



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114599370 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 07

(21) 申请号 202080073934.1

武藏国弘

(22) 申请日 2020.10.23

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

(30) 优先权数据

公司 11021

2019-193329 2019.10.24 JP

专利代理师 关旭颖 吴小明

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int. Cl.

2022.04.21

A61K 31/655 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 19/00 (2006.01)

PCT/JP2020/039896 2020.10.23

A61P 19/04 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

A61P 19/02 (2006.01)

W02021/079983 JA 2021.04.29

(71) 申请人 国立大学法人京都大学

地址 日本国京都府

申请人 株式会社京都创药研究所

(72) 发明人 西谷江平 垣塚彰 池田华子

松田秀一 岩井祥子 齐藤元央

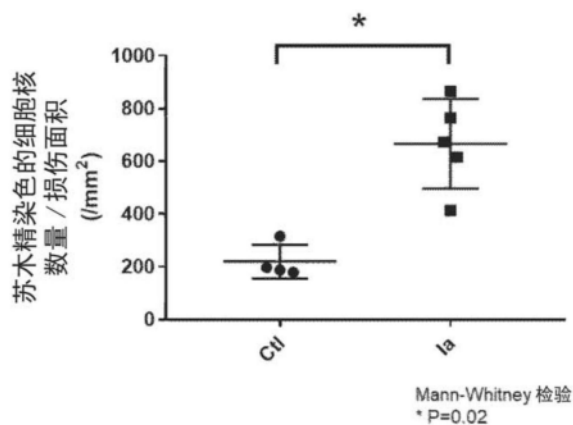
权利要求书3页 说明书14页 附图12页

(54) 发明名称

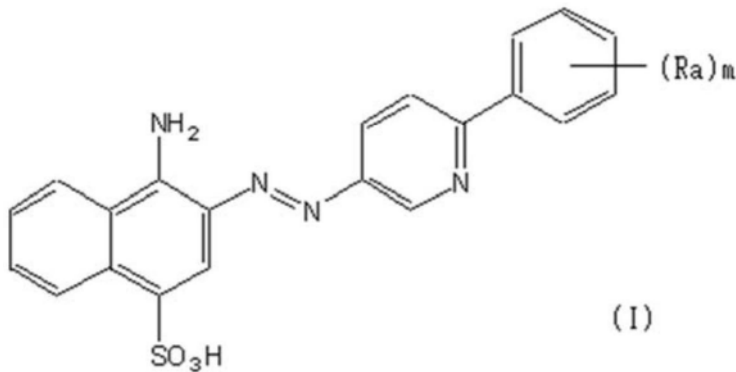
用于保护软骨的药物组合物

(57) 摘要

本申请的发明人已经发现式(I)的化合物具有保护软骨的效果。因此,本公开提供了一种用于保护软骨的药物组合物,所述药物组合物包含式(I)的化合物或者其酯、氧化物、药用盐或溶剂化物。该药物组合物可以用于治疗和/或预防与软骨退变相关的疾病,诸如骨关节炎。



1. 一种用于保护软骨的药物组合物,所述药物组合物包含式(I)的化合物,或者其酯、氧化物、药用盐或溶剂化物:



其中

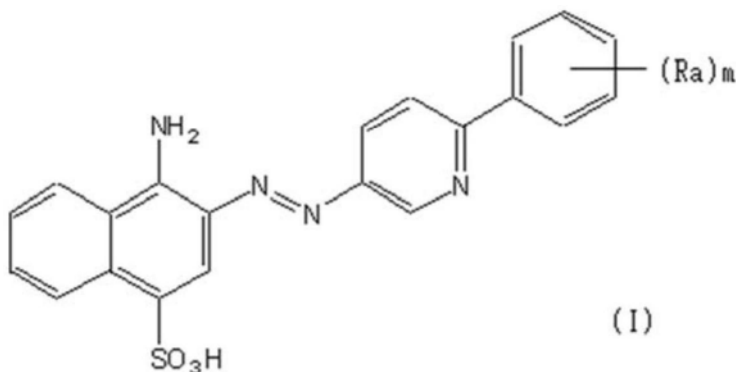
Ra选自自由以下各项组成的组:卤素、羟基、烷基、卤素取代的烷基、芳基、卤素取代或烷基取代的芳基、烷氧基、羟基取代或羧基取代的烷氧基、芳氧基、卤素取代或烷基取代的芳氧基、CHO、C(O)-烷基、C(O)-芳基、C(O)-烷基-羧基、C(O)-亚烷基-羧基酯和氰基,并且m为选自0至4的整数。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,所述药物组合物用于保护软骨细胞。

3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,所述药物组合物用于治疗和/或预防与软骨退变相关的疾病。

4. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中所述与软骨退变相关的疾病是骨关节炎。

5. 一种用于治疗 and/或预防与软骨退变相关的疾病的药物组合物,所述药物组合物包含式(I)的化合物,或者其酯、氧化物、药用盐或溶剂化物:



其中

Ra选自自由以下各项组成的组:卤素、羟基、烷基、卤素取代的烷基、芳基、卤素取代或烷基取代的芳基、烷氧基、羟基取代或羧基取代的烷氧基、芳氧基、卤素取代或烷基取代的芳氧基、CHO、C(O)-烷基、C(O)-芳基、C(O)-烷基-羧基、C(O)-亚烷基-羧基酯和氰基,并且m为选自0至4的整数。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述与软骨退变相关的疾病是骨关节炎。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的药物组合物,其中每个Ra基团独立地选自自由以下各项组成的组:卤素、羟基、烷基、卤素取代的烷基、和烷氧基。

8. 根据权利要求1至6中任一项所述的药物组合物,其中所述式(I)的化合物选自自由以

下各项组成的组：

- 4-氨基-3-(6-苯基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-(6-对甲苯基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-(6-间甲苯基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-(6-邻甲苯基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-(6-联苯-2-基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸；
- 3-[6-(2-乙酰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]-4-氨基萘-1-磺酸；
- 3-[6-(3-乙酰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]-4-氨基萘-1-磺酸；
- 3-[6-(4-乙酰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]-4-氨基萘磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2,4-二氯苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-三氟甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；4-氨基-3-[6-(4-三氟甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-氯苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(3-氯苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(4-氯苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-甲氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(4-甲氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-异丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(4-异丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-苯氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(3-甲氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2,3-二甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2,5-二甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(3,5-二甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(3-三氟甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-[4-[5-(1-氨基-4-磺基萘-2-基偶氮基)吡啶-2-基]苯基]-4-氧代丁酸；
- 4-氨基-3-(6-联苯-3-基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(3-氰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(4-氰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(3,5-双三氟甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(4-苯甲酰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(4-氟-2-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(5-氟-2-丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-氟-6-丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(4-氟-2-丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(5-氟-2-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-氟-5-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；
- 4-氨基-3-[6-(2-丁氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；

- 4-氨基-3-[6-(2-己氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(4-丁基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(2-羟基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-[2-(6-羟基己氧基)苯基]吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-[2-[5-(1-氨基-4-磺基萘-2-基偶氮基)吡啶-2-基]苯氧基]丁酸；  
4-氨基-3-[6-[2-(3-羟基丙氧基)苯基]吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(2-异丁氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(5-氯-2-羟基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(4-甲基联苯-2-基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(4'-氯-4-甲基联苯-2-基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(4,3',5'-三甲基联苯-2-基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(3'-氯-4-甲基联苯-2-基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(2,6-二甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；  
4-氨基-3-[6-(3-甲酰基-2-异丙氧基-5-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸；和  
4-氨基-3-[6-(3-甲酰基-2-丁氧基-5-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的药物组合物,其中所述式(I)的化合物是4-氨基-3-[6-(4-氟-2-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸。
10. 根据权利要求1至9中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物是关节内施用的。
11. 根据权利要求1至9中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物是静脉内施用的。

## 用于保护软骨的药物组合物

### 技术领域

[0001] 本申请要求日本专利申请号2019-193329的优先权的权益,其完整内容通过引用并入本文。

[0002] 本公开涉及用于保护软骨的药物组合物。

### 背景技术

[0003] 关节软骨是透明软骨,并且由软骨细胞和软骨基质组成。软骨基质由软骨细胞产生,并且由2型胶原蛋白和蛋白聚糖诸如硫酸软骨素组成。透明软骨是一种无血管组织,并且难以愈合。一旦透明软骨损伤,其就不会被修复为透明软骨,并且变成纤维软骨。

[0004] 骨关节炎是关节软骨的一种主要病理。估计日本的患者数量超过两千万,并且估计具有QOL降低的症状诸如疼痛、行走困难或日常生活困难的患者数量为七百万至一千万。骨折或创伤后的软骨损伤也降低QOL,然后发展为继发性骨关节炎。这样的对关节软骨的损伤是不可逆的。目前,没有可用的修复软骨的药物,并且仅可用对症治疗。当骨关节炎发展至其终末期并且QOL显著降低时,进行关节置换术以移除所有损伤的关节软骨并且用人工关节替代整个关节。关节置换术的数量在全球范围内不断增加,并且引起大量的医疗费用。

[0005] 已经报道了用药物修复关节软骨的尝试。例如,在临床试验中调查了通过抑制Wnt- $\beta$ -连环蛋白对关节软骨的保护(非专利文献1)。报道了不饱和脂肪酸具有抑制软骨细胞的细胞凋亡和保护软骨细胞的效果(非专利文献2)。然而,尚没有药物可用于实际使用。

[0006] 某些4-氨基-萘-1-磺酸衍生物具有VCP(含缬酪肽蛋白)ATP酶抑制活性,并且被认为对于治疗多种疾病有效(专利文献1)。尤其是,已知它们在治疗和/或预防一些眼病和瘦素抵抗方面有效(专利文献2至6)。

[0007] 参考文献

[0008] 专利文献

[0009] [专利文献1]W02012/014994

[0010] [专利文献2]W02012/043891

[0011] [专利文献3]W02014/129495

[0012] [专利文献4]W02015/129809

[0013] [专利文献5]W02015/033981

[0014] [专利文献6]W02019/131720

[0015] 非专利文献

[0016] [非专利文献1]Yazici Y等人,Osteoarthritis Cartilage,2017年10月;25(10):1598-1606。

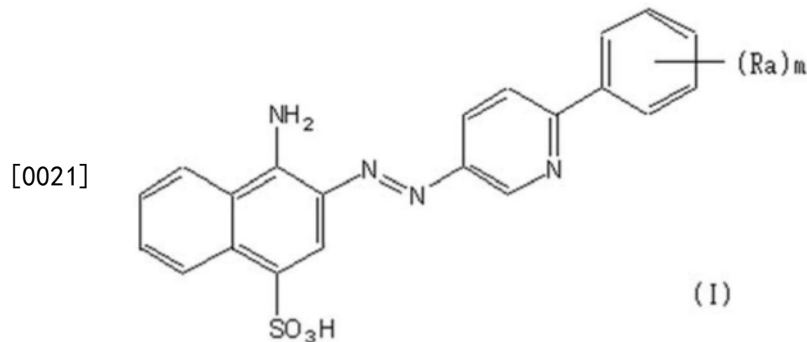
[0017] [非专利文献2]Sakata S等人,J Orthop Res,2015年3月;33(3):359-65。

