



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103751169 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 30

(21) 申请号 201310509492. 2

(22) 申请日 2013. 10. 25

(71) 申请人 南通瑞普埃尔生物工程有限公司

地址 226005 江苏省南通市港闸经济开发区
永兴路 58 号

(72) 发明人 姚炎华 朱鹏 葛亮 刘晓磊
奚年英

(74) 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200

代理人 李纪昌

(51) Int. Cl.

A61K 31/235 (2006. 01)

A61P 29/00 (2006. 01)

A61P 19/02 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书6页

(54) 发明名称

3'-甲氧基苯甲基-3, 5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基) 苯甲酸酯在制备治疗或预防类风湿关节炎中的应用

(57) 摘要

本发明涉及药物领域, 具体涉及具有抑制蛋白酶体, 能预防和治疗类风湿性关节炎的化合物。其分子结构为 3'-甲氧基苯甲基-3, 5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基) 苯甲酸酯, 本发明的有益效益是可用于治疗类风湿性关节炎, 具有潜在的新药开发价值。

1. 3'-甲氧基苯甲基-3,5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基)苯甲酸酯在治疗或预防类风湿性关节炎药物中的应用。

3'-甲氧基苯甲基-3,5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基)苯甲酸酯在制备治疗或预防类风湿关节炎中的应用

[0001] 技术领域：

本发明涉及药物领域，具体涉及用于预防和治疗或预防类风湿性关节炎的抑制蛋白酶体化合物。

[0002] 背景技术：

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)是临床最常见的炎性关节病和主要致残因素之一。在全世界约为0.5%-1.0%，RA的发病在我国约为0.4%。RA可发生于任何年龄，随着年龄的增长，发病率也随之增高。女性高发年龄为45-55岁，性别与RA发病关系密切，男女之比约1:3。RA是一种病因尚未明了的慢性全身性炎症性疾病，以慢性、对称性、多滑膜关节炎和关节外病变为主要临床表现，属于自身免疫炎性疾病。患者常以手部或腕部疼痛及肿胀（特别是腕背部的肿胀）为首发症状，症状持续不缓解，普通的对症治疗虽可以缓解症状，但常常由于用药不规则或不足量而导致症状反复。病情进展时可以出现明显的晨僵，通常可达1小时以上，并不断加重；同时出现一定的关节功能障碍。

[0003] 目前治疗RA的药物分为两大类：控制症状药和控制疾病药。由于RA病因不明，故当今并无堪称控制疾病的药。控制症状的抗风湿药分为四类：一、非甾体类抗炎药，通常称为一线药，这类药物种类繁多，国内市场已多达数十种。二、类固醇激素，激素是一个非常好的止痛抗炎药，但长期单独使用不能改善病情，反而带来许多副作用，激素作为二线慢作用药起效前的过渡性用是可以的，但用量要小，时间不宜过长。在病情较重，伴有关节外表现的患者，短期治疗冲击，并联合二线药治疗时必须的。三、慢作用抗风湿药，通常称为二线药，所谓慢作用药包括抗疟药、金盐、青霉胺和柳氮磺胺吡啶，它们治疗RA起效慢，长期作用对RA病情有一定缓解作用，故也称病情改善药。四、免疫抑制剂：常用有甲氨蝶呤、环磷酰胺、硫唑嘌呤、雷公藤、青风藤等。

[0004] 蛋白酶体(proteasomes)是在真核生物和古菌中普遍存在的，在真核生物中，蛋白酶体位于细胞核和细胞质中。主要作用是降解细胞不需要的或受到损伤的蛋白质，尤其能直接参与了适应性免疫系统的运作，并在其中扮演着关键角色。无论对T细胞免疫，还是B细胞免疫都起到积极的促进作用。另外，由于蛋白酶体参与生成活性形式的NF- κ B(一种抗凋亡和促炎症调控因子，调控细胞因子的表达)，因此，蛋白酶体被认为与炎症反应和自身免疫性疾病相关。蛋白酶体活性水平的提高与类风湿性关节炎的自身免疫性疾病相关。

