



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111655254 A

(43)申请公布日 2020.09.11

(21)申请号 201980010594.5

朴庆熙 李玄京 萨允智 李智贤

(22)申请日 2019.01.28

(74)专利代理机构 北京三高永信知识产权代理  
有限责任公司 11138

(30)优先权数据

10-2018-0012511 2018.01.31 KR

代理人 关越

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.07.28

(51)Int.Cl.

A61K 31/353(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

A61P 3/10(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2019/001158 2019.01.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/151732 KO 2019.08.08

(71)申请人 先生株式会社

地址 韩国江原道春川市苏阳江路32号B10-  
1洞405号洞24232号

(72)发明人 林淳成 黄胜焕 李寿庆 佐光磊

权郑汉 韩郑宇 韩本南 李智妍

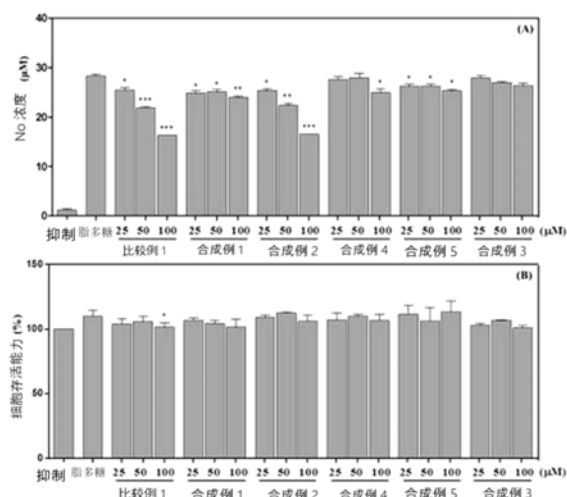
权利要求书1页 说明书9页 附图1页

## (54)发明名称

包含新型白杨素衍生物化合物作为活性成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物

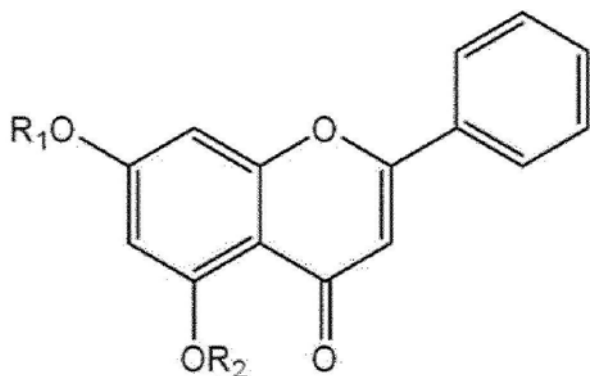
## (57)摘要

本发明涉及一种包含白杨素衍生物化合物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物,更详细而言,涉及一种具有抑制晚期糖基化终末产物的形成的效能,可以预防或治疗糖尿病并发症的包含白杨素衍生物化合物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物。



1. 一种包含白杨素衍生物化合物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物,所述白杨素衍生物化合物由以下化学式1表示:

[化学式1]



在化学式1中,

R<sub>1</sub>选自由C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烯基及-COR<sub>3</sub>组成的组;

R<sub>2</sub>选自由H、卤素、C<sub>1-4</sub>烷基及-COR<sub>4</sub>组成的组;

R<sub>3</sub>及R<sub>4</sub>分别独立地为C<sub>1-4</sub>烷基。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,R<sub>1</sub>为-COR<sub>3</sub>,R<sub>2</sub>选自由H、-CH<sub>3</sub>及-COCH<sub>3</sub>组成的组,R<sub>3</sub>为C<sub>1-4</sub>烷基。

3. 根据权利要求2所述的药物组合物,其特征在于,R<sub>1</sub>为-COCH<sub>3</sub>。

4. 根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,所述化学式1的化合物选自由以下化合物组成的组:

7-0-乙酰基白杨素;

5,7-二-0-乙酰基白杨素;

7-0-异戊二烯基白杨素;

7-0-甲氧基白杨素;以及

5,7-二-0-甲氧基白杨素。

5. 根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,所述药物组合物用于抑制晚期糖基化终末产物的形成。

6. 根据权利要求1所述的药物组合物,其特征在于,所述糖尿病并发症是选自由糖尿病性神经病、糖尿病性肾病、糖尿病性心肌梗塞、糖尿病性视网膜病、糖尿病性白内障及糖尿病性溃疡组成的组中的一种以上。

