



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 115837023 B

(45) 授权公告日 2023.05.16

(21) 申请号 202310133152.8

A61P 9/00 (2006.01)

(22) 申请日 2023.02.20

A61P 9/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 9/12 (2006.01)

申请公布号 CN 115837023 A

A61P 13/12 (2006.01)

(43) 申请公布日 2023.03.24

A61P 3/06 (2006.01)

(73) 专利权人 中山大学附属第八医院(深圳福田)

A61P 3/10 (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

地址 518033 广东省深圳市福田区福田街道深南中路3025号

(56) 对比文件

CN 114392256 A, 2022.04.26

US 2015011551 A1, 2015.01.08

US 2018318280 A1, 2018.11.08

(72) 发明人 黄辉 朱慧瑾 陈艳莲 谢晨

审查员 李玉婷

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务有限公司 44205

专利代理师 林德强

(51) Int. Cl.

A61K 31/455 (2006.01)

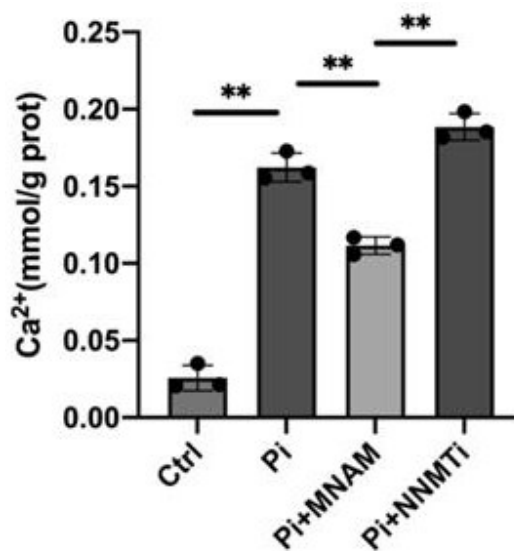
权利要求书1页 说明书5页 附图3页

(54) 发明名称

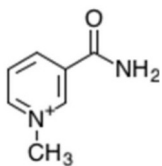
1-甲基烟酰胺在制备抗血管钙化药物中的应用

(57) 摘要

本发明公开了1-甲基烟酰胺在制备抗血管钙化药物中的应用。本发明发现小分子代谢物1-甲基烟酰胺具有抑制血管钙化及其进展的作用,为血管钙化的治疗提供了新的思路。1-甲基烟酰胺具有较好的药物安全性和较强的血管钙化抑制效果,可以作为抑制血管钙化的候选药物。而且1-甲基烟酰胺为已知的小分子代谢物,能溶于水或者DMSO,稳定性良好,细胞毒性低,药物安全性好,可通过口服和静脉注射等多种方式灵活给药。



1. 1-甲基烟酰胺或其药学上可接受的盐作为唯一活性成分在制备预防和/或治疗血管钙化的药物中的应用,所述1-甲基烟酰胺为式(I)所示化合物;



(I);

所述血管钙化为由衰老引起的血管钙化。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述药物还包括药学上可接受的辅料。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述药学上可接受的辅料包括:稀释剂、黏合剂、润湿剂、润滑剂、崩解剂、溶剂、乳化剂、助溶剂、防腐剂、pH调节剂、渗透压调节剂、表面活性剂、包衣材料、抗氧化剂或缓冲剂中的至少一种。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述药物的剂型包括混悬剂、颗粒剂、胶囊剂、散剂、片剂、滴丸剂、注射剂、栓剂、气雾剂或滴剂中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述药物的给药途径包括静脉注射、腹腔注射、肌肉注射、皮下注射、口服给药、舌下给药、鼻腔给药或雾化给药中的至少一种。

6. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述药物还包括其他预防和/或治疗血管钙化的活性成分。

## 1-甲基烟酰胺在制备抗血管钙化药物中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,具体涉及1-甲基烟酰胺在制备抗血管钙化药物中的应用。

### 背景技术

[0002] 血管钙化常见于慢性肾脏病、高血压、糖尿病、高脂血症、衰老等人群。血管钙化可增加心脏病、卒中、动脉粥样硬化斑块破裂的风险,因此血管钙化是增加心血管疾病发病率、死亡率的重要危险因素,并严重影响患者的生存质量和预后。为了阻止甚至逆转其进程,血管钙化受到全世界越来越多学者的关注。血管钙化根据发生位置的不同,主要可分为血管内膜钙化、血管中膜钙化、血管外膜钙化、心脏瓣膜钙化、钙化防御5种类型。血管钙化的发病机制至今尚未完全阐明,目前解释血管钙化的机制主要理论有血管平滑肌细胞成骨型分化、钙化抑制剂缺失、钙和磷酸盐稳态异常、炎症、氧化应激、细胞凋亡、自噬、基质重塑、miRNA调控等学说。目前临床缺乏用于预防和治疗血管钙化的有效药物,因此深入研究血管钙化的发病机制,并开发可应用于预防和治疗血管钙化的高效药物具有重大的临床意义。

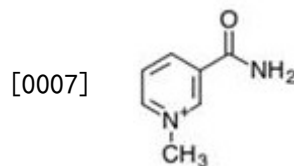
[0003] 1-甲基烟酰胺是机体内烟酰胺的主要代谢物,在肝脏中由外源烟酸和色氨酸通过烟酰胺(NA)在烟酰胺N-甲基转移酶的催化下生物合成。根据现有的报道,1-甲基烟酰胺在抗血栓、抗炎、抗动脉粥样硬化、舒张血管、抗心肌肥厚、抗心肌纤维化等方面均发挥重要作用。比如,1-甲基烟酰胺通过直接作用于血管内皮细胞发挥抗血栓和抗炎作用,这种作用可能部分地有助于烟酸的血管保护特性。1-甲基烟酰胺在载脂蛋白APOE<sup>-/-</sup>小鼠身上显示出显著的抗动脉粥样硬化作用,这种保护作用与改善前列腺素-2依赖的内皮功能、抑制血小板激活、减少斑块中的局部炎症负担和全身炎症有关。然而,关于1-甲基烟酰胺是否具有抗血管钙化的作用仍未见报道。因此,深入探究1-甲基烟酰胺对血管钙化的抑制作用及其相关机制具有重大意义。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供1-甲基烟酰胺在制备抗血管钙化药物中的应用。

[0005] 本发明所采取的技术方案是:

[0006] 本发明的第一方面,提供1-甲基烟酰胺或其药学上可接受的盐在制备预防和/或治疗血管钙化的药物中的应用,所述1-甲基烟酰胺为式(I)所示化合物;



[0008] (I)。

[0009] 在本发明的一些实施方式中,所述血管钙化为慢性肾脏病、高血压、糖尿病、高脂

血症、衰老、动脉粥样硬化、血管病变伴发或引起的血管钙化。

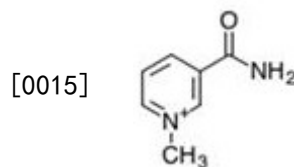
[0010] 在本发明的一些实施方式中,所述药物还包括药学上可接受的辅料。

[0011] 在本发明的一些实施方式中,所述药学上可接受的辅料包括:稀释剂、黏合剂、润湿剂、润滑剂、崩解剂、溶剂、乳化剂、助溶剂、增溶剂、防腐剂、pH调节剂、渗透压调节剂、表面活性剂、包衣材料、抗氧化剂、抑菌剂或缓冲剂中的至少一种。

[0012] 在本发明的一些实施方式中,所述药物的剂型包括混悬剂、颗粒剂、胶囊剂、散剂、片剂、乳剂、溶液剂、滴丸剂、注射剂、口服剂、栓剂、灌肠剂、气雾剂、贴剂或滴剂中的至少一种。

[0013] 在本发明的一些实施方式中,所述药物的给药途径包括静脉注射、腹腔注射、肌肉注射、皮下注射、口服给药、舌下给药、鼻腔给药、雾化给药或经皮给药中的至少一种。

[0014] 本发明的第二方面,提供一种药物,所述药物包含1-甲基烟酰胺或其药学上可接受的盐,所述1-甲基烟酰胺为式(I)所示化合物;所述药物用于预防和/或治疗血管钙化;



[0016] (I)。

[0017] 在本发明的一些实施方式中,所述药物还包括预防和/或治疗血管钙化的活性成分。

[0018] 在本发明的一些实施方式中,所述药物还包括药学上可接受的辅料。

[0019] 在本发明的一些实施方式中,所述药学上可接受的辅料包括:稀释剂、黏合剂、润湿剂、润滑剂、崩解剂、溶剂、乳化剂、助溶剂、增溶剂、防腐剂、pH调节剂、渗透压调节剂、表面活性剂、包衣材料、抗氧化剂、抑菌剂或缓冲剂中的至少一种。

