



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115813900 A

(43) 申请公布日 2023. 03. 21

(21) 申请号 202211484881.X *A61P 19/10* (2006.01)

(22) 申请日 2022.11.24 *A61P 19/08* (2006.01)

(83) 生物保藏信息 *A61P 35/04* (2006.01)

GDMCC No. 60670 2019.05.20 *C07C 51/42* (2006.01)

(71) 申请人 广西中医药大学 *C07C 51/47* (2006.01)

地址 530200 广西壮族自治区南宁市五合 *C07C 59/64* (2006.01)

大道13号 *C12N 1/14* (2006.01)

(72) 发明人 罗小卫 谭艳辉 林妙萍 刘永宏 *C12P 7/40* (2006.01)

高程海 覃育宁 *C12R 1/645* (2006.01)

(74) 专利代理机构 广西中知华誉知识产权代理
有限公司 45140

专利代理师 陆丽婷

(51) Int. Cl.

A61K 31/192 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

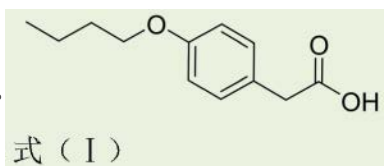
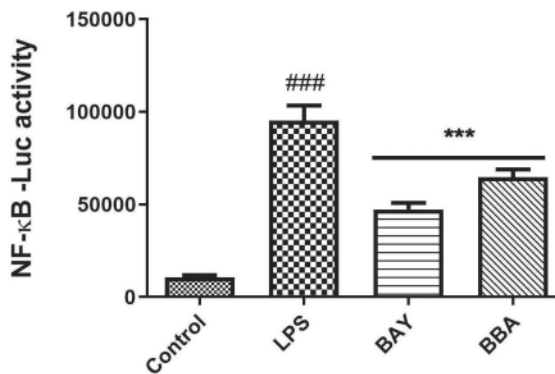
权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

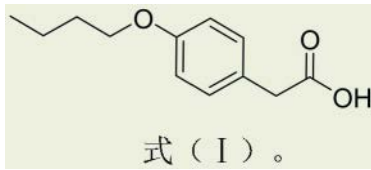
苯乙酸类化合物在制备破骨细胞分化抑制剂中的应用

(57) 摘要

本发明提供苯乙酸类化合物在制备破骨细胞分化抑制剂中的应用,涉及海洋天然产物领域。公开一个苯乙酸类化合物,其结构式如式(I)所示,将其命名为4-butoxy-benzeneacetic acid,10 μM浓度下对LPS诱导的NF-κB荧光素酶具显著抑制作用,且在6 μM浓度下能显著抑制RANKL诱导的破骨前体细胞RAW264.7细胞和BMMs细胞分化成破骨细胞,体内通过抑制破骨细胞对卵巢切除所致骨质疏松小鼠的骨破坏具保护作用,能有效替代现有的双磷酸盐药物及地诺昔单抗,抑制破骨细胞的骨吸收活性,是开发成为新型破骨细胞分化抑制剂类药物的理想候选化合



1. 苯乙酸类化合物在制备破骨细胞分化抑制剂中的应用,所述苯乙酸类化合物的结构式如式(I)所示,将其命名为4-butoxy-benzeneacetic acid:



2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的破骨细胞分化抑制剂为治疗破骨细胞过度活化造成的溶骨性疾病的药物。

3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述的破骨细胞分化抑制剂为治疗骨质疏松、类风湿性关节炎、肿瘤转移骨破坏的药物。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于:所述苯乙酸类化合物还可以在制备NF- κ B核因子表达抑制剂药物中的应用。

5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述破骨细胞分化抑制剂或NF- κ B核因子表达抑制剂药物,包括有效量的苯乙酸类化合物或其药用盐,和药学上可以接受的载体或辅剂。

6. 一种用于制备权利要求1所述的苯乙酸类化合物的菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21,其保藏编号为:GDMCC NO.60670。

7. 一种制备权利要求1所述的苯乙酸类化合物的方法,其特征在于,所述的苯乙酸类化合物是从菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21的发酵培养物中制备分离得到的。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述的制备苯乙酸类化合物的方法,具体步骤如下:

a)、制备菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21的发酵培养物,用乙酸乙酯浸泡发酵产物,将发酵培养物切成小块,超声提取15min,用布氏漏斗过滤,滤液经蒸馏浓缩后得到浸膏A;滤渣继续用乙酸乙酯提取3遍,经蒸馏浓缩后得到浸膏B;

b)、将浸膏A和浸膏B合并的粗提物经中压正相液相色谱,用石油醚/二氯甲烷作为洗脱剂,从体积比(100:0)~(0:100)进行梯度洗脱,收集石油醚/二氯甲烷体积比80:20梯度洗脱下来的流份,继续过中压反相C₁₈柱色谱,用甲醇/水作为洗脱剂,从体积比(10:90)~(100:0)进行梯度洗脱,收集甲醇/水体积比58:42梯度洗脱下来的流份,收集流份再经纯化后得到苯乙酸类化合物。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,所述的步骤a)的制备菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21的发酵培养物是将活化的菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21接入种子培养基中,25℃,180rpm,动态培养72h制得种子液,将种子液以5%的接种量接入到发酵培养基中,25℃,静态培养100天制得发酵培养物;所述的种子培养基配方为每1L培养基中含有:麦芽提取粉15g,溴化钠20g,余量为水,pH 7.5;

所述的发酵培养基的配方为每1L三角瓶培养基中含有:大米130g,溴化钠3g,水150mL,pH 7.5。

苯乙酸类化合物在制备破骨细胞分化抑制剂中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及海洋天然产物领域,具体涉及苯乙酸类化合物在制备破骨细胞分化抑制剂中的应用。