### 发明内容

[0018] 本公开的一个目的是提供一种用于保护软骨的药物组合物。

[0019] 本发明人已经发现, VCP抑制剂具有保护软骨的效果, 并且对于治疗和/或预防与软骨退变相关的疾病有效。

[0020] 因此, 本公开的一个方面提供了一种用于保护软骨的药物组合物, 所述药物组合物包含式 (I) 的化合物, 或者其酯、氧化物、药用盐或溶剂化物:



[0022] 其中

[0023] Ra选自自由以下各项组成的组: 卤素、羟基、烷基、卤素取代的烷基、芳基、卤素取代或烷基取代的芳基、烷氧基、羟基取代或羧基取代的烷氧基、芳氧基、卤素取代或烷基取代的芳氧基、CHO、C(O)-烷基、C(O)-芳基、C(O)-烷基-羧基、C(O)-亚烷基-羧基酯和氰基, 并且

[0024] m为选自0至4的整数。

[0025] 本公开的另一个方面提供了一种用于治疗和/或预防与软骨退变相关的疾病的药物组合物, 所述药物组合物包含式 (I) 的化合物或者其酯、氧化物、药用盐或溶剂化物。

[0026] 本公开的一个效果是提供一种用于保护软骨的药物组合物。

### 附图说明

[0027] 图1示出了在衣霉素存在下培养的小鼠软骨细胞中的活细胞的相对数量。

[0028] 图2示出了在葡萄糖饥饿应激下培养的小鼠软骨细胞中的活细胞的相对数量。

[0029] 图3示出了在TNF $\alpha$ 存在下培养的小鼠软骨细胞中的活细胞的相对数量。

[0030] 图4示出了用于测量在衣霉素存在下培养的小鼠软骨细胞中的Bip和CHOP的蛋白质印迹的结果。

[0031] 图5示出了用于测量在TNF $\alpha$ 存在下培养的小鼠软骨细胞中的cCap3的蛋白质印迹的结果。

[0032] 图6示出了在衣霉素存在下培养的人软骨细胞中的活细胞的相对数量。

[0033] 图7示出了在衣霉素存在下培养的人软骨细胞的胱天蛋白酶3/7活性。

[0034] 图8示出了用于测量在衣霉素存在下培养的人软骨细胞中的Bip、ATF4和CHOP的蛋白质印迹的结果。在不存在衣霉素的情况下的ATF4和CHOP的表达水平分别为 $0.001 \pm 0.001$ 和 $0.01 \pm 0.02$ 。

[0035] 图9示出了用于测量在衣霉素存在下培养的人软骨细胞中的p-JNK和JNK的蛋白质印迹的结果。

[0036] 图10示出了在IL-1 $\beta$ 存在下培养的人软骨细胞中的MMP13和MMP1的基因表达水平, 其通过实时PCR测定。

[0037] 图11示出了在器官培养中培养的人腿胫关节软骨中的活细胞的相对数量。

[0038] 图12示出了由用单碘代乙酸酯 (MIA) 处理的大鼠膝软骨制备并且用番红-O染色的切片的图像。

[0039] 图13示出了图12所示的胫骨关节的放大图。

[0040] 图14示出了用MIA处理的大鼠的ORSI评分。示出了内侧股骨、外侧股骨、内侧胫骨和外侧胫骨的评分的平均值。

[0041] 图15示出了创伤性软骨损伤模型大鼠的后外侧股骨髁的Mankin评分。在膝关节的周期性压缩后两周或四周时评估评分。

[0042] 图16示出了创伤性软骨损伤模型大鼠的后外侧股骨髁中的软骨损伤体积。在膝关节的周期性压缩后四周时测定体积。

[0043] 图17示出了创伤性软骨损伤模型大鼠的后外侧股骨髁中的软骨细胞的数量。在膝关节的周期性压缩后四周时测定数量。

### 具体实施方式

[0044] 当数值伴随术语“约”时,所述值旨在表示在所述值的-10%至所述值的+10%的范围内的任何值。例如,“约20”意指“从18到22的值”。用下限值和上限值限定的范围涵盖从下限到上限的所有值,包括两个界限值。当范围伴随术语“约”时,两个界限解读为伴随该术语。例如,“约20至30”解读为“18至33”。

[0045] 除非另外限定,本文中使用的术语按照诸如有机化学、医学科学、药物科学、分子生物学和微生物学的技术领域中的技术人员通常理解的进行解读。本文中使用的某些术语如下定义。本文中的定义优先于通常的理解。

[0046] 术语“烷基”是指具有1至10个、优选1至6个碳原子的一价饱和脂族烃基。烷基的实例包括但不限于直链和支链的烃基,诸如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、正戊基和新戊基。

[0047] 作为修饰基团名称的用语的术语“取代的”表示基团的一个或多个氢原子相同地或不同地被一个或多个指定取代基取代。

[0048] 术语“亚烷基”是指具有1至10个、优选1至6个碳原子的二价饱和脂族烃基。亚烷基包括支链和直链的烃基。

[0049] 术语“烷氧基”是指-O-烷基,其中所述烷基如本文中所定义。烷氧基的实例包括但不限于甲氧基、乙氧基、正丙氧基、异丙氧基、正丁氧基、叔丁氧基、仲丁氧基和正戊氧基。

[0050] 术语“芳基”是指具有单个环(例如苯基)或多个稠合环(例如萘基或蒽基)的6至14个碳原子的一价芳族碳环基团。芳基典型地包括苯基和萘基。

[0051] 术语“芳氧基”是指-O-芳基,其中所述芳基如本文中所定义,包括例如苯氧基和萘氧基。

[0052] 术语“氰基”是指-CN基团。

[0053] 术语“羧基(carboxyl/carboxy)”是指-COOH基团或其盐。

[0054] 术语“羧酸酯”是指-C(O)O-烷基,其中所述烷基如本文中所定义。

[0055] 术语“卤素(halo)”是指卤素(halogen),尤其是氟、氯、溴或碘。

[0056] 术语“羟基”是指-OH基团。

[0057] 除非另外指明,本文中未明确定义的取代基通过以下方式命名:首先描述取代基

的末端官能团的名称,随后描述朝向与取代基的结合点的一个或多个相邻官能团。例如,取代基“芳基烷基氧基羰基”是指(芳基)-(烷基)-O-C(O)-。

[0058] 一些式(I)的化合物具有对映异构体或非对映异构体,这取决于它们的取代基的排列。一些式(I)的化合物可以作为外消旋混合物提供,或者可以通过已知方法分离的立体异构纯的形式提供。一些式(I)的化合物可以是互变异构体。

[0059] 术语“酯”是指在体内水解的酯,其可以在人体内容易地分解以留下母体化合物或其盐。合适的酯包括例如来源于药用脂族羧酸(尤其是烷酸、烯酸、环烷酸和烷二酸)的那些,其中每个烷基或烯基具有例如不超过六个碳原子。酯的实例包括甲酸酯、乙酸酯、丙酸酯、丁酸酯、丙烯酸酯和乙基琥珀酸酯。

[0060] 术语“氧化物”是指其中杂芳基中的氮原子被氧化而形成N-氧化物的氧化物。

[0061] 术语“药用盐”可以表示式(I)的化合物与无机酸或有机酸的盐。优选的盐包括:与无机酸诸如盐酸、氢溴酸、磷酸和硫酸的盐,以及与有机羧酸和磺酸诸如乙酸、三氟乙酸、丙酸、马来酸、富马酸、苹果酸、柠檬酸、酒石酸、乳酸、苯甲酸、甲磺酸、乙磺酸、苯磺酸、甲苯磺酸、萘磺酸和萘二磺酸的盐。

[0062] 药用盐还包括与常规碱的盐,诸如碱金属盐(例如钠盐和钾盐)、碱土金属盐(例如钙盐和镁盐)、来源于氨和有机胺(例如二乙胺、三乙胺、乙基二异丙基胺、普鲁卡因、二苄基胺、N-甲基吗啉、二氢松香胺(dihydroabiethylamine)、甲基哌啶、L-精氨酸、肌酸、胆碱、L-赖氨酸、乙二胺、N,N-二苄基乙二胺(benzathine)、乙醇胺、葡甲胺和氨丁三醇)的铵盐,尤其是钠盐。

[0063] 术语“溶剂化物”意指与溶剂分子配位形成固态或液态的配合物的式(I)的化合物。合适的溶剂化物是水合物。

[0064] 如本文中使用的术语“式(I)的化合物”旨在包括其酯、氧化物、药用盐和溶剂化物,只要情况允许即可。

[0065] 在一个实施方案中,式(I)中的每个Ra基团都独立地选自由以下各项组成的组:卤素、羟基、烷基、卤素取代的烷基、和烷氧基。

[0066] 在一个实施方案中,式(I)中的每个Ra基团都独立地选自由卤素和烷基组成的组。

[0067] 在一个实施方案中,式(I)具有两个Ra基团,所述两个Ra基团是卤素和烷基。

[0068] 在一个实施方案中,式(I)的化合物选自下表1中所列出的化合物:

[0069] [表1-1]

编号	化合物名称
1	4-氨基-3-(6-苯基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸
2	4-氨基-3-(6-对甲苯基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸
3	4-氨基-3-(6-间甲苯基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸
4	4-氨基-3-(6-邻甲苯基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸
[0070] 5	4-氨基-3-(6-联苯-2-基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸
6	3-[6-(2-乙酰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]-4-氨基萘-1-磺酸
7	3-[6-(3-乙酰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]-4-氨基萘-1-磺酸
8	3-[6-(4-乙酰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]-4-氨基萘磺酸
9	4-氨基-3-[6-(2,4-二氯苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
10	4-氨基-3-[6-(2-三氟甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
11	4-氨基-3-[6-(4-三氟甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
12	4-氨基-3-[6-(2-氯苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
13	4-氨基-3-[6-(3-氯苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
14	4-氨基-3-[6-(4-氯苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
15	4-氨基-3-[6-(2-甲氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
[0071] 16	4-氨基-3-[6-(4-甲氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
17	4-氨基-3-[6-(2-异丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
18	4-氨基-3-[6-(4-异丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
19	4-氨基-3-[6-(2-苯氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
20	4-氨基-3-[6-(3-甲氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸

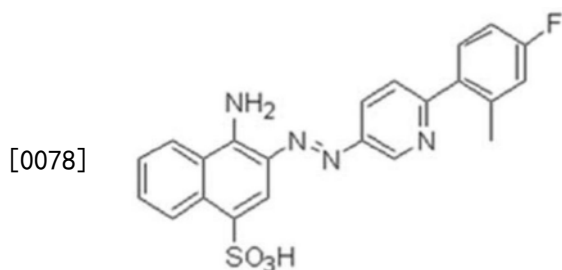
[0072] [表1-2]

	21	4-氨基-3-[6-(2,3-二甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	22	4-氨基-3-[6-(2,5-二甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	23	4-氨基-3-[6-(3,5-二甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	24	4-氨基-3-[6-(3-三氟甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	25	4-{4-[5-(1-氨基-4-磺基萘-2-基偶氮基)吡啶-2-基]苯基}-4-氧代丁酸
	26	4-氨基-3-(6-联苯-3-基吡啶-3-基偶氮基)萘-1-磺酸
	27	4-氨基-3-[6-(3-氰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
[0073]	28	4-氨基-3-[6-(4-氰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	29	4-氨基-3-[6-(3,5-双三氟甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘磺酸
	30	4-氨基-3-[6-(4-苯甲酰基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	31	4-氨基-3-[6-(2-丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	32	4-氨基-3-[6-(4-氟-2-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	33	4-氨基-3-[6-(5-氟-2-丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	34	4-氨基-3-[6-(2-氟-6-丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	35	4-氨基-3-[6-(4-氟-2-丙氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	36	4-氨基-3-[6-(5-氟-2-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	37	4-氨基-3-[6-(2-氟-5-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	38	4-氨基-3-[6-(2-丁氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
[0074]	39	4-氨基-3-[6-(2-己氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	40	4-氨基-3-[6-(4-丁基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸

[0075] [表1-3]

	41	4-氨基-3-[6-(2-羟基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	42	4-氨基-3-{6-[2-(6-羟基己氧基)苯基]吡啶-3-基偶氮基}萘-1-磺酸
	43	4-{2-[5-(1-氨基-4-磺基萘-2-基偶氮基)吡啶-2-基]苯氧基}丁酸
	44	4-氨基-3-{6-[2-(3-羟基丙氧基)苯基]吡啶-3-基偶氮基}萘-1-磺酸
	45	4-氨基-3-[6-(2-异丁氧基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	46	4-氨基-3-[6-(5-氯-2-羟基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	47	4-氨基-3-[6-(4-甲基联苯-2-基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
[0076]	48	4-氨基-3-[6-(4'-氯-4-甲基联苯-2-基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	49	4-氨基-3-[6-(4,3',5'-三甲基联苯-2-基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	50	4-氨基-3-[6-(3'-氯-4-甲基联苯-2-基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	51	4-氨基-3-[6-(2,6-二甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	52	4-氨基-3-[6-(3-甲酰基-2-异丙氧基-5-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸
	53	4-氨基-3-[6-(3-甲酰基-2-丁氧基-5-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸

[0077] 在一个实施方案中,药物组合物的活性成分是由下式表示的4-氨基-3-[6-(4-氟-2-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸:



[0079] 或者其酯、氧化物、药用盐或溶剂化物,优选钠盐。

[0080] 在W02012/014994(专利文献1)中详细描述了式(I)的化合物(尤其是以上所列出的化合物)的特征以及其合成方法。

[0081] 如以下描述的实施例所证实的,式(I)的化合物可以保护软骨。因此,本公开的一个方面提供了一种用于保护软骨的药物组合物,所述药物组合物包含式(I)的化合物。如本文中使用的,“保护软骨”或“软骨的保护”包括保护软骨细胞、抑制软骨破坏酶(例如,软骨基质降解酶,诸如基质金属蛋白酶)的表达和/或抑制软骨基质的退变。保护软骨细胞包括抑制软骨细胞的死亡。在一个实施方案中,保护软骨可以保持软骨的结构和/或功能、预防软骨退变和/或抑制软骨功能下降。因此,药物组合物可以保护软骨,例如,在软骨在关节内骨折、韧带损伤或关节手术中受损时保护软骨。药物组合物还可以用于在治疗和/或预防软骨退变中或在治疗和/或预防与软骨退变相关的疾病诸如骨关节炎中保护软骨。

[0082] 以下描述的实施例进一步证明式 (I) 的化合物抑制在创伤性软骨损伤模型中的软骨退变。因此,本公开的一个方面提供了一种用于治疗 and/或预防软骨退变的药物组合物。本公开的一个方面提供了一种用于治疗 and/或预防与软骨退变相关的疾病的药物组合物。与软骨退变相关的疾病的实例包括骨关节炎。骨关节炎包括原发性骨关节炎和继发性骨关节炎,并且尤其是创伤后继发性骨关节炎。骨关节炎可以在任何关节中发生,并且包括例如颞下颌关节骨关节炎、膝部骨关节炎、髌部骨关节炎、踝部骨关节炎、肩部骨关节炎、肘部骨关节炎、腕部骨关节炎、手指骨关节炎或椎关节强硬 (spondylosis)。

[0083] 如本文中使用的术语“治疗 (treating/treatment)”意指在患有疾病的受试者中减少或消除病因,延迟或停止疾病的进展,和/或减少、减轻、改善或消除疾病的症状。

[0084] 如本文中使用的术语“预防 (preventing/prevention)”意指在受试者尤其是易患病但尚未患病的受试者中防止疾病开始或者降低疾病开始的可能性。易患骨关节炎但尚未患病的受试者的实例包括具有骨关节炎的风险因素的受试者。风险因素的实例包括但不限于遗传、职业、吸烟、代谢疾病 (例如,高脂血症、高血压、肥胖)、软骨脆弱性、软骨下骨脆弱性、骨质疏松、创伤、关节发育不良、连枷状关节和高龄 (例如,超过50岁、尤其是超过60岁的人)。

[0085] 用药物组合物治疗的受试者包括动物,典型是哺乳动物 (例如,人、小鼠、大鼠、仓鼠、兔、猫、狗、牛、绵羊或猴),尤其是人。

[0086] 药物组合物可以通过常规的施用途径以任何方式施用,例如,通过口服施用、肠胃外施用、注射或输注。所述组合物可以是适合于各施用途径的剂型。在一个实施方案中,药物组合物是关节内施用的。在一个实施方案中,药物组合物是静脉内施用的。

[0087] 适合于口服施用的剂型包括颗粒剂、细粒剂、粉剂、包衣片剂、片剂、栓剂、细粉剂、胶囊剂、微胶囊剂、咀嚼片剂、液体剂、混悬剂和乳剂。适合于注射的剂型可以是常规药物剂型,例如适合于冠状动脉内施用、静脉注射、输注或用于活性成分延长释放的制剂的那些。用于关节内施用、静脉注射或输注的剂型包括:水性和非水性可注射溶液,其可以包含赋形剂,诸如抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂或等渗剂;以及水性和非水性可注射混悬剂,其可以包含赋形剂,诸如悬浮剂或增稠剂。这样的剂型可以作为在密封的安瓿或小瓶中的液体剂提供,或者作为冻干产品提供,以在使用前通过加入无菌液体诸如注射用水而立即进行准备。可注射溶液或混悬剂可以由粉剂、颗粒剂或片剂制备。

[0088] 这样的剂型可以通过常规配制方法制备。如果制剂需要的话,可以加入各种药用赋形剂。可以根据所采用的剂型使用任何赋形剂。赋形剂的实例包括缓冲剂、表面活性剂、稳定剂、防腐剂、填充剂、稀释剂、添加剂、崩解剂、粘合剂、包衣剂、润滑剂、润滑剂、调味剂、甜味剂和增溶剂。

[0089] 基于诸如受试者的动物物种、健康状况、年龄和重量,施用途径以及所采用的剂型的因素,药物组合物的给药的剂量和次数可以由本领域技术人员适当地设定,使得将有效量的式 (I) 的化合物施用至受试者。本领域技术人员在给定情形下可以使用临床医师的普通技术和判断通过常规实验容易地确定有效量。例如,式 (I) 的化合物可以在约0.001至1000mg/kg体重/天、约0.01至300mg/kg体重/天、约0.1至100mg/kg体重/天或约1至100mg/kg体重/天的范围内施用。药物组合物可以以单次剂量或多次剂量施用,或者可以长期地施用。当以多次剂量或长期地施用时,药物组合物可以例如一天一次至多次地施用,例如,一

天一次、两次或三次,每天或每几天地施用,例如每一天、每两天、每三天或每七天。施用期没有限制,并且可以在一天至受试者的一生的范围内。例如,当以多次剂量施用时,药物组合物从一天到几个月(例如,一天到六个月、一天到三个月、一天到两个月或一天到一个月)、从一天到几周(例如,一天到三周、一天到两周、一天到一周)、从一天到几天(例如,一天到三天或一天到两天)或在一天内施用。当长期施用时,药物组合物可以在受试者的一生中施用,在此期间可以暂时中断施用。

[0090] 式(I)的化合物可以单独使用,或与至少一种另外的活性成分、尤其是用于保护软骨或用于治疗 and/或预防与软骨退变相关的疾病的活性成分组合使用。例如,除式(I)的化合物以外,药物组合物还可以含有至少一种另外的活性成分。

[0091] 当组合使用一些成分时,可以采用含有全部成分的剂型或单独含有所述成分的剂型的组合。多种成分可以同时施用,或者任一种成分都可以在稍后的时间点施用,只要所述成分用于保护软骨或者治疗和/或预防与软骨退变相关的疾病即可。可以组合使用两种以上的另外的活性成分。适合组合使用的活性成分的实例包括但不限于非甾体抗炎剂、类固醇、透明质酸和局部麻醉剂。

[0092] 可以将非药物疗法与式(I)的化合物的施用组合。合适的疗法的实例包括韧带重建术、关节成形术、接骨术和再生医学。

[0093] 本公开的一个方面提供了一种保护软骨的方法,所述方法包括将有效量的式(I)的化合物施用至有此需要的受试者。

[0094] 本公开的一个方面提供了用于保护软骨的式(I)的化合物。

[0095] 本公开的一个方面提供了式(I)的化合物用于保护软骨的用途。

[0096] 本公开的一个方面提供了式(I)的化合物用于制备用于保护软骨的药物组合物的用途。

[0097] 本公开的一个方面提供了一种治疗和/或预防与软骨退变相关的疾病的方法,所述方法包括将有效量的式(I)的化合物施用至有此需要的受试者。

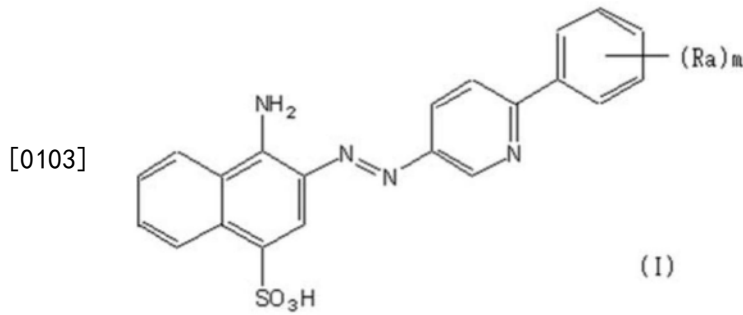
[0098] 本公开的一个方面提供了用于治疗 and/或预防与软骨退变相关的疾病的式(I)的化合物。

[0099] 本公开的一个方面提供了式(I)的化合物用于治疗 and/或预防与软骨退变相关的疾病的用途。

[0100] 本公开的一个方面提供了式(I)的化合物用于制备用于治疗 and/或预防与软骨退变相关的疾病的药物组合物的用途。

[0101] 例如,本公开提供了以下实施方案。

[0102] [1]一种用于保护软骨的药物组合物,所述药物组合物包含式(I)的化合物,或者其酯、氧化物、药用盐或溶剂化物:



[0104] 其中

[0105] Ra选自由以下各项组成的组:卤素、羟基、烷基、卤素取代的烷基、芳基、卤素取代或烷基取代的芳基、烷氧基、羟基取代或羧基取代的烷氧基、芳氧基、卤素取代或烷基取代的芳氧基、CHO、C(0)-烷基、C(0)-芳基、C(0)-烷基-羧基、C(0)-亚烷基-羧基酯和氰基,并且

