



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107115335 B

(45)授权公告日 2019.11.19

(21)申请号 201610102211.5

A61P 19/08(2006.01)

(22)申请日 2016.02.24

A61P 35/00(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

A61P 35/04(2006.01)

申请公布号 CN 107115335 A

C07D 311/32(2006.01)

C07D 311/40(2006.01)

(43)申请公布日 2017.09.01

A23L 33/10(2016.01)

(73)专利权人 香港理工大学深圳研究院

(56)对比文件

地址 518000 广东省深圳市南山区高新技术产业园南区粤兴一道18号香港理工大学产学研大楼205室

Xin-Luan Wang.Osteogenic effects of flavonoidaglycones from an osteoprotective fraction of *Drynariafortunei* - An in vitro efficacy study.《Phytomedicine》.868- 872,2011,第18卷

专利权人 暨南大学

Xin-Luan Wang.Osteogenic effects of flavonoidaglycones from an osteoprotective fraction of *Drynariafortunei* - An in vitro efficacy study.《Bone》.2010,第47卷第S405页.

(72)发明人 黄文秀 姚新生 邱佐成 董晓莉 戴毅

(74)专利代理机构 深圳中一专利商标事务所 44237

代理人 张全文

(51)Int.Cl.

A61K 31/352(2006.01)

A61P 19/02(2006.01)

A61P 19/10(2006.01)

审查员 姜晖

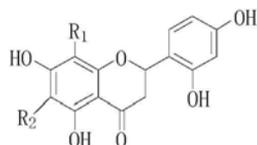
权利要求书2页 说明书14页 附图7页

(54)发明名称

异戊烯基二氢黄酮类化合物在防治骨疾病领域的应用

(57)摘要

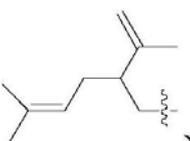
本发明适用于天然药物领域,提供了一种具有下述式I结构的异戊烯基二氢黄酮化合物,在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,



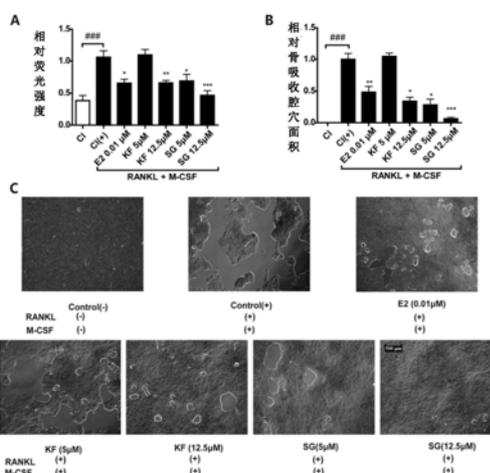
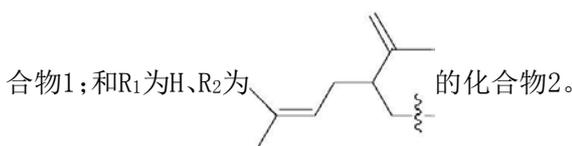
其中,所述异戊烯基二氢

式 I

黄酮化合物包括R1为

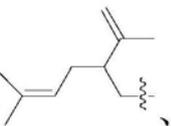


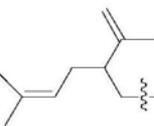
R2为H的化



1. 一种具有下述式I结构的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,



其中,所述异戊烯基二氢黄酮化合物包括R₁为  R₂为H的化合物1;和R₁为H、R₂

为  的化合物2。

2. 如权利要求1所述的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,其特征在于,所述异戊烯基二氢黄酮化合物通过抑制Cathepsin K活性在制备骨疾病防治药物和保健品中应用。

3. 如权利要求1所述的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,其特征在于,所述骨疾病为骨质疏松疾病。

4. 如权利要求1-3任一所述的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,其特征在于,所述药物为包括所述化合物1和/或所述化合物2的药物组合物,所述保健品中含有所述化合物1、所述化合物2中的至少一种。

5. 如权利要求4所述的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,其特征在于,所述药物组合物含有医药上可接受的其他载体。

6. 如权利要求1-3任一所述的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,其特征在于,所述异戊烯基二氢黄酮化合物通过对骨碎补进行提取获得。

7. 如权利要求6所述的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,其特征在于,通过骨碎补提取所述异戊烯基二氢黄酮化合物的方法,包括以下步骤:

提供骨碎补,使用乙醇水溶液加热回流获得提取液,将所述提取液进行干燥、浓缩处理得到浸膏,其中,所述乙醇水溶液中,乙醇的体积百分含量为55-65%;

采用大孔吸附树脂对所述浸膏进行第一梯度洗脱,其中,所述第一梯度洗脱的方法为:依次采用乙醇体积百分比为0、25-35%、45-55%、65-75%、95%的乙醇水溶液进行洗脱,获得各梯度洗脱馏分;

取95%乙醇水溶液的洗脱馏分,采用硅胶柱色谱进行第二梯度洗脱,所述第二梯度洗脱以甲醇-水溶剂体系作为流动相,每1/3柱保留体积收集一份馏分,依次采用体积比50:50的水-甲醇洗脱得到馏分1、体积比35:65的水-甲醇洗脱得到馏分2、体积比25:75的水-甲醇洗脱得到馏分3和馏分4;

将所述馏分3依次采用Sephadex LH-20柱色谱和制备型反向C₁₈高效液相柱色谱进行分离,得到化合物1;

将所述馏分4依次采用Sephadex LH-20柱色谱和制备型反向C₁₈高效液相柱色谱进行分离,得到化合物2。

8. 如权利要求7所述的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,其特征在于,将所述馏分3采用Sephadex LH-20柱色谱进行分离时,流动相为体积比8:2的甲醇-水溶液;和/或

将所述馏分4采用Sephadex LH-20柱色谱进行分离时,流动相为体积比8:2的甲醇-水溶液。

9. 如权利要求7所述的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,其特征在于,将所述馏分3采用制备型反向C₁₈高效液相柱色谱进行分离时,流动相为甲醇体积百分含量为60%的甲醇水溶液;和/或

将所述馏分4采用制备型反向C₁₈高效液相柱色谱进行分离时,流动相为甲醇体积百分含量为60%的甲醇水溶液。

异戊烯基二氢黄酮类化合物在防治骨疾病领域的应用

技术领域

[0001] 本发明属于天然药物领域,涉及异戊烯基二氢黄酮类化合物在防治骨疾病领域的应用,尤其涉及异戊烯基二氢黄酮类化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用。

背景技术

[0002] 骨质疏松症(Osteoporosis,简称OP)是以骨量减少、骨的微细结构破坏为特征的一种全身性代谢性的骨骼疾病,其表现为骨脆性增加,易诱发骨折。据统计,目前全球约2亿人口患有骨质疏松,其发病率在常见病、多发病中列第7位;国家卫生部2002-2005年关于骨质疏松症的调查结果显示,在我国骨质疏松症的患病率为8.8%,名列中国居民慢性病患病率的第三位。目前,50岁以上人群中约有6944万人患有骨质疏松症,每年有近68.7万人因此发生髌部骨折;随着人口老龄化,预计到2020年,我国骨质疏松症患者将增至2.866亿人,髌部骨折人数将达163.82万人。因此针对骨质疏松开展药物研发具有重大的医疗及社会经济学价值。骨质疏松的发病过程最终都与骨重建的失调有关,骨重建是指骨在成熟后仍不断进行的更新与改造,依赖于骨骼代谢中骨吸收(Bone resorption)和骨形成(Bone formation)的动态平衡。骨吸收是由破骨细胞(Osteoclast)介导的骨质分解代谢活动,骨形成是由成骨细胞(Osteoblast)介导的骨质合成代谢活动。骨重建是成熟骨组织骨转换的细胞与形态学基础,具有预防骨组织疲劳和微损伤的积累、保持其正常生物力学功能的作用。正常的情况下,骨骼维持在健康状态,然而一旦骨重建的动态平衡被打破,骨吸收超过了骨形成的话,就导致了骨质疏松疾病的发生。

[0003] 目前,临床上治疗骨质疏松的药物主要采用如雌激素替代疗法、选择性雌激素受体调节剂、双磷酸盐类等,也有一些中成药制剂开始应用于临床,如骨疏康胶囊、仙灵骨葆胶囊等。这些药物能够不同程度地预防和治疗骨质疏松症,缓解疼痛,降低骨折发生率,但是这些药物也存在疗效不确切以及不良反应、价格昂贵等问题。因此,骨质疏松症领域的药物研发工作者致力于针对骨质疏松疾病发生过程中其他新颖靶标开展药物研发,希望能寻找出新的、疗效确切、毒副作用低、容易获得的骨质疏松症预防及治疗药物。