[0020] 在本发明的一些实施方式中,所述药物的剂型包括混悬剂、颗粒剂、胶囊剂、散剂、片剂、乳剂、溶液剂、滴丸剂、注射剂、口服剂、栓剂、灌肠剂、气雾剂、贴剂或滴剂中的至少一种。

[0021] 在本发明的一些实施方式中,所述药物的给药途径包括静脉注射、腹腔注射、肌肉注射、皮下注射、口服给药、舌下给药、鼻腔给药、雾化给药或经皮给药中的至少一种。

[0022] 本发明的有益效果是:

[0023] 本发明发现小分子代谢物1-甲基烟酰胺具有抑制血管钙化及其进展的作用,为血管钙化的治疗提供了新的思路。1-甲基烟酰胺具有较好的药物安全性和较强的血管钙化抑制效果,可以作为抑制血管钙化的候选药物。而且1-甲基烟酰胺为已知的小分子代谢物,能溶于水或者DMSO,稳定性良好,细胞毒性低,药物安全性好,可通过口服和静脉注射等多种方式灵活给药。

## 附图说明

[0024] 图1为1-甲基烟酰胺抑制血管钙化,具体为实施例1中的茜素红染色结果。

[0025] 图2为对图1各组血管平滑肌细胞分别进行钙含量测定(\*\*P<0.01)。

[0026] 图3为1-甲基烟酰胺抑制衰老条件下的血管钙化。图3的A为实施例2中的1-甲基烟

酰胺能抑制博来霉素 (BLM) 和磷诱导的血管平滑肌细胞钙化的发生的茜素红染色结果。图3的B为对图3的A各组血管平滑肌细胞分别进行钙含量测定 (\*\*P<0.01)。图3的C为1-甲基烟酰胺能抑制顺铂 (DDP) 和磷诱导的血管平滑肌细胞钙化的发生的茜素红染色。图3的D为对图3的C各组血管平滑肌细胞分别进行钙含量测定 (\*\*P<0.01)。

[0027] 图4为1-甲基烟酰胺抑制衰老小鼠发生血管钙化。图4的A为实施例3中的茜素红染色 (比例尺10mm)。图4的B为实施例3中的对上述各种小鼠动脉环进行收缩表型 $\alpha$ -SMA和成骨表型BMP2 IHC染色 (比例尺100 $\mu$ m)。

## 具体实施方式

[0028] 以下将结合实施例对本发明的构思及产生的技术效果进行清楚、完整地描述,以充分地理解本发明的目的、特征和效果。显然,所描述的实施例只是本发明的一部分实施例,而不是全部实施例,基于本发明的实施例,本领域的技术人员在不付出创造性劳动的前提下所获得的其他实施例,均属于本发明保护的范围。

[0029] 人类血管平滑肌细胞VSMCs均购自赛百慷(上海)生物技术股份有限公司;磷酸氢二钠购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司;1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)购自上海陶素生物科技有限公司;博来霉素、顺铂购自MedChemExpress (MCE)公司;钙含量试剂盒购自南京建成生物工程研究所;高钙高腺嘌呤饲料购自广东省医学动物实验中心;茜素红染料购自北京索莱宝科技有限公司; $\alpha$ -SMA一抗购自武汉三鹰生物技术有限公司;BMP2一抗购自武汉爱博泰克生物技术有限公司;1-甲基烟酰胺购自西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司。

[0030] 实施例1 1-甲基烟酰胺抑制血管钙化

[0031] 1、本实施例应用磷诱导血管平滑肌细胞发生血管钙化,并分别给予1-甲基烟酰胺或1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)干预7天后进行茜素红染色,以评估1-甲基烟酰胺对血管钙化的抑制作用。具体操作包括:

[0032] 8-12代人血管平滑肌细胞以 $1 \times 10^5$ /孔,铺12孔板,每孔加1ml DMEM完全培养基。铺板后第1天给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100 $\mu$ M 1-甲基烟酰胺或25 $\mu$ M 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第4日更换DMEM完全培养基并再次给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100 $\mu$ M 1-甲基烟酰胺或25 $\mu$ M 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第7日进行茜素红染色。