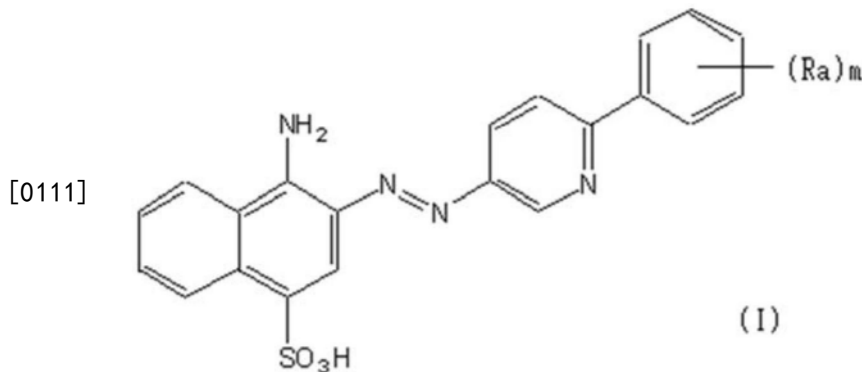
[0106] m为选自0至4的整数。

[0107] [2]根据项目1所述的药物组合物,所述药物组合物用于保护软骨细胞。

[0108] [3]根据项目1或2所述的药物组合物,所述药物组合物用于抑制软骨细胞的死亡。

[0109] [4]根据项目1至3中任一项所述的药物组合物,所述药物组合物用于治疗 and/或预防与软骨退变相关的疾病。

[0110] [5]一种用于治疗 and/或预防与软骨退变相关的疾病的药物组合物,所述药物组合物包含式(I)的化合物,或者其酯、氧化物、药用盐或溶剂化物:



[0112] 其中

[0113] Ra选自由以下各项组成的组:卤素、羟基、烷基、卤素取代的烷基、芳基、卤素取代或烷基取代的芳基、烷氧基、羟基取代或羧基取代的烷氧基、芳氧基、卤素取代或烷基取代的芳氧基、CHO、C(0)-烷基、C(0)-芳基、C(0)-烷基-羧基、C(0)-亚烷基-羧基酯和氰基,并且

[0114] m为选自0至4的整数。

[0115] [6]根据项目4或5所述的药物组合物,其中所述与软骨退变相关的疾病是骨关节炎。

[0116] [7]根据项目6所述的药物组合物,其中所述骨关节炎是原发性骨关节炎或继发性骨关节炎。

[0117] [8]根据项目6或7所述的药物组合物,其中所述骨关节炎是创伤后继发性骨关节炎。

[0118] [9]根据项目6至8中任一项所述的药物组合物,其中所述骨关节炎是颞下颌关节骨关节炎、膝部骨关节炎、髌部骨关节炎、踝部骨关节炎、肩部骨关节炎、肘部骨关节炎、腕

部骨关节炎、手指骨关节炎或椎关节强硬。

[0119] [10]根据项目1至9中任一项所述的药物组合物,其中每个Ra基团独立地选自由以下各项组成的组:卤素、羟基、烷基、卤素取代的烷基、和烷氧基。

[0120] [11]根据项目1至10中任一项所述的药物组合物,其中每个Ra基团独立地选自由卤素和烷基组成的组。

[0121] [12]根据项目1至11中任一项所述的药物组合物,其中式(I)具有两个Ra基团,所述两个Ra基团是卤素和烷基。

[0122] [13]根据项目1至12中任一项所述的药物组合物,其中所述式(I)的化合物选自表1中所列出的化合物。

[0123] [14]根据项目1至13中任一项所述的药物组合物,其中所述式(I)的化合物是4-氨基-3-[6-(4-氟-2-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸。

[0124] [15]根据项目1至14中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物是关节内施用的。

[0125] [16]根据项目1至14中任一项所述的药物组合物,其中所述药物组合物是静脉内施用的。

[0126] 本文中引用的文件的全部内容通过引用并入本文。

[0127] 以下实施例是非限制性的,并且仅提供用于描述本发明。上述实施方案是非限制性的,并且可以在不偏离如所附权利要求所限定的本发明的范围的情况下进行改变。

[0128] 实施例

[0129] 在实施例中,采用以下化合物。

[0130] KUS121:4-氨基-3-[6-(4-氟-2-甲基苯基)吡啶-3-基偶氮基]萘-1-磺酸钠盐

[0131] KUS121通过W02012/014994中所公开的方法制备。

[0132] 实施例1

[0133] KUS121在培养的软骨细胞中的效果

[0134] 细胞培养和分化

[0135] 在含有5%FBS的DMEM/Ham's F12培养基中培养来源于小鼠畸胎瘤的细胞系ATDC5 (J Cell Biol.1996年4月;133(2):457-68)的细胞。将细胞以 $3 \times 10^4$ 个细胞/孔的密度传代到12孔板,并且在胰岛素(10 $\mu$ g/ml)的存在下进行培养(分化诱导开始,第0天)。通过分化诱导14至21天将细胞分化为软骨细胞。细胞在以下实验中使用。

[0136] Tm应激

[0137] 在分化诱导的第15天,将诱导ER应激的衣霉素(0.2 $\mu$ g/mL)和KUS121(50或100 $\mu$ M)加入到培养基中,并且将软骨细胞培养40小时。通过使用2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯基)-2H-四唑鎓一钠盐(WST8)测定活细胞的相对数量。结果在图1中示出。在KUS121的存在下显著抑制细胞死亡。

[0138] 葡萄糖饥饿应激

[0139] 从分化诱导的第17天开始,将软骨细胞在不含有葡萄糖并且含有KUS 121(50或100 $\mu$ M)的培养基中培养五天。通过使用WST8测定活细胞的相对数量。结果在图2中示出。在100 $\mu$ M KUS121的存在下显著抑制细胞死亡。

[0140] TNF $\alpha$ 应激

[0141] 在分化诱导的第15天,将诱导细胞凋亡的TNF $\alpha$  (10ng/mL) 和KUS121 (50或100 $\mu$ M) 加入到培养基中,并且将软骨细胞培养48小时。通过使用WST8测定活细胞的相对数量。结果在图3中示出。在KUS121的存在下显著抑制细胞死亡。

[0142] 通过蛋白质印迹测量应激标志物

[0143] 在分化诱导的第15天,将衣霉素 (3 $\mu$ g/mL) 和KUS121 (50或100 $\mu$ M) 加入到培养基中,并且将软骨细胞培养6小时。对细胞进行蛋白质印迹。作为一抗,使用Bip (Cell Signaling# 3177S)、CHOP (Proteintech#15204-1-AP) 和肌动蛋白 (Sigma#A5441)。结果在图4中示出。在KUS121的存在下抑制了Bip和CHOP的表达。Bip是一种ER应激标志物,并且CHOP诱导与ER应激有关的细胞凋亡。

[0144] 在分化诱导的第15天,将TNF $\alpha$  (20ng/mL) 和KUS121 (50或100 $\mu$ M) 加入到培养基中,并且将软骨细胞培养48小时。对细胞进行蛋白质印迹。作为一抗,使用cCasp3 (Cell Signaling#9661S) 和肌动蛋白 (Sigma#A5441)。结果在图5中示出。在KUS121的存在下抑制了细胞凋亡标志物Casp3的表达。

[0145] 实施例2

[0146] KUS121在人软骨细胞的单层培养物中的效果

[0147] 从在膝关节置换术中从患者取出的膝关节中收集软骨细胞。将细胞在24孔板上在DMEM-F12 (Gibco, 11330-032) 中培养至70-80%汇合,并且在没有FBS的培养基中再培养24小时。然后将细胞在含有衣霉素 (3 $\mu$ g/mL) 和KUS121 (100 $\mu$ M) 的培养基中培养24小时。将培养基替换为含有0.5%FBS的培养基,并且将细胞培养48小时。为了对活细胞进行计数,加入CCK-8 (DOJINDO LABORATORIES),其是包含WST8作为显色底物的用于细胞计数的试剂盒。将细胞在37 $^{\circ}$ C温育15分钟,并且测定吸光度 (450nm, 570nm)。结果在图6中示出。活细胞由于加入衣霉素而减少,但是在KUS121的存在下不减少。

[0148] 将人软骨细胞培养至70-80%汇合。将衣霉素 (3 $\mu$ g/mL) 和KUS121 (100 $\mu$ M) 加入到培养基中,并且将细胞再培养6小时。根据制造商的说明使用Casp3/7Glo测定 (Promega),并且通过光度计测定胱天蛋白酶3/7活性。结果在图7中示出。胱天蛋白酶活性由于加入衣霉素而增加,但是在KUS121的存在下不增加。

[0149] 将人软骨细胞培养至70-80%汇合。将衣霉素 (3 $\mu$ g/mL) 和KUS121 (12.5、25、50或100 $\mu$ M) 加入到培养基中,并且将细胞再培养8小时。从细胞收集蛋白质,并且对其进行蛋白质印迹。作为一抗,使用Bip (Cell Signaling Technology, #3177)、ATF4 (Cell Signaling Technology, #11815)、CHOP (Cell Signaling Technology, #2895) 和 $\beta$ -肌动蛋白 (Cell Signaling Technology, #5125)。结果在图8中示出。在不存在衣霉素的情况下,观察到ATF4和CHOP的表达,但是表达水平相当低。在衣霉素的存在下,KUS121以剂量依赖性方式抑制Bip、ATF4和CHOP的表达。结果表明KUS121抑制与ER应激有关的细胞凋亡。

[0150] 将人软骨细胞培养至70-80%汇合。将衣霉素 (3 $\mu$ g/mL) 和KUS121 (12.5、25、50或100 $\mu$ M) 加入到培养基中,并且将细胞再培养8小时。从细胞收集蛋白质,并且对其进行蛋白质印迹。作为一抗,使用p-JNK (Cell Signaling Technology, #4668)、JNK (Cell Signaling Technology, #9252) 和 $\beta$ -肌动蛋白 (Cell Signaling Technology, #5125)。结果在图9中示出。KUS121以剂量依赖性方式抑制磷酸化JNK (p-JNK) (一种MAP激酶) 的表达。

[0151] 将人软骨细胞在24孔板上培养至70-80%汇合,并且在没有FBS的培养基中培养24

小时。然后将细胞在含有IL-1 $\beta$  (2ng/mL) 和KUS121 (12.5、25、50或100 $\mu$ M) 的培养基中培养24小时。从细胞提取信使RNA, 并且通过逆转录产生cDNA。通过实时PCR测定MMP13和MMP1的基因表达水平。结果在图10中示出。KUS121以剂量依赖性方式抑制作为胶原蛋白酶的MMP13和MMP1的表达。

[0152] 实施例3

[0153] KUS121在人软骨的器官培养中的效果

[0154] 通过使用直径为7mm的活检穿孔器从在膝关节置换术中从患者取出的膝关节中收集腿胫关节的软骨(后外侧股骨髁)。将软骨在没有FBS的培养基中培养48小时, 然后在含有KUS121 (100 $\mu$ M) 的培养基中培养72小时。通过用PBS洗涤软骨、加入CCK-8、将软骨在37 $^{\circ}$ C温育30分钟并且测定吸光度(450nm, 570nm) 来测定活细胞的数量。结果在图11中示出。在KUS121的存在下, 活细胞的数量更大。表明在该实验中, 患者的软骨细胞直到收集时一直承受各种应激, 并且KUS121减轻了应激。