[0004] Cathepsin K是一种溶酶体半胱氨酸蛋白激酶,作为直接参与骨吸收过程中骨基质降解的主要酶,其能选择性地破骨细胞中大量表达,在骨的重塑过程中,由单核的前体细胞诱导分化成的成熟的多核破骨细胞首先粘附于骨基质表面,形成一个密闭的骨吸收腔隙,并由H⁺ATP酶酸化产生酸性(PH=4.5-4.8)微环境,在酸性环境下Cathepsin K前体会自动降解自身前段肽从而形成活化的Cathepsin K,其直接参与降解骨有机质中占95%以上的I型胶原蛋白、骨桥蛋白和骨连接素,导致骨表面孔状结构的形成,其与多种疾病的发生都有直接关系,如类风湿性关节炎,骨关节炎及骨质疏松,骨肿瘤的浸润与转移等。近年来针对该靶点的抑制剂发现也逐渐成为一个热点。目前已有的Cathepsin K抑制剂主要分为两类,可逆型抑制剂和非可逆型抑制剂,可逆型抑制剂主要包括脂肪族类、环酮类、醛类和腈类;非可逆型主要包括环氧琥珀酸衍生物、 β -内酰胺、乙烯基砷和酰肼类等,由于腈类小分子具有较好的抑制活性且相对稳定,对其研究报道也相对较多。已经进入临床阶段的

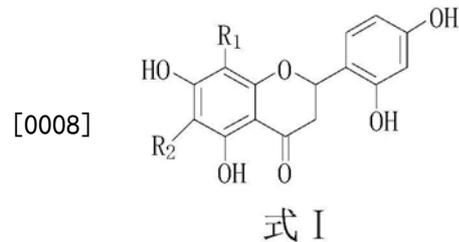
Cahepsin K抑制药物主要是一些人工合成类化合物如Odanacatib、ONO-5334、Baticatib等,其中Odnacatib已经进入临床Ⅲ期研究阶段,有潜力成为第一个上市的Cathepsin K抑制剂用于治疗骨质疏松症等相关骨疾病。而其他两个药物由于在临床试验中出现皮肤病的不良反应或者基于市场竞争考虑中止了临床实验,所以目前尚未有成熟的Cathepsin K抑制剂发展成为药物上市,因此对Cathepsin K抑制剂开展研究仍然具有较大的空间。

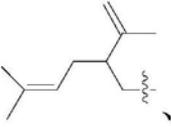
[0005] 而从天然药物如传统治疗骨疾病中药中寻找具有Cathepsin K抑制活性的化合物比起人工合成的抑制剂在用药安全性、资源可利用性方面具有更大的优势。中药治疗骨病已经有数千年历史,其中骨碎补作为临床上常用治疗骨疾病的中药之一疗效显著。骨碎补为水龙骨科植物槲蕨[Drynaria fortuneae (Kunze) J.Sm]的干燥根茎,中国、韩国都有大量关于其化学及药理活性研究报道。不过对于骨碎补中单体成分的化学研究如分离、鉴定虽然很多,但是药理研究尤其是作用机制方面的研究都不够深入,大多数关于骨碎补的活性报道主要是针对骨碎补粗提取物。然而由于骨碎补粗提物包含复杂多样的化学成分,其作用机制大多不明确,如果直接用骨碎补的粗提取物作为治疗药物的话可能存在疗效、副作用不明确,质量控制困难等风险。因此,从骨碎补含有的大量单体成分中筛选出化学结构明确,并具有Cathepsin K抑制活性的单体化合物显得尤为重要。

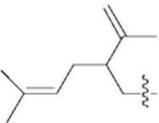
发明内容

[0006] 为了解决上述现有技术中存在的不足,本发明提供了一种具有式I结构的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用。

[0007] 本发明是这样实现的,一种具有下述式I结构的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,



[0009] 其中,所述异戊烯基二氢黄酮化合物包括R₁为 R₂为H的化合物1;和R₁

为H、R₂为的化合物2。

[0010] 本发明提供了两个天然来源的异戊烯基二氢黄酮类化合物(化合物1、化合物2)的新用途。本发明具有式I结构的异戊烯基二氢黄酮化合物(化合物1、化合物2)不仅在未见细胞毒活性的浓度下对骨吸收过程关键靶点蛋白Cathepsin K具有较好的抑制活性(IC₅₀值分别为8.797μmol/L和27.24μmol/L),而且对破骨细胞的成熟、分化具有不同程度的抑制作用,此外,在破骨细胞分化成熟后还能通过抑制参与破骨细胞骨吸收功能的催化水解酶Cathepsin K活性来抑制骨吸收腔穴的形成,从而使得所述异戊烯基二氢黄酮化合物(化合

物1、化合物2)能够用作骨疾病防治的药物、食品以及食品添加剂,特别适用于骨质疏松症的防治。本发明提供的两个化合物单独或者形成组合物,可作为药物、保健品(包括食品或食品添加剂)用于骨吸收过度引起的骨疾病特别是骨质疏松症的治疗,此外还能用于其他骨相关疾病如风湿性关节炎,骨关节炎及骨肿瘤的浸润与转移作用的预防及治疗。

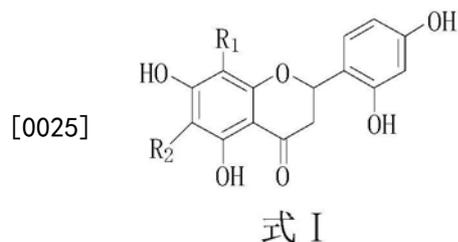
附图说明

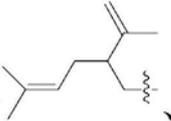
- [0011] 图1是本发明实施例1提供的化合物1以DMSO为溶剂测定的HMBC图谱;
- [0012] 图2是本发明实施例1提供的化合物以DMSO为溶剂测定的2-位碳原子的碳谱图;
- [0013] 图3是本发明实施例1提供的化合物2的H-H COSY图谱(δ 5.03和 δ 2.04相关);
- [0014] 图4是本发明实施例1提供的化合物2的HMBC图谱(δ 5.03分别与 δ 25.9、 δ 17.9相关);
- [0015] 图5是本发明实施例1提供的化合物2的HMBC图谱(δ 1.62、 δ 1.55均分别于 δ 131.9、 δ 128.8相关);
- [0016] 图6是本发明实施例1提供的化合物2的HMBC图谱(δ 1.69与 δ 149.6、 δ 111.3相关);
- [0017] 图7是本发明实施例1提供的化合物2的结构单元图;
- [0018] 图8是本发明实施例1提供的化合物2以DMSO为溶剂的HMBC图谱(5-OH(δ 12.47)与7-OH(δ 10.64)均与A环被取代的季碳(δ 106.7)相关);
- [0019] 图9是本发明实施例2提供的化合物1和化合物2对组织蛋白酶Cathepsin K催化活性结果图;
- [0020] 图10是本发明实施例3提供的化合物1和化合物2对破骨前体细胞即巨噬细胞系RAW264.7细胞的细胞毒活性结果图;
- [0021] 图11是本发明实施例4提供的化合物1、化合物2对于破骨前体细胞分化、成熟影响测试结果图;
- [0022] 图12是本发明实施例5提供的不同浓度下化合物1、化合物2对Cathepsin K蛋白参与的破骨细胞骨吸收作用形成骨吸收腔穴的影响测试结果图。

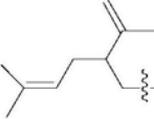
具体实施方式

[0023] 为了使本发明要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白,以下结合实施例,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仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

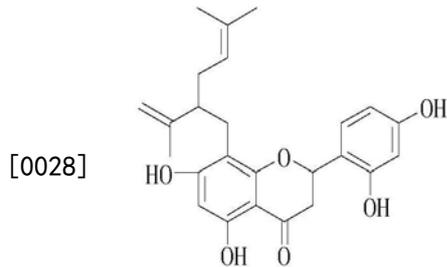
[0024] 本发明实施例提供了一种具有下述式I结构的异戊烯基二氢黄酮化合物在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,



[0026] 其中,所述异戊烯基二氢黄酮化合物包括R₁为  R₂为H的化合物1;和R₁

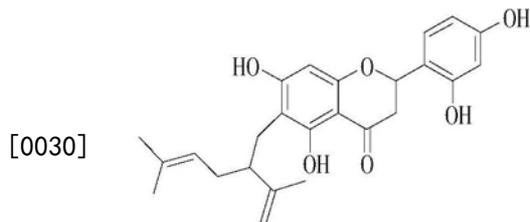
为H、R₂为  的化合物2。

[0027] 具体的,本发明实施例中,所述化合物1为Sophoraflavanone G,其结构如下式II所示,



式II;

[0029] 所述化合物2为Kushenol F,其结构如下式III示,



式III。

[0031] 本发明实施例所述化合物1和所述化合物2促进类成骨细胞分化酶ALP的活性;此外,所述化合物2在雌激素受体阻断剂ICI182、780存在时,其促进ALP的活性被抑制,可见,该活性与雌激素受体作用信号通路相关。但是所述化合物1和所述化合物2对于破骨细胞参与的骨吸收过程的抑制活性,尤其是对参与骨吸收的关键靶点蛋白Cathepsin K的抑制活性,至今仍未见报道。

[0032] 本发明实施例首次提出了所述化合物1和所述化合物2在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,进一步的提出了所述化合物1、所述化合物2通过Cathepsin K抑制活性在制备骨疾病防治药物和保健品中应用,即意味着所述化合物1、所述化合物2可以作为Cathepsin K抑制剂用于骨疾病防治药物和保健品领域。进一步的,本发明实施例所述骨疾病尤其包括骨质疏松疾病,所述保健品包括保健食品或食品添加剂。

