



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104974215 A

(43) 申请公布日 2015. 10. 14

(21) 申请号 201410131280. X

(22) 申请日 2014. 04. 02

(71) 申请人 华东师范大学

地址 200062 上海市普陀区中山北路 3663
号

(72) 发明人 汤杰 刘明耀 常亮 仇文卫
罗剑 杨帆 石英

(74) 专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务
所(普通合伙) 31257

代理人 董红曼

(51) Int. Cl.

C07J 71/00(2006. 01)

A61P 19/10(2006. 01)

权利要求书2页 说明书9页

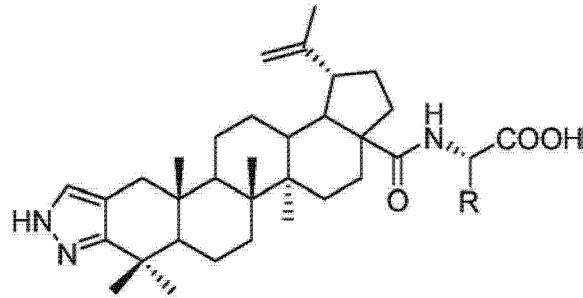
(54) 发明名称

白桦脂酸-氨基酸衍生物及其制备方法和应用

(57) 摘要

本发明公开了式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物及其制备方法,在氮气保护下,原料式(a)化合物与乙酸酐和吡啶酰化反应得到式(b)化合物,再与草酰氯反应得到式(c)化合物,继而分别与甘氨酸甲酯、L-丙氨酸甲酯、L-缬氨酸甲酯、L-异亮氨酸甲酯、L-谷氨酸甲酯反应得到式(d)化合物,与LiOH反应后,经洗涤,干燥,纯化得到式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物,合成效率高,工艺简便。本发明还公开了式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物在制备治疗骨质疏松药物中的应用,可用作破骨前体细胞分化抑制剂,具有显著增强的破骨细胞分化活性抑制效果。

1. 一种白桦脂酸-氨基酸衍生物,其特征在于,其结构如式(I)所示,



式(I)

式(I)中,R为 H 、 CH_3 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}$ 、 $(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_2$ 、或 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 。

2. 式(I)所示白桦脂酸-氨基酸衍生物的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

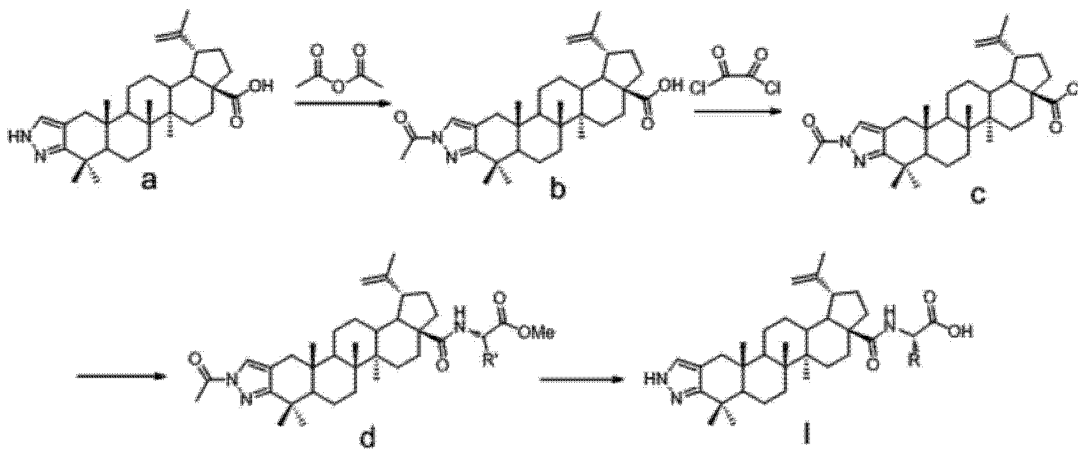
步骤一,在氮气保护下,式(a)化合物与乙酸酐和吡啶酰化反应得到式(b)化合物;

步骤二,在氮气保护下,式(b)化合物与草酰氯反应得到式(c)化合物;

步骤三,在氮气保护下,式(c)化合物分别与甘氨酸甲酯、L-丙氨酸甲酯、L-缬氨酸甲酯、L-异亮氨酸甲酯、或L-谷氨酸甲酯反应,得到式(d)化合物;

步骤四,向式(d)化合物中加入蒸馏水和LiOH,室温搅拌反应,经洗涤,干燥,纯化得到式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物;

其反应过程如下所示:



其中,

R^1 为 H 、 CH_3 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$ 、 $(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、或 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$;

R 为 H 、 CH_3 、 $(\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$ 、 $(\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_3\text{CH}_2$ 、或 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 。

3. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤一中以无水四氢呋喃为溶剂,反应温度为 30°C ,反应时间为 0.5 小时,收率 87%;乙酸酐的摩尔量为式(a)化合物的 1.5 倍量,吡啶的摩尔量为式(a)化合物的 1 倍量。

4. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤二中以二氯甲烷为溶剂,反应时间为 18 小时;草酰氯的摩尔量为式(b)化合物的 5 倍量。

5. 如权利要求2所述的制备方法,其特征在于,所述步骤三中以二氯甲烷为溶剂,所述甘氨酸甲酯盐酸盐、L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-缬氨酸甲酯盐酸盐、L-异亮氨酸甲酯盐酸盐、

L-谷氨酸甲酯盐酸盐的摩尔量为式(c)化合物的1.2倍量, N, N二异丙基乙基胺的摩尔量为式(c)化合物的1.5倍量, 反应温度为0℃~25℃, 反应时间为8-16小时, 收率65~76%。

6. 如权利要求2所述的制备方法, 其特征在于, 所述步骤四中, 溶剂为90%四氢呋喃和10%水混合溶剂, 氢氧化锂的摩尔量为式(d)化合物的3倍量, 反应温度为0℃~25℃, 反应时间为两小时, 收率62~80%。

