



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102271517 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 08

(21) 申请号 200980153378. 2

A61K 31/685(2006. 01)

(22) 申请日 2009. 11. 05

A61P 9/10(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/193220 2008. 11. 06 US

(56) 对比文件

CN 101039680 A, 2007. 09. 19, 说明书第
10-11 页、第 34 页、第 36 页.

(85) PCT 国际申请进入国家阶段日

2011. 06. 30

CN 1526605 A, 2004. 09. 15, 权利要求 3, 说
明书第 12-14 页.

(86) PCT 国际申请的申请数据

PCT/IL2009/001049 2009. 11. 05

US 2007112211 A1, 2007. 05. 17, 权利要求
25-26、38、43, 说明书第 9、19-28 页.

(87) PCT 国际申请的公布数据

W02010/052718 EN 2010. 05. 14

审查员 汤怀武

(73) 专利权人 脉管生物生长有限公司

地址 以色列耶胡达

(72) 发明人 E. 科瓦莱夫斯基 - 伊沙伊

Z. 齐纽克 G. 哈尔佩林 I. 门德尔

E. 费伊格 N. 亚科夫

E. 布雷特巴特

(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 11038

代理人 韩威威

(51) Int. Cl.

C07C 43/10(2006. 01)

C07F 9/10(2006. 01)

权利要求书5页 说明书109页 附图42页

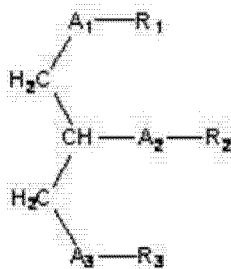
(54) 发明名称

氧化的脂质化合物和其用途

(57) 摘要

本文提供了新的氧化的脂质以及制备其的方法、其在治疗或预防与内源性氧化的脂质相关的炎症和相关病症中的用途。

1. 具有下式的化合物：



或其立体异构体或立体异构混合物、或其可药用盐，其中：

(i) A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地选自 O 和 S；

(ii) R_1 选自十二烷基，十八烷基，辛基，二十烷基，顺式-9-十六碳烯基，(2-辛基)十二烷基和(15-羧基)十五烷基；

(iii) R_2 是



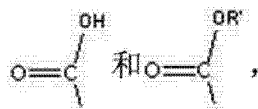
条件是，如果 R_1 不是(15-羧基)十五烷基，

其中

X 是 C_{1-25} 链，

Y 选自：-OH，-H 和 C_{1-4} 烷基；和

Z 选自：



而 R' 是 C_{1-4} 烷基；和

(iv) R_3 选自 H，酰基，磷酸基，胆碱磷酸，磷酸乙醇胺，磷酸乙醇胺-N-戊二酸，磷酸丝氨酸和磷酸肌醇。

2. 权利要求 1 的化合物，或其立体异构体或立体异构混合物，其中所述化合物选自：

1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸；

1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸；

1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺；

1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸；

1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺；

1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸；

1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸；

1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺；

1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸；

1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺；

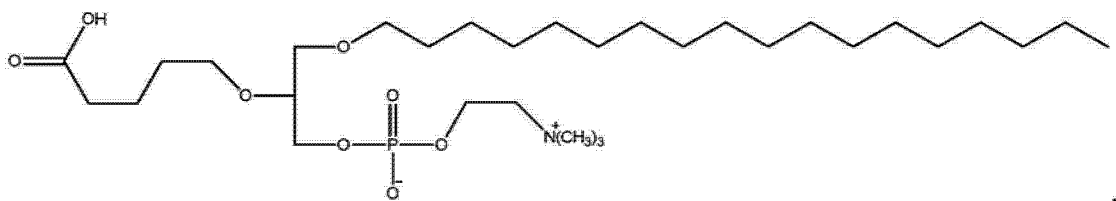
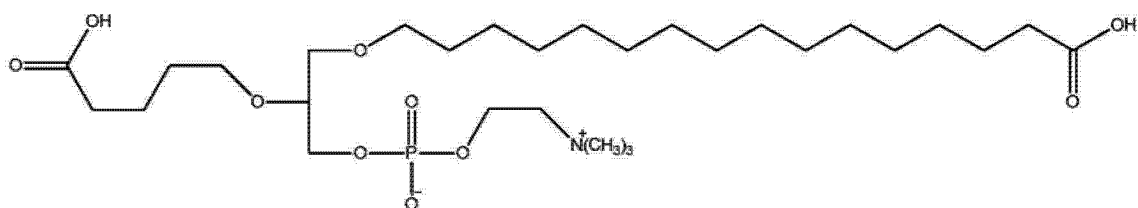
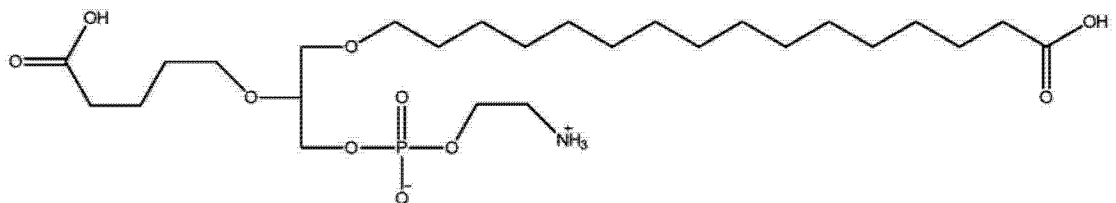
1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸；和

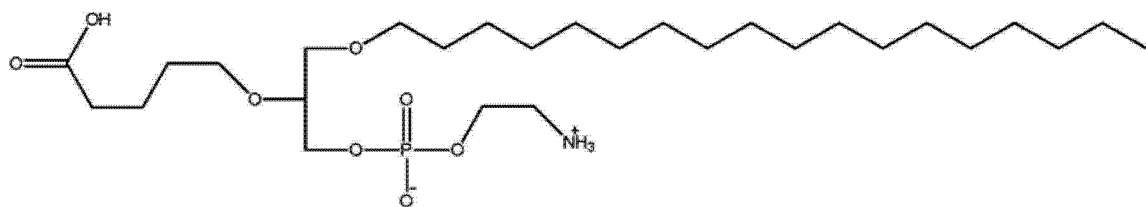
1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

3. 权利要求 2 的化合物,或其立体异构体或立体异构混合物,其中所述化合物是 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸。

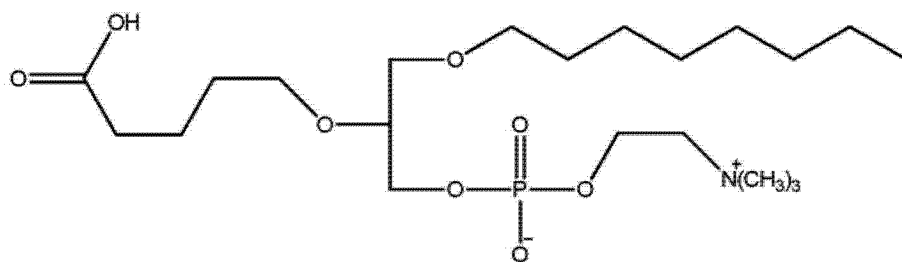
4. 权利要求 2 的化合物,或其立体异构体或立体异构混合物,其中所述化合物是 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸。

5. 权利要求 2 的化合物,其选自:

