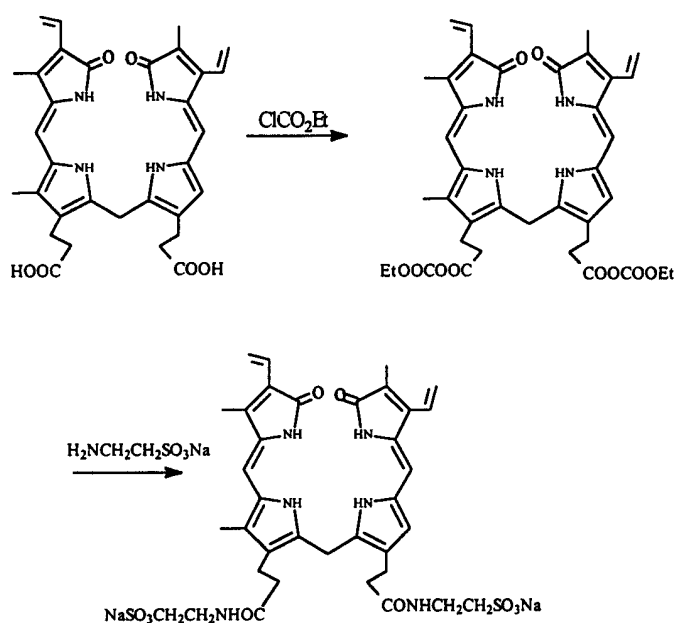
我们所用的起始原料为胆红素与牛磺酸钠盐。依据多肽的合成原理使胆红素与牛磺酸结合。其化学反应路线如下所示，合成方法如下：胆红素(1.2g)在乙酸乙酯中加入三乙胺 0.6mL，氯甲酸乙酯 0.45mL，搅拌 2 小时，然后加入牛磺酸钠盐($\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}$)的甲醇溶液 (0.51g 牛磺酸钠盐在 20mL 甲醇中)，搅拌充分，过夜、离心、干燥，得固体 1.5g (产率 87%)，在甲醇和乙酸乙酯中进行重结晶，真空干燥，得产品 DTB。重结晶的收率为 98%，纯度大于 95%。

DTB 的结构的确证

我们是通过常规的物理方法确证 DTB 的化学结构的。

① 红外光谱 DTB 的红外光谱见附图 1。图 1 是经过两次重结晶纯化并干燥后的 DTB 样品制作溴化钾压片测得的。特征鉴别处有①酰胺的形成：酰胺 NH 面内弯曲振动的第一倍频 3300cm^{-1} ；酰胺 I 吸收带 1640cm^{-1} ；酰胺 II 吸收带 1560cm^{-1} ；②磷酸盐的特征带 1050cm^{-1} 和 1200cm^{-1} 。余下各峰与胆红素本身的红外谱极其相似。

② 可见吸收光谱 图 2 是 DTB 在含人血清蛋白 pH7.4 的磷酸缓冲液中的可见吸收光谱。由于胆红素在与牛磺酸以化学键结合以后发色团部分没有变化，所以吸收光谱与胆红素基本类似。



DTB 合成路线图

③ 核磁共振谱 采用重水作溶剂 400MHz 高分辨核磁共振谱仪上进行测量。主要峰及归属列表 2 如下:

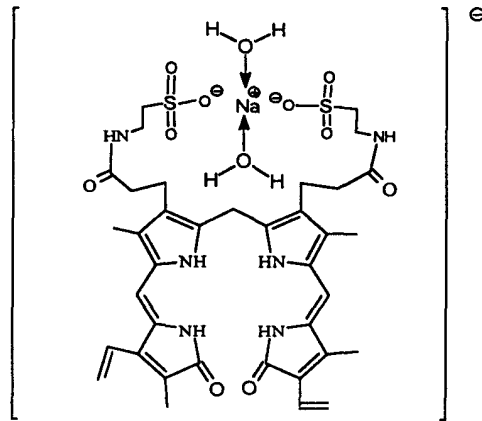
表 2. DTB 的 400MHz 核磁共振谱数据(内标 TMS=0ppm)