[0155] 实施例4

[0156] KUS121在膝部骨关节炎模型中的效果

[0157] 已知关节内施用的单碘代乙酸酯(MIA) 损伤软骨细胞, 并且抑制胶原蛋白和蛋白聚糖的分泌, 从而诱发骨关节炎(M. Udo等人, *Osteoarthritis Cartilage*, 2016, 24:1284-91)。通过将25 $\mu$ l 盐水溶液中的0.5mg单碘代乙酸酯(MIA) 施用到健康大鼠的两个后肢的膝关节腔中来产生膝部骨关节炎模型大鼠。在MIA施用之前, 腹膜内施用50mg/Kg/天的KUS121, 持续四天。在MIA施用之后, 每周五天腹膜内施用相同量的KUS121。

[0158] 在MIA施用后的两周时, 将大鼠的膝软骨切出, 用10%中性缓冲福尔马林固定约一周, 用Morse溶液去矿物质(两周) 或用EDTA去矿物质(一个月), 沿着内侧副韧带切割, 并且在切割表面朝上的情况下包埋在石蜡中。每100-200 $\mu$ m切出厚度为3-6 $\mu$ m的切片。将切片用染色软骨细胞的番红-O染色, 并且用荧光显微镜(KEYENCE BZ9000) 观察。代表性结果在图12中示出。图13示出了胫骨关节的放大图。在KUS121治疗组中的指示软骨细胞的染色比在对照组(PBS) 中的染色深。另外, 三名盲评估人员基于番红-O染色的结果评估内侧股骨、外侧股骨、内侧胫骨和外侧胫骨的ORSI评分。ORSI评分用于对膝部骨关节炎分级(Osteoarthritis cartilage histopathology (骨关节炎软骨组织病理学); *Osteoarthritis Cartilage*. 2006年1月; 14(1):13-29)。结果在图14中示出。KUS121治疗组中的评分比对照组中的评分低。结果表明通过施用KUS121抑制了软骨损伤。

[0159] 实施例5

[0160] KUS121在创伤性软骨损伤模型中的效果

[0161] 已知可以使用经受对膝关节的周期性压缩的小鼠作为创伤后软骨损伤的模型(Wu P, Sandell L等人, *Arthritis Rheumatol*. 2014; 66(5):1256-65)。以类似的方式, 产生大鼠创伤后软骨损伤模型。具体地, 将后肢的膝盖深度弯曲, 并且在膝盖骨朝下的情况下固定在Autograph (Shimadzu Corporation) 的工作台上。从足跟向下施加5N的垂直负荷, 然后以5秒间隔施加240次最大20N的负荷。在八周后, 收集后外侧股骨髁, 并且用番红-O对其进行染色。观察到减少的染色, 这表明软骨损伤。该模型用于以下实验。

[0162] 通过上述方法对12周龄雄性Wister大鼠(每组五只大鼠) 的膝关节进行周期性压缩。在KUS 121组中, 在术前立即以及在术后第1天、第2天和第3天将在5%葡萄糖溶液(100 $\mu$

1) 中的KUS121 (20mg/ml) 关节内施用至大鼠。在对照组中,将5%葡萄糖溶液 (100 $\mu$ l) 施用至大鼠。在术后两周或四周处死大鼠。在组织学上评估后外侧股骨髁的损伤。图15示出了在术后两周和四周评估的改进Mankin评分,其是关节软骨退变的指标。在术后两周,治疗组 (IA) 的评分显著低于对照组的评分,这表明被抑制的细胞凋亡的趋势。在术后四周,未观察到明显的差异。在术后四周,治疗组中的软骨损伤的体积显著降低 (图16)。在术后四周,治疗组中的软骨细胞数量保持在显著较高的水平 (图17)。

[0163] 工业实用性

[0164] 本公开提供了用于保护软骨的方法,并且因此可以用于医疗领域,例如用于治疗和/或预防与软骨退变相关的疾病,诸如骨关节炎。

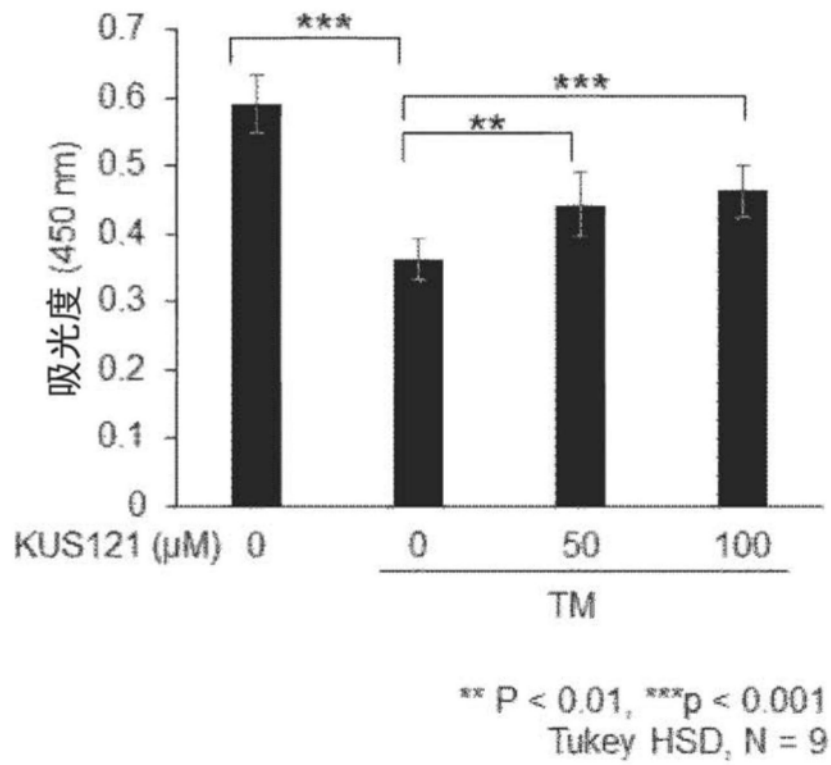


图1

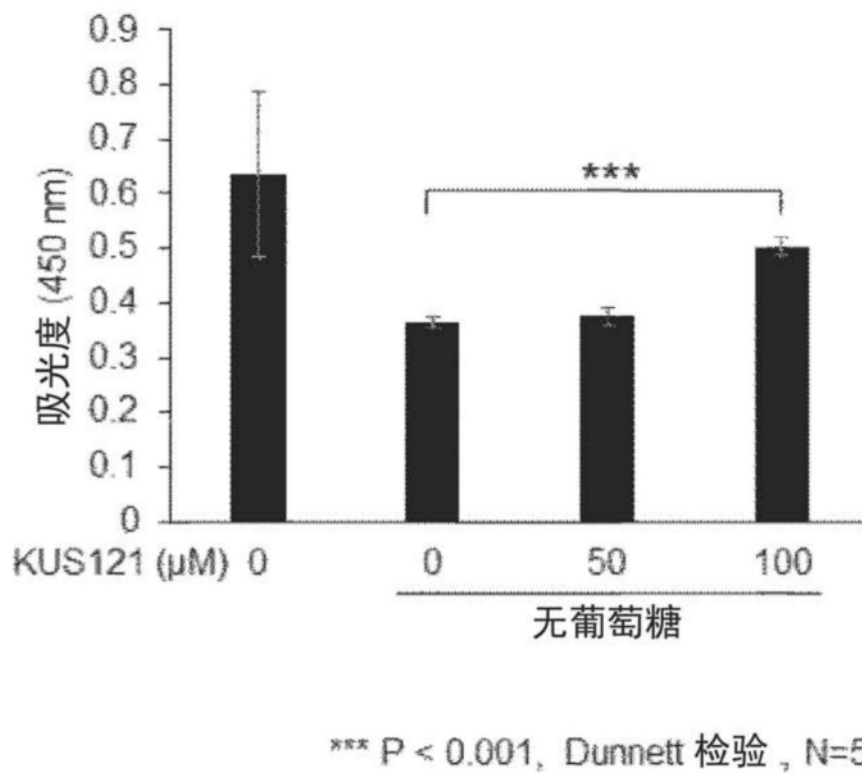
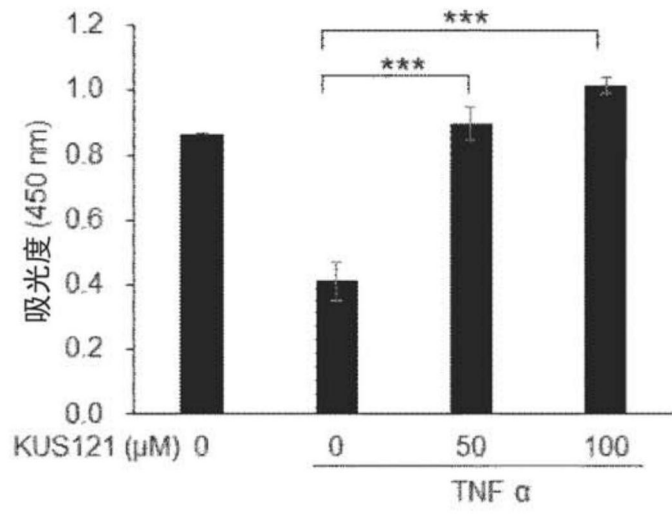


图2



\*\*\* P < 0.001, Tukey HSD, N = 6

图3

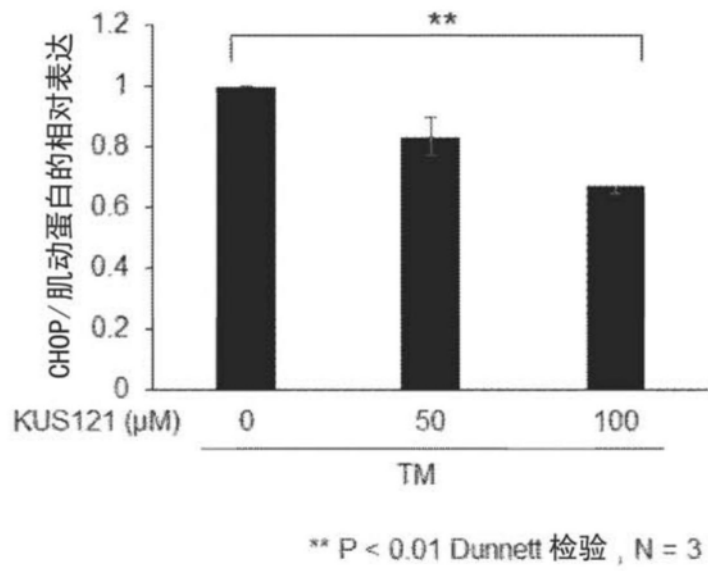
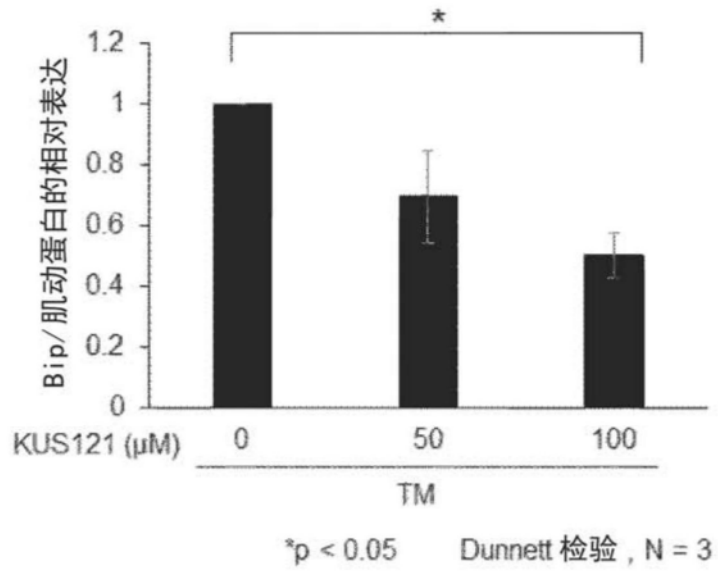