[0033] 2、为了进一步阐明1-甲基烟酰胺抑制血管钙化作用,应用磷诱导血管平滑肌细胞发生血管钙化,并分别给予1-甲基烟酰胺或1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)干预7天后进行钙含量测定。具体操作包括:

[0034] 8-12代人血管平滑肌细胞以 $2 \times 10^5$ /孔,铺6孔板,每孔加2ml DMEM完全培养基。铺板后第1天给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100 $\mu$ M 1-甲基烟酰胺(MNAM)或25 $\mu$ M 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第4日更换DMEM完全培养基并再次给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100 $\mu$ M 1-甲基烟酰胺或25 $\mu$ M 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第7日进行钙含量测定。

[0035] 结果显示,通过茜素红染色结果可以看出,1-甲基烟酰胺可以显著抑制血管钙化的发生,而这种抑制作用可以被1-甲基烟酰胺的抑制剂(NNMTi)所逆转(图1)。进一步的钙

含量测定结果也同样证明了1-甲基烟酰胺具有抑制血管钙化的作用(图2)。

[0036] 综合以上结果可见,式(I)小分子代谢合物1-甲基烟酰胺能有效抑制血管钙化的发生,可作为抗血管钙化的药物。

[0037] 实施例2 1-甲基烟酰胺抑制衰老条件下的血管钙化

[0038] 1、本实施例应用博来霉素(BLM)和磷诱导血管平滑肌细胞发生钙化,并分别给予1-甲基烟酰胺或1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)干预7天后进行茜素红染色,以评估1-甲基烟酰胺对血管钙化的抑制作用。具体操作包括:

[0039] 8-12代人血管平滑肌细胞以 $1 \times 10^5$ /孔,铺12孔板,每孔给予1ml DMEM完全培养基。铺板后第1日给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100uM 1-甲基烟酰胺或25uM 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第2日给予1ug/ml博来霉素,第4日更换DMEM完全培养基并再次给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100uM 1-甲基烟酰胺或25uM 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第7日进行茜素红染色。

[0040] 2、为了进一步阐明1-甲基烟酰胺抑制衰老条件下血管钙化的作用,应用博来霉素和磷诱导血管平滑肌细胞发生钙化,并分别给予1-甲基烟酰胺或1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)干预7天后进行钙含量测定。具体操作如下:

[0041] 8-12代人血管平滑肌细胞以 $2 \times 10^5$ /孔,铺6孔板,每孔给予2ml DMEM完全培养基。铺板后第1日给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100uM 1-甲基烟酰胺或25uM 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第2日给予1ug/ml博来霉素,第4日更换DMEM完全培养基并再次给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100uM 1-甲基烟酰胺或25uM 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第7日进行钙含量测定。

[0042] 结果显示,通过茜素红染色结果可以看出,1-甲基烟酰胺可以显著抑制博来霉素诱导衰老的血管平滑肌细胞发生钙化,而这种抑制作用可以被1-甲基烟酰胺的抑制剂(NNMTi)所逆转(图3的A)。进一步的钙含量测定结果也同样说明了1-甲基烟酰胺具有抑制衰老条件下血管钙化的作用(图3的B)。

[0043] 3、为进一步验证1-甲基烟酰胺抑制衰老条件下血管钙化的作用,应用顺铂(DDP)和磷诱导血管平滑肌细胞发生钙化,并分别给予1-甲基烟酰胺或1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)干预7天后进行茜素红染色,以进一步评估1-甲基烟酰胺对衰老条件下血管钙化的抑制作用。具体操作如下:

[0044] 8-12代人血管平滑肌细胞以 $1 \times 10^5$ /孔,铺12孔板,每孔给予1ml DMEM完全培养基。铺板后第1日给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100uM 1-甲基烟酰胺或25uM 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第2日给予1uM顺铂,第4日更换DMEM完全培养基并再次给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100uM 1-甲基烟酰胺或25uM 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第7日进行茜素红染色。

[0045] 4、应用顺铂和磷诱导血管平滑肌细胞发生钙化,并分别给予1-甲基烟酰胺或1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)干预7天后进行钙含量测定。具体操作如下:

[0046] 8-12代人血管平滑肌细胞以 $2 \times 10^5$ /孔,铺6孔板,每孔给予2ml DMEM完全培养基。铺板后第1日给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100uM 1-甲基烟酰胺或25uM 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干预,第2日给予1uM顺铂,第4日更换DMEM完全培养基并再次给予2.6mM磷诱导钙化,同时给予100uM 1-甲基烟酰胺或25uM 1-甲基烟酰胺抑制剂(NNMTi)进行干

预,第7日进行钙含量测定。

[0047] 结果显示,通过茜素红染色结果可以看出,1-甲基烟酰胺可以显著抑制顺铂诱导衰老的血管平滑肌细胞发生钙化,而这种抑制作用可以被1-甲基烟酰胺的抑制剂(NNMTi)所逆转(图3的C)。进一步的钙含量测定结果也同样说明了1-甲基烟酰胺具有抑制衰老条件下血管钙化的作用(图3的D)。

[0048] 综合以上结果可见,式(I)小分子代谢合物1-甲基烟酰胺能有效抑制衰老条件下血管钙化的发生,可作为抗血管钙化的药物。

[0049] 实施例3 1-甲基烟酰胺抑制衰老小鼠发生血管钙化

[0050] 1、本实施例应用高钙高腺嘌呤饮食诱导衰老小鼠发生血管钙化,并分别给予1-甲基烟酰胺干预2.5个月对小鼠主动脉进行茜素红染色,以评估1-甲基烟酰胺对衰老小鼠血管钙化的抑制作用。具体操作为:

[0051] 将自然衰老的C57BL/6小鼠(鼠龄25个月)随机分为对照组(n=10)、高钙高腺嘌呤组(n=10)、高钙高腺嘌呤+1-甲基烟酰胺组(100mg/kg/day)(n=10),分别给予正常饲料、高钙高腺嘌呤饲料、高钙高腺嘌呤饲料+1-甲基烟酰胺饮水喂养,2.5个月后处死小鼠,并取小鼠主动脉进行茜素红染色。

[0052] 结果显示,通过茜素红染色结果可以看出,高钙高腺嘌呤饲料成功诱导衰老小鼠血管钙化的发生,而1-甲基烟酰胺可以显著抑制衰老小鼠发生血管钙化(图4的A)。

[0053] 2、为进一步验证1-甲基烟酰胺抑制衰老小鼠发生血管钙化的作用,应用高钙高腺嘌呤饮食诱导衰老小鼠发生血管钙化,并分别给予1-甲基烟酰胺干预2.5个月对小鼠主动脉环分别进行收缩表型 $\alpha$ -SMA和成骨表型BMP2 IHC染色,以进一步评估1-甲基烟酰胺对衰老小鼠血管钙化的抑制作用。具体操作如下:

[0054] 将自然衰老的C57BL/6小鼠(鼠龄25个月)随机分为对照组(n=10)、高钙高腺嘌呤组(n=10)、高钙高腺嘌呤+1-甲基烟酰胺组(n=10),分别给予正常饲料、高钙高腺嘌呤饲料、高钙高腺嘌呤饲料+1-甲基烟酰胺饮水喂养,2.5个月后处死小鼠,并取小鼠主动脉环分别进行收缩表型 $\alpha$ -SMA和成骨表型BMP2 IHC染色。

[0055] 结果显示,通过IHC染色结果可以看出,无论是收缩表型 $\alpha$ -SMA还是成骨表型BMP2,均表明1-甲基烟酰胺可以显著抑制衰老小鼠发生血管钙化(图4的B)。

[0056] 综合以上结果可见,式(I)小分子代谢合物1-甲基烟酰胺能有效抑制衰老小鼠血管钙化的发生,可作为抗血管钙化的药物。

[0057] 上述具体实施方式对本发明作了详细说明,但是本发明不限于上述实施例,在所属技术领域普通技术人员所具备的知识范围内,还可以在不脱离本发明宗旨的前提下作出各种变化。此外,在不冲突的情况下,本发明的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