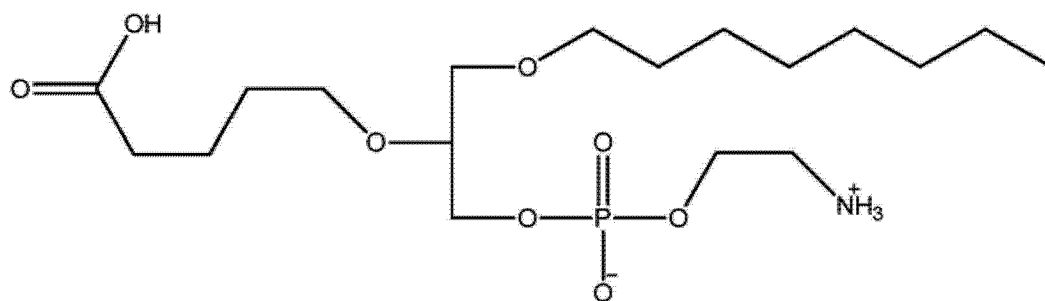




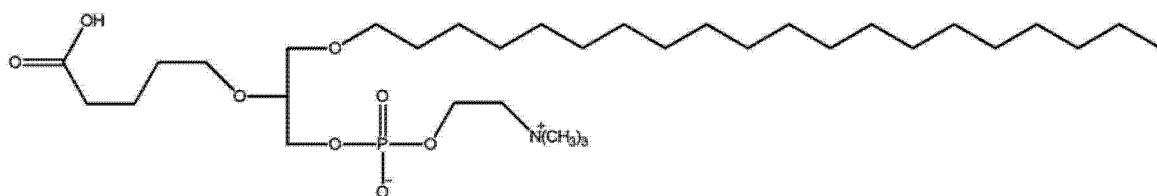
2



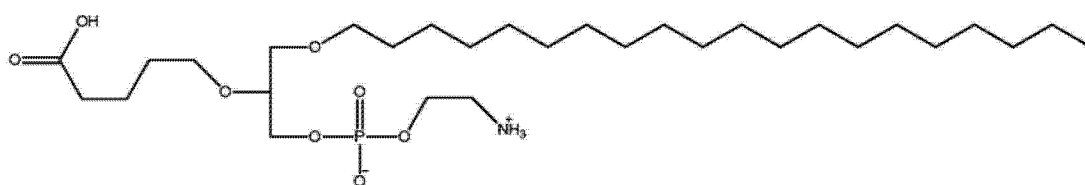
3



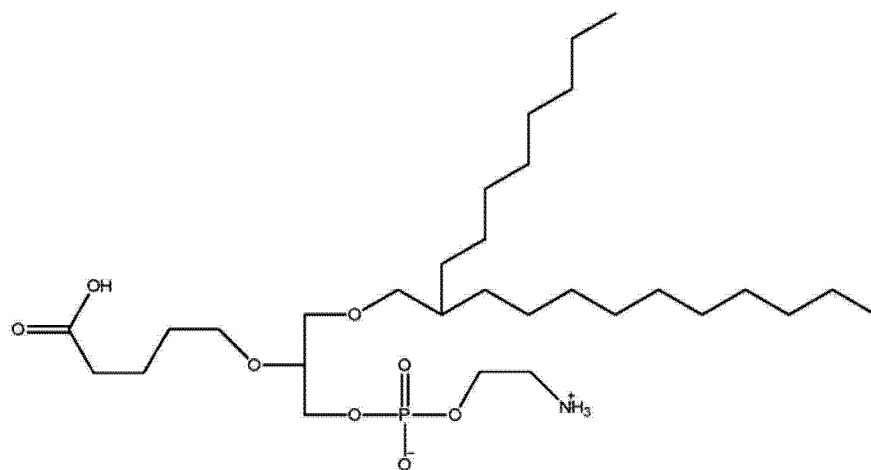
4



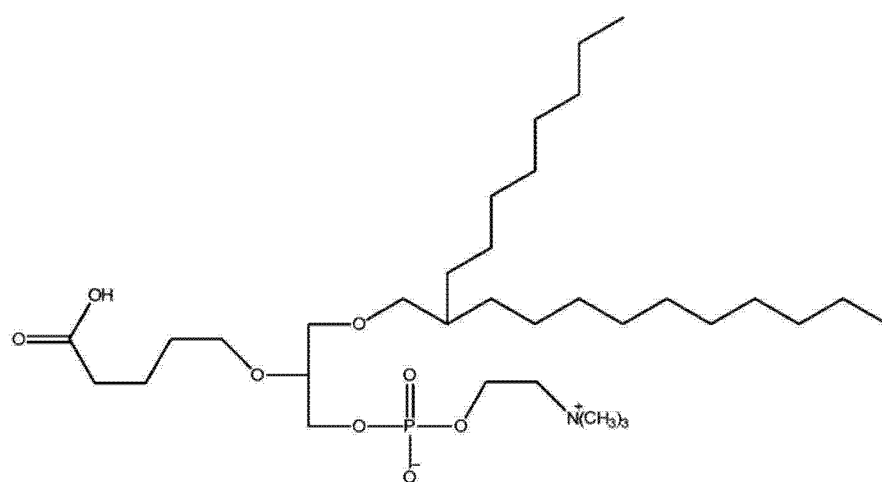
5



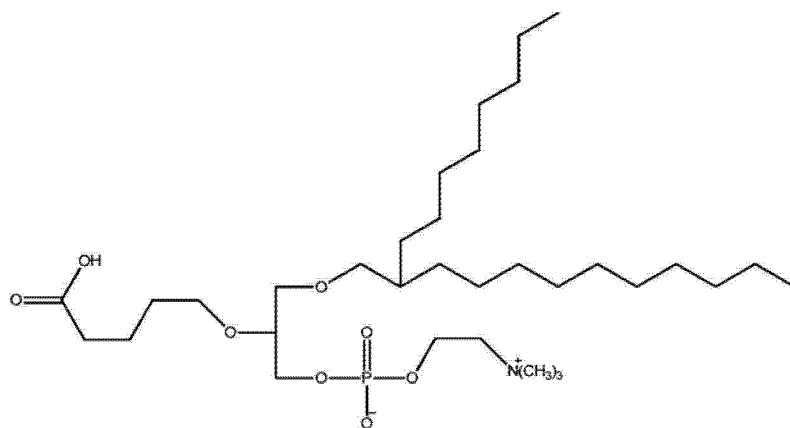
6



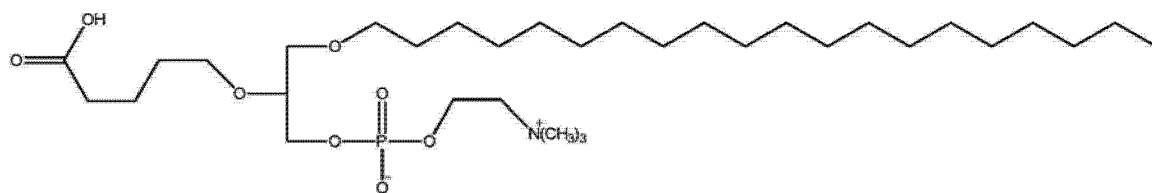
, 和



6. 权利要求 2 的化合物,其具有下式:



7. 权利要求 2 的化合物,其具有下式:



8. 一种药物组合物,其包含作为活性组分的权利要求 1-7 的任一项的化合物和可药用

载体。

9. 权利要求 8 的药物组合物,其用于治疗或预防炎症相关疾病或病症。

10. 权利要求 8 的药物组合物,其用于治疗疾病或病症,在这种疾病或病症中,降低细胞因子的水平是有利的,其中细胞因子选自白细胞间介素 -12 和白细胞间介素 -23。

11. 权利要求 1-7 的任一项的化合物在制备药物中的用途,该药物用于治疗或预防炎症相关疾病或病症。

12. 权利要求 1-7 的任一项的化合物在制备药物中的用途,该药物用于治疗疾病或病症,在这种疾病或病症中,降低细胞因子的水平是有利的,其中细胞因子选自白细胞间介素 -12 和白细胞间介素 -23。

13. 权利要求 9 的组合物,其中所述炎症相关疾病或病症选自:特发性的炎性疾病或病症,慢性炎性疾病或病症,急性炎性疾病或病症,自身免疫性疾病或病症,感染性疾病或病症,炎症性恶性疾病或病症,炎症性移植相关的疾病或病症,炎症性变性疾病或病症,与超敏反应相关的疾病或病症,炎症性的心血管疾病或病症,炎症性的脑血管疾病或病症,周围性血管疾病或病症,炎症性的腺疾病或病症,炎症性的胃肠疾病或病症,炎症性的皮肤疾病或病症,炎症性的肝疾病或病症,炎症性的神经学疾病或病症,炎症性的肌-骨骼疾病或病症,炎症性的肾疾病或病症,炎症性的生殖疾病或病症,炎症性的系统疾病或病症,炎症性的结缔组织疾病或病症,炎症性的肿瘤,坏疽,炎症性的植入物相关的疾病或病症,炎症性的老化过程,免疫缺乏疾病或病症和炎症性的肺疾病或病症。

14. 权利要求 11 的用途,其中所述炎症与选自下列的疾病或病症有关:特发性的炎性疾病或病症,慢性炎性疾病或病症,急性炎性疾病或病症,自身免疫性疾病或病症,感染性疾病或病症,炎症性恶性疾病或病症,炎症性移植相关的疾病或病症,炎症性变性疾病或病症,与超敏反应相关的疾病或病症,炎症性的心血管疾病或病症,炎症性的脑血管疾病或病症,周围性血管疾病或病症,炎症性的腺疾病或病症,炎症性的胃肠疾病或病症,炎症性的皮肤疾病或病症,炎症性的肝疾病或病症,炎症性的神经学疾病或病症,炎症性的肌-骨骼疾病或病症,炎症性的肾疾病或病症,炎症性的生殖疾病或病症,炎症性的系统疾病或病症,炎症性的结缔组织疾病或病症,炎症性的肿瘤,坏疽,炎症性的植入物相关的疾病或病症,炎症性的老化过程,免疫缺乏疾病或病症和炎症性的肺疾病或病症。

氧化的脂质化合物和其用途

[0001] 本发明的领域和背景

[0002] 本发明在其一些实施方案中涉及新的氧化的脂质和使用氧化的脂质来治疗或预防与内源性氧化的脂质相关的炎症的方法。本实施方案的方法可以用于治疗或预防炎症相关的疾病和病症,例如,动脉粥样硬化和相关病症,自身免疫疾病或病症,和增殖性疾病或病症。

[0003] 过去已经描述了氧化磷脂可以用于治疗医学病症,例如,心血管疾病、脑血管疾病和炎症性疾病和病症。

[0004] 本受让人的国际专利申请 PCT/IL2004/000453(公开号 WO 04/106486) 描述了氧化的脂质用于预防和治疗与内源性氧化的脂质相关的炎症。描述了示范性的这种化合物,并且被称为 CI-201(本领域还指的是 VB-201)。

[0005] 本受让人的国际专利申请 PCT/IL01/01080(公开号 WO 02/41827) 描述了氧化的脂质用于预防和治疗动脉粥样硬化和相关疾病。

[0006] 本受让人的国际专利申请 PCT/IL05/000735(公开号 WO 06/006161) 描述了适合于工业制备治疗有利的氧化磷脂的合成路线(不使用柱色谱)。

[0007] 其它的背景技术包括国际专利申请 PCT/IL02/00005(公开号 WO 02/053092) 和 PCT/IL08/000013(公开号 WO 08/084472),两者也都属于本受让人。

[0008] 本文结合上述所有引用的公开作为参考(如同完全列出一样)。

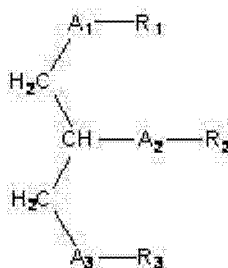
[0009] 上述所有列举的公开描述了醚化的氧化的脂质,其包括碳主链,该碳主链与烷基链、被氧化部分取代的烷基链和包含磷酸酯基的基团(phosphate-containing group)相连接。优选,被氧化部分取代的烷基链通过醚键与碳主链连接(由此化合物被称为“醚化的氧化的脂质”),这种键赋予化合物所需要的药理学性能(上述公开进行了详细描述)。

[0010] 本发明概述

[0011] 本发明人现在已经设计和成功地制备并且试验了新的氧化磷脂。

[0012] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供了具有下式的化合物:

[0013]



[0014] 或其可药用盐,其中:

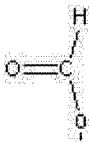
[0015] (i) A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地选自 O 和 S;

[0016] (ii) R_1 选自长度为 2-28 个碳的烷基链,和

[0017]

[0018] 其中 X 是 C₁₋₂₅ 链, Y 选自 :

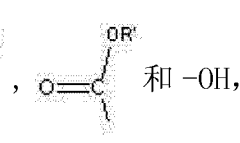
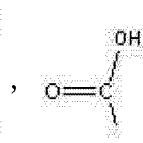
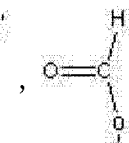
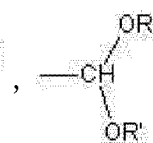
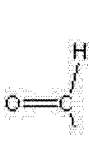
[0019]



, -OH, -H, 烷基, 烷氧基, 卤素, 乙酰氧基和芳香官能团 ; 和

[0020] Z 选自 :

[0021]

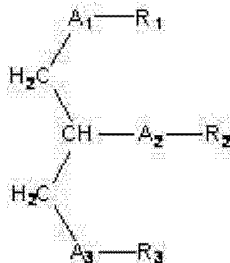


和 -OH,

[0022] 而 R' 是 C₁₋₄ 烷基 ; 和[0023] (iii) R₂ 选自 (4- 甲基羧基) 丁基, (3- 羧基) 丙基, (6- 羧基) 己基, (2- 羧基) 乙基, 5, 6- 二羟基己基, 5, 5- 二乙氧基戊基和 5, 5- 二甲氧基戊基 ; 和[0024] (iv) R₃ 选自 H, 酰基, 烷基, 磷酸基 (phosphate), 胆碱磷酸 (phosphocholine), 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇胺 -N- 戊二酸, 磷酸丝氨酸和磷酸肌醇。

[0025] 按照本发明一些实施方案的一个方面, 提供了具有下式的化合物 :

[0026]

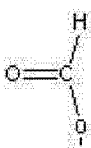


[0027] 或其可药用盐, 其中 :