7. 一种药物制剂,其特征在于,包含权利要求1所述的药物组合物。

8. 根据权利要求7所述的药物制剂,其特征在于,所述药物制剂为片剂、丸剂、散剂、胶囊剂、糖浆或乳液形态。

9. 根据权利要求7所述的药物制剂,其特征在于,所述药物制剂还包含选自由药学上可接受的载体、佐剂和赋形剂而组成的组中的一种以上。

## 包含新型白杨素衍生物化合物作为活性成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种包含新型白杨素衍生物化合物作为活性成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物,更详细而言,涉及一种通过具有优异的晚期糖基化终末产物(AGE)的形成的抑制效果,能预防或治疗糖尿病并发症的包含白杨素衍生物化合物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物。

### 背景技术

[0002] 糖尿病(diabetes mellitus,DM)是一种通常与肥胖有关的进行性疾病(progressive disease),其特征在于胰岛素缺乏及胰岛素抵抗或两者。空腹和餐后血糖升高时,患者会暴露于急性及慢性并发症(微血管及大血管(micro-and macro-vascular))中,这些并发症会导致失明、肾功能衰竭、心脏病、卒中(strok)及截肢(amputation)。已证明血糖调整的改善降低这些糖尿病并发症的风险。

[0003] 由于这些疾病的进行性属性,为了保持血糖调整,需要不断发展的治疗策略。糖尿病有两种类型:1型糖尿病或儿童糖尿病或胰岛素依赖型糖尿病(IDDM),以及2型糖尿病或成人糖尿病或非胰岛素依赖型糖尿病(NIDDM)。1型糖尿病患者由于合成和分泌胰岛素的胰腺β细胞的免疫破坏而必须缺乏胰岛素。2型糖尿病的病因更为复杂,其特征是相对胰岛素缺乏、胰岛素作用降低和胰岛素抵抗。早发性NIDDM或青少年发病的成年性糖尿病(maturity-onset diabetes of the young;MODY)具有中年发病的最常见形式的NIDDM的许多特性(Rotter外,1990)。对于MODY,观察到了明确的方式的遗传(常染色体显性)。在MODY家族中已经确认出至少三种完全不同的突变(Bell外,1996)。

[0004] 另一方面,糖尿病并发症包括糖尿病性神经病、糖尿病性肾病、糖尿病性心肌梗塞、糖尿病性视网膜病、糖尿病性白内障、糖尿病性血管并发症或糖尿病性溃疡,已知其主要原因是因多元醇途径的醛糖还原酶(aldose reductase)的激活而积累过量山梨醇。因此,周知抑制醛糖还原酶在糖尿病并发症的治疗和预防中起重要作用。据报告迄今为止开发出的醛糖还原酶抑制剂,如zopolrestat、ponalrestat、sorbiniol、tolrestat、fidarestat、ranirestat及epalrestat等在各种动物实验中可以预防和延迟糖尿病并发症。

[0005] 但是,在临床试验中,zopolrestat及ponalrestat的疗效较差,并且,由于sorbiniol的过敏反应和tolrestat的肝功能障碍等副作用而在开发过程中被中止。目前,在日本和美国正在进行ranirestat和fidarestat的临床试验。Epalrestat未获得美国食品药品监督管理局(FDA)的批准,仅在日本于1992年被批准上市。

[0006] 此外,山梨糖醇的积累通过山梨糖醇脱氢酶转化为果糖,因此,高浓度的果糖与蛋白质结合,最终加速了晚期糖基化终末产物(advanced glycation end products,AGE)的形成。在此,已知晚期糖基化终末产物不仅攻击生物组织和细胞来促进衰老,而且还涉及引起多种疾病,包括糖尿病、心脏病和癌症等。另外,当形成晚期糖基化终末产物时,在血管壁

或淋巴细胞的细胞膜形成可以与晚期糖基化终末产物结合的受体 (RAGE: Receptor of AGEs), 若晚期糖基化终末产物结合于受体, 则与炎症相关的各种免疫因素被激活而引起或恶化慢性疾病。

[0007] 另外, 白杨素 (Chrysin) 为黑杨 (*Populus nigra* L.) 的嫩叶、日本五针松 (五针松) (*Pinus parviflora* Sieb. et Zucc.) 的心材或配糖体柯因葡萄糖苷, 包含于 *Cornus Tschonoski* Maxim (蔷薇科) 的树皮。众所周知, 白杨素通常具有抗氧化作用, 用于止痛药等中。