[0033] 更进一步地,本发明实施例所述药物为包括所述化合物1和/或所述化合物2的药物组合物,所述保健品中含有所述化合物1、所述化合物2中的至少一种。当然,应当理解,所述药物组合物含有医药上可接受的其他载体。

[0034] 本发明实施例所述化合物1、所述化合物2在制备骨疾病防治药物和保健品中的应用,有望应用于更年期妇女骨质疏松症以及老年性骨质疏松症的预防与治疗,改善由骨吸收过度导致的骨量减少、骨折、骨脆性增加引起的骨质疏松相关症状。

[0035] 相较于人工合成的先导化合物,中药中提取出来的天然产物,更有潜力发展为临床上的安全、有效的单体药物,因此,本发明实施例优选从中药中提取所述化合物1、所述化合物2。进一步的,所述异戊烯基二氢黄酮化合物通过对骨碎补进行提取获得。

[0036] 具体的,通过骨碎补提取所述异戊烯基二氢黄酮化合物的方法,包括以下步骤:

[0037] S01. 提供骨碎补,使用乙醇水溶液加热回流获得提取液,将所述提取液进行干燥、浓缩处理得到浸膏,其中,所述乙醇水溶液中,乙醇的体积百分含量为55-65%;

[0038] S02. 采用大孔吸附树脂对所述浸膏进行第一梯度洗脱,其中,所述第一梯度洗脱的方法为:依次采用乙醇体积百分比为0、25-35%、45-55%、65-75%、95%的乙醇水溶液进行洗脱,获得各梯度洗脱馏分;

[0039] S03. 取95%乙醇水溶液的洗脱馏分,采用硅胶柱色谱进行第二梯度洗脱,所述第二梯度洗脱以甲醇-水溶剂体系作为流动相,每1/3柱保留体积收集一份馏分,依次采用体积比50:50的水-甲醇洗脱得到馏分1、体积比35:65的水-甲醇洗脱得到馏分2、体积比25:75的水-甲醇洗脱得到馏分3和馏分4;

[0040] S041. 将所述馏分3依次采用Sephadex LH-20柱色谱和制备型反向C₁₈高效液相柱色谱进行分离,得到化合物1;

[0041] S042. 将所述馏分4依次采用Sephadex LH-20柱色谱和制备型反向C₁₈高效液相柱色谱进行分离,得到化合物2。

[0042] 具体的,上述步骤S01中,所述骨碎补为水龙骨科植物槲蕨 [*Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm] 的干燥根茎。本发明实施例取骨碎补,使用乙醇水溶液加热回流。为了充分提取其中的活性物质,同时减少后续纯化分离的复杂度,本发明实施例采用55-65%乙醇加热回流提取,具体优选的,采用60%乙醇加热回流提取;回流提纯的提取溶剂用量具体可为骨碎补的6-10倍量。

[0043] 将提取液进行干燥处理,为了提高干燥效率,优选采用减压干燥方式;经干燥、浓缩处理后,得到无醇的浸膏。

[0044] 上述步骤S02中,采用大孔吸附树脂对提取物进行粗分离,具体的,粗分离采用梯度洗脱的方式实现。本发明实施例所述第一梯度洗脱采用乙醇体积百分比为0、25-35%、45-55%、65-75%、95%的乙醇水溶液进行,更具体的采用醇体积百分比为0、30%、50%、70%、95%的乙醇水溶液进行,收集各梯度洗脱液浓缩备用。

[0045] 上述步骤S03中,将95%乙醇水溶液的洗脱馏分进行进一步分离,收集体积比25:75的水-甲醇洗脱。

[0046] 上述步骤S041中,将得到的所述馏分3进行精细分离,依次包括采用Sephadex LH-20柱色谱纯化和反向C₁₈高效液相柱色谱进行制备,得到化合物1,具体优选的,为了获得高纯、高收率的化合物1,将所述馏分3采用Sephadex LH-20柱色谱进行分离时,流动相为体积比8:2的甲醇-水溶液;将所述馏分3采用制备型反向C₁₈高效液相柱色谱进行分离时,流动相为甲醇体积百分含量为60%的甲醇水溶液。

[0047] 上述步骤S042中,将得到的所述馏分4进行精细分离,依次包括采用Sephadex LH-20柱色谱纯化和反向C₁₈高效液相柱色谱进行制备,得到化合物2,具体优选的,为了获得高纯、高收率的化合物2,将所述馏分4采用Sephadex LH-20柱色谱进行分离时,流动相为体积比8:2的甲醇-水溶液;将所述馏分4采用制备型反向C₁₈高效液相柱色谱进行分离时,流动相

为甲醇体积百分含量为60%的甲醇水溶液。

[0048] 本发明实施例从骨碎补中分离纯化得到的所述化合物1、所述化合物2作用于目前骨质疏松比较新颖的靶点Cathepsin K(该靶点能选择性大量表达于破骨细胞中,因此,具有潜在副作用小,靶点确切,作用机制新颖等特点),显示两个化合物能不同程度抑制Cathepsin K活性,从而有助于揭示中药骨碎补临床用于骨疾病治疗的作用机制,从而为其临床用药提供现代科学依据。

[0049] 此外,本发明实施例从骨碎补中分离纯化得到的所述化合物1、所述化合物2,不仅原材料来源广泛,可以实现规模化制备;而且,作为天然药物,其对于人体的安全性和有效性具有优势。此外,所述化合物1、所述化合物2的蛋白以及细胞水平体外活性测试显示,两个化合物具有较好的蛋白活性抑制功能,在细胞水平上也展现出比较显著的抑制破骨细胞分化成熟以及骨吸收作用的活性,为阐明骨碎补治疗骨质疏松症的作用机制以及进一步开发出成分、作用机制确切的预防或治疗骨疾病尤其是骨质疏松药物奠定了基础。因此将其开发治疗骨吸收过度导致的骨质疏松症的药物具有较好的依据。

[0050] 本发明实施例提供了两个天然来源的异戊烯基二氢黄酮类化合物(化合物1、化合物2)的新用途。本发明具有式I结构的异戊烯基二氢黄酮化合物(化合物1、化合物2)不仅在未见细胞毒活性的浓度下对骨吸收过程关键靶点蛋白Cathepsin K具有较好的抑制活性(IC_{50} 值分别为 $8.797\mu\text{Mol/L}$ 和 $27.24\mu\text{Mol/L}$),而且对破骨细胞的成熟、分化具有不同程度的抑制作用,此外,在破骨细胞分化成熟后还能通过抑制参与破骨细胞骨吸收功能的催化水解酶Cathepsin K活性来抑制骨吸收腔穴的形成,从而使得所述异戊烯基二氢黄酮化合物(化合物1、化合物2)能够用作骨疾病防治的药物、食品以及食品添加剂,特别适用于骨质疏松症的防治。本发明提供的两个化合物单独或者形成组合物,可作为药物、保健品(包括食品或食品添加剂)用于骨吸收过度引起的骨疾病特别是骨质疏松症的治疗,此外还能用于其他骨相关疾病如风湿性关节炎,骨关节炎及骨肿瘤的浸润与转移作用的预防及治疗。

[0051] 下面,结合具体实施例进行说明。

[0052] 实施例1

[0053] 化合物1和化合物2的制备方法,包括以下步骤:

[0054] S11.取槲蕨(DF)的根茎50kg,用8倍量60%乙醇加热回流提取2小时,共提取两次,减压蒸发溶剂至37L(取100mL蒸干,减压干燥,称重约10.3g,折合总浸膏(DF)3.8kg取出2000mL蒸干,冷冻干燥,留作动物实验用)。蒸至无醇的流浸膏上大孔树脂($\phi 25 \times 150\text{cm}$);

[0055] S12.依次采用0、30%(v/v)、50%(v/v)、70%(v/v)、95%(v/v)的乙醇水依次洗脱(约200L/梯度),减压回收溶剂的95%乙醇洗脱部分,共得到72g(通过活性筛选显示该部分具有抗骨质疏松活性);

[0056] S13.取95%乙醇洗脱部分15g用ODS柱色谱分离,采用甲醇-水溶剂系统梯度洗脱,洗脱液以每1/3柱保留体积为一份收集,最后得到5个馏分;用水-甲醇按照体积比50:50洗脱得到馏分1;水-甲醇35(340mg):65得到馏分2(380mg);水-甲醇25:75得到馏分3(4.2g)和4(3.7g);水-甲醇15:85得到馏分5(2.1g);