化学位移	峰多重度及偶合常数	氢数目	归属
1.915	s	6	吡咯 CH ₃
1.930	s	6	吡咯 CH ₃
2.927	t 6.8Hz	2	-CH ₂ CH ₂ CONH-
3.101	t 6.8Hz	2	-CH ₂ CH ₂ CONH-
3.267	t 6.8Hz	2	-CH ₂ CH ₂ CONH-
3.356	t 6.8Hz	2	-CH ₂ CH ₂ CONH-
3.483	t 6.8Hz	2	-CH ₂ CH ₂ SO ₃ Na
3.501	t 6.8Hz	2	-CH ₂ CH ₂ SO ₃ Na
3.964	m	4	-CH ₂ CH ₂ SO ₃ Na

注: 由于样品中存在少量的水以及氘代试剂的纯度限制, 核磁谱中水峰

(HDO 在 $\sim 5\text{ppm}$ 处)的吸收强度特别大,致使烯氢本身由于偶合等原因强度很低,不能很好地分辨;而 10-CH_2 上氢被溶剂峰覆盖, 10-CH_2 应在 4.5ppm 附近,本谱中没有分辨出来。

④ 质谱分析 由于 DTB 的分子量很大,而且 DTB 分子中有很多易断裂的化学键,因此,DTB 不能用电子轰击(EI)方法测定 DTB 的质谱。DTB 的质谱分析是用快原子轰击(FAB)负离子质谱进行的。得到的负离子峰的质量数为 855。其负离子团可能具有如下结构:



由于 10-CH_2 的旋转,胆红素的骨架上羰基可分别与匹配的水分子形成氢键而稳定负离子团。

从上面数据分析可以得出结论:我们制备的 DTB 的化学结构是正确的。即为化学反应式中所列的化学结构。

DTB 的纯度分析

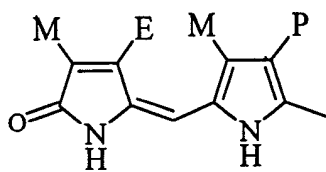
① 绝对纯度

制备的 DTB 经两次结晶后,经五氧化二磷真空干燥 (1mmHg) 10 小时,进行 DTB 的绝对纯度分析。 $\epsilon_{460\text{nm}}=47400$ 。

② 相对含量比

用高压液相色谱对制备的 DTB 进行分析。采用 C18 反相分析柱在 450mm 处检测,用 92% 的 0.1mol 正辛胺甲醇溶液和 8% 水做淋洗剂,参见《美国化学会志》1982 年 104 卷 6865 页(A.F.McDonagh, L.A.Palma, F.R.Trull and D.A.Lightner, J. Am. Chem. Soc., **104**, 6865, 1982)。

本发明的技术方案中所用黄胆红酸(XBR)的结构如式(IV)所示:



(IV)

其中 $M=CH_3$; $E=CH_2CH_3$; $P=CH_2CH_2COOH$

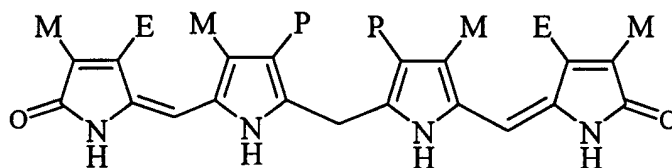
黄胆红酸 (XBR) 的合成方法为:

乙酰乙酸乙酯的肟与戊二酮在醋酸-锌粉还原下缩合成 4-乙酰基-3, 5-二甲基-1 氢吡咯-2-羧酸乙酯, 进一步经还原、水解、脱羧、氧化、溴化得到 5-溴甲基-4-乙基-3-甲基-2-氧代-2, 5-二氢吡咯, 该吡咯与 2, 4-二甲基-5-羧基-1 氢吡咯-3-丙酸在甲醇中酸催化回流缩合成黄胆红酸甲酯, 然后用 NaOH 水溶液水解, 就得到黄胆红酸 (XBR)。参考文献《杂环化学杂志》1984 年 21 卷 139-144 页 (D. A. lightner, J. S. Ma et. al., J. Heterocyclic Chem., **21** 139-144, 1984.)。

结构参数: IR (KBr) ν 3360, 3200, 2500, 1705, 1670, 1630 cm^{-1} 。

1H NMR (DMSO- d_6): δ 1.10 (t, 3H), 1.81 (s, 3H), 2.07 (s, 3H), 2.22 (s, 3H), 2.25-2.80 (m, 6H), 5.93 (s, 1H), 9.67 (br s, 1H), 10.18 (broad s, 1H), 11.83 (br s, 1H)。Uv-vis: λ_{max} (CHCl₃)=408nm, ϵ =28000, λ_{max} (CH₃OH)=416nm, ϵ =34000。