图4

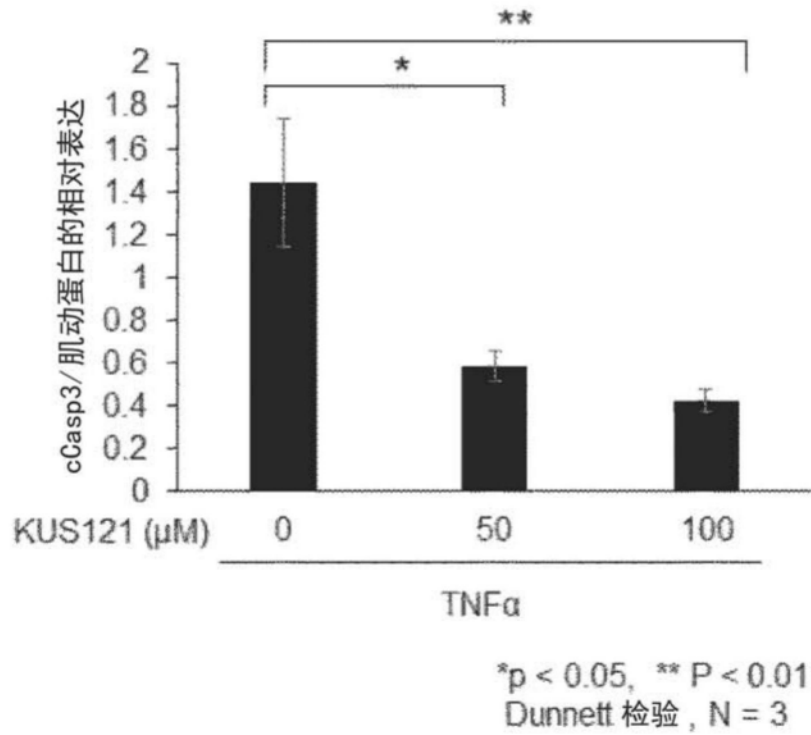


图5

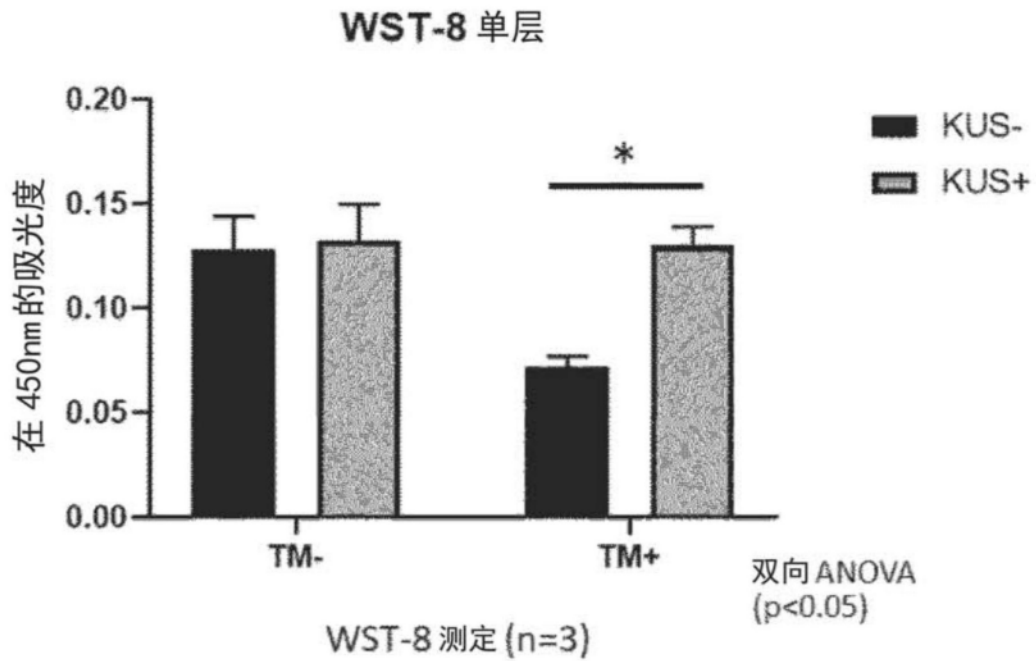


图6

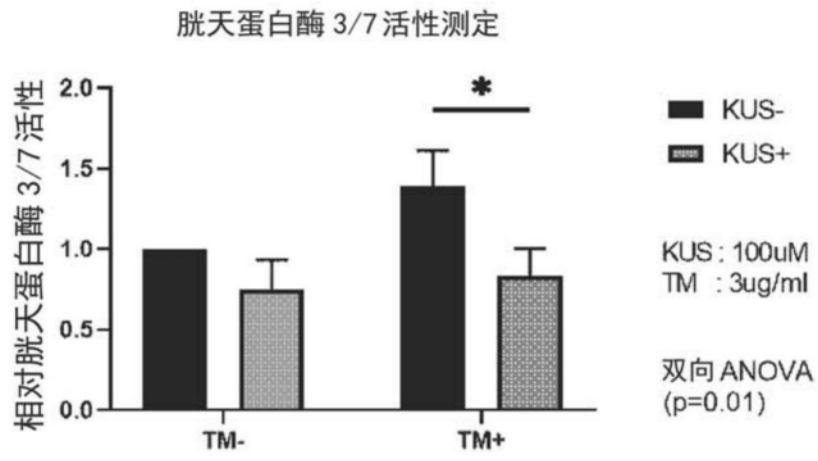


图7

### 蛋白质印迹 (n=4)

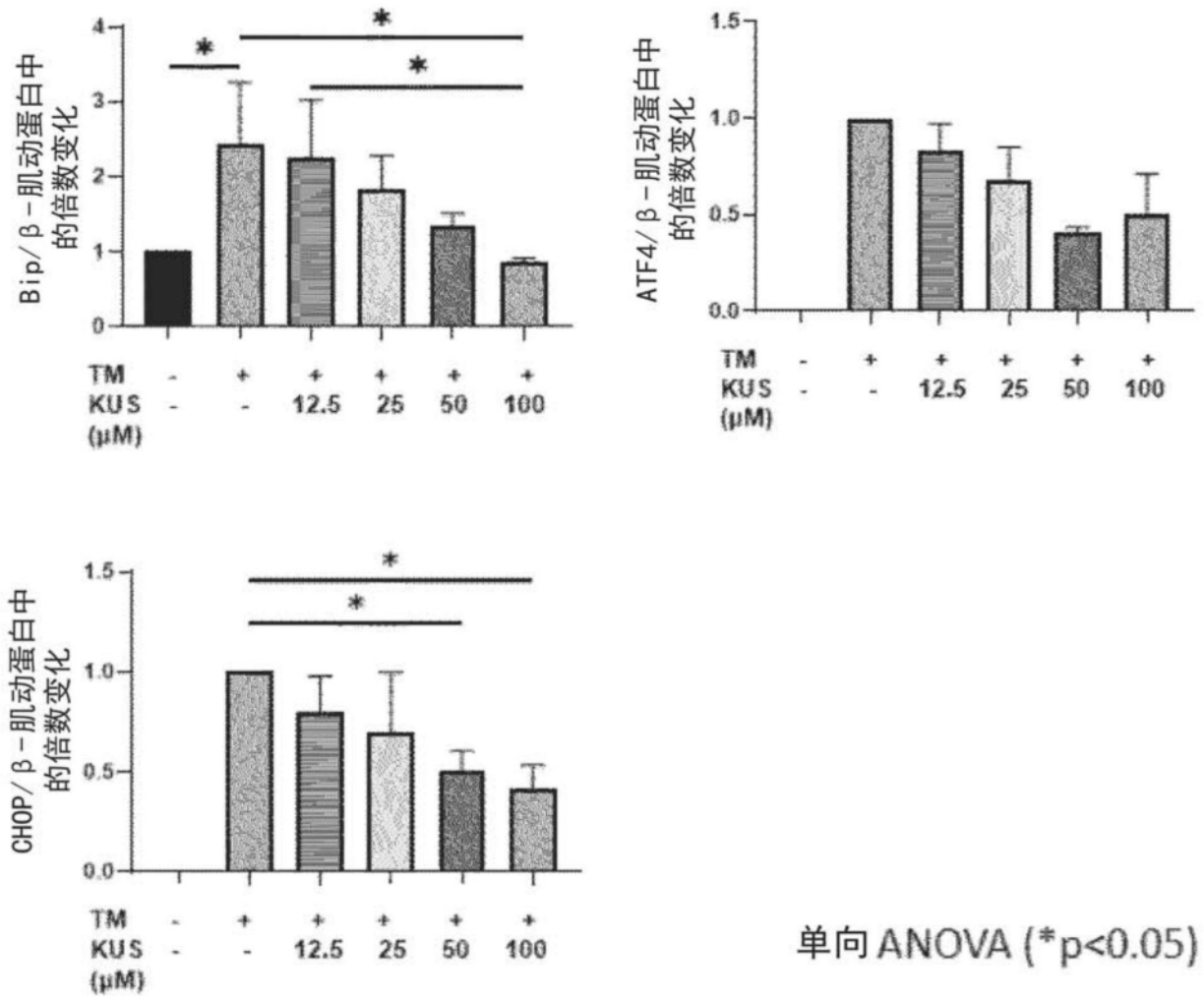


图8

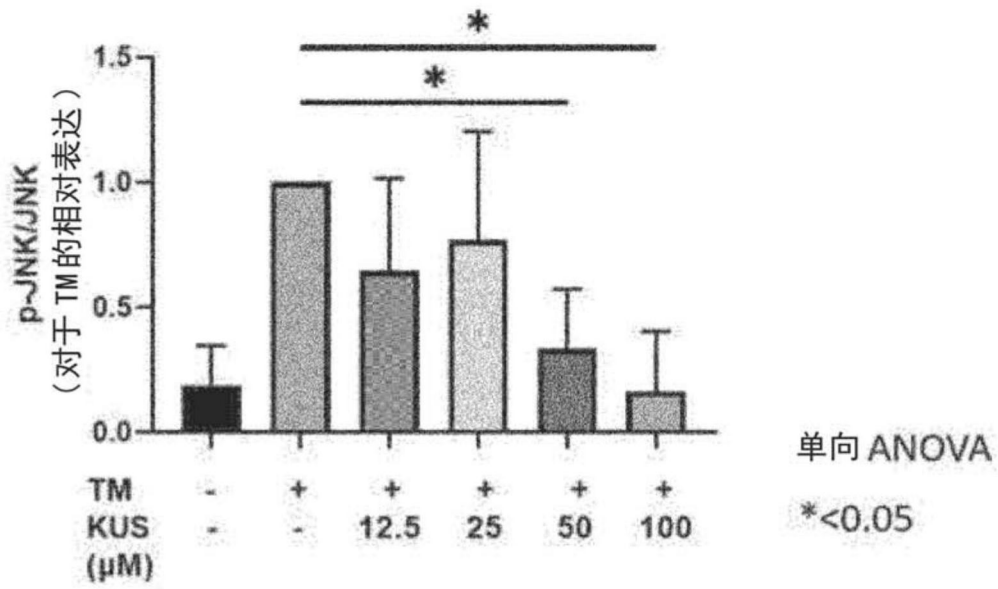
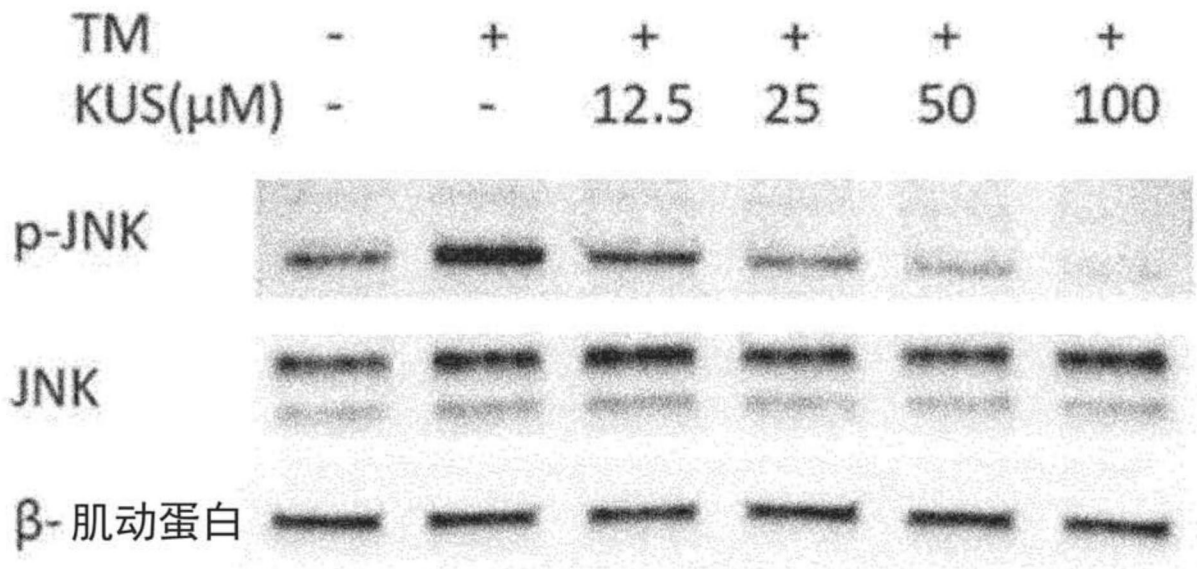