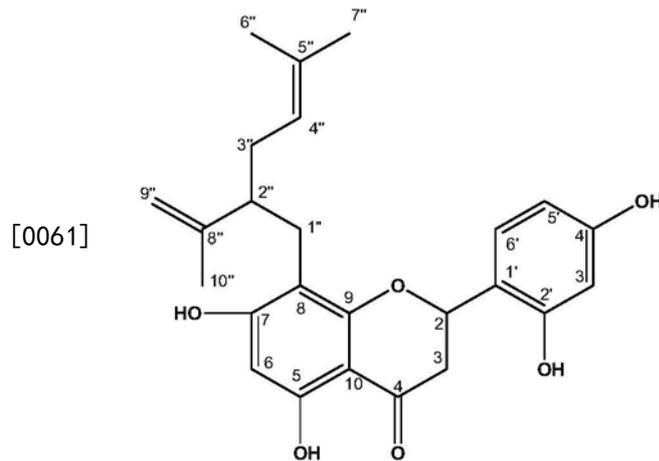
[0057] S141.Sophoraflavanone G的提取与制备工艺:用水-甲醇25:75洗脱得到的馏分3(4.2g)经Sephadex LH-20柱色谱分离,采用甲醇-水8:2洗脱,得到三个子馏分3-1(720mg);3-2(520mg);3-3(60mg),取子馏分3-2(520mg)再经PHPLC(ODS)柱色谱分离,以60%甲醇洗

脱,再在甲醇中结晶得到Sophoraflavanone G (100mg)。

[0058] S142.Kushenol F的提取与制备工艺:用水-甲醇25:75洗脱得到的馏分4 (3.7g)经硅胶柱层析分离,采用甲醇-水8:2洗脱,得到三个子馏分4-1 (80mg);4-2 (100mg);4-3 (13mg),其中取子馏分4-2;4-3再经PHPLC (ODS) 柱色谱分离,以60%甲醇洗脱得到化合物Kushenol F (113mg)。

[0059] 本发明实施例通过理化常识和现代波谱学手段 (UV、IR、MS、NMR) 鉴定了这两个化合物的结构,如下所示:

[0060] 化合物1



[0062] 黄色针状结晶,mp 180-184°C, $[\alpha]_D^{25} -43.3^\circ$ (c=1.0, MeOH)。三氯化铁反应呈阳性,提示有酚羟基存在;盐酸镁粉及四氢硼钠反应呈阳性,提示为二氢黄酮类化合物。ESI-MS (positive and negative) 分别给出m/z 447 $[M+Na]^+$, m/z 423 $[M-H]^-$, 推出化合物的分子量为424。结合¹H-NMR和¹³C-NMR确定化合物的分子式为C₂₅H₂₈O₆, 计算其不饱和度为12。UV图谱 (CH₃OH) 在293nm有最大吸收,提示为二氢黄酮类化合物。以上理化性质均提示化合物属二氢黄酮类。

[0063] 同样差向异构体在核磁图谱上有所表现。¹H-NMR (400MHz, in CD₃OD) 图谱,结合HSQC谱,显示低场区有4个芳香氢信号:δ7.29 (1H, d, J=8.1Hz), 6.35 (1H, d, J=2.4Hz), 6.33 (1H, dd, J=8.1, 2.4Hz), 说明B环为1,2,4-三取代苯环,和5.90 (1H, s), 为A环8或6位特征氢信号;偏低场区有1个连氧次甲基氢信号:δ5.55 (5.50) (1H, dd, J=13.2, 2.8Hz) 为C环2位氢的特征信号;还有烯氢信号:δ5.01 (4.96) (1H, t, J=5.5Hz), 和CH₂=氢信号:δ4.57 (4.53), 4.51 (4.37) (2H), 亚甲基氢信号:δ2.95 (1H, m), 2.71 (1H, m), 为-CH₂-氢信号;在偏高场区还有:δ2.56 (2H, m), 2.44 (1H, m), 2.02 (2H, m);高场区有三组甲基氢信号 (由于存在差向异构体,出现6个甲基信号峰):δ1.62 (CH₃, s), 1.59 (CH₃, s), 1.58 (CH₃, s), 1.552 (CH₃, s), 1.550 (CH₃, s), 1.51 (CH₃, s)。¹³C-NMR (100MHz, in CD₃OD) 共显示25组碳信号,结合DEPT及HSQC图谱,显示低场区有11组SP²杂化的季碳信号:δ199.0为羰基碳信号,166.5 (166.4)、163.2 (163.1)、162.6、159.5 (159.4)、156.6 (156.5)、149.7 (149.3)、132.1 (132.0)、118.6 (118.3)、108.8 (108.6)、103.3 (103.2), 5组SP²杂化的叔碳信号:δ128.6 (128.5)、124.8、107.7、103.3 (103.2)、96.2 (95.3), 1个SP²杂化的CH₂碳信号:δ111.2 (111.1), 此外还有1组连氧次甲基碳信号:δ75.8;高场区有1组次甲基碳信号:δ48.8 (48.3), 3组亚甲基碳信号:δ

43.5 (43.3)、32.8 (32.3)、28.0 (27.9), 和3组甲基碳信号: δ 25.9、19.2 (18.7)、17.9 (17.8)。分析以上核磁数据, 可知结构中同样存在一个lavandulyl基团, 与化合物2为同分异构体, 有一个lavandulyl基的二氢黄酮。DMSO做溶剂测定的HMBC图谱显示5-OH [δ 12.12 (12.11)] 和A环未被取代的叔碳 (δ 95.0) 有相关如图1所示, 因此确定lavandulyl基团的连接在A环的8位。分析以上 ^1H -和 ^{13}C -NMR数据, 以及化合物的理化性质, 确认化合物为含lavandulyl基团的二氢黄酮。与文献报道的sophoraflavanone G数据基本一致, 确定该化合物为sophoraflavanone G。结合二维图谱, 氢谱和碳谱核磁数据见下表1, 该化合物为首次从该属植物中分离得到。

[0064] 表1

[0065]

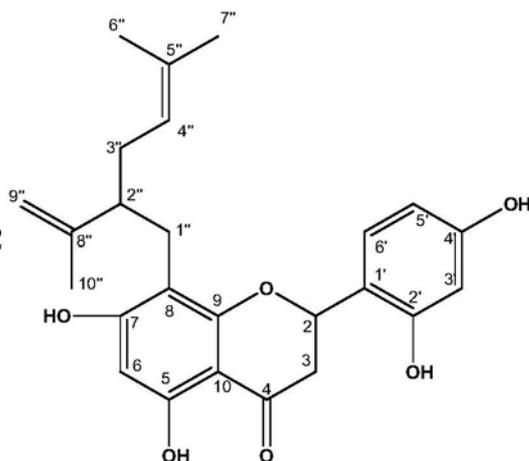
位置	化合物 1 (in CD_3OD)	
	δ_{H}	δ_{C}
2	5.55(5.50) (1H, dd, $J = 13.2, 2.8$ Hz)	75.8
3	2.95(1H, m), 2.71(1H, m)	43.5(43.3)
4		199.0
5		163.1(163.1)
6		108.8(108.6)
7		166.5(166.4)
8	5.90(1H, s)	108.8(108.6)
9		162.6
10		103.3(103.2)
1'		118.6(118.3)
2'		156.6(156.5)
3'	6.35 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)	103.4

[0066]

4'		159.5(159.4)
5'	6.33 (1H, dd, $J=8.1, 2.4$ Hz)	107.7
6'	7.29 (1H, d, $J=8.1$ Hz)	128.6(128.5)
1''	2.56(2H,m)	28.0(27.9)
2''	2.44(1H, m)	48.8(48.3)
3''	2.02 (2H, m)	32.8(32.3)
4''	5.01(4.96) (1H, t, $J=5.5$ Hz)	124.8
5''		132.1(132.0)
6''	1.59 (CH ₃ , s), 1.58(CH ₃ ,s)	25.9
7''	1.550(CH ₃ ,s), 1.51(CH ₃ ,s)	17.9(17.8)
8''		149.7(149.3)
9''	4.57(4.53), 4.51(4.37) (2H)	111.2(111.1)
10''	1.62(CH ₃ ,s), 1.552(CH ₃ ,s)	19.2(18.7)

[0067] 分析化合物2和化合物1的核磁共振图谱可知, lavandulyl基团在8位取代时, 离2-位手性中心较近, 使差向异构更加明显: 化合物1在氘代甲醇做溶剂是, 两种异构体的化学位移几乎完全重合, 仅在DMSO做溶剂的时候, 2-位碳原子有轻微裂分, 如图2所示; 而化合物1在氘代甲醇做溶剂时, 两种构型的化合物的化学位移有较明显区别。

[0068] 化合物2



[0069] 黄色针状结晶, mp 120-123 °C, $[\alpha]_D^{25} -49.8^\circ$ ($c=1.0, \text{MeOH}$)。三氯化铁反应呈阳性, 提示有酚羟基存在; 盐酸镁粉及四氢硼钠反应呈阳性, 提示为二氢黄酮类化合物。ESI-MS (positive and negative) 分别给出 m/z 447 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, m/z 423 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。推出化合物的分子量为424。结合¹H-NMR和¹³C-NMR确定化合物的分子式为C₂₅H₂₈O₆, 计算其不饱和度为12。UV图谱 (CH₃OH) 在293nm有最大吸收, 提示为二氢黄酮类化合物。以上理化性质均提示化合物属二氢黄酮类。