背景技术

[0002] 骨质疏松症是一种常见的骨骼退行性疾病,主要表现为骨脆性增加、骨量减少和骨微结构破坏,严重威胁老龄化人群和绝经后女性的健康。破骨细胞(osteoclasts,OCs)是由单核细胞/巨噬细胞造血谱系前体细胞融合形成的特殊细胞,是人体内唯一具有骨吸收功能的细胞。破骨细胞活性缺陷导致骨硬化和骨髓衰竭,过度激活可导致骨质疏松症、类风湿性关节炎、肿瘤骨转移等溶骨性疾病,抑制OCs的形成和再吸收功能是治疗骨质疏松症的主要策略之一。海洋微生物是发现新型药源分子的新理想资源,关于海洋微生物天然产物抗破骨细胞分化抑制剂的研究报道较少,故其抗破骨细胞分化潜力有待进一步挖掘。

[0003] 破骨细胞的形成是一个逐步过程,由核因子- κ B受体活化因子配体(Receptor activator of nuclear κ B ligand,RANKL)的受体激活剂与其在单核细胞/巨噬细胞前体上的受体RANK结合而启动。目前临床上运用的破骨细胞分化相关抑制剂主要为地诺昔单抗和双膦酸盐类药物,但都具有一定的并发症和副作用。因此,亟需寻找一种安全、有效、质量可控、经济的靶向抑制破骨细胞形成和骨吸收的药物,有效解决临床上对于破骨细胞分化抑制剂的巨大需求。

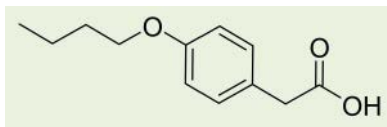
发明内容

[0004] 本发明针对上述问题,提供苯乙酸类化合物(命名为4-butoxy-benzeneacetic acid)的新应用。

[0005] 为达到上述目的,本发明所采用的技术方案是:

[0006] 本发明的苯乙酸类化合物在制备破骨细胞分化抑制剂中的应用,所述苯乙酸类化合物的结构式如式(I)所示,将其命名为4-butoxy-benzeneacetic acid:

[0007]



[0008]

式(I)。

[0009] 在本发明中,进一步说明,所述的破骨细胞分化抑制剂为治疗破骨细胞过度活化造成的溶骨性疾病的药物。

[0010] 在本发明中,进一步说明,所述的破骨细胞分化抑制剂为治疗骨质疏松、类风湿性关节炎、肿瘤转移骨破坏的药物。

[0011] 在本发明还提供苯乙酸类化合物在制备NF- κ B核因子表达抑制剂药物中的应用。

[0012] 在本发明中,进一步说明,所述破骨细胞分化抑制剂或NF- κ B核因子表达抑制剂药物,包括有效量的苯乙酸类化合物或其药用盐,和药学上可以接受的载体或辅剂。

[0013] 在本发明中,进一步说明,所述的破骨细胞分化抑制剂或NF- κ B核因子表达抑制剂药物为口服制剂、注射剂型或外用剂型。

[0014] 本发明还提供一种制备苯乙酸类化合物的方法,所述的苯乙酸类化合物是从菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21的发酵培养物中制备分离得到的。

[0015] 在本发明中,进一步说明,所述的制备苯乙酸类化合物的方法,具体步骤如下:

[0016] a)、制备菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21的发酵培养物,用乙酸乙酯浸泡发酵培养物,将发酵物切成小块,超声提取15min,用布氏漏斗过滤,滤液经蒸馏浓缩后得到浸膏A;滤渣继续用乙酸乙酯提取3遍,经蒸馏浓缩后得到浸膏B;

[0017] b)、将浸膏A和浸膏B合并的粗提物经中压正相液相色谱,用石油醚/二氯甲烷作为洗脱剂,从体积比100:0~0:100进行梯度洗脱,收集石油醚/二氯甲烷体积比80:20梯度洗脱下来的流份,继续过中压反相C₁₈柱色谱,用甲醇/水作为洗脱剂,从体积比10:90~100:0进行梯度洗脱,收集甲醇/水体积比58:42梯度洗脱下来的流份,收集流份再经纯化后得到苯乙酸类化合物。

[0018] 在本发明中,进一步说明,所述的步骤a)的制备菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21的发酵培养物是将活化的菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21接入种子培养基中,25℃,180rpm,培养72h制得种子液,将种子液以5%的接种量接入到发酵培养基中,25℃,静态培养100天制得发酵培养物。

[0019] 在本发明中,进一步说明,所述的种子培养基配方为每1L升培养基中含有:麦芽提取粉15g,溴化钠20g,余量为水,pH 7.5。

[0020] 在本发明中,进一步说明,所述的发酵培养基的配方为每1L三角瓶培养基中含有:大米130g,溴化钠3g,水150mL,pH 7.5。

[0021] 本发明还提供菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21在制备苯乙酸类化合物中的应用。

[0022] 本发明通过试验得到:苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid在10 μ M浓度下对LPS诱导的NF- κ B荧光素酶具有显著抑制作用(p<0.001),活性与阳性药BAY相当,可以作为研制NF- κ B核因子表达抑制剂的先导化合物。

[0023] 本发明通过试验得到:苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid在6 μ M浓度下呈剂量依赖地显著抑制RANKL诱导的破骨前体细胞RAW264.7(小鼠单核巨噬细胞)和BMMs(Bone marrow macrophage cells,骨髓巨噬细胞)细胞分化成破骨细胞,且无明显细胞毒性,因此可望开发成为安全有效的新型破骨细胞分化抑制剂药物。

[0024] 本发明通过试验得到:苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid体内对破骨细胞激活导致骨破坏的经典模型-卵巢切除骨质疏松小鼠的骨丢失具显著保护作用,降低破骨细胞在骨片上形成的骨凹陷面积,抑制破骨细胞的骨吸收活性,具有结构简单、方便服用、经济有效等优点。因此,能有效替代现有的双磷酸盐药物及地诺昔单抗。

[0025] 本发明的一个目的是提供苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid或其药用盐在制备NF- κ B核因子表达抑制剂或破骨细胞分化抑制剂药物中的应用。所述的抗破骨细胞分化类药物为治疗双磷酸盐、地诺昔单抗临床适应症的药物,用于防治骨质疏松、类风湿性关节炎、肿瘤转移骨破坏等溶骨性疾病。