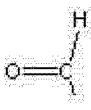
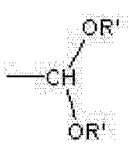
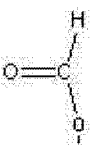
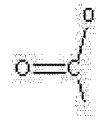
[0028] (i) A₁、A₂ 和 A₃ 各自独立地选自 O 和 S ;[0029] (ii) R₁ 和 R₂ 各自独立地选自长度为 2-28 个碳的烷基链, 和

[0030]

[0031] 条件是, R₁ 和 R₂ 中的至少一个是[0032] 其中 X 是 C₁₋₂₅ 链, Y 选自 :

[0033]  , -OH, -H, 烷基, 烷氧基, 卤素, 乙酰氧基和芳香官能团 ;和

[0034] Z 选自 :

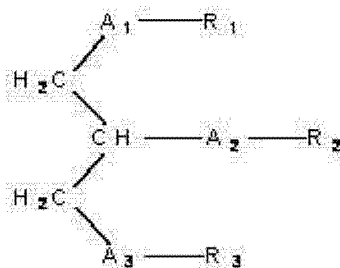
[0035]  ,  ,  ,  ,  和 -OH,

[0036] 而 R' 是 C₁₋₄ 烷基 ;和

[0037] (iii) R₃ 选自 H, 磷酸基 (phosphate), 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇胺 -N- 戊二酸和磷酸丝氨酸。

[0038] 按照本发明一些实施方案的一个方面, 提供了具有下式的化合物 :

[0039]



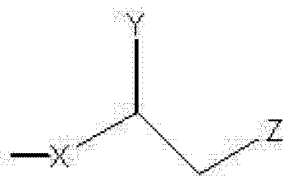
[0040] 或其可药用盐, 其中 :

[0041] (i) A₁、A₂ 和 A₃ 各自独立地选自 O 和 S ;

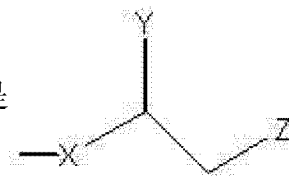
[0042] (ii) R₁ 选自十二烷基, 十八烷基, 辛基, 二十烷基, 顺式 -9- 十六碳烯基, (2- 辛基) 十二烷基和 (15- 羧基) 十五烷基 ;

[0043] (iii) R₂ 选自长度为 2-28 个碳的烷基链, 和

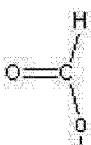
[0044]



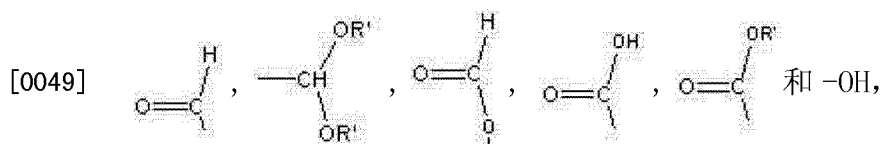
[0045] 条件是, 如果 R₁ 不是 (15- 羧基) 十五烷基, 则 R₂ 是



[0046] 其中 X 是 C₁₋₂₅ 链, Y 选自 :

[0047]  , -OH, -H, 烷基, 烷氧基, 卤素, 乙酰氧基和芳香官能团 ;和

[0048] Z 选自 :

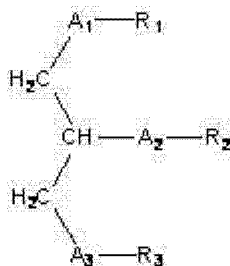


[0050] 而 R' 是 C_{1-4} 烷基 ; 和

[0051] (iv) R_3 选自 H, 酰基, 烷基, 磷酸基 (phosphate), 胆碱磷酸, 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇胺 -N- 戊二酸, 磷酸丝氨酸和磷酸肌醇。

[0052] 按照本发明一些实施方案的一个方面, 提供了具有下式的化合物 :

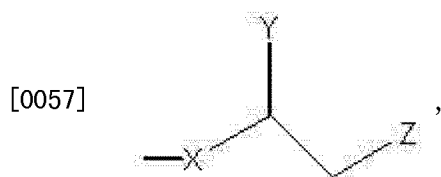
[0053]



[0054] 或其可药用盐, 其中 :

[0055] (i) A_1 是 S, A_2 和 A_3 各自是 O ;

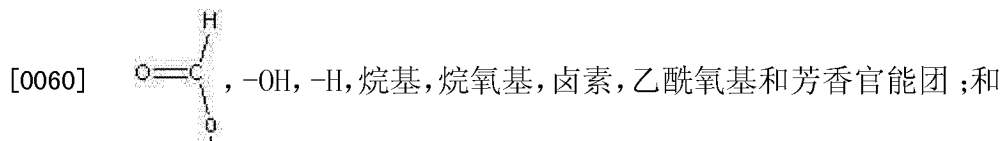
[0056] (ii) R_1 和 R_2 各自独立地选自长度为 2-28 个碳的烷基链, 和



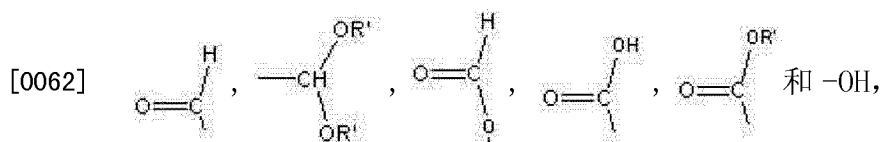
[0058] 条件是, R_1 和 R_2 中的至少一个是



[0059] 其中 X 是 C_{1-25} 链, Y 选自 :



[0061] Z 选自 :



[0063] 而 R' 是 C_{1-4} 烷基 ; 和

[0064] (iii) R_3 选自 H, 酰基, 烷基, 磷酸基 (phosphate), 胆碱磷酸, 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇胺 -N- 戊二酸, 磷酸丝氨酸和磷酸肌醇。

[0065] 按照本发明一些实施方案的一个方面, 提供了选自下列的化合物 :

[0066] 1- 十六烷基 -2-(4- 羧基) 丁基 - 甘油基 -3- 磷酸酯 (CI-201-PA) ;

- [0067] 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺；
- [0068] 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-208)；
- [0069] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-202)；
- [0070] 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-206)；
- [0071] 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-205)；
- [0072] 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-203)；
- [0073] 1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-209)；
- [0074] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸(CI-210)；
- [0075] 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-213)；
- [0076] 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-214)；
- [0077] 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-215)；
- [0078] 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-216)；
- [0079] 1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-217)；
- [0080] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(1-S-CI-201)；
- [0081] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(1-S-CI-202)；
- [0082] 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸(二-OH)；
- [0083] 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸；
- [0084] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油；
- [0085] 1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸(diEtAc)；
- [0086] 1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸(diMeAc)；
- [0087] 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-207)；
- [0088] 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺；
- [0089] 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-219)；
- [0090] 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-220)；
- [0091] 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(VB-221)；
- [0092] 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(VB-222)；和
- [0093] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸丝氨酸(VB-223)。
- [0094] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供了药物组合物,其包含作为活性组分的本文化合物和可药用载体。
- [0095] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供了治疗或预防与内源性氧化的脂质相关的炎症的方法,该方法包括:给予需要其的患者治疗有效量的本文所描述的化合物,由此在患者中治疗或预防与内源性氧化的脂质相关的炎症。
- [0096] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供了降低患者的细胞因子水平的方法,其中细胞因子选自白细胞介素-12和白细胞介素-23,该方法包括:给予患者有效量的本文所描述的化合物。
- [0097] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供了治疗疾病或病症的方法,在这种疾病或病症中,降低选自白细胞介素-12和白细胞介素-23的细胞因子的水平是有利的,该方法包括:给予需要其的患者有效量的本文所描述的化合物。
- [0098] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供了本文所描述化合物在制备药物中的