[0008] 然而, 在以往公开的技术中, 尚未报道过有关利用本发明的新型白杨素衍生物化合物的预防或治疗糖尿病并发症的记载。

## 发明内容

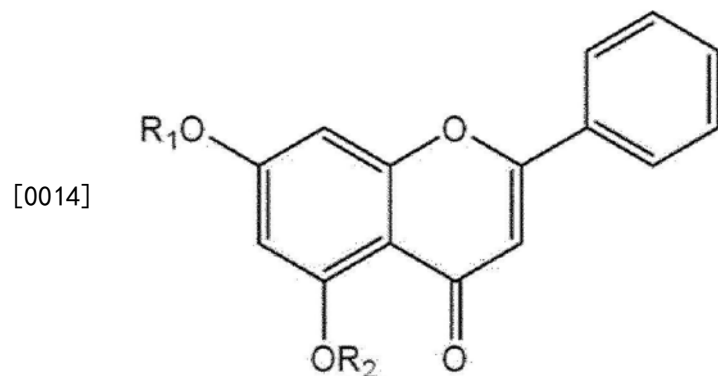
[0009] 技术问题

[0010] 于是, 在本发明中, 研究了对预防或治疗糖尿病并发症具有效果的活性物质。结果, 证实了新型白杨素衍生物化合物对晚期糖基化终末产物的形成具有抑制作用。因此, 本发明的目的在于, 提供一种用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物, 其包含新型的白杨素衍生物化合物, 其可通过抑制晚期糖基化终末产物的形成而用于预防或治疗糖尿病并发症。

[0011] 技术方案

[0012] 根据所述目的, 本发明提供一种包含由以下化学式1表示的白杨素衍生物化合物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物。

[0013] 化学式1



[0015] 化学式1中,

[0016] R<sub>1</sub>选自由C<sub>1-4</sub>烷基、C<sub>1-6</sub>烯基及-COR<sub>3</sub>组成的组中;

[0017] R<sub>2</sub>选自由H、卤素、C<sub>1-4</sub>烷基及-COR<sub>4</sub>组成的组中;

[0018] R<sub>3</sub>及R<sub>4</sub>各自独立地为C<sub>1-4</sub>烷基。

[0019] 根据本发明的其他实施例, 提供包含所述药物组合物的药学制剂。

[0020] 发明效果

[0021] 本发明所提供的新型白杨素衍生物化合物, 由于具有抑制晚期糖基化终末产物的形成的效能, 因此, 可以有效地用作预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物。

## 附图说明

[0022] 图1是作为本发明的一实施例在RAW264.7细胞中白杨素及其衍生物对NO产生(A)和细胞存活(B)引起的影响的结果。

## 具体实施方式

[0023] 下面列出的定义是用于描述本发明的各种术语的定义。除非另外加以限制,这些定义可单独或作为包含它们的术语的一部分在整个说明书中应用。

[0024] 除非另有说明,本说明书中使用的术语“卤素”是指氟、氯、溴或碘。

[0025] 除非另有说明,本说明书中使用的术语“烷基”是指由 $C_nH_{2n+1}$ 表示的饱和、直链或支链的烃基,具体而言,可以是指分别包含1至4个碳原子的饱和、直链或支链的烃基。这些基团的可以举甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、叔丁基,但不限于此。例如,除非另有说明,否则本说明书中使用的术语“ $C_{1-4}$ 烷基”是指具有1-4个碳原子的直链或支链烃基。可以举甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基等,但不限于此。

[0026] 除非另有说明,本说明书中使用的术语“烯基”是指衍生自具有至少一个碳-碳双键的不饱和、直链或支链烃部分的一价基团,具体而言,是指分别包含2至6个碳原子的不饱和、直链或支链1价基团。可以举乙烯基、丙烯基、丁烯基、1-甲基-2-丁烯-1-基,但不限于此。

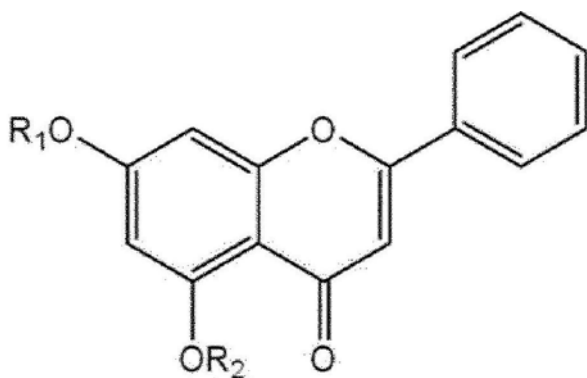
[0027] 下面,将更详细说明本发明。

[0028] 本发明涉及以下化学式1表示的新型白杨素衍生物化合物及其用途,更具体而言,涉及一种包含白杨素衍生物化合物作为活性成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物。本发明的新型白杨素衍生物化合物具有优异的血糖调节和抑制晚期糖基化终末产物(AGE)形成的效能,因此,可以预防或治疗糖尿病并发症。

[0029] 具体而言,根据本发明的一体现例,提供一种包含由以下化学式1表示的白杨素衍生物化合物作为有效成分的用于预防或治疗糖尿病并发症的药物组合物。

[0030] 化学式1

[0031]



[0032] 在化学式1中,

[0033]  $R_1$ 选自由 $C_{1-4}$ 烷基、 $C_{1-6}$ 烯基及 $-COR_3$ 组成的组中;