[0070] 同样二氢黄酮2位存在手性中心,从生合成途经有R,S两种构型,在普通HPLC不能得以分离,在核磁数据中得以体现,如图2所示。¹H-NMR (400MHz, in CD₃OD) 图谱,结合HSQC谱,显示低场区有4个芳香氢信号:δ7.22 (1H,d,J=8.9Hz),6.33 (1H,dd,J=8.9,2.4Hz),6.32 (1H,d,J=2.4Hz),说明B环为1,2,4-三取代苯环,和5.92 (1H,s),为A环8或6位特征氢信号;偏低场区有1个连氧次甲基氢信号:δ5.57 (1H,dd,J=13.0,2.9Hz)为C环2位氢的特征信号;还有烯氢信号:δ5.03 (1H,t,J=6.3Hz),和CH₂=氢信号:δ4.59,4.52 (2H),亚甲基氢信号:δ3.04 (1H,dd,J=17.1,13.1Hz),2.68 (1H,dd,J=17.1,3.0Hz),为-CH₂-氢信号;在偏高场区还有:δ2.59 (1H,m),2.52 (1H,m),2.04 (2H,m);高场区有三组甲基氢信号:δ1.69 (3H,s),1.62 (3H,s),1.55 (3H,s)。¹³C-NMR (100MHz, in CD₃OD) 共显示25个碳信号,结合DEPT及HSQC图谱,显示低场区有11个SP²杂化的季碳信号:δ198.5为一个羰基碳信号,166.4、163.0、163.0、159.7、156.4、149.6、131.9、118.1、109.0、103.0,5个SP²杂化的叔碳信号:δ128.8、124.9、107.8、103.4、95.3,1个SP²杂化的CH₂碳信号:δ111.3;此外还有1个连氧次甲基碳信号:δ75.8;高场区有1个次甲基碳信号:δ48.0,3个亚甲基碳信号:δ43.2、32.5、27.7,和3个甲基碳信号:δ25.9、18.9、17.9。H-H COSY图谱(图3)显示δ5.03和δ2.04有偶合相关,δ2.04和δ2.52有偶合相关,得到片断=CH₂-CH₂-CH-,δ4.56和δ18.9有偶合相关;结合HMBC图谱,δ5.03和δ25.9和17.9有HMBC相关(图4),δ1.62和1.55均和δ131.9和128.8有相关(图5);δ2.04和δ149.6和27.7有相关,δ4.56和δ18.9有相关,δ1.69和δ149.6和111.3有相关(图6),连出lavandulyl基团(图7),这是自然界中生合成的取代基,含此取代基的化合物大量存在于苦参属植物中。DMSO做溶剂测定的HMBC图谱显示5-OH(δ12.47)与7-OH(δ10.64)均和A环被取代的季碳(δ106.7)有相关(图8),由此可以确定lavandulyl基团的连接在A环的8位。分析以上¹H-和¹³C-NMR数据,以及化合物的理化性质,确认化合物为含lavandulyl基团的二氢黄酮。与文献报道的Kushenno1 F数据基本一致,确定该化合物为Kushenno1 F。结合二维图谱,氢谱和碳谱核磁数据见下表2。该化合物为首次从该属植物中分离得到。

[0071] 表2

[0072]

position	化合物 2 (in CD ₃ OD)	
	δ_{H}	δ_{C}
2	5.57(1H, dd, $J=13.0, 2.9$ Hz)	75.8
3	3.04(1H, dd, $J=17.1, 13.1$ Hz), 2.68(1H, dd, $J=17.1, 3.0$ Hz)	43.2
4		198.5
5		163.0
6		109.0
7		166.4
8	5.92(1H,s)	95.3
9		163.0
10		103.0
1'		118.1
2'		156.4
3'	6.32(1H, d, $J=2.4$ Hz)	103.4
4'		159.7
5'	6.33(1H, dd, $J=8.9, 2.4$ Hz)	107.8
6'	7.22 (1H, d, $J=8.9$ Hz)	128.8
[0073]		
1"	2.59 (2H, m)	27.7
2"	2.52(1H,m)	48.0
3"	2.04 (2H, m)	32.5
4"	5.03 (1H, t, $J=6.3$ Hz)	124.9
5"		131.9
6"	1.62 (3H, s)	25.9
7"	1.55(3H, s)	17.9
8"		149.6
9"	4.56 (2H, ds)	111.3
10"	1.69 (3H, s)	18.9

[0074] 实施例2

[0075] 实施例1中所得化合物1和化合物2对组织蛋白酶Cathepsin K催化活性的影响。

[0076] 采用Cathepsin K抑制剂筛选试剂盒进行验证,由于Cathepsin K能选择性切断其多肽底物与AFC连接键,从而生成能发出荧光的AFC片段产物,通过检测其降解产物AFC的荧光强度,对测试化合物抑制Cathepsin K蛋白活性进行定量检测。将Cathepsin K (Human Recombinant) 蛋白用反应缓冲液进行溶解,配制成Cathepsin K蛋白溶液,以每孔1 μ l Ctsk蛋白溶液、1 μ l Ctsk反应液、48 μ l反应缓冲液的比例混合均匀加入到黑色96微孔板中。然后加入10 μ l待测试浓度的阳性药化合物FF-FMK以及不同浓度的化合物1(以SG表示)和化合物2(以KF表示),与蛋白混合液混合均匀,室温下孵化15min。

[0077] 将2 μ l的Ctsk与38 μ l Ctsk反应缓冲液混合,配制40 μ l的Ctsk催化底物溶液,分别加入到上述孔中,充分混匀后,将96-孔板与FLUOstar Galaxy荧光酶标仪中,在37 $^{\circ}$ C条件下进行孵化,并通过测试Ex/Em=400/505nm波长的荧光,动态检测30-60min中荧光的变化。最后,选取两个时间点计算其相应的IC₅₀值。

[0078] 结果显示如图9所示,化合物1(以SG表示)和化合物2(以FF表示)在不同程度显示出对Cathepsin K蛋白的抑制活性,其IC₅₀分别为化合物2(IC₅₀:8.797 μ M)、化合物1(IC₅₀:27.24 μ M);阳性对照FF-FMK、化合物1和化合物2的IC₅₀、pIC₅₀值如下表3所示。

[0079] 表3

[0080]

化合物	IC ₅₀	pIC ₅₀
阳性对照(FF-FMK)	0.0471	7.327
化合物 2	8.797	5.056
化合物 1	27.24	4.565

[0081] 实施例3

[0082] 化合物1和化合物2对破骨前体细胞即巨噬细胞系RAW264.7细胞存活的影响

[0083] 以破骨前体细胞巨噬细胞系RAW264.7细胞的细胞增殖活性,评价实施例1中分离得到的化合物1和化合物2对破骨前体细胞存活的影响。

[0084] 将RAW264.7细胞接种于96孔板(1 \times 10⁴细胞/孔),在含有10%FBS(胎牛血清)和1%抗生素的DMEM培养基中进行培养,24小时后(37 $^{\circ}$ C、湿度95%、5%CO₂)。

[0085] 一天后,加入不同浓度的化合物2(5~50 μ M),化合物1(5~50 μ M)、阴性对照组(1%乙醇)并更换成新的培养液,共培养四天,每两天更换一次新的培养液和药物。

[0086] 第四天后,弃掉原配养液,以20:1的比例配制0.2mg/ml 3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-5-(3-羧甲氧基苯)-2-(4-磺苯基)-2H-四唑(金翁,内盐;MTS)与50 μ l/ml吩嗪硫酸二甲酯(PMS)的混合液,然后将MTS并PMS的混合液按照1:5的比例与新鲜培养液混合,按照100 μ l每孔加入到细胞中孵化2个小时,最后在分光光度计490nm出检测OD值。

[0087] 结果如图10所示(纵坐标表示与阴性对照组相比较得到的细胞生长相对比),与阴性对照组相比,化合物1(以SG表示)和化合物2(以FF表示)随着浓度的增加,在浓度达到15 μ M之前未见细胞毒性,随着浓度的进一步增加,化合物逐渐开始显示较强的细胞毒性,并显示出剂量依赖性。因此提示我们在进一步评价化合物对破骨细胞分化、成熟、及相关骨吸收

活性时,应该选择低于15 μ M的浓度。

[0088] 实施例4

[0089] 以RANKL诱导巨噬细胞系RAW264.7分化为成熟多核细胞为例,评价化合物1和化合物2对破骨前体细胞分化、成熟的影响

[0090] 以RANKL诱导单核破骨细胞前体RAW264.7分化为成熟多核破骨细胞活性,评价实施例1中得到的化合物1和化合物2对破骨前体细胞分化的影响,具体实验步骤为:

[0091] 将RAW264.7细胞接种到 3×10^3 细胞/孔接种于96孔板,在含有10%FBS和1%抗生素的DMEM培养基中进行培养,24小时后换成新鲜的去酚红的含有10% cFBS以及1%抗生素的PRF- α -MEM培养液。24小时后去除酚红后,PBS润洗细胞一遍,加入诱导剂M-CSF (30ng/ml), sRANKL (100ng/ml) 以及化合物在实施例2中未见细胞毒性的两个浓度化合物2 (5 μ m, 12.5 μ m), 化合物1 ((5 μ m, 12.5 μ m) 并阳性对照组17 β -estradiol (E2, 10 $^{-8}$ M), 阴性对照组(不加入诱导剂只加入1%乙醇)培养4天,两天换一次药物和培养基。在共计6天的培养后,吸出培养液,用冷的PBS润洗一遍,用4%多聚甲醛溶液固定,最红采用TRAP即抗酒石酸酸性磷酸酶染色,由于诱导产生的成熟多核破骨细胞细胞核能被TRAP染色,通过在显微镜下对分化产生的细胞核数量大于3个的细胞进行细胞计数,就能对破骨细胞分化能力进行定性和初步的定量分析。