用途,该药物用于治疗或预防与内源性氧化的脂质相关的炎症。

[0099] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供了本文所描述化合物在制备药物中的用途,该药物用于降低患者的选自白细胞间介素-12和白细胞间介素-23的细胞因子的水平。

[0100] 按照本发明一些实施方案的一个方面,提供了本文所描述化合物在制备药物中的用途,该药物用于治疗疾病或病症,在这种疾病或病症中,降低选自白细胞间介素-12和白细胞间介素-23的细胞因子的水平是有利的。

[0101] 按照本发明的一些实施方案, R_1 是长度为2-28个碳的烷基链。

[0102] 按照本发明的一些实施方案,鉴定本文所描述的化合物,用于治疗或预防与内源性氧化的脂质相关的炎症的方法。

[0103] 按照本发明的一些实施方案,鉴定本文所描述的化合物,用于降低选自白细胞间介素-12和白细胞间介素-23的细胞因子的水平的方法。

[0104] 按照本发明的一些实施方案,确定本文所描述的化合物,用于治疗疾病或病症的方法,在这种疾病或病症中,降低选自白细胞间介素-12和白细胞间介素-23的细胞因子的水平是有利的。

[0105] 按照本发明的一些实施方案,将药物组合物包装在包装材料中,并以印刷的形式在包装材料中或在包装材料上做出标记,用于治疗或预防与内源性的氧化的脂质相关的炎症。

[0106] 按照本发明的一些实施方案,将药物组合物包装在包装材料中,并以印刷的形式在包装材料中或在包装材料上做出标记,用于降低选自白细胞间介素-12和白细胞间介素-23的细胞因子的水平。

[0107] 按照本发明的一些实施方案,将药物组合物包装在包装材料中,并以印刷的形式在包装材料中或在包装材料上做出标记,用于治疗疾病或病症,在这种疾病或病症中,降低选自白细胞间介素-12和白细胞间介素-23的细胞因子的水平是有利的。

[0108] 按照本发明的一些实施方案,炎症与选自下列的疾病或病症有关:特发性的炎性疾病或病症,慢性炎性疾病或病症,急性炎性疾病或病症,自身免疫性疾病或病症,感染性疾病或病症,炎症性的恶性疾病或病症,炎症性的移植相关的疾病或病症,炎症性的变性疾病或病症,与超敏反应相关的疾病或病症,炎症性的心血管疾病或病症,炎症性的脑血管疾病或病症,周围性血管疾病或病症,炎症性的腺疾病或病症,炎症性的胃肠疾病或病症,炎症性的皮肤疾病或病症,炎症性的肝病或病症,炎症性的神经系统疾病或病症,炎症性的肌骨骼疾病或病症,炎症性的肾病或病症,炎症性的生殖疾病或病症,炎症性的系统疾病或病症,炎症性结缔组织疾病或病症,炎症性的肿瘤,坏疽,炎症性的植入物相关的疾病或病症,炎症性的老化过程,免疫缺陷疾病或病症和炎症性的肺疾病或病症。

[0109] 除非另外定义,否则,本文使用的所有技术和/或科学词语具有与本发明所涉及领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。虽然可以在本发明实施方案的实践或试验中使用与本文所描述的那些相似或等效的方法和物质,但示范性的方法和/或物质描述如下。在出现矛盾的情况下,以本专利说明书(包括定义)为准。另外,这些物质、方法和实施例只是说明性的,并不一定是限制性的。

[0110] 附图的简要说明

[0111] 本文中通过参考附图仅举例描述了本发明的一些实施方案。现通过详细地具体参考附图,强调了显示的具体特例是通过实施例的方式,且目的在于说明性地讨论本发明实施方案。在这方面,通过结合附图进行说明使得本领域技术人员可以清楚地知道如何可以实施本发明的实施方案。

[0112] 在附图中:

[0113] 图 1 是表示在用各种剂量 CI-202 处理的细胞中生成的 IL12/23 p40 的曲线(每个条代表 3 个样品);与对照物(0 μ g/ml)相比较,每个剂量的 $P < 0.004$;

[0114] 图 2 是表示在用 CI-201、CI-202 和磷脂酰胆碱(PC)处理后 2、3 和 4 小时后的细胞中 IL12/23 p40 mRNA 表达的曲线;

[0115] 图 3 提供了 Western 印迹的照像,显示了在用 10 或 20 μ g/ml (18.5 或 37 μ M) CI-202、10 或 20 μ g/ml (17 或 34 μ M) CI-201、磷脂酰胆碱(PC)和 PBS/1% 乙醇(sol)处理的样品中的磷酸酪氨酸(p-酪氨酸);ERK1/2 表示为蛋白加载的对照物;

[0116] 图 4A 和 4B 各自是表示测试各种剂量 CI-202 毒性的独立实验结果的曲线;

[0117] 图 5 是表示 MOG 引起的实验性自身免疫脑脊髓炎的发展曲线(在用 PBS 或 4 mg/kg CI-202 处理的小鼠中);

[0118] 图 6 是表示胶原引起的关节炎的发展的曲线(在用 CI-202(CI-201 的乙醇胺类似物)处理的小鼠中和在对照小鼠中);

[0119] 图 7 是表示在用各种剂量 CI-203 处理的细胞中 IL12/23 p40 的生成的曲线(每个条代表 6 个样品)和 P 值(与对照物(0 μ g/ml)相比较);

[0120] 图 8 展现了 Western 印迹的照像,显示了在用 1 或 20 μ g/ml (1.6 或 33 μ M) (R)-CI-203(R-CI-203)和外消旋 CI-203(rac-CI-203)、1 或 20 μ g/ml (1.7 或 34 μ M) (R)-CI-201(R-CI-201)和(S)-CI-201(S-CI-201)和 1 或 20 μ g/ml (1.3 或 26 μ M) 磷脂酰胆碱(Ph. Ch.)处理的样品中的磷酸酪氨酸(p-酪氨酸);ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0121] 图 9A 和 9B 各自是表示测试各种剂量 CI-203 毒性的独立实验结果的曲线;

[0122] 图 10 是表示在用各种剂量 CI-209 处理的细胞中 IL12/23 p40 生成的曲线(每个条代表 5 个样品)和 P 值(10 和 20 μ g/ml 的剂量的 $P < 0.008$, 1、2.5 和 5 μ g/ml 的剂量的 $P < 0.016$)(与对照物(0 μ g/ml)比较);

[0123] 图 11 展现了 Western 印迹的照像,显示了在用 20 μ g/ml (38 μ M) CI-209、CI-201 或磷脂酰胆碱(PC)或用 PBS/1% 乙醇(sol)处理的样品中的磷酸酪氨酸(p-酪氨酸);ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0124] 图 12A 和 12B 各自是表示测试各种剂量 CI-209 毒性的独立实验结果的曲线;

[0125] 图 13 是表示在用各种剂量 CI-210 处理的细胞中 IL12/23 p40 生成的曲线(每个条代表 4 个样品)和 P 值(10 和 20 μ g/ml 的剂量的 $P < 0.029$, 2.5 和 5 μ g/ml 的剂量的 $P < 0.057$)(与对照物(0 μ g/ml)比较);