7. 式(I)所示白桦脂酸-氨基酸衍生物抑制破骨前体细胞分化的方法, 其特征在于, 所述方法包括将破骨前体细胞RAW264.7经接种、培养, 经RANKL诱导、TRAP染色, 计数TRAP阳性的多核细胞数, 检测所述破骨前体细胞RAW264.7的分化、成熟的活性。

8. 式(I)所示白桦脂酸-氨基酸衍生物在制备治疗骨质疏松药物中的应用。

9. 式(I)所示白桦脂酸-氨基酸衍生物作为破骨前体细胞分化抑制剂的应用。

白桦脂酸 - 氨基酸衍生物及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药及其制备和应用的技术领域,具体涉及一种白桦脂酸 - 糖衍生物及其制备方法和在制备抗骨质疏松药物中的应用。

背景技术

[0002] 骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是世界范围内的常见病,多发病,是吞噬老年人健康的“隐形流行病”。世界卫生组织将骨质疏松症定义为:一种以骨量减少、骨的微观结构退化为特征,致使骨的脆性增加,易于发生骨折的全身性骨骼疾病。由于没有明显的早期症状,骨质疏松称得上是一位“隐形杀手”,很容易被人们忽视。一旦患病,得不到及时治疗,可能会带来髌骨骨折、脊椎骨折等情况,不仅会给生活造成沉重的负担,严重时甚至危及生命。世界卫生组织已将每年的 10 月 20 日定为“世界骨质疏松日”。我国骨质疏松患者数量庞大,最新统计数据表明大约有 1 亿人受到骨质疏松的影响。45 岁以上人口中大约 25% 的男性患有骨质疏松症;女性发病率更高,在 30% 以上,70 岁以上的妇女,骨质疏松患病率高达 90% 以上。过去 30 年间,我国骨质疏松患者增加了 300%,每年医疗费用按最保守估计也需要 150 亿人民币。

[0003] 骨的新陈代谢由破骨细胞 (osteoclast) 介导的骨吸收与成骨细胞 (osteoblast) 介导的骨形成之间精巧的平衡来维持 (N. Engl. J. Med. 2006, 354, 2250-2261)。破骨细胞活性过高,或成骨细胞活性不够,则骨丢失增加,易导致骨质疏松。尽管人们已研发了多种治疗骨质疏松的药物,但到目前为止,大部分药物的临床疗效均不理想,如:(1) 绝经期妇女由于体内雌激素水平下降导致破骨细胞数量及活性增加,从而导致骨质疏松。雌激素替代疗法 (Estrogen-replacement therapy) 曾经长期被用作治疗绝经期妇女骨质疏松的一线药物,能抑制破骨细胞活性、促进其凋亡,并能抑制成骨细胞凋亡。然而研究发现使用该方法治疗骨质疏松可能会导致乳腺癌、中风、血栓等 (Am. J. Crit. Care 2005, 14, 157-160)。考虑到雌激素的副作用,雌激素替代疗法目前仅作为治疗骨质疏松的短期用药 (小于 3 年)。(2) 双膦酸盐 (Bisphosphonates) 能抑制破骨细胞的活性,被广泛用于治疗破骨细胞介导的过量骨吸收所引起的骨质疏松。然而口服双膦酸盐不仅生物利用度低、肠胃耐受性差,甚至可能会引起肾毒性及颌骨坏死 (J. Cancer Res. Clin. Oncol. 2010, 136, 1117-1124)。(3) 甲状旁腺素 (Parathyroid hormone) 是一种多肽,能增加骨质疏松患者体内成骨细胞的数量及活性,从而促进骨形成。然而长期使用甲状旁腺素会增加患骨肉瘤的风险 (Curr. Osteoporos. Rep. 2008, 6, 12-16),临床仅推荐短期使用 (美国 2 年,欧洲 18 个月)。

[0004] 目前临床上常用的治疗骨质疏松的药物均有较为严重的副作用,远远不能满足需求,因此,开发新颖的,更有效、更安全的抗骨质疏松药物成为一种迫切的需要。迄今,骨质疏松的治疗多以破骨细胞为靶点,可通过抑制破骨细胞前体分化成多核成熟的破骨细胞来降低骨降解速率、改善骨吸收。因此,抑制破骨细胞分化的骨吸收抑制剂是治疗骨质疏松的热点,正逐渐成为制药公司和各大药厂关注的焦点,这一类药物有望在未来几年成为治疗骨质疏松的一线药物而替代现有的临床用药。如欧洲人用药委员会 (CHMP) 于 2009 年 12

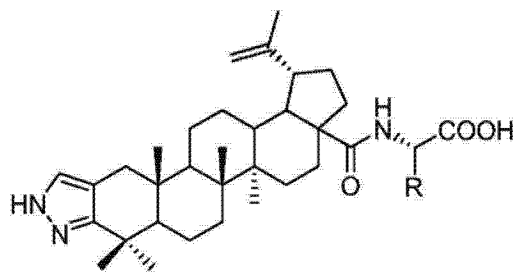
月份批准的安进公司 (Amgen) 的狄诺塞麦 (Denosumab) 是破骨细胞分化因子 RANKL 的单克隆抗体, 能够与 RANKL 作用, 中和成骨细胞分泌的 RANKL, 抑制破骨细胞的分化、成熟及活性, 进而治疗骨质疏松 (N. Engl. J. Med. 2006, 354, 821-831), 本品被认为有成为重磅炸弹药物的潜力。