[0026] 本发明的另外一个目的是提供一个NF- κ B核因子表达抑制剂或破骨细胞分化抑制

剂药物,包括有效量的作为活性成份的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid或其药用盐,和药学上可以接受的载体或辅剂。

[0027] 由于采用上述技术方案,本发明具有以下有益效果:

[0028] 本发明在对广西涠洲岛来源鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)共附生菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21的次生代谢产物的研究过程中,分离获得一个苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid,其对LPS诱导的NF- κ B荧光素酶具显著抑制作用,呈剂量依赖地显著抑制RANKL诱导的破骨前体细胞RAW264.7和BMMs细胞分化成破骨细胞,不产生细胞毒性,体内对破骨细胞激活导致骨破坏的经典模型-卵巢切除骨质疏松小鼠的骨丢失具显著改善作用,降低破骨细胞在骨片上形成的骨凹陷面积,抑制破骨细胞的骨吸收活性。因此是开发成为新型NF- κ B核因子表达抑制剂或破骨细胞分化抑制剂药物的理想候选化合物。

附图说明

[0029] 图1是苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid(简称BBA)在10 μ M浓度下对在RAW264.7细胞经脂多糖(LPS)诱导的NF- κ B荧光素酶的抑制活性对比图,BAY是阳性对照,####表示 $p < 0.001$ vs. control group;***表示 $p < 0.001$ vs. LPS group;

[0030] 图2是苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对RAW264.7和BMMs细胞的细胞活力影响;

[0031] 图3是苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid(简称BBA)对破骨前体RAW264.7细胞分化成破骨细胞的影响的实验结果,其中:RANKL为激活核因子NF- κ B受体的配体,与空白对照组比较,#### $P < 0.001$;与RANKL组比较,* $P < 0.05$;

[0032] 图4是苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid(简称BBA)对小鼠骨髓巨噬细胞(BMMs)分化成破骨细胞的影响的实验结果,其中:RANKL为激活核因子NF- κ B受体的配体,M-CSF为巨噬细胞集落刺激因子,与空白对照组比较,#### $P < 0.001$;与RANKL组比较,* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$;

[0033] 图5是苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid(简称BBA)对去卵巢骨质疏松小鼠股骨作用的Micro-CT扫描结果,其中:Sham为假手术,OVX为去卵巢,5mg/kg(低剂量)和10mg/kg(高剂量)为苯乙酸类化合物给药剂量,Ez为阳性药物雌二醇;

[0034] 图6是苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid(简称BBA)对去卵巢骨质疏松小鼠股骨作用的骨参数统计分析结果,其中:Sham为假手术,OVX为去卵巢,苯乙酸类化合物高低给药剂量分别为10mg/kg和5mg/kg,Ez为阳性药物雌二醇;ConnD表示骨小梁的连接密度,BS/BV表示单位体积骨组织的面积大小,Tb/Th表示骨小梁厚度;

[0035] 图7是苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对去卵巢骨质疏松小鼠股骨切片HE与TRAP染色的结果,其中Sham为假手术组,OVX为去卵巢骨质疏松模型组,OVX+5mg/kg和OVX+10mg/kg分别为苯乙酸类化合物低、高剂量组,Ez为阳性药物雌二醇组;

[0036] 图8是苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid(简称BBA)对去卵巢骨质疏松小鼠股骨切片单位骨面积的破骨细胞数量与破骨细胞表面积定量分析结果,其中:Sham为假手术,OVX为去卵巢骨质疏松模型组,OVX+5mg/kg和OVX+10mg/kg分别为苯乙酸类化合物低、高剂量组,Ez为阳性药物雌二醇组。

具体实施方式

[0037] 为了使本发明的目的、技术方案及技术效果更加清晰,以下结合实施例和附图,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0038] 本发明是一个苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid在制备抗破骨细胞分化抑制剂或NF- κ B核因子表达抑制剂药物的应用。所述的破骨细胞分化抑制剂或NF- κ B核因子表达抑制剂药物为口服制剂、注射剂型或外用剂型;包括活性成分苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid和医学上可接受的药用辅料。抗破骨细胞分化类药物可以治疗包括但不限于:绝经后骨质疏松、肿瘤转移骨破坏等已知的破骨细胞抑制剂类药物如双磷酸盐、地诺昔单抗被批准治疗的临床适应症。

[0039] 通常而言,作为药物,均是在制备成制剂后才临床应用。本发明所述的有效活性成分苯乙酸类化合物,作为有效活性成分苯乙酸类化合物可根据本领域公知的方法制备。可通过将本发明有效活性成分苯乙酸类化合物与一种或多种药学上可接受的固体或液体赋形剂和/或辅剂结合,制成适于人或动物使用的任何剂型。本发明有效活性成分苯乙酸类化合物或含有它的有效活性成分苯乙酸类化合物可以单位剂量形式给药,给药途径可为肠道或非肠道,如口服、静脉注射、肌肉注射、皮下注射、鼻腔、口腔粘膜、眼、肺和呼吸道、皮肤、阴道、直肠等。

[0040] 口服制剂优先为胶囊剂。为了将给药单元制成胶囊剂,可以将有效成分本发明有效活性成分苯乙酸类化合物与稀释剂、助流剂混合,将混合物直接置于硬胶囊或软胶囊中。也可将有效成分本发明有效活性成分苯乙酸类化合物先与稀释剂、黏合剂、崩解剂制成颗粒或微丸,再置于硬胶囊或软胶囊中。用于制备本发明有效活性成分苯乙酸类化合物片剂的各种稀释剂、黏合剂、润湿剂、崩解剂、助流剂品种也可用于制备本发明有效活性成分苯乙酸类化合物的胶囊剂。

[0041] 为将本发明有效活性成分苯乙酸类化合物制成注射剂,可以用水、乙醇、异丙醇、丙二醇或它们的混合物作溶剂并加入适量本领域常用的增溶剂、助溶剂、pH调剂剂、渗透压调节剂。增溶剂或助溶剂可以是泊洛沙姆、卵磷脂、羟丙基- β -环糊精等;pH调剂剂可以是磷酸盐、醋酸盐、盐酸、氢氧化钠等;渗透压调节剂可以是氯化钠、甘露醇、葡萄糖、磷酸盐、醋酸盐等。如制备冻干粉针剂,还可加入甘露醇、葡萄糖等作为支撑剂。