[0034]  $R_2$ 选自由H、卤素、 $C_{1-4}$ 烷基及 $-COR_4$ 组成的组中;

[0035]  $R_3$ 及 $R_4$ 各自独立地为 $C_{1-4}$ 烷基。

[0036] 根据本发明的其他体现例,提供一种药物组合物,在由所述化学式1表示的化合物中, $R_1$ 为 $-COR_3$ , $R_2$ 选自由H、 $-CH_3$ 及 $-COCH_3$ 组成的组中, $R_3$ 为 $C_{1-4}$ 烷基。

[0037] 根据本发明的其他体现例,提供一种药物组合物,在由所述化学式1表示的化合物中, $R_1$ 为 $-COCH_3$ 。

[0038] 根据本发明的由所述化学式1表示化合物的优选例为如下,但并不局限于此:

[0039] 7-0-乙酰基白杨素;

[0040] 5,7-二-0-乙酰基白杨素;

[0041] 7-0-异戊二烯基白杨素;

[0042] 7-0-甲氧基白杨素;以及

[0043] 5,7-二-0-甲氧基白杨素。

[0044] 根据本发明的药物组合物,通过包含于所述药物组合物的由化学式1表示的化合物抑制晚期糖基化终末产物(AGE)的形成,从而,有效地预防或治疗与此相关的各种疾病。

[0045] 在本发明的一具体例中,所述化合物优选为5,7-二-0-乙酰基白杨素,因为对晚期糖基化终末产物的形成具有优异的抑制作用,但不限于此。

[0046] 在本发明的一具体例中,所述糖尿病并发症是选自由糖尿病性神经病、糖尿病性肾病、糖尿病性心肌梗塞、糖尿病性视网膜病、糖尿病性白内障及糖尿病发溃疡组成的组中的一种以上,但不限于此。

[0047] 在本说明书中使用的术语“预防”是指通过施用本发明的药物组合物来抑制糖尿病并发症或延迟发病的所有行为。

[0048] 在本说明书中使用的术语“治疗”是指通过施用本发明的药物组合物来改善或有益地改变因糖尿病并发症引起的症状的所有行为。

[0049] 根据本发明的另一体现例,提供一种包含所述药物组合物的药物制剂。

[0050] 本发明的药物制剂可为片剂、丸剂、散剂、胶囊剂、糖浆或乳液等各种经口给药的形态或注射剂等肌肉内、静脉内或皮下给药等非经口给药的形态,优选为经口给药的形态。

[0051] 而且,所述药物制剂除了有效成分之外可以为无毒性的药学上可接受的添加剂,具体而言,可以举选自由载体、佐剂和赋形剂而组成的组中的一种以上,可根据通常的方法进行制剂化。

[0052] 可用于本发明的药物制剂的赋形剂,可包括甜味剂、粘合剂、增溶剂、增、加溶剂、湿润剂、乳化剂、张度剂、吸附剂、崩解剂、抗氧化剂、防腐剂、润滑剂、填充剂、香料等,但不限于此。例如,赋形剂可以使用乳糖、右旋糖、蔗糖、甘露醇、山梨醇、纤维素、甘氨酸、二氧化硅、硅酸铝镁、淀粉、明胶、黄蓍胶、精氨酸、藻酸钠、甲基纤维素、羧甲基钠纤维素、水、乙醇、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮、氯化钠、氯化钙、橙色香精、草莓香精、香草香精等。

[0053] 当本发明的药物制剂为口服给药形态时,所使用的载体可以举纤维素、硅酸钙、玉米淀粉、乳糖、蔗糖、右旋糖、磷酸钙、硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸钙、明胶、滑石粉等,但不限于此。

[0054] 当本发明的药物制剂为注射剂形态时,所述载体可以举水、盐水、葡萄糖水溶液、类似的糖溶液、醇、乙二醇、醚、油、脂肪酸、脂肪酸酯和甘油酯等,但不限于此。

[0055] 为了将根据本发明的化合物用作药剂,将后者制造为制药制剂的形态,除了用于经口或非经口给药的活性成分之外,包含适合制药的有机或无机惰性载体材料,例如水、明胶、阿拉伯胶、乳糖、淀粉、植物油、聚亚烷基二醇等。制药制剂可以以如片剂、糖衣丸、栓剂或胶囊剂的固体形态存在,或者以液体、悬浮剂或乳剂的液体形态存在。另外,这些含有任

意的佐剂,例如防腐剂、稳定剂、湿润剂或乳化剂;用于变更渗透压的盐或缓冲剂。

[0056] 作为非经口给药,尤其优选为注射溶液或悬浮剂。

[0057] 作为载体系统,还可以使用表面活性剂助剂,例如胆汁酸盐或动植物磷脂、以及它们的混合物,以及脂质体或其组分。

[0058] 作为经口给药,尤其适合滑石及/或烃媒介物或粘合剂,例如含有乳糖、玉米或马铃薯淀粉的片剂、糖衣丸或胶囊剂。并且,还可以以液体形态给药,例如添加甜味剂的果汁。