[0005] 与人工合成的小分子化合物相比, 天然产物在成药性方面具有先天的优越性, 因此从天然产物、特别是从高安全性天然产物的有效成分入手, 寻找新颖的母核结构并进行构效关系研究, 是发现成药性好、安全性高的抗骨质疏松药物的重要途径。近年来, 一些天然三萜类化合物被报道具有抑制破骨细胞分化的作用, 如黑升麻醇的糖苷 ACCX 能够抑制 RANKL 诱导的破骨细胞的分化、成熟 (Chem. Bio. 2007, 14, 860-869); 五环三萜类乳香酸衍生物 AKBA 同样可以抑制破骨细胞的分化、成熟 (J. Immunol. 2006, 176, 3127-3140)。五环三萜类化合物白桦脂酸 (Betulinic acid) 是我国民间用草药接骨木中的主要成分之一 (CN200410051613. 4), 民间主要用于治疗跌打损伤, 最近研究发现接骨木能够增加卵巢切除的骨质疏松模型鼠的骨量 (Biol. Pharm. Bull. 2005, 28, 1879-1885)。

发明内容

[0006] 本发明提出一类白桦脂酸-氨基酸衍生物, 其结构如式 (I) 所示:

[0007]



式 (I):

[0008] 式 (I) 中, R 为 -H 、 -CH_3 、 $\text{-C(CH}_3)_2$ 、 $\text{-C(CH}_3)_2\text{CH}_2$ 、或 $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$ 。

[0009] 本发明中, 式 (I) 白桦脂酸-氨基酸衍生物的名称分别为 CL-1 (R 为 -H)、CL-2 (R 为 -CH_3)、CL-3 (R 为 $\text{-C(CH}_3)_2$)、CL-4 (R 为 $\text{-C(CH}_3)_2\text{CH}_2$)、CL-5 (R 为 $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)。

[0010] 本发明还提出了式 (I) 白桦脂酸-氨基酸衍生物的制备方法, 包括以下步骤:

[0011] 步骤一, 在氮气保护下, 式 (a) 化合物与乙酸酐和吡啶酰化反应得到式 (b) 化合物; 乙酸酐的摩尔量为式 (a) 化合物的 1.5 倍量, 吡啶的摩尔量为式 (a) 化合物的 1 倍量。

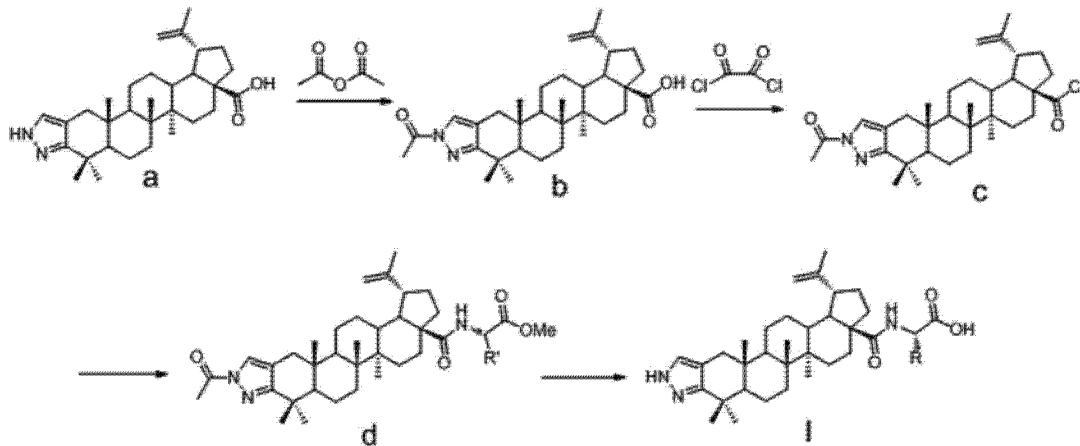
[0012] 步骤二, 在氮气保护下, 式 (b) 化合物与草酰氯反应得到式 (c) 化合物; 草酰氯的摩尔量为式 (b) 化合物的 5 倍量。

[0013] 步骤三, 在氮气保护下, 式 (c) 化合物分别与甘氨酸甲酯、L-丙氨酸甲酯、L-缬氨酸甲酯、L-异亮氨酸甲酯、或 L-谷氨酸甲酯反应, 得到式 (d) 化合物; 所述甘氨酸甲酯盐酸盐、L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-缬氨酸甲酯盐酸盐、L-异亮氨酸甲酯盐酸盐、L-谷氨酸甲酯盐酸盐的摩尔量为式 (c) 化合物的 1.2 倍量, N, N 二异丙基乙基胺的摩尔量为式 (c) 化合物的 1.5 倍量。

[0014] 步骤四,向式(d)化合物中加入蒸馏水和LiOH,室温搅拌反应,经洗涤,干燥,纯化得到式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物;氢氧化锂的摩尔量为式(d)化合物的3倍量。

[0015] 其反应过程的反应式如下所示:

[0016]



[0017] 其中,

[0018] R^1 为 H、 CH_3 、 $(CH_3)_2CH_2$ 、 $(C_2H_5)CH_3CH_2$ 、或 CH_2CH_2COOMe ;

[0019] R 为 H、 CH_3 、 $(CH_3)_2CH_2$ 、 $(C_2H_5)CH_3CH_2$ 、或 CH_2CH_2COOH 。

[0020] 本发明制备方法的具体步骤包括:以式(a)化合物(XJ-479,即文献(J. Med. Chem. 2012, 55, 3122-3134;CN201110059622)报道的较易合成的原料XJ-479)为原料,在氮气保护下与乙酸酐和吡啶酰化反应0.5小时得到化合物b,溶剂为无水四氢呋喃,反应温度为 $30^{\circ}C$,所得产物经硅胶柱层析纯化得白桦脂酸衍生物b,收率87%,该制备方法收率高,反应时间短。化合物b在氮气保护下,反应温和无需使用到剧毒试剂,二氯甲烷作溶剂与草酰氯反应18小时得到化合物c,所得化合物c无需纯化,直接用于下一步反应。即化合物c在氮气保护下分别与甘氨酸甲酯盐酸盐、L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-缬氨酸甲酯盐酸盐、L-异亮氨酸甲酯盐酸盐和L-谷氨酸甲酯盐酸盐反应,以二氯甲烷为溶剂,反应8-16小时,温度控制在 $0^{\circ}C \sim 25^{\circ}C$ 之间,所得产物经硅胶柱层析纯化分别得白桦脂酸衍生物d,收率65~76%,该方法可以高效地合成新型白桦脂酸C-28位氨基酸衍生物。化合物d经氢氧化锂水解,以四氢呋喃和水作混合溶剂,反应2小时,温度控制在 $0^{\circ}C \sim 25^{\circ}C$ 之间。所得产物经硅胶柱层析纯化得白桦脂酸衍生物I,收率62~80%,与传统方法相比,该方法反应温和,收率较高。