中胆红素 XIII α (MBR) 的结构如式 (V) 所示:



(V)

其中 $M=CH_3$; $E=CH_2CH_3$; $P=CH_2CH_2COOH$

中胆红素 XIII α 的合成方法为:

黄胆红酸甲酯经 2, 3-二氯-5, 6-二氰基-1, 4-对苯二醌 (DDQ) 氧化缩合成中胆绿素 XIII α 二甲酯, 最后经硼氢化钠还原、水解成中胆红素 XIII α , 纯度为 99% 以上。参考文献《杂环化学杂志》1987 年 24 卷 1573-1579 页 (R. T. Trull,

R. W. Franklin and D. A. Lightner, J. Heterocyclic Chem., **24** 1573-1579 1987)。

结构参数: IR (液膜): ν 3420, 3260, 2966, 1704, 1689, 1629 cm^{-1} 。¹HNMR(氘代氯仿): δ 1.12(t, 6H, J=7Hz), 1.85(s, 6H, 2、18 位 CH_3), 1.85(s, 6H, 7、13 位 CH_3), 2.48(q, 4H, J=7Hz), 2.78(m, 8H, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$), 4.06(s, 2H, 10 位 $-\text{CH}_2-$), 6.04(s, 2H, 5、10 位 $=\text{CH}$), 9.15(s, 2H, 吡咯 NH), 10.52(s, 2H, 内酰胺 NH), 13.31(s, 2H, COOH) ppm; MS: M^+ 587.7。UV-Vis (氯仿): λ_{max} = 431nm, ϵ = 60000。¹³CNMR(氘代氯仿): 8.54(q), 9.62(q), 15.29(q), 17.64(t), 19.74(t), 23.96(t), 34.81(t), 98.19(d), 119.72(s), 122.43(s), 123.00(s), 123.39(s), 128.28(s), 130.81(s), 147.67(s), 172.42(s), 174.46(s)。

本发明之化合物可用于制备治疗艾滋病药物。

胆红素二牛磺酸钠盐 (DTB) 抗艾滋病毒药物试剂的配置:

将胆红素二牛磺酸钠盐 (DTB) 直接溶在无血清的 RPMI 1640 培养液中 (0.5mg/mL), 配成所需浓度 (见表 3 和表 4)。

黄胆红素 (XBR) 抗艾滋病毒药物试剂的配置:

准确称重, 配制成二甲基亚砷 (DMSO) 的饱和溶液, 浓度为 12.3mg/mL。实验时用无血清的 RPMI 1640 培养基稀释至所需浓度 (见表 3 和表 4)。

中胆红素 XIII α (MBR) 抗艾滋病毒药物试剂的配置:

准确称重, 配制成二甲基亚砷 (DMSO) 的饱和溶液, 浓度为 11.6mg/mL。实验时用无血清的 RPMI 1640 培养基稀释至所需浓度 (见表 3 和表 4)。

本发明所述化合物, 特别是 DTB, 可以用传统方法制备成胶囊、片剂、注射剂等。

本发明的效果:

我们对合成的多种胆红素衍生物进行了抗 HIV 病毒筛选, 体外实验证明几种胆红素衍生物具有抑制艾滋病毒的效果, 其中 DTB 效果最好, 它的半数抑制浓度 (IC_{50}) 为 3.75 $\mu\text{g/mL}$, 浓度为 40 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率为 100%, 浓度为 10 $\mu\text{g/mL}$ 时抑制率为 90%。细胞毒性实验表明 DTB 的细胞毒性为零。对小老鼠的急毒性实验表明, 对小鼠灌胃给药相当于体外抗病毒有效剂量的 390 倍以上, 无任何毒性。DTB 是鸡胆和鱼胆中的组分, 在传统中药中也有使用。利用我们的合成方法, 易于大量合成和生产。