[0126] 图 14 展现了 Western 印迹的照像,显示了在用 20 μ g/ml (38 μ M) CI-210、CI-201 或磷脂酰胆碱(PC)或用 PBS/1% 乙醇(sol)处理的样品中的磷酸酪氨酸(p-酪氨酸);ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0127] 图 15A 和 15B 各自是表示测试各种剂量 CI-210 毒性的独立实验结果的曲线;

[0128] 图 16 是表示在用各种剂量 CI-216 处理的细胞中 IL12/23 p40 生成的曲线(每个

条代表 4 个样品) 和 P 值(与对照物(0 μ g/ml) 相比较);

[0129] 图 17 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 10 或 20 μ g/ml (17 或 34 μ M) CI-215 或用磷脂酰胆碱 (PC) 或用 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0130] 图 18 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 10 或 20 μ g/ml (15 或 30 μ M) CI-216、10 或 20 μ g/ml (17 或 34 μ M) CI-201、磷脂酰胆碱 (PC) 或 PBS/1% 乙醇 (sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0131] 图 19 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 20 μ g/ml (38 μ M) CI-206 或磷脂酰胆碱 (PC) 或用 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0132] 图 20 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 20 μ g/ml (35 μ M) CI-205、CI-201 或磷脂酰胆碱 (PC) 或用 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0133] 图 21A 和 21B 各自是表示测试各种剂量 CI-206 毒性的独立实验结果的曲线;

[0134] 图 22A 和 22B 各自是表示测试各种剂量 CI-205 毒性的独立实验结果的曲线;

[0135] 图 23 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 20 μ g/ml (34 μ M) CI-208、CI-201 或磷脂酰胆碱 (PC) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); α -微管蛋白 (α -Tub) 表示蛋白加载的对照物;

[0136] 图 24A 和 24B 各自是表示测试各种剂量 CI-208 毒性的独立实验结果的曲线;

[0137] 图 25A 和 25B 各自是表示测试各种剂量 CI-213 毒性的独立实验结果的曲线;

[0138] 图 26A 和 26B 各自是表示测试各种剂量 CI-214 毒性的独立实验结果的曲线;

[0139] 图 27 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 10 或 20 μ g/ml (18 或 36 μ M) CI-217、10 或 20 μ g/ml (17 或 34 μ M) CI-201、磷脂酰胆碱 (PC) 和 PBS/1% 乙醇 (sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0140] 图 28 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 10 或 20 μ g/ml (31 μ M) CI-219 和 20 μ g/ml (34 μ M) CI-201 或磷脂酰胆碱 (PC) 或用 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0141] 图 29 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 10 或 20 μ g/ml (34 μ M) CI-220 和 20 μ g/ml (34 μ M) CI-201 或磷脂酰胆碱 (PC) 或用 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0142] 图 30A 和 30B 各自是表示测试各种剂量 CI-201-PA 毒性的独立实验结果的曲线;

[0143] 图 31 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 10 或 20 μ g/ml (17 或 34 μ M) 1-S-CI-201 (CI-S-201)、10 或 20 μ g/ml (17 或 34 μ M) CI-201、磷脂酰胆碱 (PC) 和 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

[0144] 图 32 展现了 Western 印迹的照像, 显示了在用 10 或 20 μ g/ml (18 或 36 μ M) 1-S-CI-202 (CI-S-202)、10 或 20 μ g/ml (18.5 或 37 μ M) CI-202、10 或 20 μ g/ml (17 或 34 μ M) CI-201、磷脂酰胆碱 (PC) 和 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p- 酪氨酸); ERK1/2 表示蛋白加载的对照物;

- [0145] 图 33A 和 33B 各自是表示测试各种剂量 di-OH 毒性的独立实验结果的曲线；
- [0146] 图 34 是表示动脉粥样硬化病变面积的曲线（在用 di-OH 处理的小鼠中和对照小鼠中）；
- [0147] 图 35 是表示动脉粥样硬化病变面积的曲线（在用 diMeAc 处理的小鼠中和对照小鼠中）；
- [0148] 图 36A 和 36B 各自是表示测试各种剂量 diEtAc 毒性的独立实验结果的曲线；
- [0149] 图 37 展现了 Western 印迹的照像，显示了在用 1、5、10 或 20 μ g/ml (1.7、8.3、16.7 或 33.3 μ M) VB-223 或 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p-酪氨酸)；ERK1/2 表示蛋白加载的对照物；
- [0150] 图 38 展现了 Western 印迹的照像，显示了在用 1、5、10 或 20 μ g/ml (1.6、8、16 或 32 μ M) VB-221 或 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p-酪氨酸)；ERK1/2 表示蛋白加载的对照物；和
- [0151] 图 39 展现了 Western 印迹的照像，显示了在用 1、5、10 或 20 μ g/ml (1.7、8.4、16.8 或 33.6 μ M) VB-222 或 PBS/1% 乙醇 (Sol) 处理的样品中的磷酸酪氨酸 (p-酪氨酸)；ERK1/2 表示蛋白加载的对照物；
- [0152] 本发明具体实施方案的说明
- [0153] 本发明在其一些实施方案中涉及新的氧化的脂质和涉及使用氧化的脂质来治疗或预防与内源性氧化的脂质相关的炎症的方法。本文所描述的氧化的脂质可以用于治疗或预防炎症相关的疾病和病症，例如，动脉粥样硬化和相关病症，自身免疫疾病或病症，和增殖疾病或病症。
- [0154] 参考附图和附有的说明书，可以更好地理解本发明的原理与操作。
- [0155] 在详细解释本发明的至少一个实施方案之前，应该理解，本发明在其应用中不受下面说明书所列出的或实施例所举例说明的细节所限制。本发明能够是其它实施方案或以多种方式实践或进行。此外，还应该理解，本文使用的短语和术语是为了说明的目的，并且不应该认为是限制性的。
- [0156] 实验和临床证据表明了氧化 LDL (ox LDL) 和 LDL 组分在动脉粥样硬化的过度炎症性响应的病原学中的成因作用。已经证明了细胞和体液两者对斑块相关的氧化 LDL 的免疫反应性，说明了在动脉粥样化形成过程中是重要的抗氧化 LDL 自身免疫组分。由此，LDL、氧化 LDL 和其组分是用于预防和治疗心脏病、脑血管病和周围性血管疾病的许多治疗的靶向。
- [0157] 本受让人的国际专利申请例如 PCT/IL2004/000453 (公开号 WO 04/106486) 和美国专利申请 11/528,657 (公开号 2007-0099868) 公开了氧化的磷脂在治疗炎症中的作用，将两个文献按照本文完全列出的那样结合到本文中作为参考。
- [0158] CI-201 (本文和本领域还指的是 VB-201) 是目前在治疗炎症病症（例如动脉粥样硬化）的高等临床试验中充满希望的氧化磷脂。
- [0159] 在提高与氧化的脂质相关的炎症和疾病和病症的治疗的尝试中，本发明人制备了新的氧化磷脂和结构上相关的化合物，设计它们显示出提高的抗炎效果 and / 或提高的药理学性能。
- [0160] 提高的抗炎效果可以容易地通过已知的炎性过程的体外和体内模型来测定，并