[0021] 本发明还提出了式(I)所示白桦脂酸-氨基酸衍生物抑制破骨前体细胞分化的方法,抑制的方法为抑制RANKL诱导破骨前体细胞RAW264.7分化、成熟的活性测试。选择4个不同浓度1、0.5、0.1、0.01 μM 对所有化合物进行了抑制活性的初步筛选。将破骨前体细胞RAW264.7接种到96孔培养板中,3000细胞/孔。用10%的胎牛血清持续培养24小时。然后,细胞培养基加入50ng/ml的RANKL和各种不同浓度的测试化合物。持续培养3天后,TRAP染色,在显微镜下计数TRAP阳性的多核细胞数(细胞核数大于3个)。

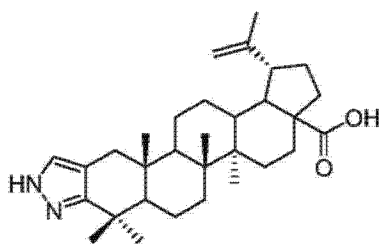
[0022] 本发明还提出了式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物在制备治疗骨质疏松药物中的应用。

[0023] 本发明还提出了式(I)所示白桦脂酸-氨基酸衍生物作为破骨前体细胞分化抑制

剂的应用,具显著增强的破骨细胞分化活性抑制效果。

[0024] 本发明对白桦脂酸进行了抑制破骨细胞分化的筛选,发现其具有中等强度抑制破骨细胞分化、成熟的作用 ($IC_{50} = 25 \mu M$),通过对其A环进行系统的并杂环结构改造,获得了一批高活性的抑制破骨细胞的分化、成熟的衍生物。特别是化合物XJ-479(其结构如式(a)所示),其抑制活性与白桦脂酸相比提高了200倍 ($IC_{50} = 0.1 \mu M$),且细胞毒性小,对卵巢切除的骨质疏松模型鼠具有缓解、抑制骨质疏松的效果(J. Med. Chem. 2012, 55, 3122-3134; CN201110059622)。

[0025]



式(a)

[0026] 天然氨基酸对于人体具有高安全性,将其引入活性分子后,不仅有可能进一步增强活性,通常还能改善其生物利用度,因此对一些具有生理活性的化合物进行氨基酸修饰是药物发现中一种常用的手段。本发明以上述式(a)化合物(XJ-479)为先导化合物,在其C-28羧酸官能团引入各种氨基酸,从而合成了一类具有显著抑制破骨细胞分化活性的本发明式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物。

[0027] 本发明通过对破骨细胞分化抑制活性筛选,发现式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物具有显著抑制破骨细胞分化的活性。本发明式(I)白桦脂酸-氨基酸衍生物抑制破骨细胞分化的活性多数 $IC_{50} < 1 \mu M$,高于五环三萜类天然产物白桦脂酸 ($IC_{50} = 25 \mu M$)。本发明优点包括,通过对天然产物白桦脂酸进行结构改造,例如,在天然产物白桦脂酸衍生物XJ-479的C28位引入氨基酸,高效合成了系列新型的白桦脂酸衍生物,合成方法简便,且通过该部位的结构改造,显著增强了该类化合物抑制破骨细胞分化的活性。

具体实施方式

[0028] 结合以下具体实施例,对本发明作进一步的详细说明,本发明的保护内容不局限于以下实施例。在不背离发明构思的精神和范围下,本领域技术人员能够想到的变化和优点都被包括在本发明中,并且以所附的权利要求书为保护范围。实施本发明的过程、条件、试剂、实验方法等,除以下专门提及的内容之外,均为本领域的普遍知识和公知常识,本发明没有特别限制内容。

[0029] 本发明式(I)所示白桦脂酸-氨基酸衍生物的制备方法,包括以下步骤:

[0030] 步骤一,以化合物a(XJ-479)为原料在氮气保护下与1.5倍摩尔量的乙酸酐和1倍摩尔量吡啶酰化反应0.5小时得到化合物b,溶剂为无水四氢呋喃,反应温度为 $30^{\circ}C$,所得产物经硅胶柱层析纯化得白桦脂酸衍生物b,收率87%。

[0031] 步骤二,化合物b在氮气保护下,以二氯甲烷作溶剂与5倍摩尔量草酰氯反应18小时得到化合物c,所得化合物c无需纯化,直接用于下一步反应。

[0032] 步骤三,化合物c在氮气保护下分别与1.2倍摩尔量甘氨酸甲酯盐酸盐、L-丙氨酸甲酯盐酸盐、L-缬氨酸甲酯盐酸盐、L-异亮氨酸甲酯盐酸盐和L-谷氨酸甲酯盐酸盐反应,