[0042] 实施例1菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21

[0043] 从采自中国广西涠洲岛的鹿角杯形珊瑚(*Pocillopora damicornis*)分离得到菌核生枝顶孢霉(*Acremonium sclerotigenum*) C2F21,于2019年05月20日保藏于广东省微生物菌种保藏中心(GDMCC),地址:广东省广州市先烈中路100号广东省微生物研究所59号楼五楼,广东省微生物研究所,保藏编号为:GDMCC No.60670。

[0044] 实施例2苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid的制备和分离

[0045] 1、培养

[0046] 1.1、种子培养基:每1L升培养基中含有麦芽提取粉15g,溴化钠20g,余量为水,pH7.5。按上述组份和含量混合均匀,然后121 $^{\circ}$ C,灭菌30min备用。

[0047] 1.2、发酵培养基:每1L三角瓶培养基中含有:大米130g,溴化钠3g,水150mL,pH7.5。按上述组份和含量混合均匀,然后121 $^{\circ}$ C,灭菌30min备用。

[0048] 2、发酵

[0049] 2.1、种子培养:将活化的菌核生枝顶孢霉 (*Acremonium sclerotigenum*) C2F21接入每瓶含有300mL种子培养基的1L的三角培养瓶中,25℃,180rpm,培养72h制得种子液。

[0050] 2.2、发酵培养:将种子液以5%的接种量(体积百分比)接入到120瓶发酵培养基三角瓶中,25℃,静态培养100d,制得发酵培养物。

[0051] 3、提取:用乙酸乙酯浸泡发酵培养物,将发酵培养物切成小块,超声破碎提取15min,采用布氏漏斗过滤,滤液经蒸馏浓缩后得到浸膏A;滤渣继续用乙酸乙酯提取3遍,经蒸馏浓缩后得到浸膏B,合并浸膏A和浸膏B得总提取物(100g)。

[0052] 4、苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid的分离纯化

[0053] 将浸膏A和浸膏B合并的粗提物(100g)经中压正相柱层析液相色谱(MPLC),用石油醚/二氯甲烷作为洗脱剂,从体积比100:0~0:100进行梯度洗脱,收集石油醚/二氯甲烷体积比为80:20洗脱的流份(2.5g),继续过中压反相C₁₈柱色谱,用甲醇/水作为洗脱剂,从体积比10:90~100:0进行梯度洗脱,收集甲醇/水体积比58:42梯度洗脱下来的流份,该流份最后用半制备高效液相精细分离,在洗脱体系为甲醇/水(体积比58:42,添加0.3%三氟乙酸, YMC-pack ODS-A色谱柱,10×250mm,5μm,2mL/min)进行纯化后得到苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid(46mg)。

[0054] 实施例3苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid的结构鉴定

[0055] 结构鉴定:苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid为淡黄色油状物。核磁数据显示为对位取代的苯乙酸类化合物,包括1个三重峰甲基($\delta_{H/C}$ 0.91/13.8),4个亚甲基($\delta_{H/C}$ 3.54/40.7,4.10/65.1,1.60/30.7,1.36/19.2),4个芳香次甲基($\delta_{H/C}$ 7.10/130.5,6.73/115.7),2个芳香季碳(δ_C 155.1,125.9),和1个羧基(δ_C 173.1)。数据归属为:¹H NMR (700MHz,CDCl₃): δ_H 3.54(2H,s,H₂-2),7.10(2H,d,J=8.4Hz,H-4,8),6.73(2H,d,J=8.4Hz,H-5,7),4.10(2H,t,J=7.0Hz,H₂-1'),1.60(2H,m,H₂-2'),1.36(2H,m,H₂-3'),0.91(3H,t,J=7.0Hz,H₃-4')。¹³C NMR (175MHz,CDCl₃): δ_C 173.1(C,C-1),40.7(CH₂,C-2),125.9(C,C-3),130.5(CH,C-4,8),115.7(CH,C-5,7),155.1(C,C-6),65.1(CH₂,C-1'),30.7(CH₂,C-2'),19.2(CH₂,C-3'),13.8(CH₃,C-4')。参考文献[中山大学学报(自然科学版),2009,48(3):136-138]报道的数据,将该化合物鉴定为4-butoxy-benzeneacetic acid。

[0056] 实施例4苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对LPS诱导的NF-κB荧光素酶抑制活性测定

[0057] NF-κB荧光素酶抑制活性测定主要参考文献(British Journal of Pharmacology, 2020,177:4242-4260)。

[0058] 取稳定转染NF-κB荧光素酶报告基因的RAW264.7细胞接种于96孔板中(1×10⁴个/孔),每孔加入含10%胎牛血清、100IU/mL青霉素和链霉素和0.1μg/mL的G418的DMEM培养基200μL,待细胞贴壁稳定后,加入苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid,设置6个复孔。继续孵育4h后,除阴性对照组外,每个化合物组(3孔)和阳性对照组(NF-κB抑制剂,BAY11-7082,5μM)分别加入LPS和RANKL,使其每孔终浓度为100ng/mL,两者刺激8h后,弃掉上清液,每孔加入细胞裂解液25μL,低速震荡10min以充分裂解细胞,然后取20μL转移至白板中,每孔加入荧光素溶液50μL,用多功能酶标仪检测Luciferase值。

[0059] 试验结论:研究发现与LPS空白组对比,苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic

acid在10 μ M对LPS诱导的NF- κ B荧光素酶具有显著抑制作用($p < 0.001$) (图1),活性与阳性对照相当。

[0060] 实施例5苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对破骨前体RAW264.7细胞和BMMs细胞毒性影响

[0061] 细胞活力测定主要参考文献(British Journal of Pharmacology, 2020, 177: 4242-4260)