这些化合物, 特别是 DTB, 用传统方法制备成胶囊、片剂、注射剂时, 取得抑制艾滋病毒的同样效果。

这些化合物, 特别是 DTB, 与 AZT 等配伍用作为抗艾滋病药物, 也取得抑制艾滋病毒的同样效果。

附图说明：

图 1- 合成 DTB 的红外光谱图

图 2- 合成 DTB 的可见吸收光谱图

以下的实施例进一步说明本发明之药物化合物的药理和毒理作用。

实施例 1 本发明之化合物的抗 HIV 病毒实验

本实验采用体外实验方法，观察淋巴细胞株感染 HIV-1 后，药物抑制病毒在细胞内复制的作用。

1. 实验材料

病毒为 HIV-1，该病毒是法国巴斯德研究所 Montagnier 教授赠送，实验中所用病毒量浓度为 1×10^4 TCID₅₀ / mL (TCID₅₀ 为 50%致细胞病变剂量)；用 CEM 细胞保存 HIV-1 病毒，由中国预防医学科学院病毒学研究所 HIV 实验室传代培养。

药物用 DTB、XBR 和 MBR。实验时用无血清的 RPMI 1640 培养液溶解，配成所需浓度(见表 3 和表 4)。

2. 实验方法

(1) 病毒和细胞培养：

将新鲜培养的 MT₄细胞 (5×10^5 / mL) 与 HIV-1 病毒液 (10^3 TCID₅₀ / mL) 共培养，在 CO₂培养箱中 37℃作用 1-1.5 小时，以 RPMI 1640 完全培养液(含 10%小牛血清和抗菌素)洗去未感染细胞的游离病毒后，再用完全培养液校正细胞浓度 (5×10^5 / mL) 备用。

(2) HIV-1 p24 抗原表达的测定：

采用一种微量 ELISA 方法，以定量测定体外培养细胞上清液中 HIV 病毒的 p24 抗原，以表示病毒量的多少。操作按试剂盒说明书。

结果根据 OD 值，Cut Off 值及标准曲线，计算出各孔所含病毒量(即 pg / mL)。

(3) 抗 HIV-1 病毒实验，测定药物的半数抑制浓度 (IC₅₀)：

细胞量为 5×10^5 / mL，加一定量 HIV-1 病毒，37℃作用 60-90 分钟，离心，弃去上清，加无血清的 RPMI 1640，使细胞悬浮，如上法离心弃去上清，再加双倍血清的 RPMI 1640 培养液配成 5×10^5 / mL。采用 96 孔板进行实验，将药物分别稀释至不同浓度，每个浓度设四个反应孔，并设病毒对照和细胞对照反

应孔，每孔加 100 μ L 药和 100 μ L 感染病毒的细胞，37 $^{\circ}$ C 孵育箱中放置，三天后换液，每孔吸除 100 μ L 上清，加入 100 μ L 与原孔相同的药液，或培养液，六天后收集各孔上清，按上述 p24 抗原分析法，测定各孔所含病毒的量，按下列公式计算抑制率。根据各浓度组的抑制率，计算出半数抑制浓度 (IC_{50})，并按公式做统计。

$$\text{抑制率(\%)} = \frac{\text{病毒对照组病毒量(pg/mL)} - \text{药物各族的病毒量(pg/mL)}}{\text{病毒对照组病毒量(pg/mL)}} \times 100$$

实验结果如下：

表 3 抗病毒活性

化合物	原液稀释	浓度 μ g/mL	OD 值	抑制率
XBR	1/200	43.25	0.058	80.56%
	1/400	21.63	0.088	72.22%
	1/800	10.81	0.112	47.22%
MBR	1/200	29.00	0.068	78.89%
	1/800	7.25	0.100	54.44%
DTB	1/12.5	40.00	0.015	100.0%
	1/50	10.00	0.030	90.00%
	1/200	2.50	0.132	43.33%
	1/800	0.625	0.147	30.56%
病毒对照组			2.5	
DTB 的 $IC_{50} \approx 3.75 \mu$ g/mL				

(4) 细胞毒性实验：

将 MT_4 细胞以双倍血清的培养液配成 5×10^5 / mL，种入 96 孔板，每孔加 100 μ L，另加入不同浓度的药液 100 μ L，对照组不加药，改加无血清 RPMI 1640 营养液 100 μ L，37 $^{\circ}$ C 培养三天，各孔吸除 100 μ L 上清液，加入 0.25% MTT (蓝四唑，用 pH7.2 磷酸缓冲液配制)，每孔 20 μ L，37 $^{\circ}$ C 培养 4 小时。黄色的 MTT 在活细胞的线粒体作用下形成紫色的结晶，每孔加 100 μ L DMSO 溶解结晶，然后在酶标仪上，用 570nm 波长测定光密度值 (OD 值)，再按下列公式计算杀细胞率：

$$\text{杀死细胞率(\%)} = \frac{\text{细胞对照组OD值} - \text{各药物组OD值}}{\text{细胞对照组OD值}} \times 100$$