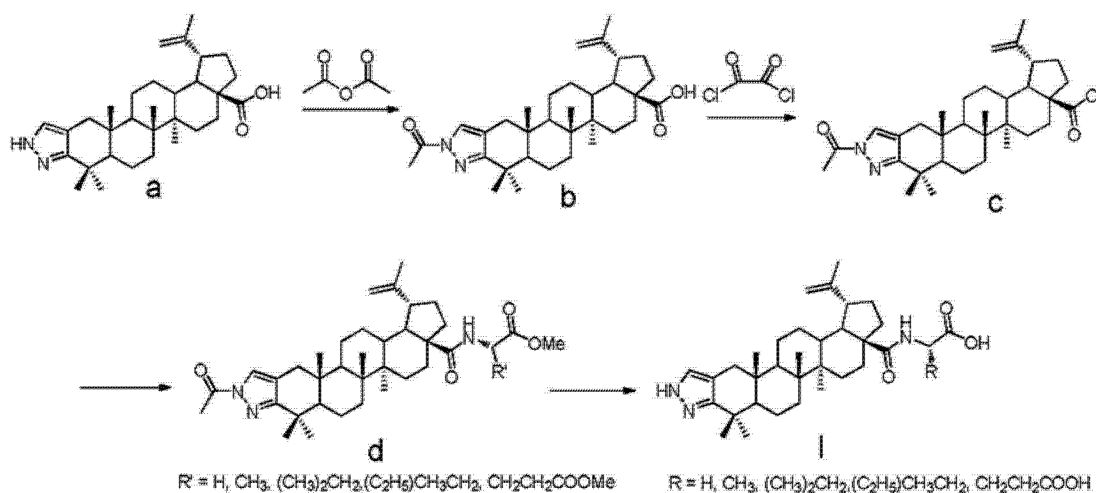
反应 8-16 小时,温度控制在 0°C ~ 25°C 之间,到化合物 d 所得产物经硅胶柱层析纯化得白桦脂酸衍生物 d,收率 65 ~ 76%。

[0033] 步骤四,将 d 溶于 THF 中,加入少量蒸馏水和 3 倍摩尔量的 LiOH,温度控制在 0°C ~ 25°C 之间反应两小时,反应结束后用 1M 的 HCl 洗涤两次,饱和食盐水洗涤,无水 Na₂SO₄ 干燥,蒸去溶剂后所得粗产物用硅胶柱层析纯化得白桦脂酸衍生物 I,收率 62 ~ 80%。

[0034] 本发明中,式 (I) 白桦脂酸-氨基酸衍生物的名称分别为 CL-1 (R 为 -H)、CL-2 (R 为 -CH_3)、CL-3 (R 为 $\text{-C(CH}_3)_2$)、CL-4 (R 为 $\text{-C(CH}_3)_2\text{CH}_2$)、CL-5 (R 为 $\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{COOH}$)。

[0035] 实施例 1:白桦脂酸衍生物 CL-1 的制备

[0036]



[0037] 在氮气保护下,将化合物 a 480mg 溶于 10mL THF 的混合溶剂中,滴入 1.5 倍摩尔量的乙酸酐和 1 倍摩尔量的吡啶,反应温度为 30°C,搅拌反应 0.5 小时。反应结束后加入 50mL 乙酸乙酯、10mL 饱和碳酸氢钠水溶液,水层用 100mL 乙酸乙酯萃取两次,合并有机层,用饱和食盐水洗涤、无水 Na₂SO₄ 干燥、减压浓缩所得的粗产品用硅胶柱层析 (PE :EA = 2 : 1) 得到化合物 b 302mg,收率 87%。¹H NMR (CDCl₃, 400MHz) δ : 7.94 (s, 1H), 4.70 (s, 1H), 4.57 (s, 1H), 3.00-2.94 (m, 1H), 2.53-2.50 (m, 1H), 2.31-2.26 (m, 1H), 2.14-2.12 (m, 1H), 2.01 (s, 3H), 1.91-1.88 (m, 1H), 1.84-1.78 (m, 2H), 1.65 (s, 3H), 1.62-1.19 (m, 18H), 1.08 (s, 3H), 0.96 (s, 3H), 0.92 (s, 3H), 0.86 (s, 3H), 0.79 (s, 3H)。

[0038] 将化合物 b 530mg 溶于 10mL THF,在 0°C 氮气保护下滴加 5 倍摩尔量草酰氯,温度控制在 0°C ~ 25°C 之间,反应 18 小时。减压蒸去溶剂后得化合物 c。该化合物 c 无需提纯就可以直接用于下一步反应。

[0039] 将化合物 c 530mg 溶于 10mL DCM,加入 150mg 甘氨酸甲酯盐酸盐,在氮气保护条件下,加入 0.3mL N, N-二异丙基乙胺,在室温下搅拌 8 小时。TLC 监测反应,反应结束后用 1M 的 HCl 洗涤两次,饱和食盐水 10mL 洗涤,无水 Na₂SO₄ 干燥,蒸去溶剂后所得粗产物用硅胶柱层析 (DCM : MeOH = 50 : 1) 纯化得化合物 d (R' = H) 300mg,收率 65%。¹H NMR (400MHz, CDCl₃) δ 7.82 (s, 1H), 6.06 (s, 1H), 5.30 (s, 1H), 4.75 (s, 1H), 4.61 (s, 1H), 4.16-3.89 (m, 2H), 3.76 (s, 3H), 3.12 (m, 4.3Hz, 1H), 2.71 (d, J = 15.4Hz, 1H), 2.63 (s, 3H), 2.51 (t, J = 10.6Hz, 1H), 2.09-1.72 (m, 5H), 1.70 (s, 3H), 1.67-1.33 (m, 15H), 1.31 (s, 3H), 1.25 (s, 3H),

1. 21 (s, 3H), 1. 00 (s, 3H), 0. 99 (s, 3H), 0. 78 (s, 3H).