[0059] 另外,根据本发明的由所述化学式1表示的化合物的对人体的容量,通常基于体重为70kg的成年患者,优选投入0.1mg/天至2,000mg/天。根据本发明的化合物可以分剂量给药一天一次至数次。然而,所述剂量可以根据患者的健康状况、年龄、体重、性别以及剂型和疾病程度而改变,因此,本发明的范围不限于上述剂量。

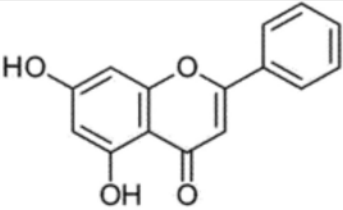
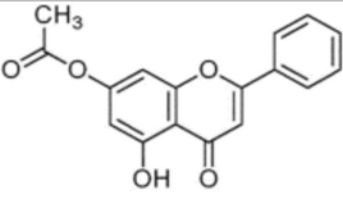
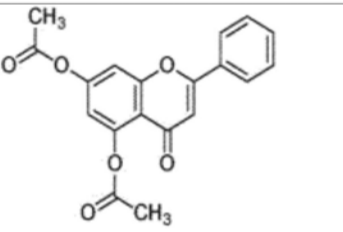
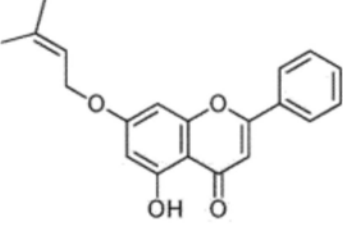
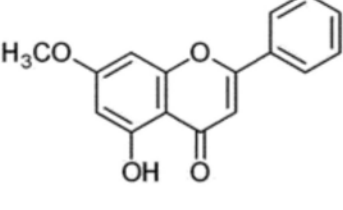
[0060] 实施方式

[0061] 下面,通过以下的制造例及实施例更详细地说明本发明,这些只是举例说明本发明而已,并不限制本发明的范围。

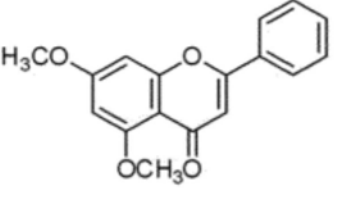
[0062] 实施例

[0063] 表1

[0064]

| 区分   | 化学结构                                                                                | 一般名称                                      |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|
|      |                                                                                     | IUPAC名称                                   |
| 比较例1 |    | 白杨素                                       |
|      |                                                                                     | 5,7-二羟基-2-苯基-4H-色烯-4-酮                    |
| 合成例1 |    | 7-O-乙酰基白杨素                                |
|      |                                                                                     | 5-羟基-4-氧代-2-苯基-4H-色烯-7-基乙酸酯               |
| 合成例2 |   | 5,7-二-O-乙酰基白杨素                            |
|      |                                                                                     | 4-氧代-2-苯基-4H-色烯-5,7-二基二醋酸酯                |
| 合成例3 |  | 7-O-异戊二烯基白杨素                              |
|      |                                                                                     | 5-羟基-7-((3-甲基-2-丁烯-1-基)氧基)-2-苯基-4H-色烯-4-酮 |
| 合成例4 |  | 7-O-甲氧基白杨素                                |
|      |                                                                                     | 5-羟基-7-甲氧基-2-苯基-4H-色烯-4-酮                 |

[0065]

|      |                                                                                     |                         |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------|
| 合成例5 |  | 5,7-二-O-甲氧基白杨素          |
|      |                                                                                     | 5,7-二甲氧基-2-苯基-4H-色烯-4-酮 |

[0066] [合成例1及2] 7-O-乙酰基白杨素和5,7-二-O-乙酰基白杨素的合成

[0067] 将乙酸酐 (10mM) 滴加到50mL的吡啶和白杨素 (10mM) 溶液中。在室温下边搅拌边反应2小时后,在40℃的温度下用旋转蒸发仪去除溶剂。

[0068] 将残余物溶解在二氯甲烷(MC),在1M的HCl中清洗3次,然后,用饱和碳酸氢钠溶液

和水进行中和。分离有机相,在MgSO<sub>4</sub>相干燥后在真空中进行浓缩。将残余物用MC/MeOH (10:0至9.5:1.5,v/v) 溶出,获得7-0-乙酰基白杨素 (7-0A) 和5,7-二-0-乙酰基白杨素。