实验结果如下:

表 4 细胞毒性

化合物	原液稀释	浓度 $\mu\text{g/mL}$	OD 值	杀细胞率
XBR	1/200	43.25	0.247	29.32%
	1/400	21.63	0.3065	12.30%
	1/800	10.81	0.3405	2.58%
MBR	1/200	29.00	0.26	25.61%
	1/400	14.50	0.315	9.87%
	1.800	7.25	0.313	10.44
DTB	1/12.5	40.00	0.361	0%
	1/50	10.00	0.370	0%
	1/200	2.50	0.395	0%
	1/400	1.25	0.372	0%
	1/800	0.625	0.492	0%
细胞对照组			0.3495	

实施例 2 本发明之化合物的毒理实验

小鼠急性毒性实验:

动物: 昆明远交系小鼠(中国医学科学院动物学研究所实验动物繁育场提供)雌雄各半, 体重为 18-20 克, 雌雄分笼饲养。实验前, 小鼠于实验室内饲养观察 3-5 天自由摄食摄水。

药物: DTB, 加水溶解。

方法: 小鼠灌胃给药, 给药后观察表现、死亡情况, 记录三天的死亡率。

结果: 小鼠给药量为 25mg/20 克体重, 给药后小鼠活动正常, 无任何毒性, 三天无死亡, 此剂量相当于体外抗病毒有效剂量的 390 倍以上。

实施例 3

将胆红素二牛磺酸钠用本领域中的公知技术作成胶囊。

实施例 4

将胆红素二牛磺酸钠用本领域中的公知技术作成片剂。

实施例 5

将胆红素二牛磺酸钠用本领域中的公知技术作成注射剂。

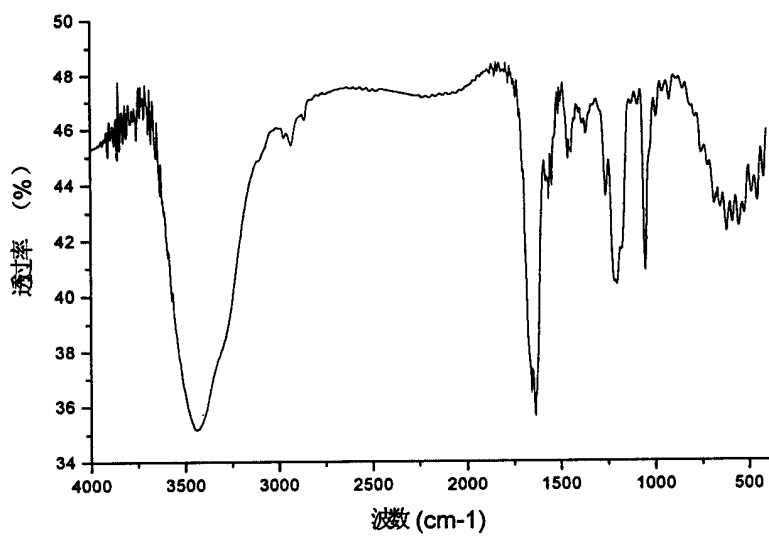


图 1

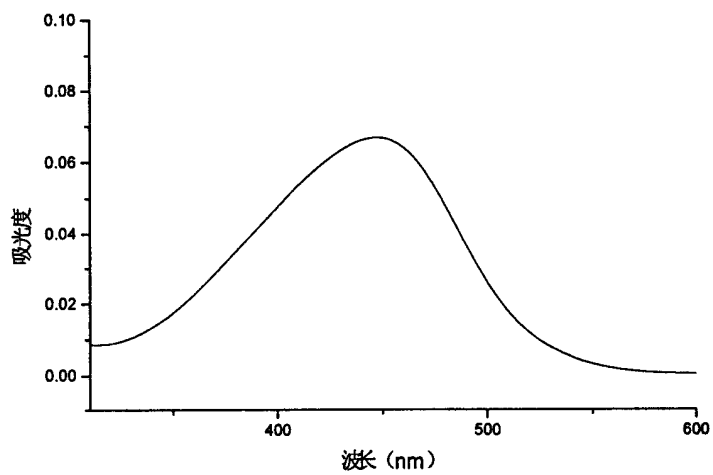


图 2