[0040] 将化合物 d300mg 溶于 10mL THF 中, 加入 0. 2mL 蒸馏水, 加入 3 倍摩尔量的 LiOH, 室温搅拌 2 小时, 反应结束后用 1M HCl 洗涤两次, 饱和食盐水 10mL 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 蒸去溶剂后所得粗产物用硅胶柱层析 (DCM : MeOH = 20 : 1) 纯化得 100mg 白桦脂酸-氨基酸衍生物 CL-1 (R = H), 收率 62%。¹H NMR (400MHz, MeOD) δ 7. 72 (s, 1H), 4. 62 (s, 1H), 4. 49 (s, 1H), 3. 91-3. 57 (m, 2H), 2. 99 (m, 1H), 2. 68 (d, J = 15. 3Hz, 1H), 2. 54 (t, J = 10. 8Hz, 1H), 2. 09 (d, J = 13. 0Hz, 1H), 1. 96 (d, J = 15. 3Hz, 1H), 1. 85 (d, J = 7. 0Hz, 2H), 1. 69 (d, J = 12. 4Hz, 1H), 1. 61 (s, 3H), 1. 58-1. 28 (m, 11H), 1. 25 (s, 3H), 1. 16 (s, 3H), 1. 04 (m, 2H), 0. 95 (s, 3H), 0. 94 (s, 3H), 0. 73 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, DMSO) δ 182. 22, 175. 89, 156. 38, 154. 91, 136. 00, 119. 86, 112. 51, 59. 53, 56. 59, 53. 76, 52. 91, 50. 59, 46. 19, 44. 52, 44. 23, 42. 08, 41. 80, 41. 44, 39. 14, 37. 23, 36. 93, 36. 57, 34. 40 (2C), 33. 17, 33. 12, 29. 50, 26. 25, 25. 17, 22. 51, 22. 20, 18. 88, 18. 85, 17. 55.

[0041] 实施例 2 : 白桦脂酸衍生物 CL-2 的制备

[0042] 本实施例中, 步骤一、二、三同实施例 1, 即化合物 d (R' = CH₃) 的合成方法类似于实施例 1, 只是将原料甘氨酸甲酯盐酸盐换成 L-丙氨酸甲酯盐酸盐。收率 65%。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 7. 99 (s, 1H), 7. 41 (d, J = 7. 4Hz, 1H), 7. 19 (s, 1H), 6. 92 (s, 1H), 4. 67 (s, 1H), 4. 55 (s, 1H), 4. 19 (m, 3H), 2. 99 (td, J = 10. 9, 4. 2Hz, 2H), 2. 60 (m, 2H), 2. 51 (s, 3H), 2. 17 (d, J = 13. 0Hz, 1H), 2. 07-1. 83 (m, 3H), 1. 77 (m, 1H), 1. 65 (s, 3H), 1. 60-1. 33 (m, 11H), 1. 31 (s, 3H), 1. 30 (s, 3H), 1. 28 (s, 3H), 1. 26 (s, 3H), 1. 22 (s, 2H), 1. 20 (s, 3H), 1. 17-0. 98 (m, 3H), 0. 96 (s, 3H), 0. 90 (s, 3H), 0. 71 (s, 3H).

[0043] 将化合物 d300mg 溶于 10mL THF 中, 加入 0. 2mL 蒸馏水, 加入 3 倍摩尔量的 LiOH, 室温搅拌两小时, 反应结束后用 1M 的 HCl 洗涤两次, 饱和食盐水 10mL 洗涤, 无水 Na₂SO₄ 干燥, 蒸去溶剂后所得粗产物用硅胶柱层析 (DCM : MeOH = 20 : 1) 纯化得 89mg CL-2 (R = CH₃) 收率 78%。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 7. 84 (s, 1H), 7. 75 (d, J = 6. 9Hz, 1H), 4. 66 (s, 1H), 4. 55 (s, 1H), 4. 22-4. 06 (m, 1H), 2. 97 (s, 1H), 2. 62 (d, J = 15. 0Hz, 2H), 2. 21 (d, J = 11. 8Hz, 1H), 1. 97 (d, J = 13. 9Hz, 2H), 1. 88-1. 71 (m, 1H), 1. 64 (s, 3H), 1. 45 (m, 9H), 1. 29 (s, 3H), 1. 26 (d, J = 7. 1Hz, 4H), 1. 18 (s, 3H), 1. 09 (m, 3H), 0. 95 (s, 3H), 0. 89 (s, 3H), 0. 71 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, DMSO) δ 175. 62, 174. 48, 150. 93, 150. 74, 131. 39, 114. 19, 109. 07, 54. 68, 52. 12, 49. 45, 48. 23, 47. 42, 45. 97, 41. 92, 37. 90, 37. 34, 36. 61, 35. 07, 33. 10, 32. 75, 32. 01, 30. 25, 29. 90, 28. 90, 25. 19 (2C), 22. 88, 21. 05, 19. 10, 18. 35, 16. 69, 15. 50, 15. 42, 14. 22.

[0044] 实施例 3 : 白桦脂酸衍生物 CL-3 的制备

[0045] 化合物 d (R' = (CH₃)₂CH₂) 的合成方法类似于实施例 1, 只是将原料甘氨酸甲酯盐酸盐换成 L-缬氨酸甲酯盐酸盐。收率 75%。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 7. 27 (s, 1H), 7. 22 (s, 1H), 7. 18 (d, J = 8. 7Hz, 1H), 7. 00 (s, 1H), 4. 67 (s, 1H), 4. 55 (s, 1H), 4. 15-4. 03 (m, 1H), 3. 00 (m, 1H), 2. 59 (m, 2H), 2. 50 (s, 3H), 2. 23 (d, J = 9. 1Hz, 1H), 2. 00 (m, 1H), 1. 90 (d, J = 15. 3Hz, 3H), 1. 64 (s, 3H), 1. 61-1. 31 (m, 11H), 1. 32-1. 24 (m, 3H), 1. 20 (s, 4H), 1. 09 (s, 3H), 0. 99 (s, 3H), 0. 96 (s, 3H), 0. 89 (s, 3H), 0. 87 (s, 3H), 0. 84 (s, 3H), 0. 82 (s, 3H), 0. 71 (s, 3H).