且可以显示出对所治疗疾病提高的治疗效果,如下文进一步所详述。提高的药理学性能包括:提高的生物稳定性、生物利用率、降低的毒性和进一步的在生产、配制和/或储存中的提高的稳定性。这些特征还可以通过本领域技术人员容易认识的实验来测定,并且在下文进一步详述。

[0161] 正如在随后的实施例部分中所说明的那样,尽管减少了本发明的实践,但实际上确定了本文所描述的新设计的氧化的脂质可以调节与对内源性氧化 LDL 的免疫和/或炎症性响应相关的细胞因子生成,由此显示出在炎症性疾病(例如但不限于:动脉粥样硬化和类风湿性关节炎)中降低炎症性响应的能力。

[0162] 正如在随后的实施例部分中所进一步说明的那样,本文所描述的新设计的氧化的脂质可以调节酪氨酸磷酸化作用,其与 CI-201 类似,由此表明这些新设计的氧化的脂质拥有先前由 CI-201 所显示出的生物学效果(例如,抗炎症效果)。

[0163] 正如在随后的实施例部分中所进一步说明的那样,本文所描述化合物显示出微小的毒性,并且在化合物基本上无毒的剂量下显示出生物学效果。

[0164] 图 1 和 2 显示了示范性化合物 CI-202 对前炎症性细胞因子白细胞间介素-12 和白细胞间介素-23 的 p40 亚型生成的抑制作用。图 3 显示了 CI-202 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。图 4A 和 4B 显示了 CI-202 的毒性特性。图 5 显示 CI-202 在小鼠自身免疫脑脊髓炎模型(人多发性硬化和急性播散性脑脊髓炎的实验模型)中的治疗有效性。图 6 显示了 CI-202 在小鼠关节炎模型中的治疗有效性。

[0165] 图 7 显示了示范性化合物 CI-203 对前炎症性细胞因子白细胞间介素-12 和白细胞间介素-23 的 p40 亚型生成的抑制作用。图 8 显示了 CI-203 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。图 9A 和 9B 显示了 CI-203 的毒性特性。

[0166] 图 10 显示了示范性化合物 CI-209 对前炎症性细胞因子白细胞间介素-12 和白细胞间介素-23 的 p40 亚型生成的抑制作用。图 11 显示了 CI-209 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用。图 12A 和 12B 显示了 CI-209 的毒性特性。

[0167] 图 13 显示了示范性化合物 CI-210 对前炎症性细胞因子白细胞间介素-12 和白细胞间介素-23 的 p40 亚型生成的抑制作用。图 14 显示了 CI-210 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用。图 15A 和 15B 显示了 CI-210 的毒性特性。

[0168] 图 16 显示了示范性化合物 CI-216 对前炎症性细胞因子白细胞间介素-12 和白细胞间介素-23 的 p40 亚型生成的抑制作用。图 18 显示了 CI-216 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。

[0169] 图 17 显示了 CI-215 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用。

[0170] 图 19 显示了示范性化合物 CI-206 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用。图 21A 和 21B 显示了 CI-206 的毒性特性。

[0171] 图 20 显示了示范性化合物 CI-205 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。图 22A 和 22B 显示了 CI-205 的毒性特性。

[0172] 图 23 显示了示范性化合物 CI-208 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。图 24A 和 24B 显示了 CI-208 的毒性特性。

[0173] 图 25A 和 25B 以及 26A 和 26B 分别显示了示范性化合物 CI-213 和 CI-214 的毒性特性。

[0174] 图 27 显示了示范性化合物 CI-217 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。

[0175] 图 28 显示了示范性化合物 CI-219 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。

[0176] 图 29 显示了示范性化合物 CI-220 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。

[0177] 图 30A 和 30B 显示了示范性化合物 CI-201-PA 的毒性特性。

[0178] 图 31 显示了示范性化合物 1-S-CI-201 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。

[0179] 图 32 显示了示范性化合物 1-S-CI-202 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用,其与 CI-201 所显示的调节相似。

[0180] 图 34 显示了示范性化合物 di-OH 在小鼠动脉粥样硬化模型中的治疗有效性。图 33A 和 33B 显示了 di-OH 的毒性特性。

[0181] 图 35 显示了示范性化合物 diMeAc 在小鼠动脉粥样硬化模型中的治疗有效性。图 36A 和 36B 显示了 diEtAc 的毒性特性,其是与 diMeAc 紧密相关的化合物。

[0182] 图 37-39 分别显示了示范性化合物 VB-223、VB-221 和 VB-222 对酪氨酸磷酸化作用的调节作用。

[0183] 由此,已经通过体外试验证明本文所描述的示范性化合物的生物学活性,并且已经确定一些化合物具有体内治疗有效性。还没有进行体内测试的氧化的脂质的性能可以在合适的动物模型中进一步测试,例如,在下文的实施例部分中、在国际专利申请 PCT/IL2004/000453(公开号 WO 04/106486)和美国专利申请 11/528,657(公开号 2007-0099868)中所描述的动物模型和例如 Singh 等人(Clinical Chemistry 51:12, 2252-2256(2005))所设计的模型,将该文献按照本文完全列出的那样结合到本文中作为参考。

[0184] 本文所描述的氧化的脂质的生物稳定性提高,这是由于存在醚和 / 或硫醚键来代替存在于大部分脂质中的酯键。生物稳定性典型地提高化合物的治疗有效性。可以测定氧化的脂质的生物稳定性,例如,通过使用 ELISA 或吸光度测量法,来试验它的由磷脂酶 -C 造成的酶催降解。

[0185] 因此,根据提高的治疗和 / 或药物动力学参数,可以有利地认识到本文所描述的氧化的脂质在治疗或预防与内源性氧化的脂质有关的炎症方面显示出提高的效果。

[0186] 由此,按照本发明实施方案的一个方面,提供了本文所描述的新的氧化的脂质(例如,氧化磷脂)。

[0187] 按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯(本文还称为“CI-201-PA”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-208”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(本文还称为“CI-202”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(本文还称为“CI-206”)。

按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-205”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-203”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-209”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸(本文还称为“CI-210”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-213”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(本文还称为“CI-214”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-215”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(本文还称为“CI-216”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-217”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“1-S-CI-201”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(本文还称为“1-S-CI-202”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“di-OH”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“diEtAc”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“diMeAc”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-207”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“CI-219”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(本文还称为“CI-220”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(本文还称为“VB-221”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(本文还称为“VB-222”)。按照一个示范性的实施方案,氧化的脂质是 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸丝氨酸(本文还称为“VB-223”)。

[0188] 本文使用的前缀“1-S-”是指其中在甘油主链 1 位(sn-1)的氧原子被硫原子取代的化合物,这样就可以使该化合物是 1-硫代甘油的衍生物(而不是甘油的衍生物)。

[0189] 本文使用的前缀“CI-”和“VB-”可互换使用。

[0190] 根据取代基,本文所描述的每个化合物中的一些碳原子可以是手性或非手性碳原子。由此,在上文所描述的示范性化合物中,甘油主链的 2 位的碳原子是手性碳原子。存在于本文所描述化合物中的任何手性碳原子可以是 R-构型、S-构型或外消旋体形式。由此,

