[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1100633A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94108234.2

[51]Int.Cl[5]

A61K 31/35

[43]公开日 1995 年 3 月 29 日

[22]申请日 94.7.8

[30]优先权

[32]93.7.9 [33]JP[31]194182/93

[71]申请人 吴羽化学工业株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 渡边孝寿 新村浩一 梅川清则

[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

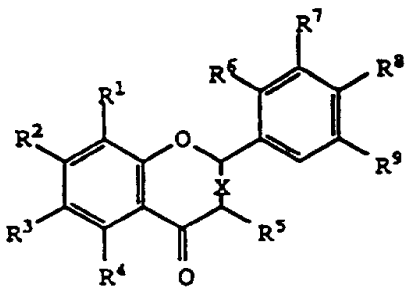
代理人 唐伟杰

说明书页数: 附图页数:

[54]发明名称 软骨保护剂

[57]摘要

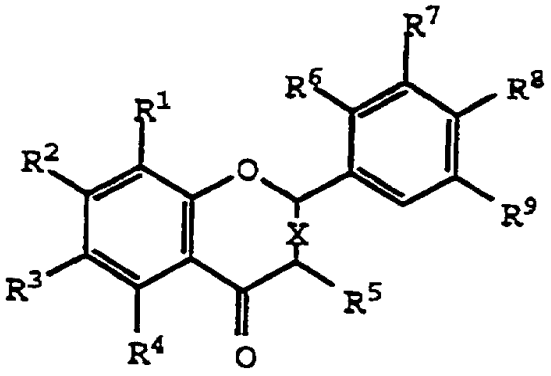
本文公开了含有式（Ⅰ）类黄酮化合物的软骨保护剂（其中 R^1—R^9 分别独立地为氢原子的羟基或甲氧基，且 X 为单键或双键），或其立体异构体，或其天然的苷类化合物。上述化合物对蛋白多糖从软骨细基质中排除有强烈的抑制作用，并显示软骨保护功能，因而可有效地治疗关节病。



(I)

权 利 要 求 书

1. 包含式(*I*)类黄酮化合物



(I)

其中 R^1—R^9 分别独立地为氢原子，羟基或甲氧基，X 为单键或双键，或其立体异构体，或其天然的苷类化合物以及制药学上可接受

的载体的软骨保护剂。

2. 权利要求 1 中的软骨保护剂，其中 X 为双键。

3. 权利要求 2 中的软骨保护剂，其中上述的类黄酮化合物是选自下列化合物中的一种或多种化合物：黄酮，白杨黄素，柯因葡糖甙，报春花黄素，芹黄素，大波斯菊甙，芹甙，木犀草素，木犀草甙，葡萄糖木犀草素，刺槐素，里那甙，香叶木甙元，香叶木甙，黄芩黄素，非瑟酮，茨非醇，三叶豆甙，紫云英甙，洋槐甙，茨非素，槐精，栎素，异栎素，芦丁，桑色素，杨梅黄酮，杨梅甙，橡精，乐草亭，乐草亭素，鼠李亭以及异鼠李亭。

4. 权利要求 1 中的软骨保护剂，其中 X 为单键。

5. 权利要求 4 中的软骨保护剂，其中所述的类黄酮化合物选自下列化合物中的一种或多种：生松素，柚皮素，*Salipurpin*，樱黄甙，柑桔甙，樱花亭，野樱黄甙，橙皮素，橙皮甙，圣草酚，圣草甙，生松素醇，香醇素，黄杞甙，二氢漆黄素，黄杉素，落新妇甙，葡萄素。

6. 权利要求 1 中的软骨保护剂，其中所述的天然苷类选自下列苷中的一种或多种：葡糖苷，半乳糖苷，果糖苷，鼠李糖苷，芦丁苷，阿糖苷，木糖苷，芹菜葡糖苷及洋槐二糖苷。

7. 权利要求 1 中的软骨保护剂，其中所述的类黄酮化合物选自下列化合物之中的一种或多种：芹黄素，木犀草素，刺槐素，里那甙，香叶木甙元，黄芩黄素，非瑟酮，茨非酮，栎精，橙皮素（*S*—