[0046] 将化合物 d300mg 溶于 10mL THF 中, 加入 0. 2mL 蒸馏水, 加入 3 倍摩尔量的 LiOH,

室温搅拌两小时,反应结束后用 1M 的 HCl 洗涤两次,饱和食盐水 10mL 洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,蒸去溶剂后所得粗产物用硅胶柱层析 (DCM : MeOH = 20 : 1) 纯化得 95mg CL-3 ($\text{R} = (\text{CH}_3)_2\text{CH}_2$) 收率 80%。 ^1H NMR(400MHz, DMSO) δ 7.90(s, 1H), 7.32(s, 1H), 7.24(d, $J = 8.7\text{Hz}$, 1H), 7.01(s, 1H), 4.67(s, 1H), 4.55(s, 1H), 4.11-4.02(m, 1H), 3.44(m, 1H), 3.00(m, 1H), 2.63(d, $J = 14.9\text{Hz}$, 1H), 2.51(s, 1H), 2.24(d, $J = 8.9\text{Hz}$, 1H), 2.01(m, 1H), 1.94-1.81(m, 1H), 1.65(s, 3H), 1.58-1.34(m, 8H), 1.30(s, 3H), 1.28-1.22(m, 2H), 1.18(s, 2H), 1.17-1.01(m, 2H), 0.96(s, 2H), 0.89(s, 3H), 0.87(m, 1H), 0.83m, 3H), 0.71(s, 3H)。 ^{13}C NMR(100MHz, DMSO) δ 175.22, 173.46, 150.87, 150.80, 131.36, 114.33, 109.16, 66.98, 57.63, 55.97, 55.16, 52.10, 49.44, 48.21, 46.06, 41.98, 37.91, 37.30, 36.76, 35.05, 33.11, 32.79, 32.49, 30.32, 30.07, 29.86, 28.95, 25.20, 25.09, 22.83, 21.09, 19.59, 19.09, 18.51, 18.34, 15.50, 15.38, 14.26。

[0047] 实施例 4:白桦脂酸衍生物 CL-4 的制备

[0048] 化合物 d($\text{R}' = (\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_3\text{CH}$) 的合成方法类似于实施例 1,只是将原料甘氨酸甲酯盐酸盐换成 L-异亮氨酸甲酯盐酸盐。收率 65%。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 7.82(s, 1H), 7.27(s, 1H), 5.91(d, $J = 8.3\text{Hz}$, 1H), 4.74(s, 1H), 4.70-4.61(m, 1H), 4.61(d, $J = 10.9\text{Hz}$, 1H), 3.73(s, 3H), 3.13(m, 1H), 2.71(d, $J = 15.3\text{Hz}$, 1H), 2.63(s, 3H), 2.54(t, $J = 10.8\text{Hz}$, 1H), 2.11-1.81(m, 4H), 1.76(d, $J = 12.9\text{Hz}$, 2H), 1.69(s, 3H), 1.67-1.33(m, 15H), 1.31(s, 3H), 1.27s, 3H), 1.21(s, 3H), 1.06(m, 2H), 1.01(s, 3H), 0.99(s, 3H), 0.97(m, 3H), 0.96(s, 3H), 0.92-0.79(m, 3H), 0.77(s, 3H)。

[0049] 将 d300mg 溶于 10mL THF 中,加入 0.2mL 蒸馏水,加入 3 倍摩尔量的 LiOH,室温搅拌两小时,反应结束后用 1M 的 HCl 洗涤两次,饱和食盐水 10mL 洗涤,无水 Na_2SO_4 干燥,蒸去溶剂后所得粗产物用硅胶柱层析 (DCM : MeOH = 20 : 1) 纯化得 85mg CL-4 ($\text{R} = (\text{C}_2\text{H}_5)\text{CH}_3\text{CH}$) 收率 80%。 ^1H NMR(400MHz, MeOD) δ 7.77(s, 1H), 7.50(d, $J = 8.2\text{Hz}$, 1H), 4.71(s, 1H), 4.59(s, 1H), 4.41-4.24(m, 1H), 3.03(m, 1H), 2.77(d, $J = 15.2\text{Hz}$, 1H), 2.71-2.52(m, 1H), 2.23(d, $J = 13.1\text{Hz}$, 1H), 2.05(d, $J = 15.3\text{Hz}$, 1H), 2.02-1.73(m, 5H), 1.70(s, 3H), 1.69-1.36(m, 14H), 1.34(s, 3H), 1.25(s, 3H), 1.23-1.06(m, 3H), 1.05(s, 3H), 1.02(s, 3H), 0.98(d, $J = 6.9\text{Hz}$, 1H), 0.95(s, 3H), 0.93(s, 3H), 0.92(s, 3H), 0.90(s, 3H), 0.82(s, 3H)。 ^{13}C NMR(100MHz, DMSO) δ 175.92, 172.64, 150.85, 150.31, 131.68, 113.74, 109.15, 56.07, 54.97, 52.24, 51.39, 49.41, 48.27, 45.88, 41.89, 37.96, 37.19, 36.62, 35.23, 34.93, 33.08, 32.07, 30.02, 28.83, 25.21, 24.95, 22.95, 21.07, 19.11, 18.36, 15.60, 15.55, 15.35, 14.24, 10.31。

[0050] 实施例 5:白桦脂酸衍生物 CL-5 的制备

[0051] 化合物 d($\text{R}' = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{COOMe}$) 的合成方法类似于实施例 1,只是将原料甘氨酸甲酯盐酸盐换成 L-谷氨酸甲酯盐酸盐。收率 74%。 ^1H NMR(400MHz, CDCl_3) δ 12.29(s, 2H), 7.77(d, $J = 7.8\text{Hz}$, 1H), 7.52(s, 1H), 4.66(s, 1H), 4.55(s, 1H), 4.17(s, 1H), 3.85(s, 3H), 3.76(s, 3H), 2.98(s, 1H), 2.73(s, 3H), 2.61-2.58(m, 2H), 2.27(m, 3H), 2.12-1.68(m, 6H), 1.64(s, 4H), 1.58-1.29(m, 11H), 1.27(s, 3H), 1.19(s, 3H), 1.10(s, 3H), 0.91(s, 3H), 0.89(s, 3H), 0.73(s, 3H)。