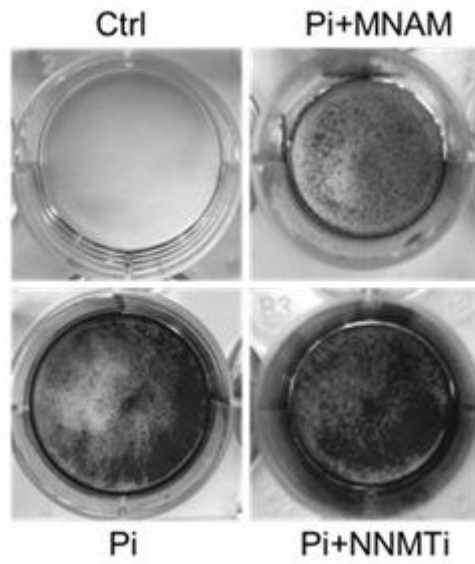


图1

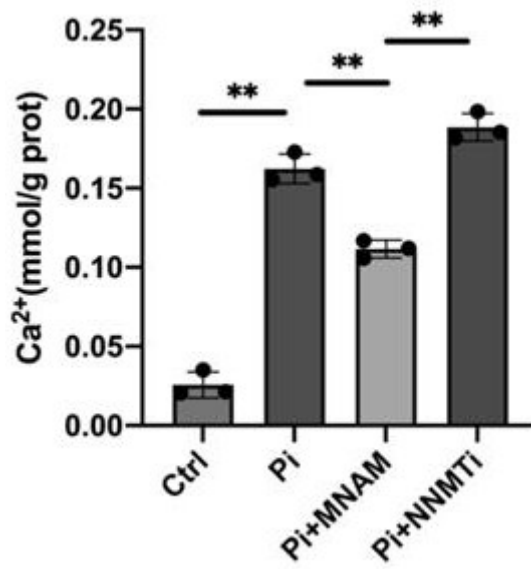


图2