[0069] [合成例3]7-0-异戊二烯基白杨素的合成

[0070] 向无水丙酮(70mL)中加入白杨素(10mM)、异戊烯基溴(2.2mM)和无水K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>(3.7mM)后,将混合物在65℃的温度下回流8小时。

[0071] 使用旋转蒸发仪在40℃的温度下除去混合物溶剂。将残余物溶于乙酸乙酯后,将其通过硅胶柱色谱法用己烷/乙酸乙酯(9:1:2:1,v/v)精制,得到7-0-7-0-异戊烯基白杨素。

[0072] [合成例4及5]7-0-甲氧基白杨素和5,7-二-0-甲氧基白杨素的合成

[0073] 在80mL的碳酸二甲酯(DMC,dimethyl carbonate)混合2.54g的白杨素(0.5mmol)和1.84g的1,8-二氮杂双环(5.4.0)十一-7-烯(1,8-Diazabicyclo(5.4.0)undec-7-ene),并在90℃的温度下反应19小时。

[0074] 向反应物加入甲醇(240ml)后进行浓缩,然后,向浓缩物加入乙酸乙酯(200ml)和1N的HCl(100ml)后进行分馏。

[0075] 浓缩有机分馏层(Ethyl acetate)后用NaCl中和,然后,用Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>脱水,并进行硅胶柱分离来分离7-0-甲氧基白杨素和5,7-二-0-甲氧基白杨素。

[0076] 实验例1

[0077] (1)对amadori化合物(amadori compound)形成的血红蛋白-δ-葡萄糖酸内酯分析(初期阶段)

[0078] 蛋白质糖基化的初期阶段的评价通过-葡萄糖酸内酯分析法(Rahbar et al., 1999)来确定。简而言之,在无菌黑暗的条件下,将新鲜的人的血液(50mg/mL)与葡萄糖(144mg/mL)在含有0.2g/L的NaN<sub>3</sub>的磷酸盐缓冲液(pH7.4)中于37℃的温度下培养7天。

[0079] 在特定实验中,将指定的样品以0.01-1mM的浓度范围添加到模型系统中。在激发和发射最大值为355nm和460nm下分别测量样品的荧光。氨基胍(Aminoguanidine)为阳性对照组利用公知的抑制剂进行了试验。

[0080] (2)对AGE形成的牛血清白蛋白-丙酮醛分析(中间阶段)

[0081] 在各种浓度的化合物(包括对照组)的存在下,将牛血清白蛋白(50mg/mL)与甲基乙二醛(100mM)在磷酸钠缓冲液(0.1mM,pH7.4)中在37℃的温度下培养24小时。

[0082] 已明确用于溶解样品而使用的二甲基亚砷不影响反应。通过0.2mm的膜滤器过滤所有试剂和样品后进行灭菌。利用荧光光谱仪(Luminescence spectrometer)LS50B(Perkin-Elmer Ltd.,Buckinghamshire,England)(Wu&Yen,2005)在355nm的激发波长和460nm的发射波长下测量荧光强度。测试了氨基胍作为阳性对照。从记录剩余活性的对数浓度的最小二乘回归线估计显示出50%的抑制活性(IC<sub>50</sub>)的每个测试样品的浓度。

[0083] (3)对AGEs交联的N-乙酰基-甘氨酸-赖氨酸-甲酯D-核糖鉴定(后期阶段)

[0084] 本试验是由Rahbar等人(1999)利用描述的方法,在D-核糖的存在下评价样品抑制GK肽交联的能力。在无菌条件下,将GK肽(26.7mg/mL)与D-核糖(200mg/mL)在磷酸钠缓冲液(0.5M,pH 7.4)中在37℃的温度下培养24小时。除了在10mM和50mM中使用的氨基胍之外,将合成的化合物以1mM的最终浓度添加到模型系统。在培养期结束时,在335nm的激发波长和460nm的发射波长测量荧光强度。

[0085] 实验例1的结果

[0086] 表2显示了在各阶段白杨素衍生物对晚期糖基化终末产物的形成的抑制效果。

[0087] 表2

|        |                           |                       |        |         |
|--------|---------------------------|-----------------------|--------|---------|
| [0088] | 区分                        | IC <sub>50</sub> (μM) |        |         |
|        | 区分                        | 初期阶段                  | 中间阶段   | 后期阶段    |
|        | 比较例1                      | 17.41                 | 24.96  | NI      |
| [0089] | 合成例1                      | 23.54                 | 21.61  | > 200   |
|        | 合成例2                      | 0.26                  | 0.91   | 22.33   |
|        | 合成例3                      | NI                    | > 200  | > 200   |
|        | 合成例4                      | NI                    | > 200  | NI      |
|        | 合成例5                      | 7.88                  | 41.78  | 39.88   |
|        | 阳性对照组<br>(Aminoguanidine) | 109.74                | 136.79 | 1902.67 |