型)以及橙皮甙(S—型)。

8. 权利要求 1 中的软骨保护剂，其中所述的类黄酮化合物，其立体异构体或天然存在的苷类是从天然物质中提取的。

9. 权利要求 1 中式(I)化合物或其立体异构体或其天然苷类，用于制备软骨保护剂的用途。

说　　明　　书

软骨保护剂

本发明涉及一种保护软骨的药剂，即软骨保护剂，更具体地说，是一种含有类黄酮化合物或其立体异构体，或其天然存在的糖甙的软骨保护剂。

存在有多种关节病，例如，类风湿性关节炎，风湿性热以及骨关节炎。许多人患有类风湿性关节炎和骨关节炎。这些疾病作为关节病的主要类型，已被研究过。还存在各种先天性和继发性的骨关节炎以及随着衰老，由于关节软骨退化变性引起的初期的骨关节炎。最近发现，老年人口的增加，病人患有初期骨关节炎的人数也正在增加。

尽管类风湿性关节炎与骨关节炎在成因及形成条件方面有很大差异，但在这两种情况中，关节的功能最终都因软骨的破坏而阻碍。

治疗风湿性疾病，例如类风湿关节炎，风湿性热，全身性红斑狼疮以及关节炎的首选药物是止痛药和抗炎剂，例如阿斯匹林或消炎痛。进一步而言，更好的化合物如，*Shiosol*，免疫调节剂，甾体或 *D*—青霉胺已被采用来治疗类风湿性关节炎。

然而，上述常规的止痛药和抗炎剂不能有效地抵抗关节软骨的破坏，且实际上有时候在使用软骨细胞的实验中还显示出不良作用。进一步而言，上述药物在治疗类风湿性关节炎方面没有观察到其对关节软骨的破坏有抑制作用。

已知类黄酮可被用作保护血管的药物，并还有以下医药方面的用途：芹菜配基，柯因，桑色素，非瑟酮及贝加因作为病毒基因组失活剂〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 2—101013〕；类黄酮作为测定多形核白细胞的药剂〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 63—253254〕，类黄酮作为戒烟的口服药剂〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 4—46119〕；芦丁，香叶木甙等用于治疗高蛋白浮肿（美国专利 *No.* 5,096,887）；类黄酮的抗肿瘤药物〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 3—275625〕；含有芹菜配基的抗肿瘤药物〔日本经审查专利公开（*Kokoku*）*No.* 3—61644〕；橙皮素，茨非醇等作为抑制过氧脂产生的药物〔日本未审查专利公开（*Kokoku*）*No.* 3—5423〕；含有茨非醇的抗肿瘤药物〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 4—103529 及 *No.* 4—103532〕；橙皮苷和藤黄菌素作为钙拮抗剂〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 4—243822〕；藤黄菌素作为唾液酶抑制剂〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 64—42427〕；藤黄菌素作为抗逆转录病毒药物〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 3—7224〕；栎精作为 *HBV*（肝炎 *B* 病毒）药物〔日本未审查专利公开（*Kokai*）*No.* 4—234320〕等等。

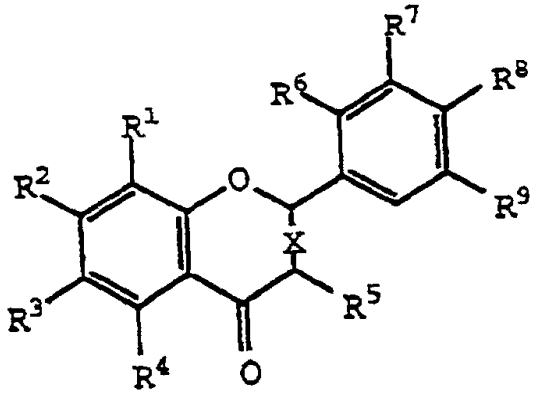
然而，从未知道将类黄酮用作为软骨保护剂。

本发明者们通过深入研究开发了一种软骨保护剂，它可抑制关节软骨的破坏作用，并发现特定的类黄酮化合物及其立体异构体，以及其天然存在的已知的苷类对蛋白多糖的排除显示出明显的抑制作用，而蛋白多糖是软骨基质中的一个重要组成部分，因此上述化合物可用作软骨保护剂以抑制关节软骨的破坏。