[0062] (1) MTT法检测伊快霉素对破骨前体RAW264.7细胞的生存影响

[0063] 取生长状态良好的RAW264.7细胞(1×10^3 个/孔)接种于96孔板中,每孔加入DMEM培养基(含10%胎牛血清、100IU/mL青霉素和100IU/mL链霉素)至200 μ L,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境下孵育过夜。细胞贴壁稳定后,分别加入不同浓度的伊快霉素,使孔中的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid终浓度为1 μ M,3 μ M,和6 μ M,每组设3个复孔,孵育4天。孵育完成后,弃掉上清,每孔加入0.5mg/mL的MTT 100 μ L,在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂继续孵育4h。孵育完成后,弃掉上清,每孔加入DMSO溶液150 μ L,在微量振荡器上震荡15min,用TECANGENiosPro多功能酶标仪测定570nm波长处的光密度值(OD值),计算各组细胞生存率。

[0064] 结果如图2所示。在加入1 μ M,3 μ M,和6 μ M的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid后,破骨前体RAW264.7细胞存活率未发生显著差异,说明在体外试验中,苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对RAW264.7细胞无细胞毒性。

[0065] (2) CCK-8法检测苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对小鼠骨髓巨噬细胞(BMMs)的生存影响

[0066] a. 小鼠骨髓巨噬细胞(BMMs)的制备:在无菌条件下,取8-12周龄C57BL/6雌性小鼠的股骨,剪断股骨两端的关节部位,用无酚红 α -MEM培养基(含10%胎牛血清、100IU/mL青霉素和100IU/mL链霉素)反复冲洗股骨,直至股骨腔发白。将冲洗出的股骨骨髓腔细胞置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂细胞培养箱孵育2h,吸取上清,用裂解液裂解红细胞,离心,重悬即得BMMs。

[0067] b. CCK-8法检测细胞存活情况:

[0068] 取步骤a制备得到的BMMs(1×10^5 个/孔)于96孔板中,每孔加入无酚红 α -MEM培养基至200 μ L(含10%胎牛血清、100IU/mL青霉素和100IU/mL链霉素),同时每孔加入巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF,终浓度为50ng/mL),然后将96孔板置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的细胞培养箱进行孵育过夜。待细胞贴壁稳定后,分别加入不同浓度的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid,使孔中的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid终浓度为1 μ M,3 μ M,和6 μ M,每组设3个复孔,孵育4天。孵育完成后,弃掉上清(100 μ L),每孔加入5 μ L的CCK-8试剂(Cell Counting Kit-8细胞计数试剂),摇匀,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂环境下继续孵育3h,用TECANGENiosPro多功能酶标仪测定450nm波长处的光密度值(OD值),计算各组细胞生存率。

[0069] 结果如图2所示,在加入1 μ M,3 μ M,和6 μ M的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid后,BMMs细胞存活率未发生显著差异,说明在体外试验中苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对BMMs细胞无细胞毒性。

[0070] 实施例6苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对RANKL诱导的破骨前体RAW264.7和BMMs细胞分化成破骨细胞的影响

[0071] RANKL诱导的破骨前体BMMs细胞分化抑制活性测定主要参考文献(British

Journal of Pharmacology, 2020, 177: 4242-4260)。

[0072] (1) 苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对RAW264.7细胞分化成破骨细胞的影响

[0073] 取生长状态良好的RAW264.7细胞(1×10^3 个/孔)接种于96孔板中,在37℃、5%CO₂环境下孵育过夜。细胞贴壁稳定后,分别加入不同浓度的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid,使孔中的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid终浓度为1 μM, 3 μM和6 μM,每组设3个复孔,孵育4h。加入RANKL(终浓度为100ng/mL),每两天换一次液,培养4-5d。对孵育完成的细胞进行TRAP染色,在倒置显微镜下拍照并计数,其中细胞核大于3个的TRAP阳性细胞即为破骨细胞。

[0074] 结果如图3所示,苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid在3 μM有效浓度时即可发挥抑制作用,而4-butoxy-benzeneacetic acid有效浓度达到6 μM时能显著抑制RANKL诱导RAW264.7破骨前体细胞生成破骨细胞。

[0075] (2) 苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对BMMs分化成破骨细胞的影响

[0076] 取上述步骤a制备得到的BMMs(2×10^4 个/孔)于96孔板中,每孔加入无酚红α-MEM培养基至200 μL(含10%胎牛血清、100IU/mL青霉素和100IU/mL链霉素),同时每孔加入巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF,终浓度为50ng/mL),然后将96孔板置于37℃、5%CO₂的细胞培养箱进行孵育过夜。待细胞贴壁稳定后,分别加入不同浓度的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid,使孔中的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid终浓度为1 μM, 3 μM和6 μM,每组设3个复孔,孵育4h。孵育完成后,加入RANKL(终浓度为100ng/mL),培养3-4d。对孵育完成的细胞进行TRAP染色,在倒置显微镜下拍照并计数,其中细胞核大于5个的TRAP阳性细胞即为破骨细胞。

[0077] 结果如图4所示,苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid能显著抑制RANKL诱导BMMs生成破骨细胞。在3 μM有效浓度时即可显著抑制RANKL诱导BMMs破骨前体细胞生成破骨细胞。

[0078] 综合上述结果,苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid体外能显著抑制破骨细胞的生成和活化,且无明显细胞毒性。

[0079] 实施例7苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对破骨细胞相关卵巢切除骨质疏松小鼠Micro-CT骨破坏、骨参数、破骨细胞相关指标等表达的影响

[0080] 雌性10周龄C57BL/6小鼠30只,随机分为2组:假手术组6只,卵巢切除组24只。以10%水合氯醛溶液80 μL/只的剂量腹腔注射麻醉,由背侧入,完整摘除双侧卵巢,止血缝合。假手术组只切除少量脂肪组织。术后肌注青霉素生理盐水2万U/kg,连用3天,饲养一周后,将去卵巢小鼠随机分为4组。(1)假手术组(sham组):给予等量的注射用生理盐水;(2)去卵巢小鼠组(OVX+Vehicle组或简称OVX组):给予等量的注射用生理盐水;(3)苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid 5mg/kg组(OVX+BBA 5mg/kg组):灌胃给予4-butoxy-benzeneacetic acid 5mg/kg;(4)苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid 10mg/kg组(OVX+BBA 10mg/kg组):灌胃给予4-butoxy-benzeneacetic acid 10mg/kg;(5)阳性药对照组(OVX+雌二醇0.02mg/kg组或简称Ez 0.02mg/kg组):皮下注射给予雌二醇0.02mg/kg。阳性药与药物组每天给药1次。连续给药12周后。摘眼球取血,制备血清样品,处死后,取