[0090] (1) 初期阶段的结果:白杨素衍生物对amadori化合物形成的抑制效果

[0091] 为了抑制amadori化合物的形成,将白杨素和其衍生物的能力进行比较的结果,合成例1和合成例5的初期抑制活性比阳性对照组高4.66倍、13.92倍。合成例2对amadori化合物形成显示出最强的抑制活性,这比白杨素及阳性对照组高66.96倍和422.07倍。合成例2在0.0025至0.05μg/mL下显示出1.76至55.13%的剂量依赖性抑制率。

[0092] (2) 中间阶段的结果:白杨素衍生物对AGE形成的抑制效果

[0093] 分析了白杨素及衍生物对AGE形成的抑制活性,并将结果示于表2。作为阳性对照组使用了AGE抑制剂氨基胍 (Aminoguanidine) (IC<sub>50</sub>=136.79μM),而白杨素显示比阳性对照组高5.48倍的活性。

[0094] 在测试化合物中,合成例1、合成例2及合成例5显示出IC<sub>50</sub>值分别为21.61、0.91及41.78μM的强活性。尤其,合成例2在0.05至0.5μg/mL的低浓度下显示出6.79至93.42%的抑制活性。

[0095] (3) 后期阶段的结果:白杨素衍生物对AGE交联的抑制效果

[0096] 如表2所示,合成例2及合成例5对AGE交联显示出有意义的抑制活性。合成例2及合成例5中,IC<sub>50</sub>值分别显示22.33和39.88μM,而阳性对照组显示较低的IC<sub>50</sub>值(1902.67μM)。

[0097] 类似地,由于在合成例2及合成例5的AGE形成的三个阶段中IC<sub>50</sub>值较低,因此,可被视为潜在的AGE抑制剂。另一方面,在10.0mg/mL的浓度下,白杨素没有显示抑制活性。

[0098] 实验例2:在RAW 264.7细胞中测量NO生成和细胞存活能力

[0099] 使用MTS分析试剂盒在RAW 264.7细胞中调查了白杨素和衍生物的细胞毒性。在96孔板中培养细胞(1.6×10<sup>4</sup>/孔),并用样品(10,25和100μM)处理12小时、24小时、48小时及72小时。培养后,将20μL/孔的MTS溶液在5%的湿度、CO<sub>2</sub>大气中在37℃的温度下培养90分钟。使用EL-800通用酶标仪(Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, USA)测量在490nm的光密度3次。未处理组的细胞存活能力设定为100%。将RAW 264.7细胞接种在4×10<sup>5</sup>细胞/孔

的12孔板中,脂多糖(LPS) (1 $\mu$ g/mL)和各种浓度的样品培养24小时。使用制造商描述的Grist试剂系统测量培养基中氮氧化物(NO)的浓度。使用EL-800通用酶标仪(Bio-Tek Instrument Inc., Winooski, USA)在570nm下测量NO的产生,并将其与亚硝酸盐标准曲线进行比较[21]。

#### [0100] 实验例2的结果

[0101] 白杨素衍生物对RAW 264.7细胞的抗炎效果的结果为如图1所示。

[0102] 在RAW 264.7细胞中调查了白杨素及其衍生物对脂多糖(LPS)-诱导的炎症的影响,并使用NO浓度作为指示细胞炎症程度的生物标记。图1(A)示出了比较例1、合成例1、合成例2、合成例4及合成例5对脂多糖(LPS)-诱导的RAW 264.7细胞中NO生成的效果。另外,合成例2的处理在脂多糖(LPS)-诱导的RAW 264.7细胞中以浓度依赖性地抑制了NO,其效果与比较例1相似。通过MTS分析观察到白杨素和衍生物在RAW 264.7细胞中的细胞存活能力的效果。在脂多糖(LPS)处理后,上清液中NO的浓度增加了,并在24小时后在25至100 $\mu$ M的浓度下,化合物没有显示出细胞毒性(图1(B))。

[0103] 图1表示白杨素及其衍生物对RAW 264.7细胞中的NO生成(A)和细胞存活能力(B)引起的影响。\*号与脂多糖(LPS)组相比显示出有意义的差异(\* $p$ <0.05,\*\* $p$ <0.01,\*\*\* $p$ <0.001)。所示的数据为平均 $\pm$ 标准误差(SEM)( $n=3$ )。

#### [0104] 实验例3:溶解度分析

[0105] 将白杨素和衍生物溶解在蒸馏水中,为了最大化溶解度,执行超声处理1小时,并在37 $^{\circ}$ C下培养。超声处理后,通过离心分离(7000g,37 $^{\circ}$ C,5分钟)除去未溶解的样品。用甲醇稀释上清液后用0.45 $\mu$ m的一次性注射器式过滤器(Advantec, Dublin, CA, USA)进行过滤,然后通过HPLC分析来分析样品的浓度。