[0092] 结果显示见图11,图A中以空白对照组Control (-) 为参照,RANKL诱导组 Control (+) 破骨细胞数量显著增加,雌二醇 (E2, 10 $^{-8}$ M) 阳性对照组具有一定抑制破骨细胞产生的作用,化合物1、化合物2对于多核破骨细胞生成数量都表现出抑制作用,并且随着浓度的进一步增加,在高浓度的时候抑制作用更加明显;图B是对破骨细胞分化指标酶TRAP的活性测试,其结果与多核破骨细胞的趋势相同,两个化合物都表现出对其分化酶TRAP活性的抑制作用,并且高浓度比低浓度活性更强,提示两个化合物对于RANKL诱导的巨噬细胞系RAW264.7分化为多核成熟破骨细胞具有明显的抑制作用;图C是显微镜低倍镜下拍摄的细胞形态学变化图片,染色较深、细胞体积较大的为分化成熟的多核破骨细胞,可以直观观察到Control (-) 全部为单核体积较小的前体细胞,未观察到多核破骨细胞出现。而与Control (-) 相比较,加入RANKL的对照组Control (+) 诱导出大量多核破骨细胞,阳性药对照组雌二醇 (E2, 10 $^{-8}$ M) 相对于Control (+) 组来看,多核破骨细胞具有一定数量的减少。化合物1在低浓度给药下观察到虽然多核破骨细胞数量减少不明显,但是单个多核破骨细胞的体积却显著变小,而在高浓度下作用更明显,几乎未见多核破骨细胞出现。化合物2在高、低两个浓度作用下观察到成熟多核破骨细胞数量减少和单个细胞体积变小,且也是浓度较高时抑制效果几乎实现完全抑制。

[0093] 实施例5

[0094] 化合物1和化合物2对Cathepsin K蛋白参与的破骨细胞骨吸收作用形成骨吸收腔穴的影响

[0095] 在实施例1中化合物1和化合物2显示出对骨吸收关键蛋白Ctsk的较好抑制活性,因此我们进一步以RAW264.7细胞系评估了其对Ctsk参与的骨吸收腔隙形成的影响。测试采用商业购买的骨吸收荧光测试试剂盒进行,首先将500 μ l 荧光硫酸软骨素标记加入到磷酸钙涂层24孔板中37 $^{\circ}$ C 孵化两小时,然后将RAW264.7细胞接种于的磷酸钙涂层24孔板中(104细胞/孔),在含有10%FBS (胎牛血清) 的 α -MEM培养液中进行培养(37 $^{\circ}$ C、湿度95%、5%

CO₂)。在细胞贴壁后,随即加入sRANKL (100ng/ml) and M-CSF (30ng/ml) 两个诱导剂培养3天,从而将单核的RAW264.7诱导为成熟的多核破骨细胞。3天后,分别加入不同浓度的化合物2 (5 μ M, 12.5 μ M)、化合物1 (5 μ M, 12.5 μ M)、赋形剂(1%的乙醇)以及阳性对照药E2 (10 μ M, 雌二醇)于培养液中,继续培养3天。在共计6天的培养后,分别从每个培养孔中取100 μ l培养液转移到黑色96孔板中,与50 μ l骨吸收测试缓冲液混合均匀后,测试Ex485nm/Em535波长下的荧光强度,从而定量测试化合物对骨吸收腔穴形成的抑制情况。

[0096] 加入5%次氯酸钠溶液于每个孔中,从而杀死贴壁的多核破骨细胞,采用ddH₂O冲洗多次,干燥后在显微镜下拍照,获取骨吸收腔穴照片,并采用图像处理软件Image-Pro plus 6.0定量分析骨吸收形成腔穴的面积。

[0097] 结果如图12所示,该图显示了不同浓度下化合物对骨吸收腔穴形成相关的荧光涂层降解的影响(图A)及对骨吸收腔穴的统计学、形态学的影响(图B和图C)。结果显示:以空白组作为对照,RANKL诱导组底物降解产生荧光强度显著增加,雌二醇阳性对照组显著降低,化合物2在浓度为5 μ M时,未见荧光强度减弱,12.5 μ M时表现出明显的荧光底物降解抑制活性。化合物1在5 μ M和12.5 μ M两个浓度都表现出较好的抑制活性,且高浓度抑制活性更强。对破骨细胞吸收腔穴分析与底物降解的荧光强度分析结果一致,空白对照组未见吸收腔穴形成,RANKL诱导组产生了大量吸收腔穴,雌二醇阳性对照组吸收腔穴大小和面积显著减小。化合物2在5 μ M时,未表现出抑制活性,12.5 μ M浓度下几乎能完全抑制。化合物1在两个测试浓度都表现出极强的抑制活性,在12.5 μ M时几乎能完全抑制吸收腔穴的产生,提示这两个化合物对于破骨细胞的骨吸收活性具有显著的抑制作用,而且这种抑制作用与靶点蛋白Cathepsin K具有紧密联系。