[0005] 因此，抑制蛋白酶体认为是治疗类风湿性关节炎的靶点。尽管如此，并没有成熟开发的蛋白酶体化合物抑制剂问世，用于治疗类风湿性关节炎。

[0006] 发明内容：

本发明目的是针对现有蛋白酶体化合物抑制剂的特点，设计一种化合物，能有效治疗或预防类风湿性关节炎。

[0007] 技术方案

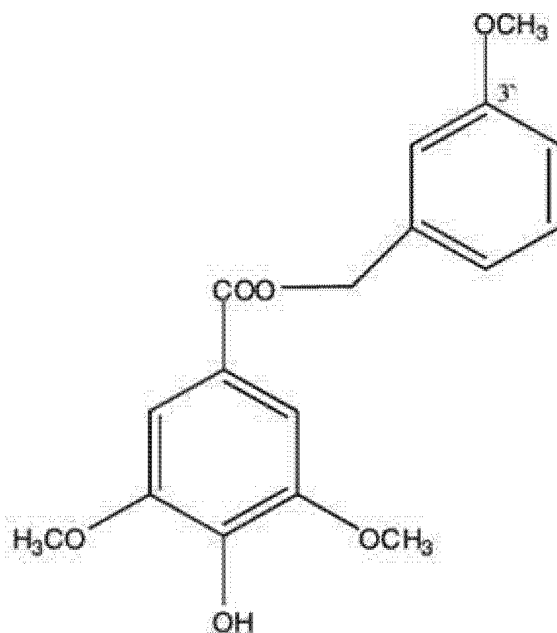
抑制蛋白酶体化合物，其特征在于其化学结构为3'-甲氧基苯甲基-3,5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基)苯甲酸酯，在治疗或预防类风湿性关节炎药物中的应用。

[0008] 有益结果：

本发明中的抑制蛋白酶体化合物化学结构为 3'-甲氧基苯甲基-3,5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基)苯甲酸酯，可以靶向抑制蛋白酶体，达到预防或治疗类风湿性关节炎的效果。

[0009] 发明人经过大量实验获知抑制蛋白酶体化合物能够抑制佐剂型大鼠类风湿性关节炎和 DBA/1 小鼠胶原型类风湿性关节炎的发展，体内实验证明具有显著的治疗类风湿性关节炎的效果。说明本发明的抑制蛋白酶体化合物能作为治疗或预防类风湿性关节炎药物。

化合物的化学结构式



化合物 3'-甲氧基苯甲基-3,5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基)苯甲酸酯

具体实施方式

[0011] 3'-甲氧基苯甲基-3,5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基)苯甲酸酯购自 sigma 公司。

[0012] 实施例 1

抑制蛋白酶体化合物在胶原诱导小鼠关节炎动物模型体内免疫保护作用

构建胶原型小鼠关节炎动物模型，研究抑制蛋白酶体化合物对小鼠胶原诱导性关节炎 (collagen induced arthritis, CIA) 的治疗作用。采用小鼠作为受试动物，SPF 级 DBA/1 小鼠 90 只 (由上海西普尔-必凯实验动物有限公司 (Sino-British SIPPR Lab. Animal Ltd) 提供，动物生产许可证号码：SCXK (沪) 2008-0016)，雄性，7-8 周龄，体重为 18-22 g，随机分成 6 组，分别是正常对照组，模型对照组，化合物低中高 3 个剂量组 (0.4, 0.8, 1.6 mg/kg) 和阳性药对照组 (甲氨蝶呤 2 mg/kg)。除正常组外，第 0 天各实验组建立小鼠 CIA 模型，方法是鸡软骨 II 型胶原 (c II) 用 0.1 mol/l 醋酸溶解成 4 mg/ml 的溶液，于 4℃ 冰箱过夜。实验当天用 II 型胶原与含 4 mg/ml Mycobacterium tuberculosis strain H37Rv 的完

全弗氏佐剂 (CFA) 等体积充分乳化,待 DBA/1 小鼠麻醉后,于其尾部皮内每只注射乳化剂 50 μ l 进行致敏,21 d 后用 4 mg/ml 的 II 型胶原 (c II) 与不完全弗氏佐剂 (IFA) 等体积充分乳化后以相同剂量的乳化剂于尾部进行再次免疫。造模第 30 d 起皮下注射给药:化合物的 3 个剂量组 (0.4, 0.8, 1.6 mg/kg):每日两次,连续 10 天;阳性药对照组 (甲氨蝶呤 2 mg/kg):每五天一次,连续 3 次;正常对照组和模型对照组 (生理盐水):连续 10 天。分别于造模后第 21 天至第 70 天每 3 天称量体重、关节评分、分别检测左右后足足踝直径来观察药物对小鼠胶原型关节炎的影响。