图9

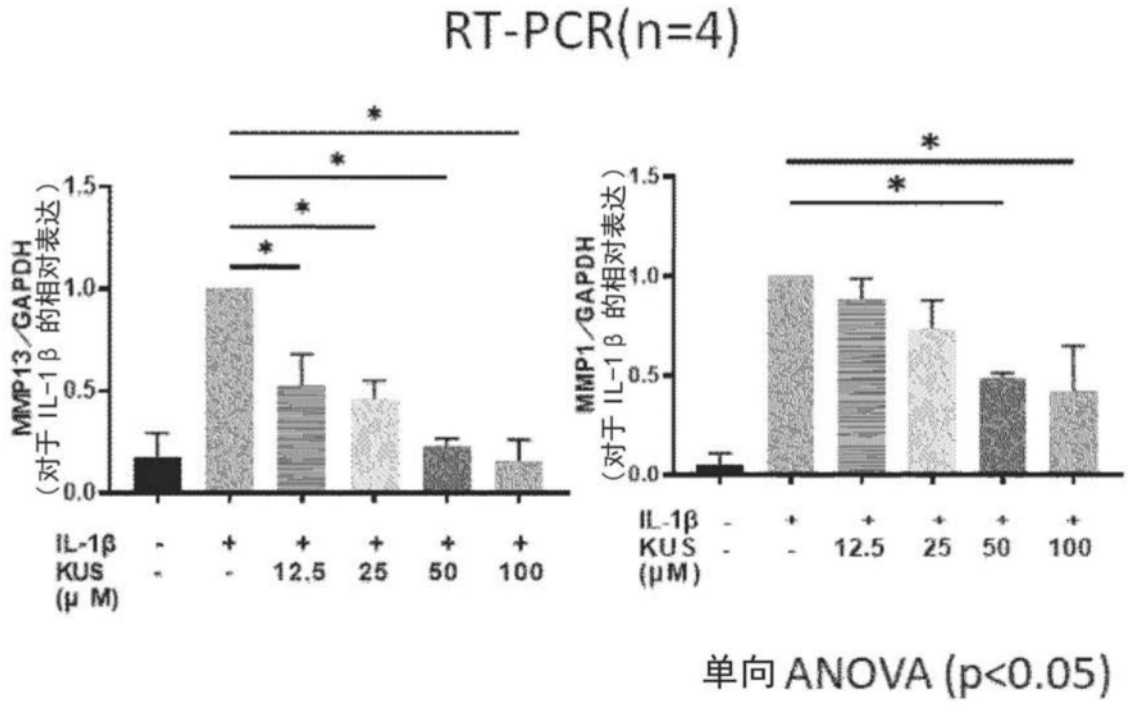


图10

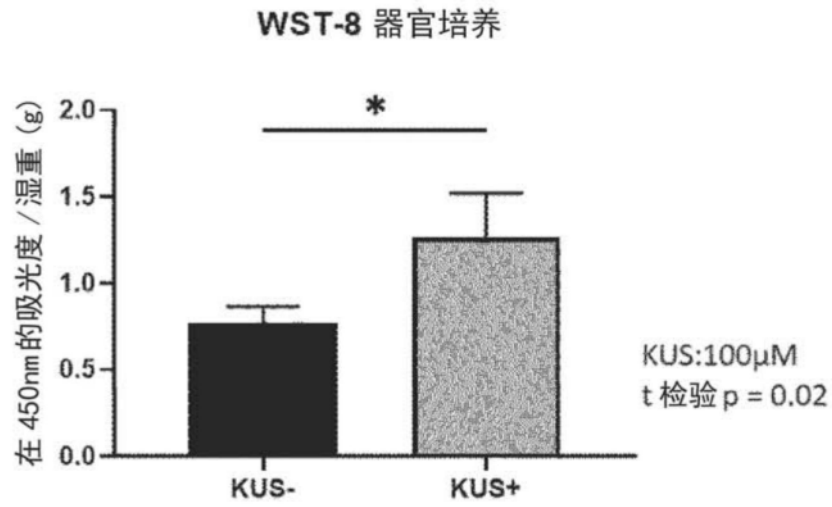


图11

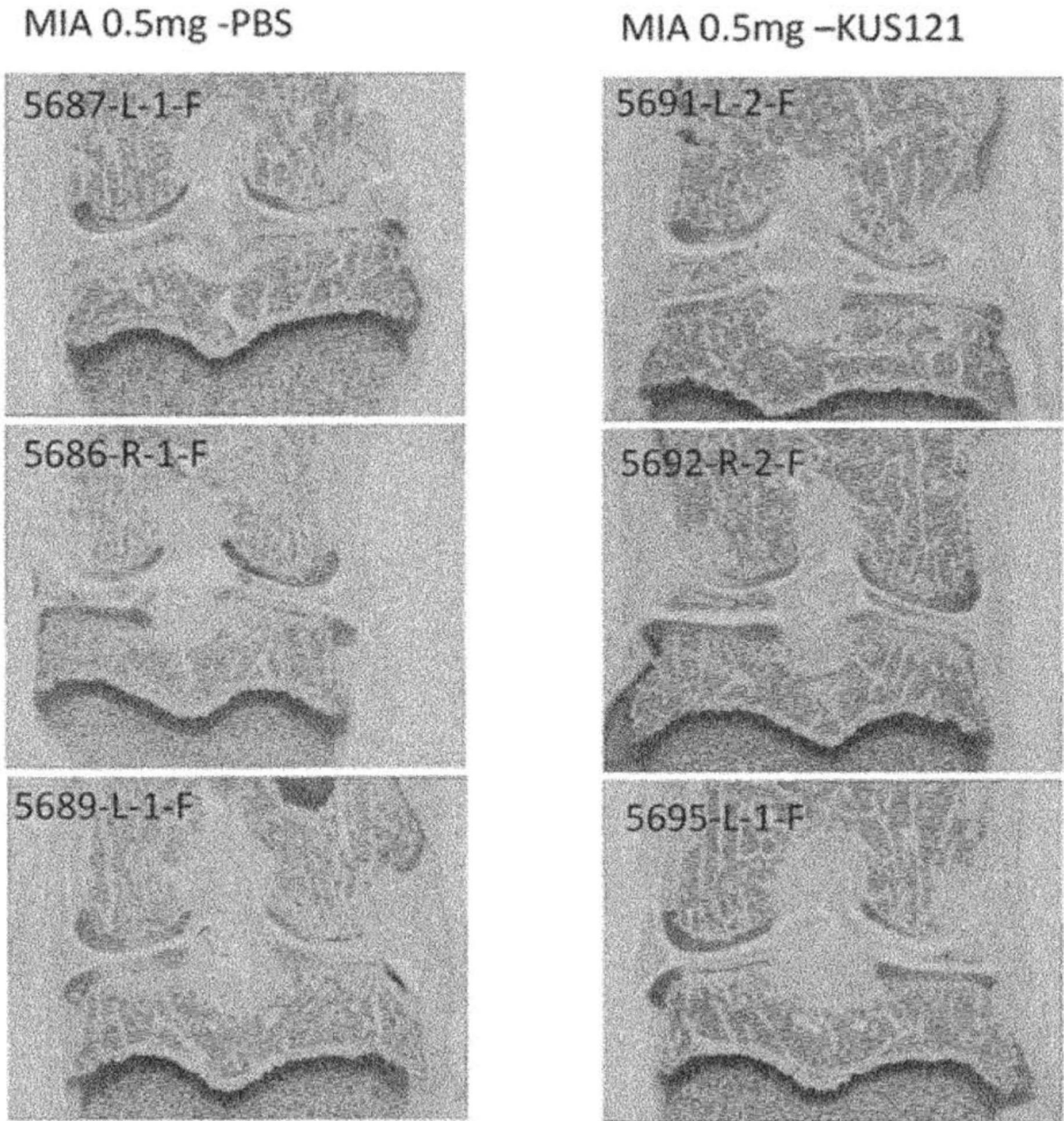


图12

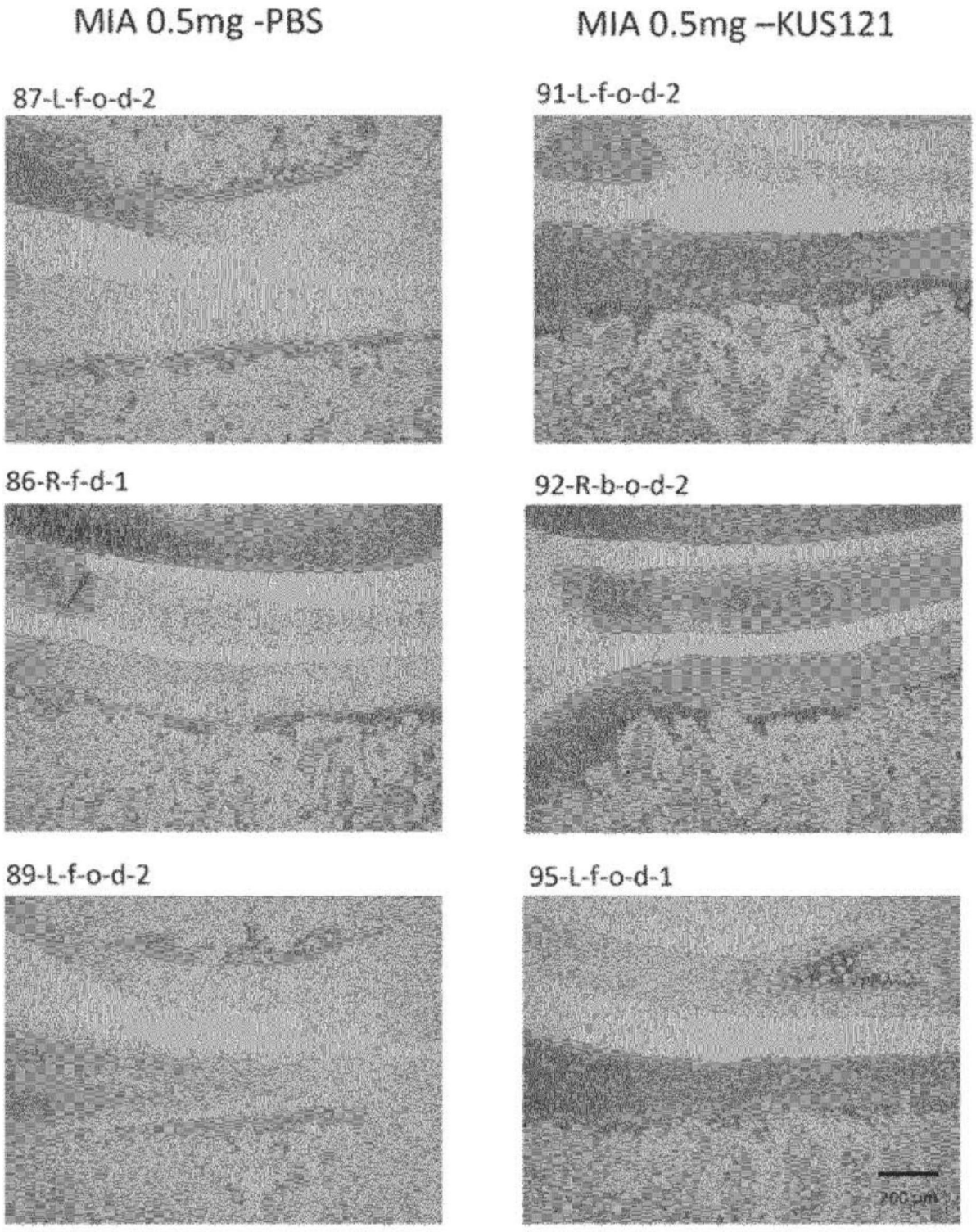