[0098] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

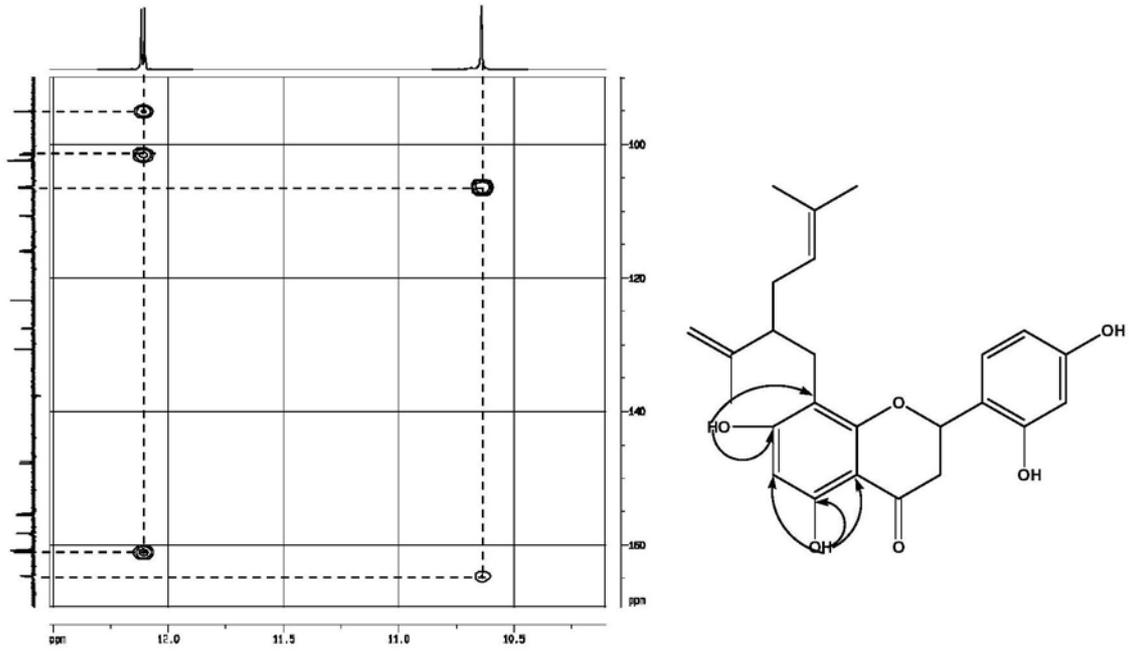


图1

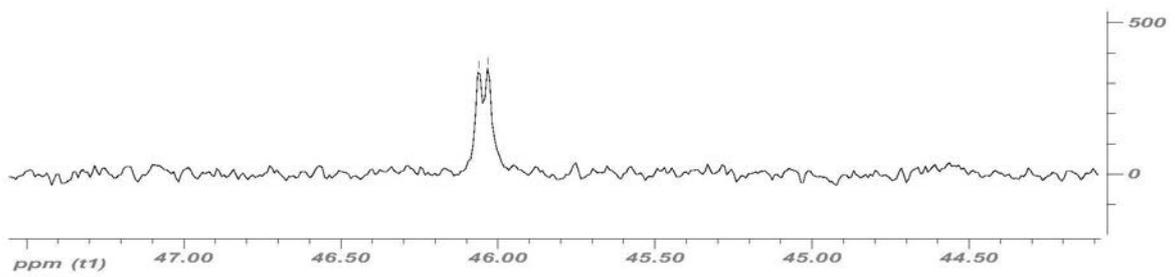


图2

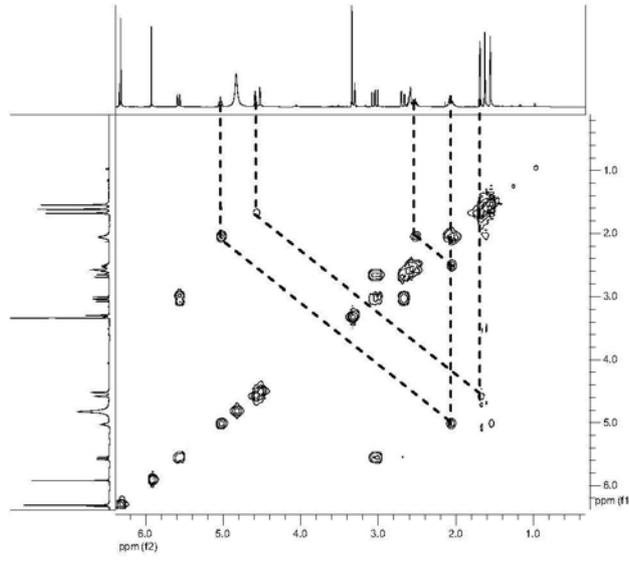


图3

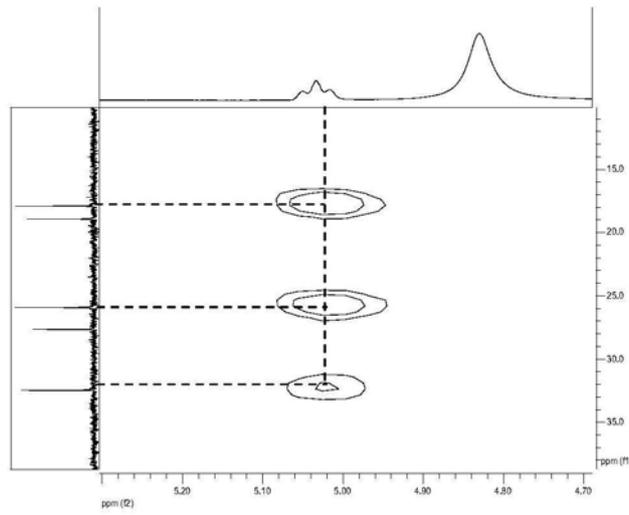


图4

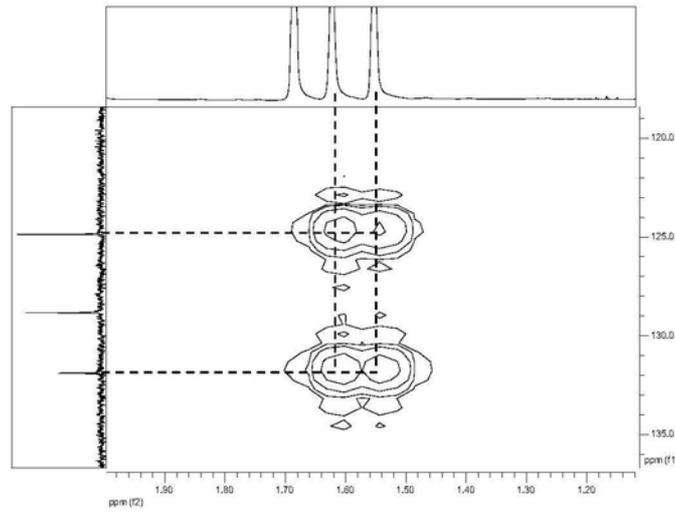


图5

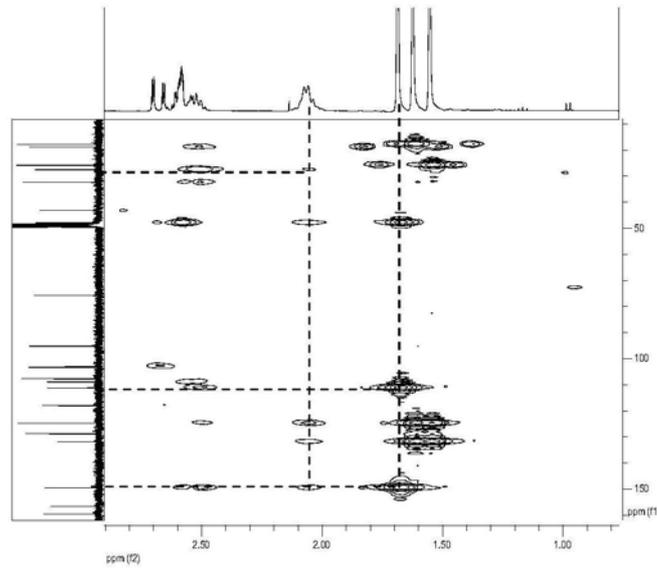


图6

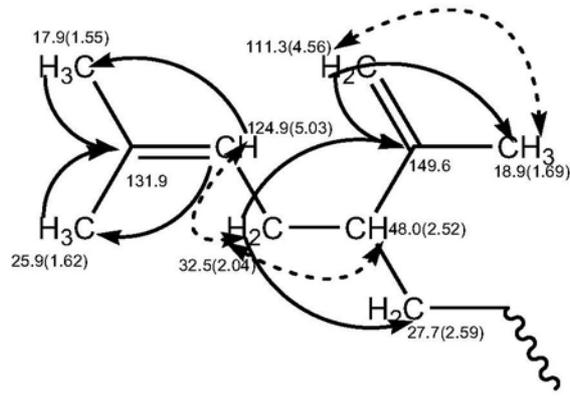


图7

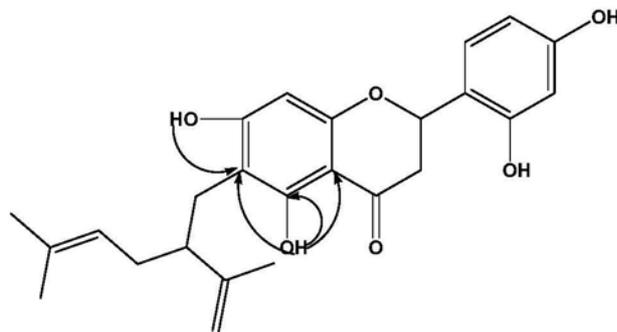
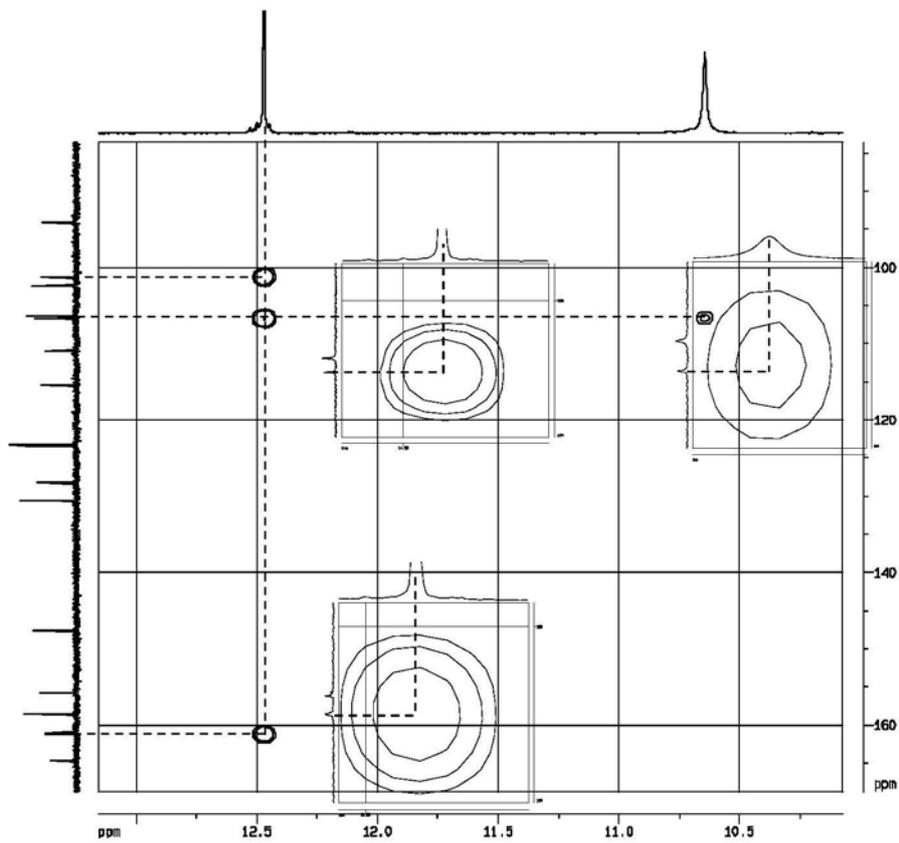