#### [0106] 实验例3的结果

[0107] 比较白杨素衍生物的溶解度为如表3所示。

[0108] 表3

| [0109] | 区分    | 对水的溶解度<br>(mM, 37 $^{\circ}$ C) | 相对溶解度 |
|--------|-------|---------------------------------|-------|
|        | 比较例1  | 0.030                           | 1.00  |
|        | 合成例1  | 0.086                           | 2.87  |
|        | 合成例2  | 0.265                           | 8.83  |
|        | 阳性对照组 | 0.030                           | 1.00  |

[0110] 在合成例1及合成例2,在水中的溶解度分别为0.086和0.265,与比较例1相比高2.87倍和8.83倍。

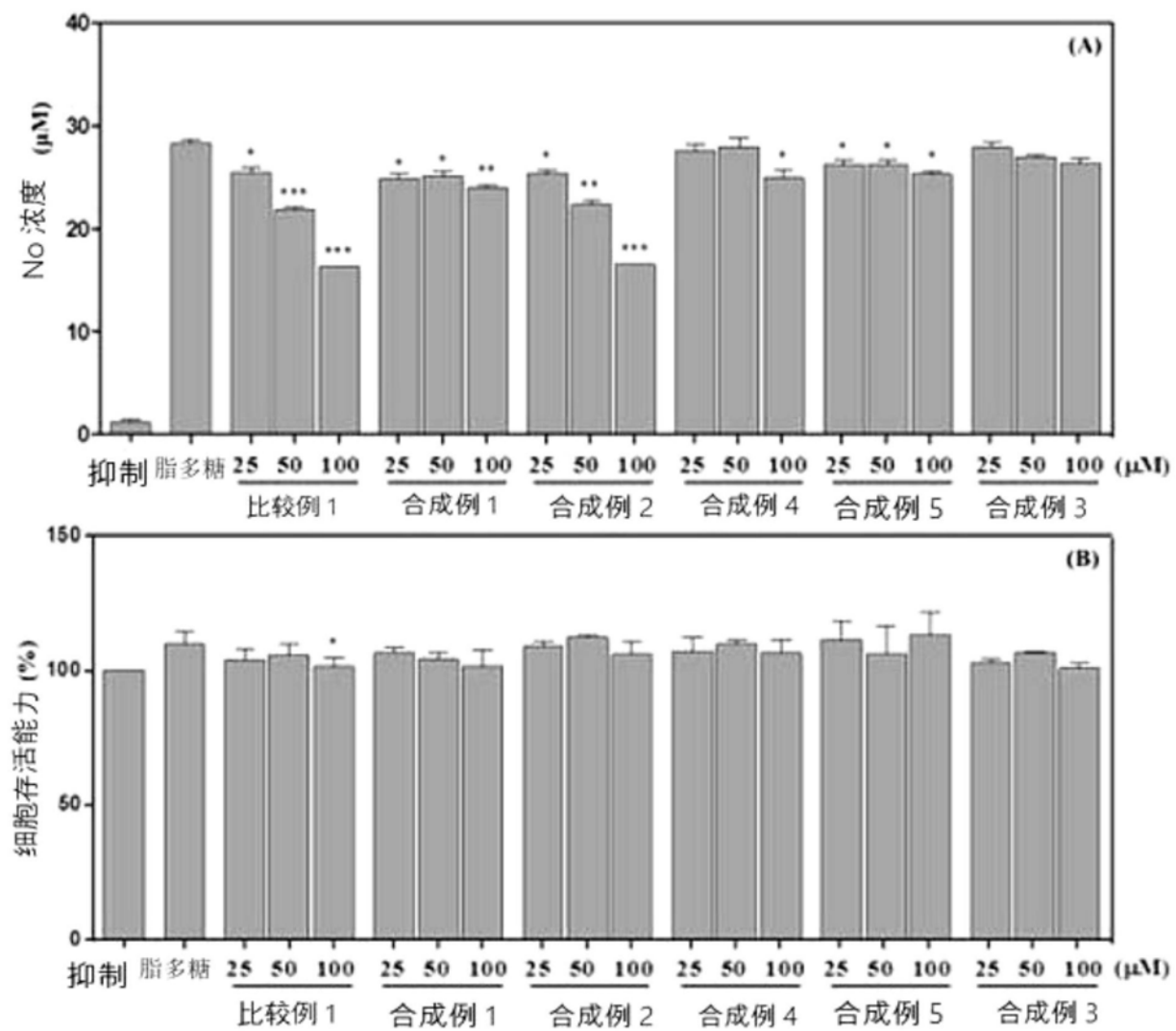


图1