图13

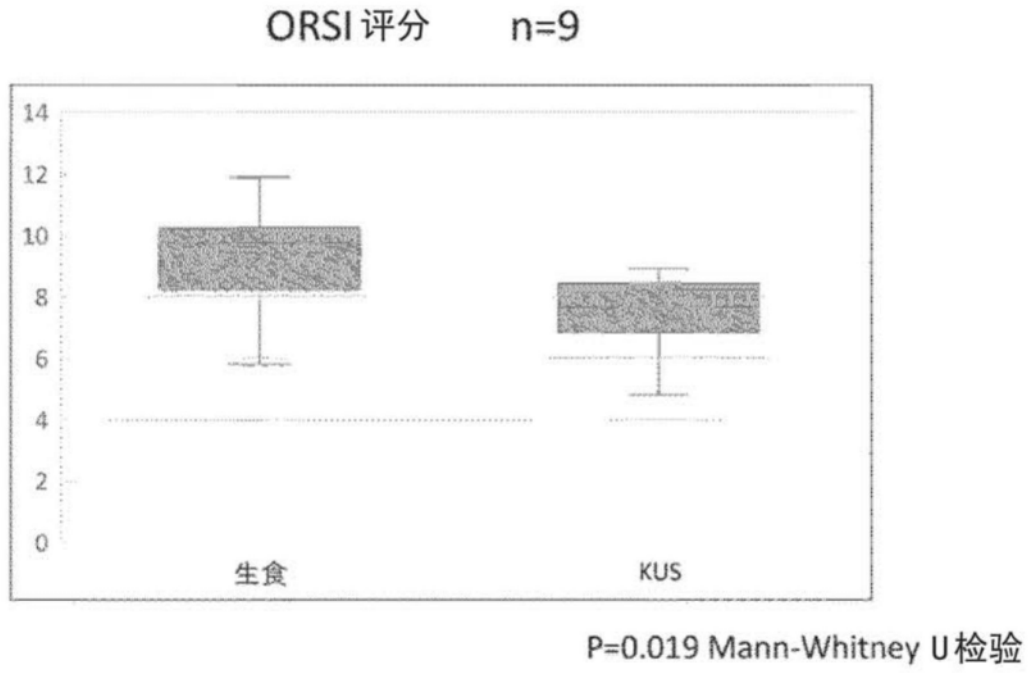


图14

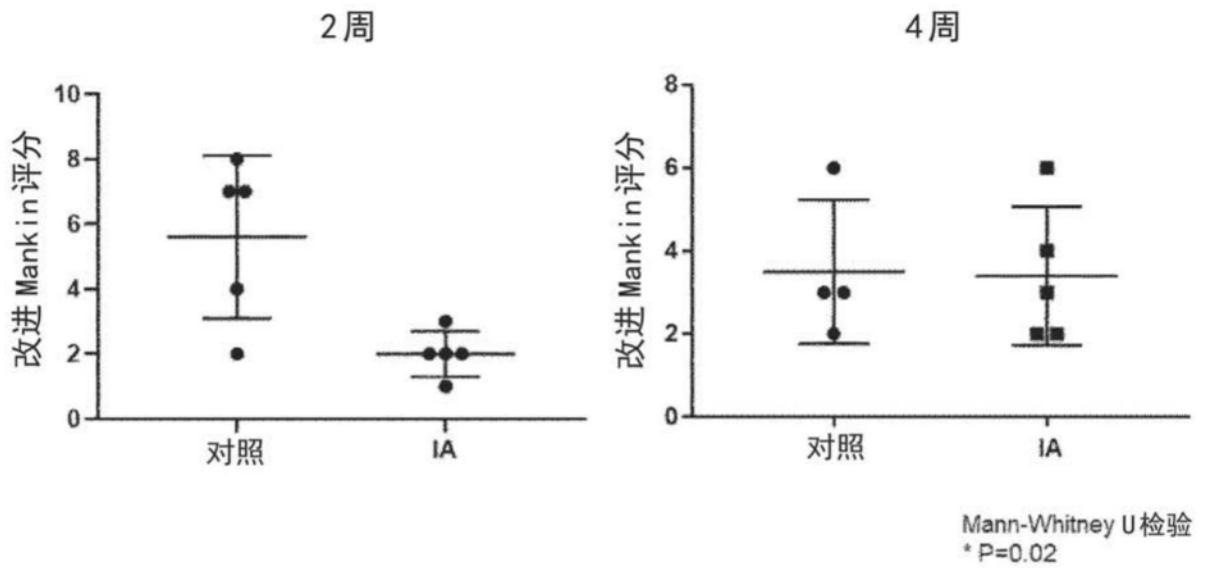


图15

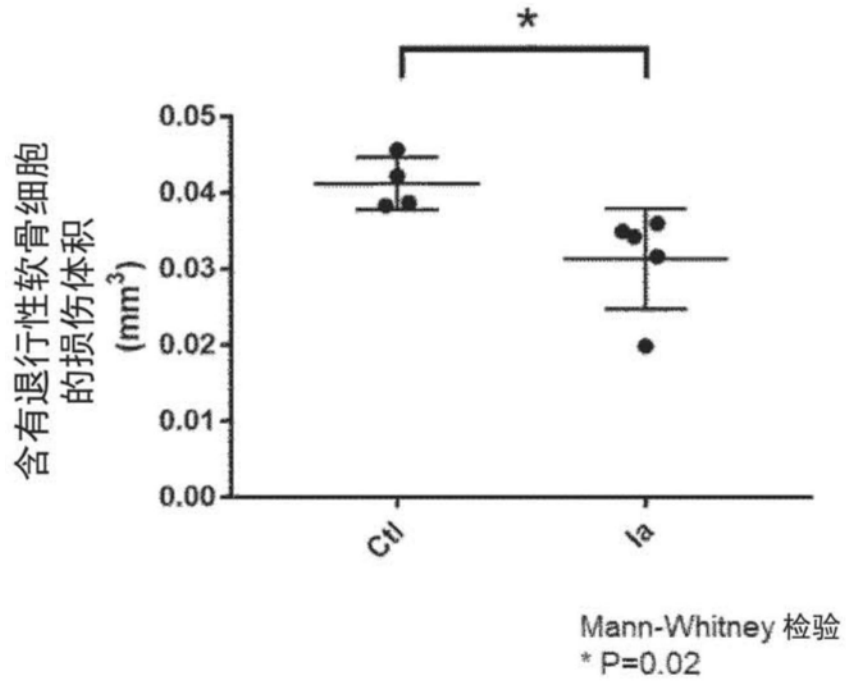


图16

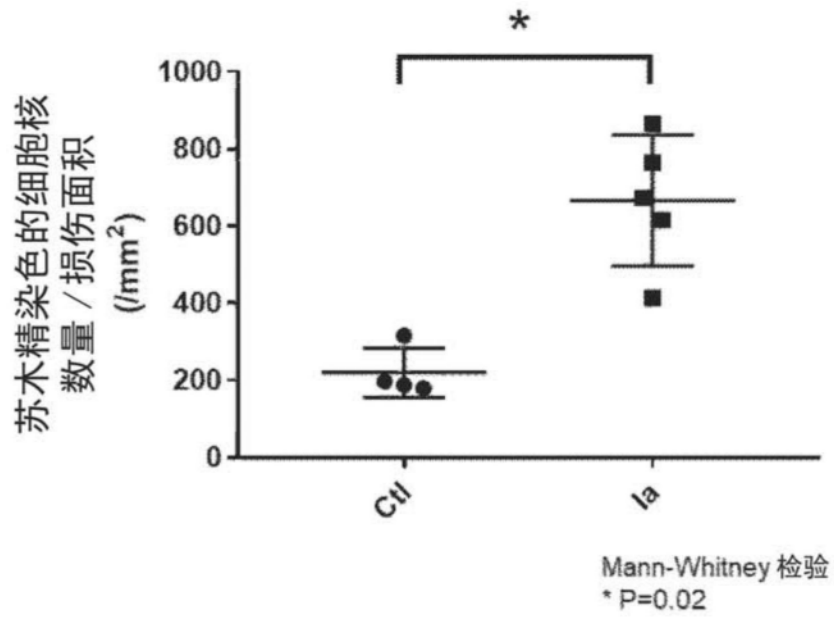


图17