小鼠右后肢,浸泡于福尔马林中,用ZKKS小动物Micro-CT扫描仪进行CT扫描,3D建模及相关骨参数分析。取小鼠左后肢固定、包埋、切片后用于HE染色和TRAP破骨细胞染色。

[0081] 通过Micro-CT分析小鼠的影像学特征,我们可以看到苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid能逆转卵巢切除所致骨质疏松骨破坏的程度,使小鼠股骨的骨量明显增加(图5),小鼠股骨骨参数的定量分析的结果也表明苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid使小鼠股骨的连接厚度ConnD、骨小梁厚度Th.Tb明显增多,单位体积骨组织的面积大小BS/BV减少,尤其是高剂量的苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid与阳性对照雌二醇药物表现出一致的作用(图6)。

[0082] HE染色结果也进一步证实了苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对卵巢切除所致骨质疏松骨破坏的保护作用(图7),降低破骨细胞在骨片上形成的骨凹陷面积,此外卵巢切除模型组的破骨细胞数量明显增多(图7),而无论是苯乙酸类化合物的高剂量组还是低剂量组的破骨细胞数量均明显减少,尤其是高剂量组,破骨细胞的数量与阳性对照组相当(图7和图8)。所以无论是静态参数还是动态参数都证实了苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid在体内通过抑制破骨细胞对卵巢切除所致骨质疏松小鼠的骨破坏具显著保护作用。

[0083] 结果讨论:苯乙酸类化合物4-butoxy-benzeneacetic acid对LPS诱导的NF- κ B荧光素酶具显著抑制作用,且在6 μ M浓度下能显著抑制RANKL诱导的破骨前体RAW264.7细胞和BMMs细胞分化成破骨细胞,且无明显毒性作用。体内进而通过抑制破骨细胞对卵巢切除所致骨质疏松小鼠的骨破坏具保护作用,能有效替代现有的双磷酸盐药物及地诺昔单抗,抑制破骨细胞的骨吸收活性。可以作为新型破骨细胞分化抑制剂或NF- κ B核因子表达抑制剂进行开发,用于防治骨质疏松症等骨溶性疾病。

[0084] 综上,本发明为研制新型破骨细胞分化抑制剂或NF- κ B核因子表达抑制剂药物提供了新的候选化合物,对中国自主知识产权的新药开发具有重要的意义。

[0085] 上述说明是针对本发明较佳可行实施例的详细说明,但实施例并非用以限定本发明的专利申请范围。凡本发明所提示的技术构思下所完成的同等变化或修饰变更,均应属于本发明所涵盖专利范围。