因此，本发明的目标就是提供含有特定的类黄酮化合物或其立体异构体，或其天然存在的已知的苷类作为活性成份的软骨保护剂。

本发明的其它目的和作用将在下文中阐述清楚。

本发明涉及包含具通式(I)的类黄酮化合物或其立体异构体，或其天然存在的已知的苷类(在下文中将其称为"本发明物质")的软骨保护剂，



(I)

其中 R^1 和 R^9 分别独立地为氢原子，羟基，或甲氧基且 X 为单键或双键。

本发明中软骨保护剂的活性成份作为类黄酮该物质广泛地存在于蔬菜中。典型的类黄酮化合物包括：黄酮，黄酮醇，黄烷酮及黄烷酮醇。在横烷酮的 2—位上含有不对称碳原子，且在黄烷酮醇的 2—位和 3—位上含有不对称碳原子，且这类化合物可以有立体异构体存在。这些立体异构体也用于本发明。进一步地，对在上述天然存在的苷中的糖没有特别的限制。例如，天然存在的苷可以是葡糖苷；半乳糖苷；果糖苷，鼠李糖苷，芦丁苷(即，鼠李葡糖苷)，阿糖苷，木糖苷，芹菜葡糖苷及刺槐糖二苷。

在本发明中，任何天然存在的类黄酮都可作为本发明物质，在下列表 1 中列出较可取的类黄酮化合物及其天然存在的苷。

表 1

编号	名称	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7	R^8	R^9	X
1	黄酮	H	H	H	H	H	H	H	H	H	双键
2.	白杨黄素	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	〃
3.	柯因葡糖甙	H	OH	H	OGlu	H	H	H	H	H	〃
4.	报春花黄素	OH	H	H	OH	H	H	H	H	H	〃
5	芹黄素	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	〃
6	大波斯菊甙	H	OGlu	H	OH	H	H	H	OH	H	〃
7	芹甙	H	OApg	H	OH	H	H	H	OH	H	〃
8	木犀草素	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	〃
9	木犀草甙	H	OH	H	OGlu	H	H	OH	OH	H	〃
10	葡萄糖木犀草素	H	OGlu	H	OH	H	H	OH	OH	H	〃
11	刺槐素	H	OH	H	OH	H	H	H	OCH_3	H	〃
12	里那甙	H	ORut	H	OH	H	H	H	OCH_3	H	〃
13	香叶木甙元	H	OH	H	OH	H	H	OH	OCH_3	H	〃
14	香叶木甙	H	ORut	H	OH	H	H	OH	OCH_3	H	〃
15	黄芩黄素	H	OH	OH	OH	H	H	H	H	H	〃
16	非瑟酮	H	OH	H	H	OH	H	H	OH	H	〃
17	茨非醇	H	OH	H	OH	OH	H	H	OH	H	〃
18	三叶豆甙	H	OH	H	OH	OGal	H	H	OH	H	〃
19	紫云英甙	H	OH	H	OH	OGlu	H	H	OH	H	〃
20	洋槐甙	H	ORha	H	OH	ORob	H	H	OH	H	〃
21	茨非素	H	ORha	H	OH	ORha	H	H	OH	H	〃
22	栎精	H	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	H	〃
23	栎素	H	OH	H	OH	ORha	H	OH	OH	H	〃
24	异栎素	H	OH	H	OH	OGlu	H	OH	OH	H	〃
25	芦丁	H	OH	H	OH	ORut	H	OH	OH	H	〃
26	桑色素	H	OH	H	OH	OH	OH	H	OH	H	〃
27	杨梅黄酮	H	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	OH	〃
28	杨酶甙	H	OH	H	OH	ORha	H	OH	OH	OH	〃

表 1(续)