图8

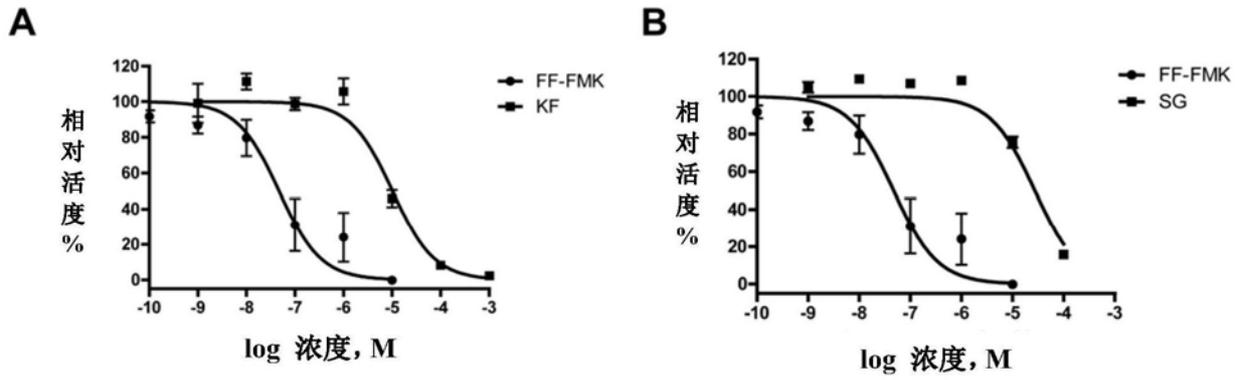


图9

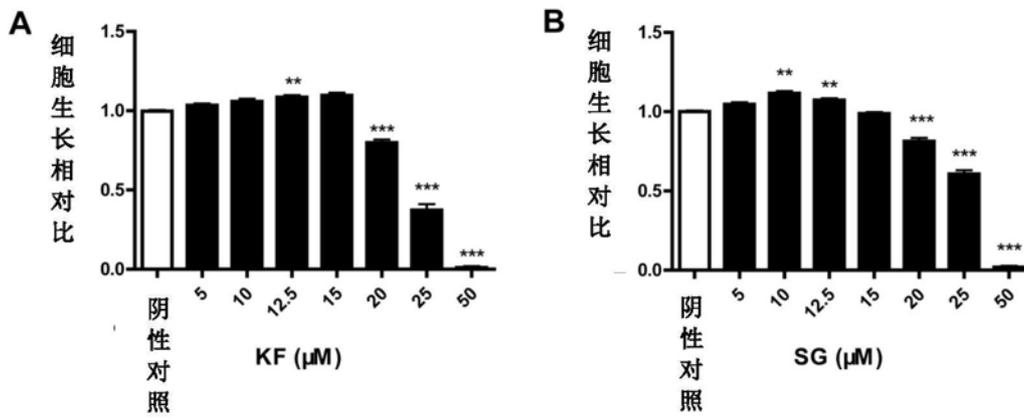


图10

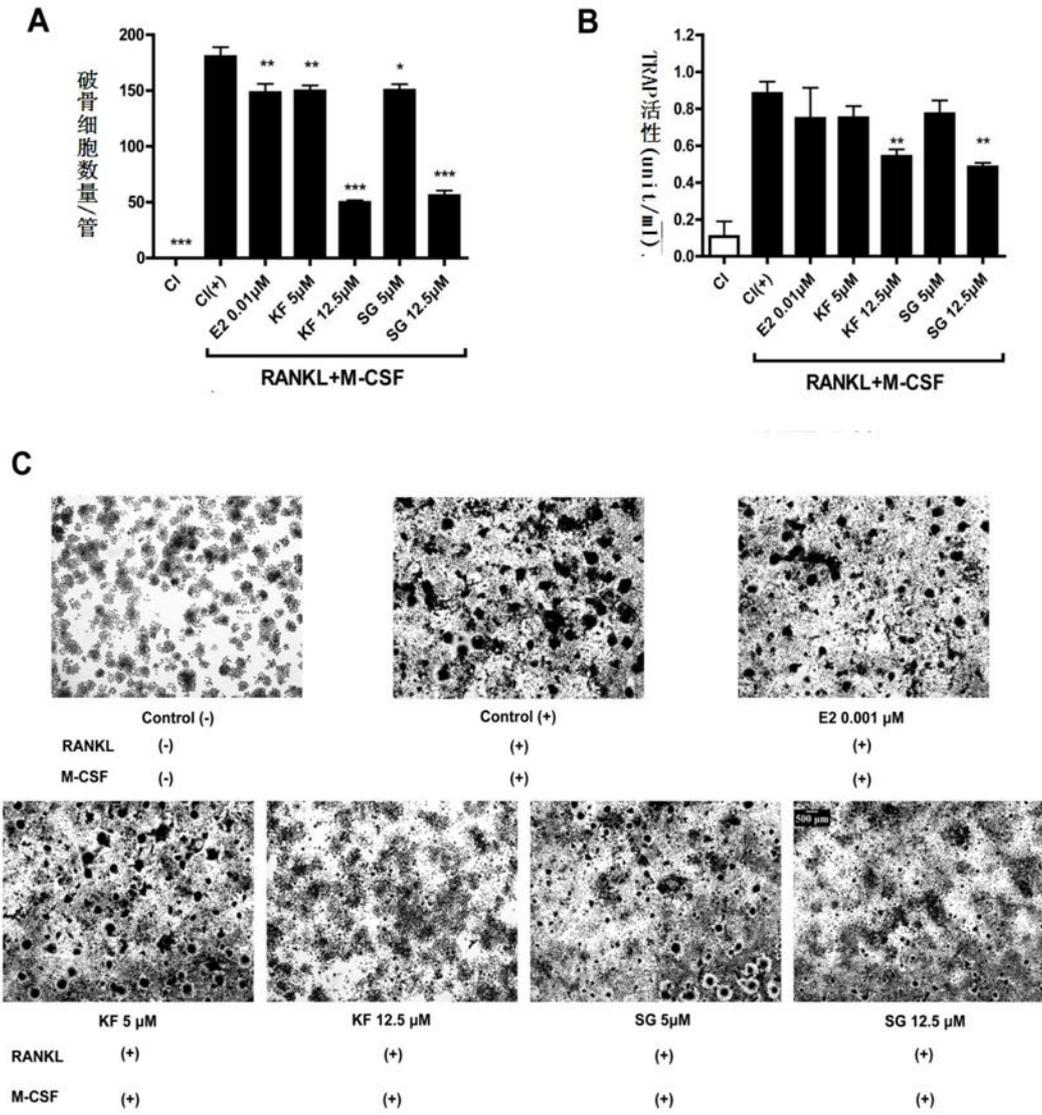


图11

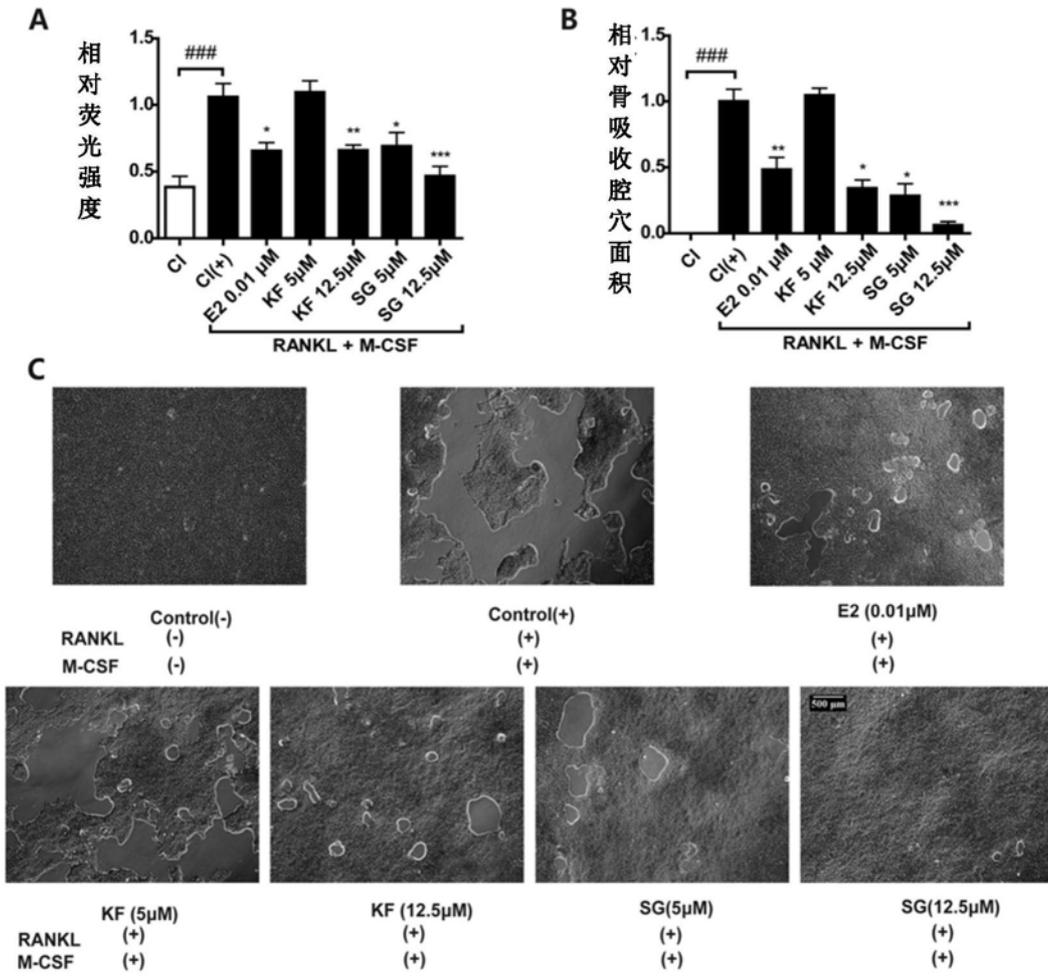


图12