[0052] 将 d300mg 溶于 10mL THF 中,加入 0.2mL 蒸馏水,加入 3 倍摩尔量的 LiOH,室

温搅拌两小时,反应结束后用 1M 的 HCl 洗涤两次,饱和食盐水 10mL 洗涤,无水 Na₂SO₄ 干燥,蒸去溶剂后所得粗产物用硅胶柱层析 (DCM : MeOH = 20 : 1) 纯化得 88mgCL-5 (R = CH₂CH₂COOH) 收率 77 %。¹H NMR (400MHz, DMSO) δ 12.29 (s, 2H), 7.74 (d, J = 7.8Hz, 1H), 7.12 (s, 1H), 4.66 (s, 1H), 4.55 (s, 1H), 4.17 (s, 1H), 2.98 (s, 1H), 2.63 (d, J = 35.1Hz, 2H), 2.27 (t, J = 22.7Hz, 3H), 2.12-1.68 (m, 6H), 1.64 (s, 4H), 1.58-1.29 (m, 11H), 1.27 (s, 3H), 1.19 (s, 3H), 1.08 (s, 3H), 0.94 (s, 3H), 0.89 (s, 3H), 0.71 (s, 3H). ¹³C NMR (100MHz, DMSO) δ 175.93, 173.86, 173.75, 150.91, 150.82, 111.19, 109.10, 99.49, 54.92, 53.03, 50.93, 49.44, 48.61, 46.00, 41.89, 38.23, 37.26, 36.70, 36.21, 32.98, 32.09, 30.75, 30.23, 28.91, 25.55, 25.32, 23.46, 21.05, 19.10, 18.63, 15.75, 15.50, 14.28.

[0053] 实施例 6 :白桦脂酸 - 氨基酸衍生物抑制破骨前体细胞分化测试

[0054] 原理 :单核的破骨前体细胞系在分化细胞因子 RANKL 的诱导下,能够逐渐融合分化为多核的成熟破骨细胞。破骨前体细胞不具备溶解骨质的能力,只有分化成熟的破骨细胞才具有溶解骨质的能力,因此,破骨细胞的分化水平能够反应其溶骨能力。本发明以现在用于治疗骨质疏松症的一线药物阿伦磷酸钠作为阳性对照,用来测试白桦脂酸衍生物抑制破骨细胞分化的活性。

[0055] 方法 :将 RAW264.7 接种到 96 孔培养板中,3000 细胞 / 孔。待细胞贴壁过夜后,设置对照组 (加 50ng/mlRANKL) 和实验组 (加 50ng/mlRANKL 和 5-20 μ M 剂量的本发明白桦脂酸 - 氨基酸衍生物,分别为 CL-1、CL-2、CL-3、CL-4、CL-5) 组,隔天换液,培养 3-5 天。等对照组细胞融合完全后,用 37℃ 预热的蒸馏水洗细胞一次,加入丙酮固定 30 秒,37℃ 预热的蒸馏水洗细胞三次,然后进行 TRAP 染色,在显微镜下计数 TRAP 阳性的多核细胞数 (核多余 3 个),得到破骨细胞形成百分数。选择 0.01 μ M, 0.1 μ M, 0.5 μ M 及 1 μ M 浓度测试白桦脂酸衍生物对破骨细胞的抑制活性。

[0056] 测试结果 :筛选结果是当化合物为各种浓度时对破骨细胞分化的百分抑制率,百分抑制率 = 100% - 破骨细胞形成百分数。

[0057] 治疗骨质疏松症药物阿伦磷酸钠与白桦脂酸衍生物抑制破骨细胞前体 RAW264.7 分化的测试结果,见表 1 :

[0058] 表 1 测试结果

[0059] a 抑制百分率

[0060]

化合物	1μM	0.5μM	0.1μM	0.01μM
阿伦磷酸钠	100	65.9±2.7	12.6±6.5	9.9±4.8
CL-1	100	86.8±6.56	76.8±6.56	70.3±3.1
CL-2	100	23.3±10.8	0	0
CL-3	100	71.4±3.1	46.1±1.55	26.9±2.33
CL-4	99.6±0.54	25.2±4.9	1.1±9.7	0
CL-5	98.9±0	48.3±17.1	30.8±3.1	17±19.4

[0061]

[0062] a 抑制百分率 = 100% - 破骨细胞形成百分数

[0063] 测试结果表明,本发明白桦脂酸-氨基酸衍生物抑制破骨细胞分化的活性多数 $IC_{50} < 1 \mu M$, 显著高于五环三萜类天然产物白桦脂酸 ($IC_{50} = 25 \mu M$)。尤其是化合物 CL-1, 其 $IC_{50} < 0.01 \mu M$, 其抑制效果在细胞水平上表现显著优于现有临床一线药物阿伦磷酸钠。

[0064] 综上所述,本发明白桦脂酸-氨基酸衍生物可作为破骨细胞分化抑制剂,具良好生物活性,全部的化合物 CL-1、CL-2、CL-3、CL-4 和 CL-5 对破骨细胞的抑制率都达到纳摩尔级,特别是化合物 CL-1, 在细胞水平上表现显著优于现有临床的一线药物阿伦磷酸钠,可作为潜在治疗骨质疏松症的候选药物,用于预防、延缓或治疗由破骨细胞介导的骨质疏松症,风湿性关节炎,类风湿性关节炎,并在牙周炎及癌症骨转移造成的骨破坏等相关疾病药物中具有重要用途。

[0065] 上述实施例只是为了说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让本领域内的普通技术人员能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡是根据本发明内容的实质所作出的等效的变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围内。