[0013] 结果:造模后小鼠与正常小鼠相比较,免疫后第 27 天, CIA 小鼠足爪红肿,关节炎指数评分增高,模型组第 45-60 天为肿胀高峰,模型组自第 35 天开始体重几乎不增加,后期还略微有下降。抑制蛋白酶体化合物在胶原诱导小鼠关节炎动物模型体内免疫保护作用具体结果如下:

抑制蛋白酶体化合物对小鼠胶原型关节炎左足足爪肿胀度的影响,阳性对照组、抑制蛋白酶体化合物高、中、低剂量组左后足踝直径与模型组比较,均有极显著性差异 ($P < 0.01$) 实验结果具有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对小鼠胶原型关节炎右足足爪肿胀度的影响,阳性对照组、抑制蛋白酶体化合物高、中、低剂量组右后足踝直径与模型组比较,均有极显著性差异 ($P < 0.01$),实验结果具有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对胶原型关节炎小鼠临床评分的影响,化合物低、中、高剂量组四肢评分显著低于模型对照组 ($P < 0.01$),与模型对照组比较极显著性差异,实验结果具有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对胶原型关节炎小鼠体重影响,化合物高、中、低剂量组体重显著高于模型对照组 ($P < 0.01$),与模型对照组比较极显著性差异,实验结果具有统计学意义。

[0014] 结论:抑制蛋白酶体化合物对小鼠胶原型关节炎具有治疗作用。

[0015] 实施例 2

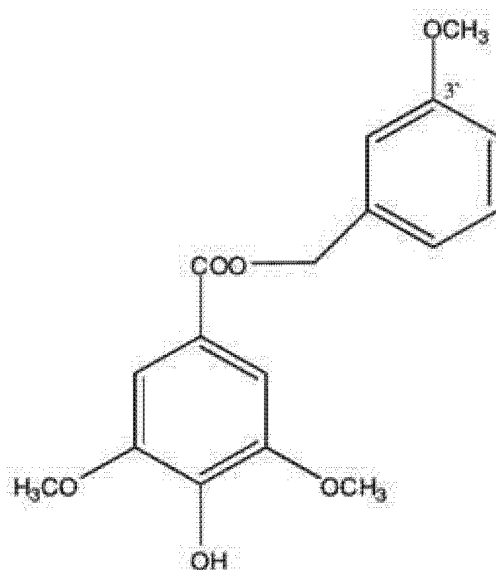
抑制蛋白酶体化合物对佐剂型大鼠关节炎动物模型体内免疫保护作用

构建佐剂型大鼠关节炎动物模型,研究抑制蛋白酶体化合物对佐剂性关节炎 (Adjuvant arthritis, AA) 大鼠的治疗作用。采用大鼠作为受试动物, SPF 级 SD 大鼠 90 只 (由上海西普尔-必凯实验动物有限公司 (Sino-British SIPPR Lab. Animal Ltd) 提供,动物生产许可证号码: SCXK (沪) 2008-0016), 雄性, 体重为 140 g-160 g, 随机分成 6 组, 分别是正常对照组, 模型对照组, 抑制蛋白酶体化合物低中高 3 个剂量组 (0.2, 0.4, 0.8 mg/kg) 和阳性药对照组 (甲氨蝶呤 1 mg/kg)。除正常组外, 第 0 天各实验组建立大鼠 AA 模型, 方法是在大鼠的左侧后足足跖注射含灭活的结核分枝杆菌 (H37RA, 10 mg/ml) 完全弗氏佐剂 0.08 ml 造成大鼠佐剂性关节炎模型。造模第 10 天起皮下注射给药:化合物的 3 个剂量组 (0.2, 0.4, 0.8 mg/kg):每日两次,连续 10 天;阳性药对照组 (甲氨蝶呤 1 mg/kg):每五天一次,连续 3 次;正常对照组和模型对照组 (生理盐水):连续 10 天。分别于造模后第 8, 11, 14, 17, 20, 23 和 26 天, 称量体重、关节评分、分别检测左右后足足踝直径来观察药物对大鼠佐剂型关节炎的影响。