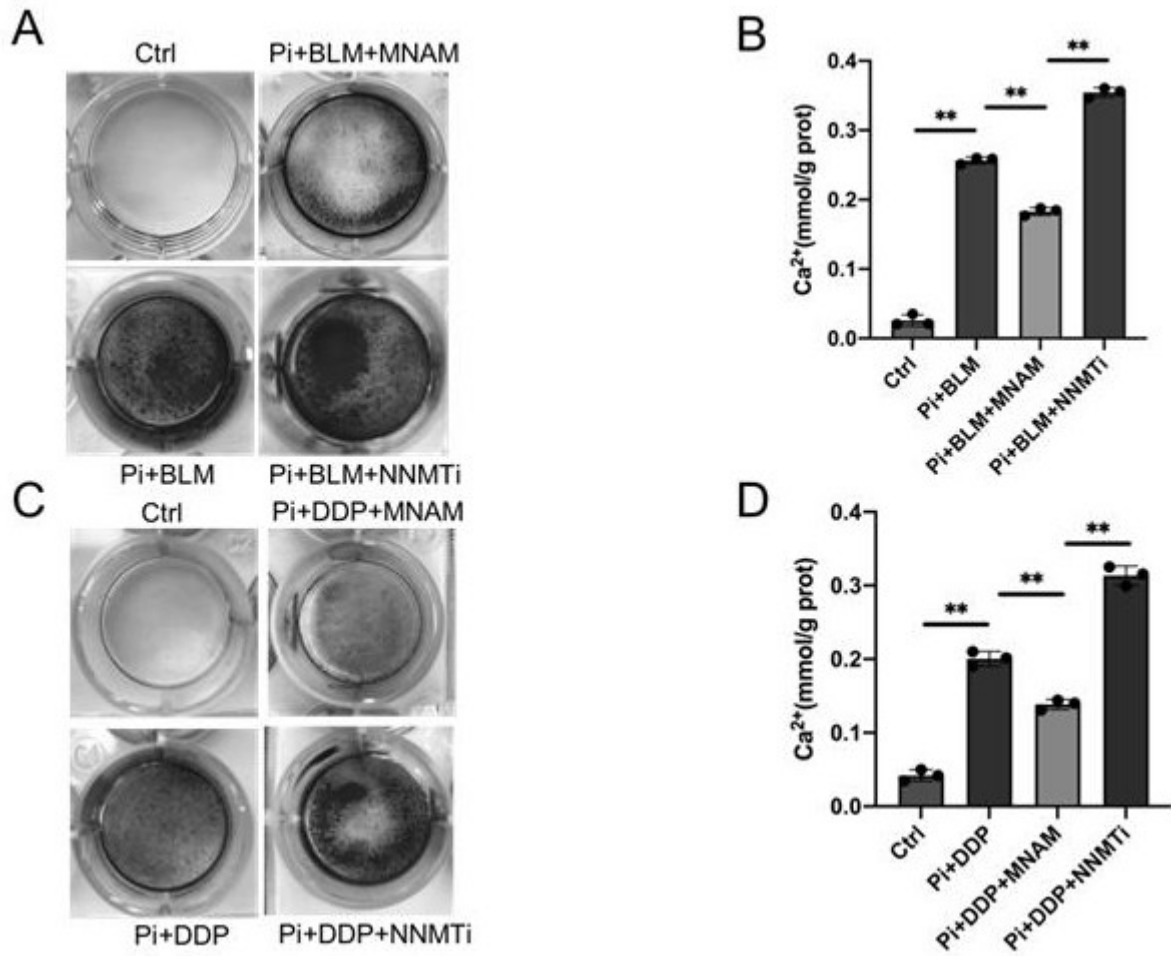


图3

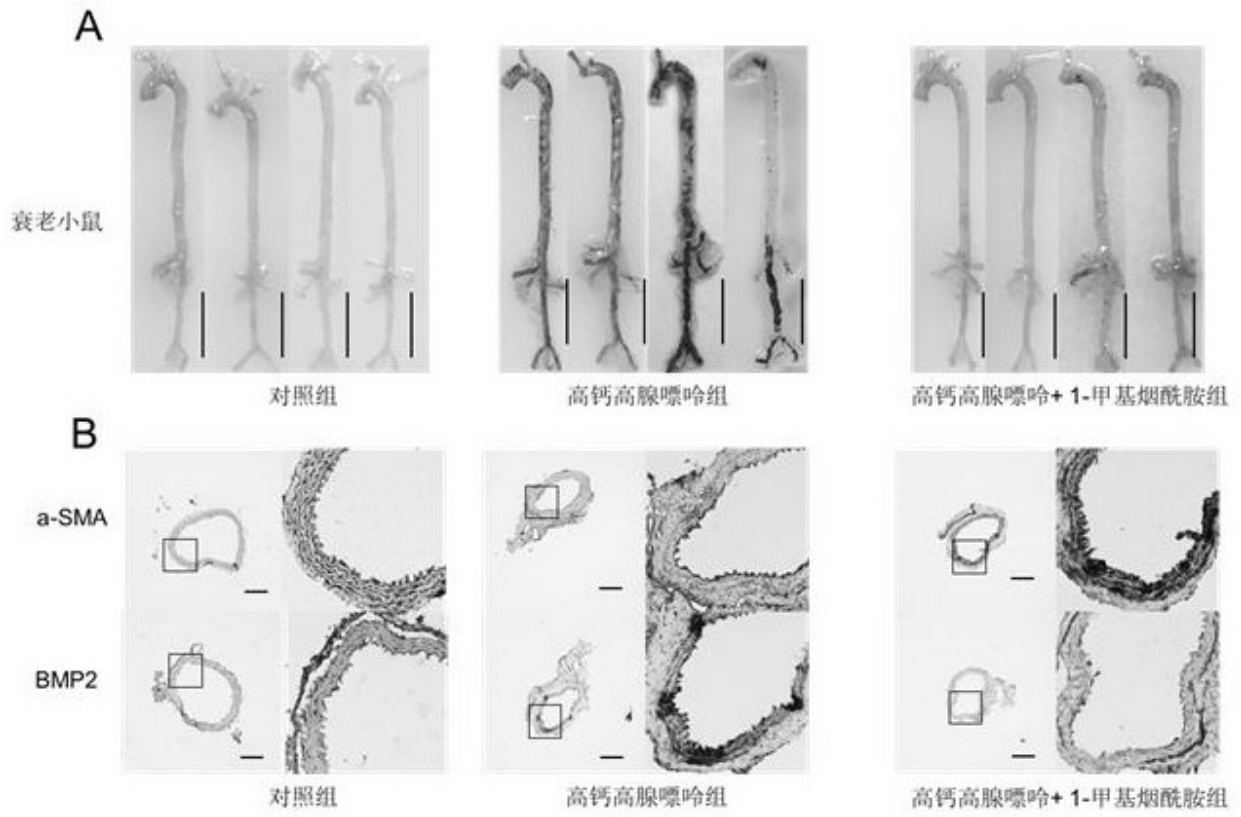


图4