编号名称	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5	R^6	R^7	R^8	R^9	X
29 橡精	H	OH	H	OH	OH	OH	H	H	H	双键
30 乐草亭	H	OH	OH	OH	OH	H	OH	OH	H	〃
31 乐草亭素	H	OGlu	OH	OH	OH	H	OH	OH	H	〃
32 鼠里亭	H	OCH_3	H	OH	OH	H	OH	OH	H	〃
33 异鼠里亭	H	OH	H	OH	OH	H	OCH_3	OH	H	〃
34 生松素	H	OH	H	OH	H	H	H	H	H	单键
35 柚皮素	H	OH	H	OH	H	H	H	OH	H	〃
36 Salipurpin	H	OH	H	OGlu	H	H	H	OH	H	〃
37 樱黄甙	H	OGlu	H	OH	H	H	H	OH	H	〃
38 柑桔甙	H	ORha	H	OH	H	H	H	OH	H	〃
39 樱花亭	H	OCH_3	H	OH	H	H	H	OH	H	〃
40 野樱黄甙	H	OCH_3	H	OGlu	H	H	H	OH	H	〃
41 橙皮素	H	OH	H	OH	H	H	OH	OCH_3	H	〃
42 橙皮甙	H	ORut	H	OH	H	H	OH	OCH_3	H	〃
43 圣草酚	H	OH	H	OH	H	H	OH	OH	H	〃
44 圣草甙	H	ORha	H	OH	H	H	OH	OH	H	〃
45 坐松素醇	H	OH	H	OH	OH	H	H	H	H	〃
46 香橙素	H	OH	H	OH	OH	H	H	OH	H	〃
47 黄杞甙	H	OH	H	OH	ORha	H	H	OH	H	〃
48 二氢漆黄素	H	OH	H	H	OH	H	OH	OH	H	〃
49 黄杉素	H	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	H	〃
50 落新妇甙	H	OH	H	OH	ORha	H	OH	OH	H	〃
51 蛇葡萄素	H	OH	H	OH	OH	H	OH	OH	OH	〃

OGLu：葡糖苷，*OApg*：芹菜葡糖苷，*ORut*：芦丁苷，

OGal：″半乳糖苷，*ORha*：鼠李糖苷，*ORob*：刺槐糖二苷

表 1 中 34—51 号化合物中含的为单键的 *X*，因此，位于 2—位或在 2—及 3—位上的碳原子为不对称的，且有立体异构体存在。已知生松素包括(±)及(*s*)异构体；柚皮素，樱花亭，橙皮素及圣草酚包括(±)，(*R*)及(*s*) 异构体；生松素醇包括(2*R*—反)及(2*S*—反)异构体；香橙素二氢漆黄素包括反—(±)，(2*R*—反)，及(2*S*—反)异构体；黄杉素及蛇葡萄素包括反—(±)，(2*R*—反)，(2*S*—反)及(2*R*—顺)异构体。

有可能从天然存在的植物中分离并纯制出该类黄酮化合物，或从化学合成方法制备各后加以应用。表 1 中所示的许多化合物均可从市场上购买。例如，可从日本东京 *Funakoshi* 有限公司得黄酮，芹黄素，木樨草素，刺槐素，里那甙，香叶木甙元，黄芩黄素，非瑟酮，茨非醇，栎精，橙皮素及橙皮甙。

本发明物质急性毒性的实例如下：

栎精 *LD*50(小鼠：口服给药)：160*mg/kg*。

非瑟酮 *LD*50(小鼠：静脉注射)：180*mg/kg*。

进一步地，给 *BALB/c* 小鼠(雌性，七周龄)按 100*mg/kg* 的剂量，经口服橙皮素一周后，未观察到异常现象。服用橙皮甙，刺槐素，

香叶木甙元，芹黄素，木樨草素或茨非醇之后得到同样的结论。

作为药理学效应，本发明物质显示出抑制在软骨细胞培养基（衍生自兔子肩和膝盖的结合点）中软骨细胞的破坏作用，（见以下实例1）。

因此，本发明化合物可以用来作为软骨保护剂，治疗各种类型伴随结合点软骨破坏的关节病。这类关节病的例子有类风湿性关节炎，骨关节炎，肱（骨）肩胛关节周炎，肩—臂—颈综合症，腰痛等。

含有本发明化合物作活性成份的软骨保护剂可以任意常规的配方出现。软骨保护剂可以单独含有本发明物质，或本发明物质与任意制药学上可接受的载体或稀释剂的混合物。软骨保护剂含有活性成份的量为0.01—100%（重量比），较好的是0.1—70%（重量比）。