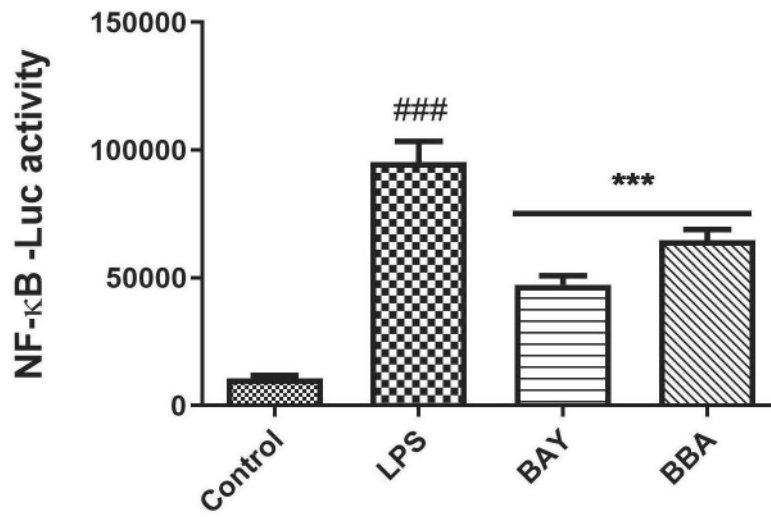


图1

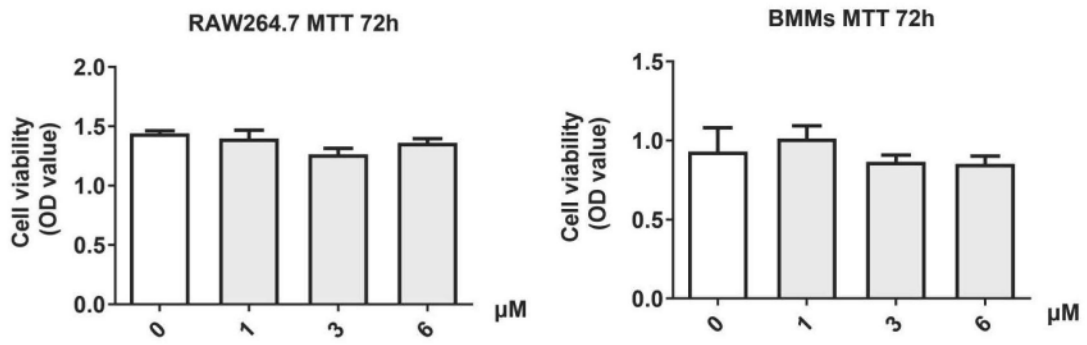


图2

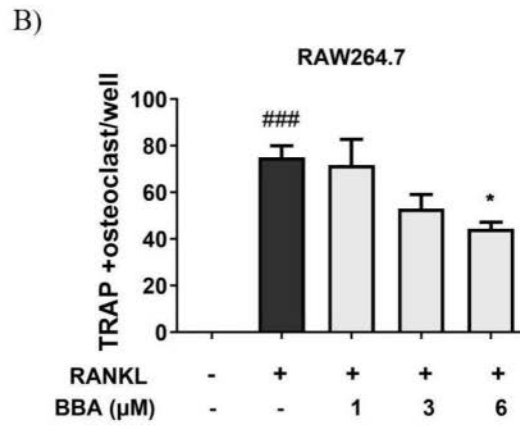
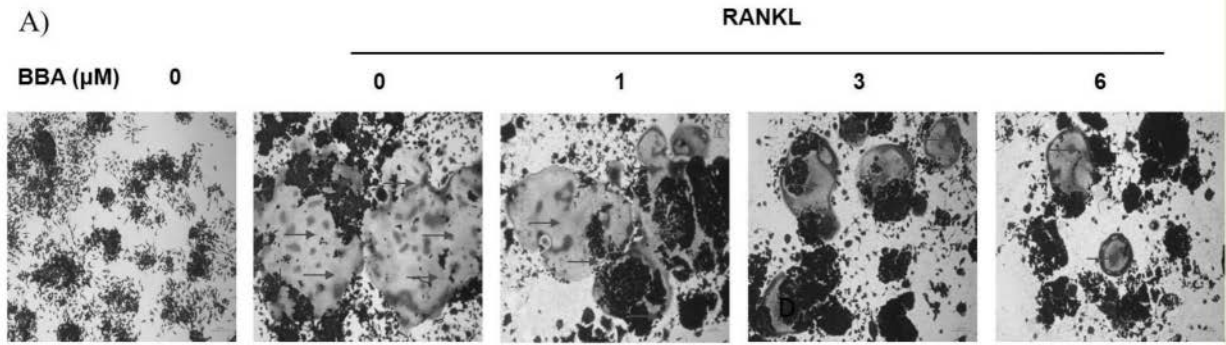