[0016] 结果:造模后大鼠与正常大鼠相比较, AA 大鼠左后足会迅速产生原发性关节炎, 出现明显的肿胀, 并伴有溃烂;右后足大约 10 d 后开始出现继发性关节炎, 评分的分值逐渐增大;同时耳部血管增生明显, 红肿明显;尾部关节出现肿胀。抑制蛋白酶体化合物在佐剂性大鼠关节炎动物模型体内免疫保护作用, 具体结果如下:

抑制蛋白酶体化合物对大鼠原发性关节炎足爪肿胀度的影响,大鼠阳性对照组、抑制蛋白酶体化合物的低、中、高剂量组左后足踝直径与模型组比较,有极显著性差异($P < 0.01$);抑制蛋白酶体化合物低、中、高剂量组左后足踝直径与模型组比较,均有显著性差异($P < 0.05$),实验结果具有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对大鼠继发性关节炎足爪肿胀度的影响,大鼠阳性对照组、抑制蛋白酶体化合物低、中、高剂量组右后足踝直径与模型组比较,有显著性差异($P < 0.05$)。抑制蛋白酶体化合物对佐剂型关节炎大鼠临床评分的影响,化合物低、中、高剂量组四肢评分显著低于模型对照组($P < 0.05$),与模型对照组比较差异均有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对佐剂型关节炎大鼠体重影响,化合物高、中、低剂量组体重显著高于模型对照组($P < 0.05$),与模型对照组比较差异均有统计学意义。

[0017] 结论:抑制蛋白酶体化合物对 AA 大鼠关节炎具有治疗作用。



[0018] 化合物 3'-甲氧基苯甲基-3,5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基)苯甲酸酯

具体实施方式

[0019] 3'-甲氧基苯甲基-3,5-二甲氧基-4-(3'-甲氧基苄氧基)苯甲酸酯购自 sigma 公司。

[0020] 实施例 1

抑制蛋白酶体化合物在胶原诱导小鼠关节炎动物模型体内免疫保护作用

构建胶原型小鼠关节炎动物模型,研究抑制蛋白酶体化合物对小鼠胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)的治疗作用。采用小鼠作为受试动物,SPF 级 DBA/1 小鼠 90 只(由上海西普尔-必凯实验动物有限公司(Sino-British SIPPR Lab. Animal Ltd)提供,动物生产许可证号码:SCXK(沪)2008-0016),雄性,7-8 周龄,体重为 18-22 g,随机分成 6 组,分别是正常对照组,模型对照组,化合物低中高 3 个剂量组(0.4, 0.8, 1.6 mg/kg)和阳性药对照组(甲氨蝶呤 2 mg/kg)。除正常组外,第 0 天各实验组建立小鼠 CIA 模型,方法是鸡软骨 II 型胶原(c II)用 0.1 mol/l 醋酸溶解成 4 mg/ml 的溶液,于 4℃ 冰箱过

夜。实验当天用Ⅱ型胶原与含 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv 的完全弗氏佐剂 (CFA) 等体积充分乳化,待 DBA/1 小鼠麻醉后,于其尾部皮内每只注射乳化剂 50 μ l 进行致敏,21 d 后用 4 mg/ml 的Ⅱ型胶原 (cⅡ) 与不完全弗氏佐剂 (IFA) 等体积充分乳化后以相同剂量的乳化剂于尾部进行再次免疫。造模第 30 d 起皮下注射给药:化合物的 3 个剂量组 (0.4, 0.8, 1.6 mg/kg):每日两次,连续 10 天;阳性药对照组 (甲氨蝶呤 2 mg/kg):每五天一次,连续 3 次;正常对照组和模型对照组 (生理盐水):连续 10 天。分别于造模后第 21 天至第 70 天每 3 天称量体重、关节评分、分别检测左右后足足踝直径来观察药物对小鼠胶原型关节炎的影响。

[0021] 结果:造模后小鼠与正常小鼠相比较,免疫后第 27 天, CIA 小鼠足爪红肿,关节炎指数评分增高,模型组第 45-60 天为肿胀高峰,模型组自第 35 天开始体重几乎不增加,后期还略微有下降。抑制蛋白酶体化合物在胶原诱导小鼠关节炎动物模型体内免疫保护作用具体结果如下:

抑制蛋白酶体化合物对小鼠胶原型关节炎左足足爪肿胀度的影响,阳性对照组、抑制蛋白酶体化合物高、中、低剂量组左后足踝直径与模型组比较,均有极显著性差异 ($P < 0.01$) 实验结果具有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对小鼠胶原型关节炎右足足爪肿胀度的影响,阳性对照组、抑制蛋白酶体化合物高、中、低剂量组右后足踝直径与模型组比较,均有极显著性差异 ($P < 0.01$),实验结果具有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对胶原型关节炎小鼠临床评分的影响,化合物低、中、高剂量组四肢评分显著低于模型对照组 ($P < 0.01$),与模型对照组比较极显著性差异,实验结果具有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对胶原型关节炎小鼠体重影响,化合物高、中、低剂量组体重显著高于模型对照组 ($P < 0.01$),与模型对照组比较极显著性差异,实验结果具有统计学意义。

[0022] 结论:抑制蛋白酶体化合物对小鼠胶原型关节炎具有治疗作用。

[0023] 实施例 2

抑制蛋白酶体化合物对佐剂型大鼠关节炎动物模型体内免疫保护作用

构建佐剂型大鼠关节炎动物模型,研究抑制蛋白酶体化合物对佐剂性关节炎 (Adjuvant arthritis, AA) 大鼠的治疗作用。采用大鼠作为受试动物,SPF 级 SD 大鼠 90 只 (由上海西普尔-必凯实验动物有限公司 (Sino-British SIPPR Lab. Animal Ltd) 提供,动物生产许可证号码:SCXK (沪) 2008-0016),雄性,体重为 140 g-160 g,随机分成 6 组,分别是正常对照组,模型对照组,抑制蛋白酶体化合物低中高 3 个剂量组 (0.2, 0.4, 0.8 mg/kg) 和阳性药对照组 (甲氨蝶呤 1 mg/kg)。除正常组外,第 0 天各实验组建立大鼠 AA 模型,方法是在大鼠的左侧后足足跖注射含灭活的结核分枝杆菌 (H37RA, 10 mg/ml) 完全弗氏佐剂 0.08 ml 造成大鼠佐剂性关节炎模型。造模第 10 天起皮下注射给药:化合物的 3 个剂量组 (0.2, 0.4, 0.8 mg/kg):每日两次,连续 10 天;阳性药对照组 (甲氨蝶呤 1 mg/kg):每五天一次,连续 3 次;正常对照组和模型对照组 (生理盐水):连续 10 天。分别于造模后第 8, 11, 14, 17, 20, 23 和 26 天,称量体重、关节评分、分别检测左右后足足踝直径来观察药物对大鼠佐剂型关节炎的影响。

[0024] 结果:造模后大鼠与正常大鼠相比较,AA 大鼠左后足会迅速产生原发性关节炎,出现明显的肿胀,并伴有溃烂;右后足大约 10 d 后开始出现继发性关节炎,评分的分值逐渐增大;同时耳部血管增生明显,红肿明显;尾部关节出现肿胀。抑制蛋白酶体化合物在佐

剂性大鼠关节炎动物模型体内免疫保护作用,具体结果如下:

抑制蛋白酶体化合物对大鼠原发性关节炎足爪肿胀度的影响,大鼠阳性对照组、抑制蛋白酶体化合物的低、中、高剂量组左后足踝直径与模型组比较,有极显著性差异($P < 0.01$);抑制蛋白酶体化合物低、中、高剂量组左后足踝直径与模型组比较,均有显著性差异($P < 0.05$),实验结果具有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对大鼠继发性关节炎足爪肿胀度的影响,大鼠阳性对照组、抑制蛋白酶体化合物低、中、高剂量组右后足踝直径与模型组比较,有显著性差异($P < 0.05$)。抑制蛋白酶体化合物对佐剂型关节炎大鼠临床评分的影响,化合物低、中、高剂量组四肢评分显著低于模型对照组($P < 0.05$),与模型对照组比较差异均有统计学意义。抑制蛋白酶体化合物对佐剂型关节炎大鼠体重影响,化合物高、中、低剂量组体重显著高于模型对照组($P < 0.05$),与模型对照组比较差异均有统计学意义。

[0025] 结论:抑制蛋白酶体化合物对 AA 大鼠关节炎具有治疗作用。