本发明的软骨保护剂可经口服或其它途径给药。

本发明的软骨保护剂的剂量可以根据患病对象（动物或人），年龄，个体差异，病情等因素变化。通常来讲，对于人体而言。本发明物质经口服给药的剂量为每日0.1—500*mg/kg*（体重），较好的是0.5—200*mg/kg*（体重），通常将上述剂量在一天内给药，尽管某些时候，也给予超出上述剂量范围的药物。

实例

下列实例将进一步说明本发明，但并不意味局限于此。

实施例 1：被测化合物对软骨细胞培养物中蛋白多糖排除的效应

(*a*)培养的软骨细胞的制备

在无菌操作下，从兔子的肩膀和膝盖结合点处提取软骨(新西兰白兔)，(体重在 1—1.5*kg* 之间)。软骨用磷酸缓冲液 *PBS*(—)(无 Ca^{2+}和 Mg^{2+}离子)，*Hanks* 溶液以及 0.1% *EDTA*—*PBS*(—)彻底洗涤，然后切成小块(1*mm*×1*mm*×1*mm*)。加入含 0.1% *EDTA* 的 *PBS*(—)后，将上述小切块置于一个 37℃的培养器中放置 30 分钟，然后用胰蛋白酶溶液(0.25%)在 37℃下对上述小切块进行处理(1 小时)，以除去附着在软骨上的结缔组织。除去上清液后，用含有 1% 的胎牛血清(*FBS*)和 0.2%胶原酶的 *Ham F*—12 培养基，对软骨处理约 2—2.5 小时。然后离心胶原酶溶液(1500*r. p. m*)，残渣软骨细胞用含 10%*FBS* 的 *Ham* 贡 *F*—12 培养基(软骨细胞培养基)洗涤两次，最后调节生成的悬浮液，以使软骨 细胞在软骨细胞培养基中的悬浮浓度为 3×10^5 细胞/*ml*。将软骨细胞接植入 24 孔的平皿中，每孔量为 1*ml* 软骨细胞。4 天以后，软骨细胞发生融合，在达到融合阶段的两周内进行实验。

(*b*)加入受试化合物以及蛋白多糖排除剂

从每个孔中除去用来培养软骨细胞的软骨细胞培养基，向其中加入 800*μl* 含 0.1%人血清白蛋白的，新鲜的不含血清的 *S*—克隆培养基，然后向其 中加入 100*μl* 含有受试化合物(其浓度为最终浓度

的 10 倍；*DMSO* 浓度为 2.5%）的 *S*—克隆培养基。软骨细胞在有 CO_2（5%）和空气（95%）存在下培养 2 小时。然后加入蛋白多糖排除剂 *PMA*（大战二萜醇肉豆蔻酸乙酸酯）（最终浓度：0.1*μg/ml*）到软骨细培养基中。

受试化合物如下：

本发明化合物，芹黄素（本发明物质 *No.* 5），木犀草素（本发明物质 *No.* 8），刺槐素（本发明物质 *No.* 11），里那甙（本发明物质 *No.* 12），香叶木甙元（本发明物质 *No.* 13），黄芩黄素（本发明物质 *No.* 15），非瑟酮（本发明物质 *No.* 16），茨非醇（本发明化合物 *No.* 17），栎精（本发明物质 *No.* 22），橙皮素（本发明物质 *No.* 41，(*S*)异构体），及橙皮甙（本发明物质 *No.* 42，(*S*)异构体）
（全部来自 *Funakosh* 公司）。

对比物质：消炎痛（*Sigma* 化学公司产品）

(*c*)蛋白多糖的测定

蛋白多糖排除的测定是通过木瓜蛋白酶对软骨细胞基质消化后测定葡糖氨基多糖（蛋白多糖的一种主要成份，下文中用 *GAG* 来表示）的浓度进行的。

2 天以后，除去软骨细培养物的上清液，向残留的软骨细胞基质层中加入 1*ml* 0.03%木瓜蛋白酶溶液，反应在 65℃下进行 1 小

时，以释放基质层中的*GAG*。在处理过的木瓜蛋白酶溶液中的*GAG*含量可用1,9—二甲基亚甲兰方法（参照*R. W. Farndale, Biochim. Biophys. Acta, Vol.* 883, *PP.* 173—177, 1986）来测定。对照实验（未加蛋白多糖排除剂）中软骨细胞基质中的*GAG*含量为"100"，除了对照实验之外其它每个实验中*GAG*的相对量用下列公式进行计算：

$$GAG\text{相对量}(\%)=(B/A)\times 100$$

其中*A*代表对照实验（未加蛋白多糖排除剂）中*GAG*含量，*B*代表仅加入蛋白多糖排除剂实验中的*GAG*含量或加入蛋白多糖排除剂和受试化合物实验中的*GAG*含量。对照实验中的*GAG*含量在11.23—59.0*μg/ml*范围内变化，取决于软骨细胞开始发生融合的时间，到在上述实验中使用软骨细胞时的时间长短。