图3

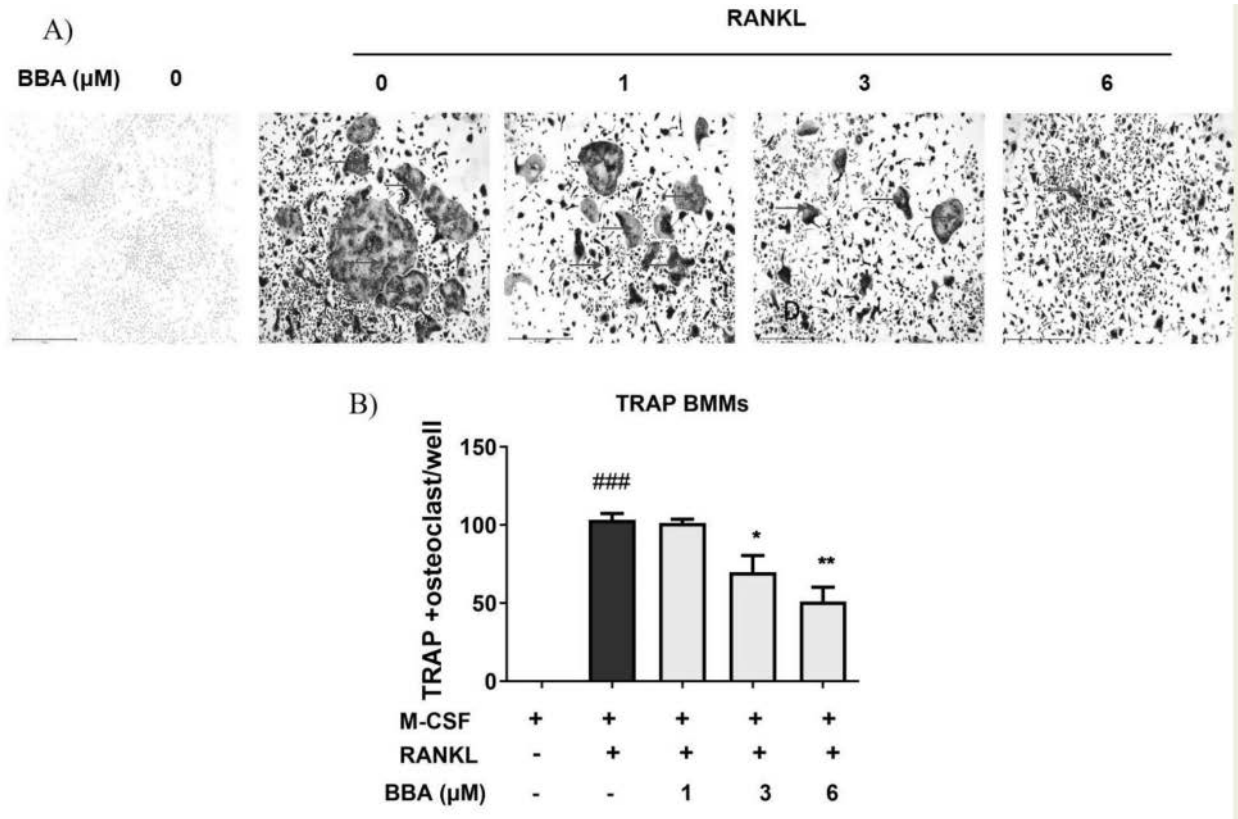


图4

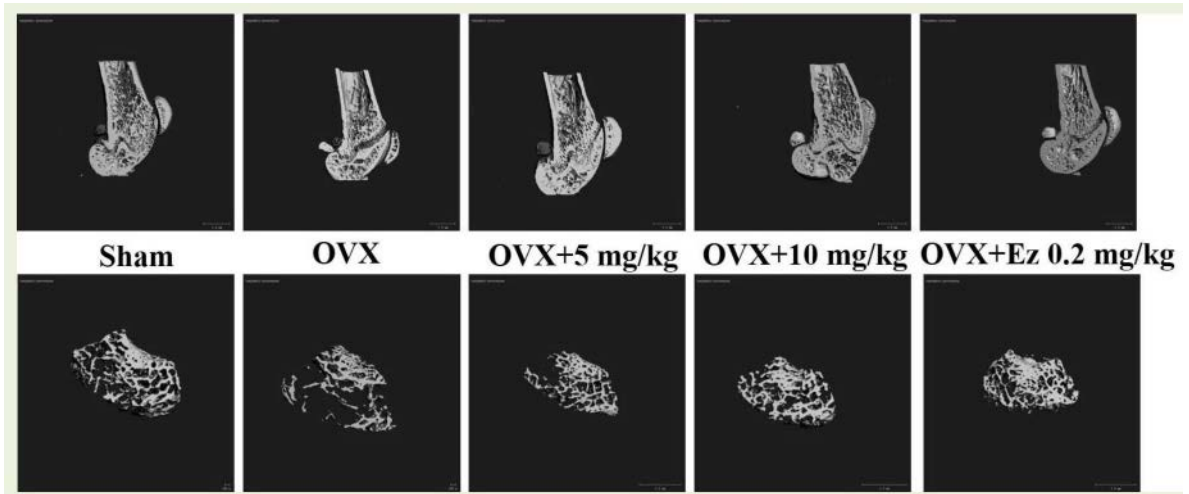


图5

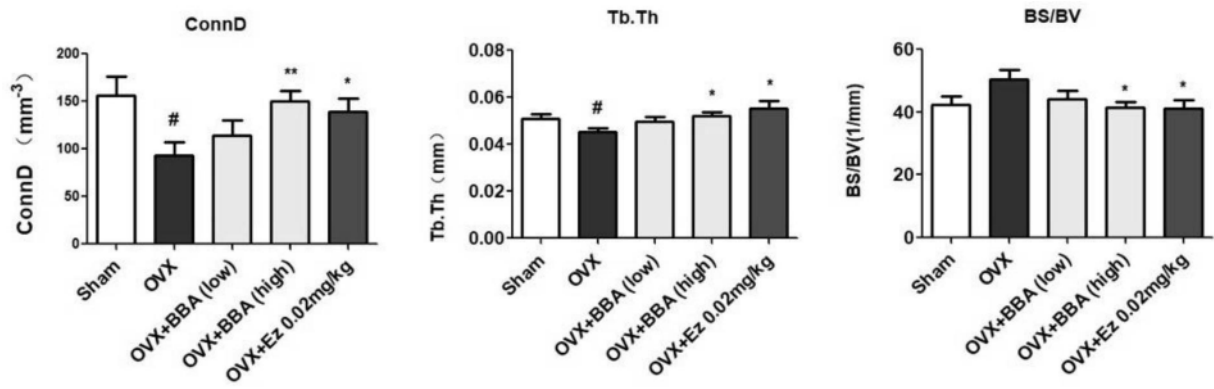


图6

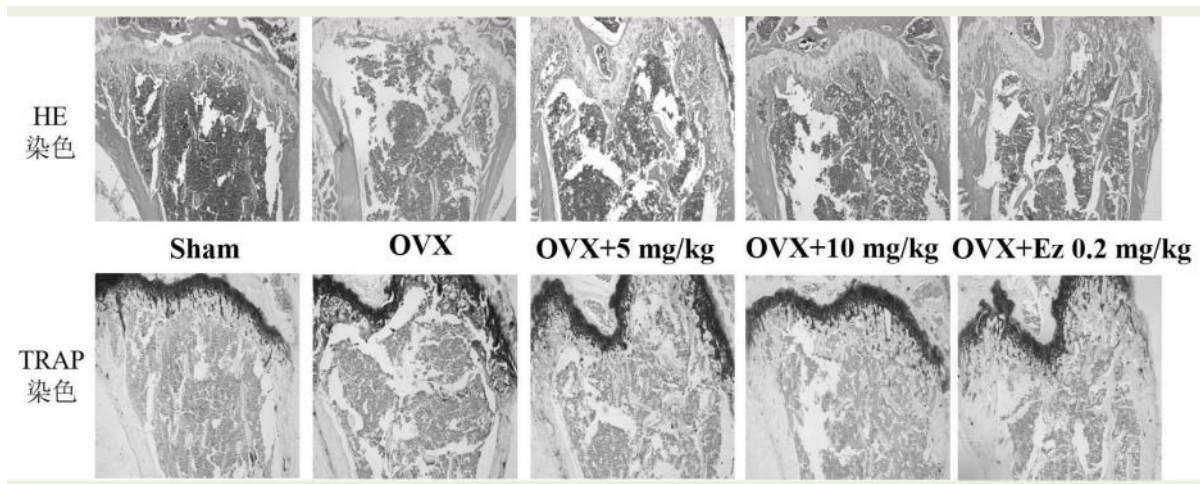


图7

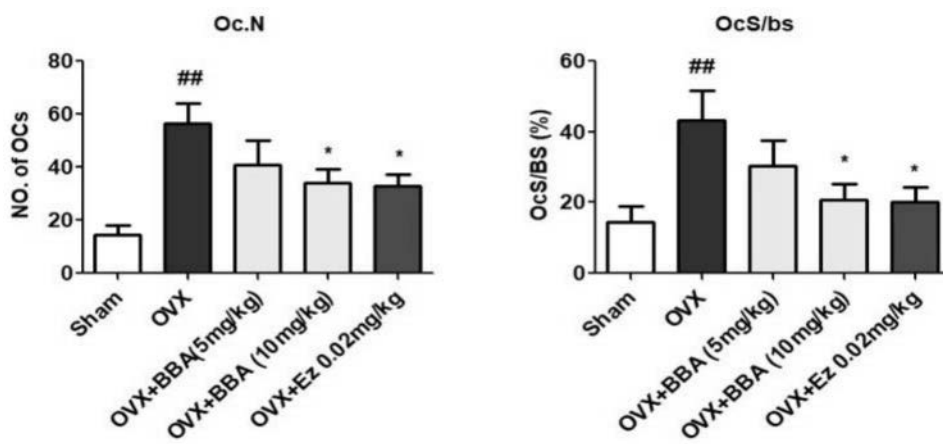


图8