结果列于表2，*GAG*含量以平均值±标准差（$n=3-6$）来表示。对于每个受试化合物来说，都进行对照实验和蛋白多糖排除实验（其中加入了蛋白多糖排除剂），其结果也显示于表中。用*Student t*—检验对蛋白多糖排除试验结果（其中加入了蛋白多糖排除剂）进行显著性试验，测定结果如下：

*：$P<0.05$；

**：$P<0.01$；

$***$：$P<0.001$。

与对照实验(其中未加蛋白多糖排除剂)中的*GAG*含量相比，加入蛋白多糖排除剂*PMA*导致实验中的*GAG*含量丢失。在这些条件下，本发明化合物可明显地抑制或减少*GAG*含量的丢失，显示出对蛋白多糖排除作用的抑制。相反，常规的止痛药和抗炎剂消炎痛对蛋白多糖排除不显示抑制功能，反而对软骨破坏有明显的加剧作用。

表 2

样品	含量 (μg/ml)	GAG 相对量(%)
对照物	54.7±0.8***	(100)
PMA	16.5±0.7	(30.2)
PMA + No. 5 (100 μM)	33.3±0.7***	(60.9)
对照物	54.8±0.5***	(100)
PMA	15.2±0.6	(27.7)
PMA + No. 8 (100 μM)	28.6±0.5***	(52.2)
PMA + No. 17 (100 μM)	30.5±0.3***	(55.7)
对照物	54.0±1.2***	(100)
PMA	20.0±0.4	(37.0)
PMA + No. 11 (100 μM)	24.2±0.3	(44.8)
PMA + No. 16 (100 μM)	30.1±0.9***	(55.7)
对照物	55.3±0.6***	(100)
PMA	17.5±0.7	(31.6)
PMA + No. 12 (100 μM)	19.8±0.7*	(35.8)
PMA + No: 13 (100 μM)	27.1±0.7***	(49.0)
对照物	11.23±0.2***	(100)
PMA	4.94±0.1	(44.0)
PMA + No. 15 (100 μM)	7.67±0.5*	(68.3)
对照物	56.1±0.8***	(100)
PMA	20.4±0.7	(36.4)
PMA + No. 22 (100 μM)	31.0±0.6***	(55.3)
PMA + No. 42 (100 μM)	24.0±0.6**	(42.8)
对照物	59.0±0.9***	(100)
PMA	21.1±0.6	(35.8)
PMA + No. 41 (100 μM)	28.7±0.4***	(48.6)
	28.0±0.7***	(100)
PMA	15.4±0.5	(55.0)
PMA + 消炎痛		
(10 μM)	13.2±0.6*	(47.1)
(33 μM)	11.7±0.8**	(41.8)

实例 2:颗粒配方

将下列成份均匀混合:

芹黄素	20 份(重量比)
乳糖	68 份(重量比)
低级取代的羟丙基纤维素	10 份(重量比)
羟丙基纤维素	2 份(重量比)

用 32 份(重量比)的湿润剂,乙醇,将该混合物揉捏,然后,用湿性成粒法将其制成颗粒,干燥后得到颗粒。

正如上述实例所述,本发明物质强烈地抑制蛋白多糖自软骨细基质中的排除,并显示出保护软骨的功能,进一步地,本发明物质毒性低。因此,本发明的质非常适合于治疗关节病,例如,风湿性关节炎,骨关节炎,肱骨肩胛关节周炎,肩—臂—颈综合症,腰痛等疾病。

尽管用一些具体的实例详尽地描述了本发明,但各种变化和修饰都应被认为是在本发明的精神,范围和概念之内的,这对技术熟练的人来说是显而易见的。