本发明实施方案包括手性和外消旋碳原子的任何组合,包括所有可能的立体异构体、旋光异构体和对映体。

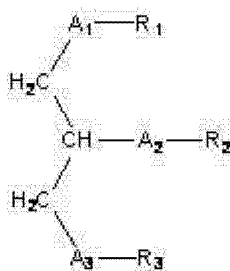
[0191] 正如在随后的实施例部分中所说明的那样,可以合成本发明实施方案的化合物,同时保持起始原料的构型。可以按照被氧化基团的立体化学进一步选择性地合成本发明实施方案的化合物。由此,通过选择合适的起始原料和合适的合成条件,可以测定光学纯度(例如,所包含的手性和/或外消旋碳)和所得到的所产生化合物的立体异构体。如果得到外消旋混合物,可用已知的技术分离光学或立体异构体。这种技术描述在例如“Organic chemistry, 第四版, Paula Yurkanis Bruice, 180-185 页和 214 页, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ 07458”中。

[0192] 可以按照上述化合物的某些新的结构单元来对其表征。

[0193] 由此,一些上面氧化的脂质包括甘油主链,该主链在其 2 位与被氧化侧链相连接,其中被氧化侧链选自(4-甲基羧基)丁基,(3-羧基)丙基,(6-羧基)己基,(2-羧基)乙基,5,6-二羟基己基,5,5-二乙氧基戊基和 5,5-二甲氧基戊基。

[0194] 由此,按照本发明的一些实施方案,提供了由下式共同代表的化合物:

[0195]



[0196] 或其可药用盐,其中:

[0197] (i) A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地选自 O 和 S;

[0198] (ii) R_1 选自长度为 2-28 个碳的烷基链,和

[0199]



[0200] 其中 X 是 C_{1-25} 链, Y 选自:

[0201] , -OH, -H, 烷基, 烷氧基, 卤素, 乙酰氧基和芳香官能团;和

[0202] Z 选自:

[0203] , , , 和 -OH,

[0204] 而 R' 是 C_{1-4} 烷基;和

[0205] (iii) R_2 选自(4-甲基羧基)丁基,(3-羧基)丙基,(6-羧基)己基,(2-羧基)

乙基, 5, 6-二羟基己基, 5, 5-二乙氧基戊基和 5, 5-二甲氧基戊基 ; 和

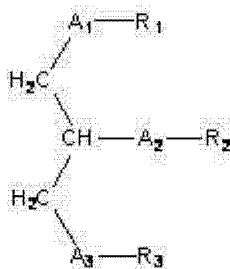
[0206] (iv) R_3 选自 H, 酰基, 烷基, 磷酸基(phosphate), 胆碱磷酸, 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇胺 -N- 戊二酸, 磷酸丝氨酸和磷酸肌醇。

[0207] 按照一些实施方案, R_1 是长度为 2-28 个碳的烷基链。

[0208] 上文所描述的一些被氧化的脂质的特征在于 : 它们在其 3 位包括选自下列的磷酸基部分 : 磷酸基(phosphate), 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇胺 -N- 戊二酸和磷酸丝氨酸, 或在 3 位是非磷酸化和非取代形式 (即, 有氢原子存在于 3 位)。

[0209] 由此, 按照本发明的一些实施方案, 提供了由下式共同代表的化合物 :

[0210]

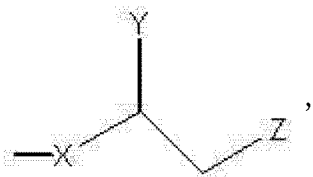


[0211] 或其可药用盐, 其中 :

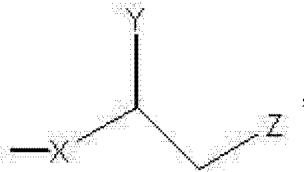
[0212] (i) A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地选自 O 和 S ;

[0213] (ii) R_1 和 R_2 各自独立地选自长度为 2-28 个碳的烷基链, 和

[0214]

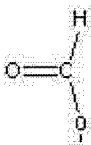


[0215] 条件是, R_1 和 R_2 中的至少一个是



[0216] 其中 X 是 C_{1-25} 链, Y 选自 :

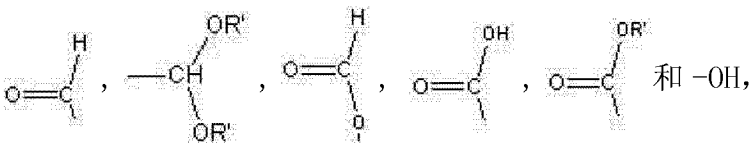
[0217]



, -OH, -H, 烷基, 烷氧基, 卤素, 乙酰氧基和芳香官能团 ; 和

[0218] Z 选自 :

[0219]



[0220] 而 R' 是 C_{1-4} 烷基 ; 和

[0221] (iii) R_3 选自 H, 磷酸基(phosphate), 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇胺 -N- 戊二酸和磷酸丝氨酸。

[0222] 按照一些实施方案, R_1 是长度为 2-28 个碳的烷基链。应该理解, 在这种实施方案

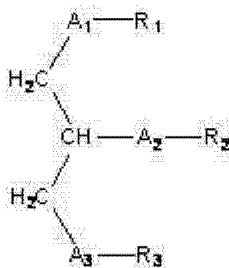
中, R_2 是



[0223] 上文所描述的一些氧化的脂质的特征在于:它们在其 1 位包括选自下列的侧链:十二烷基,十八烷基,辛基,二十烷基,顺式-9-十六碳烯基,(2-辛基)十二烷基和(15-羧基)十五烷基。

[0224] 由此,按照本发明的一些实施方案,提供了由下式共同代表的化合物:

[0225]



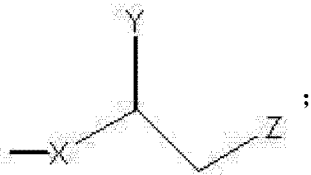
[0226] 或其可药用盐,其中:

[0227] (i) A_1 、 A_2 和 A_3 各自独立地选自 O 和 S;

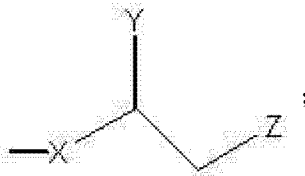
[0228] (ii) R_1 选自十二烷基,十八烷基,辛基,二十烷基,顺式-9-十六碳烯基,(2-辛基)十二烷基和(15-羧基)十五烷基;

[0229] (iii) R_2 选自长度为 2-28 个碳的烷基链,和

[0230]



[0231] 条件是,如果 R_1 不是(15-羧基)十五烷基,则 R_2 是



[0232] 其中 X 是 C_{1-25} 链, Y 选自:

[0233] , -OH, -H, 烷基, 烷氧基, 卤素, 乙酰氧基和芳香官能团;和

[0234] Z 选自:

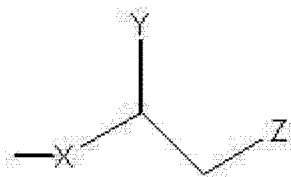
[0235] , , , , 和 -OH,

[0236] 而 R' 是 C_{1-4} 烷基;和

[0237] (iv) R_3 选自 H, 酰基, 烷基, 磷酸基(phosphate), 胆碱磷酸, 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇

胺-N-戊二酸,磷酸丝氨酸和磷酸肌醇。

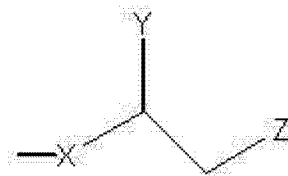
[0238] 可以理解,本文所描述的(15-羧基)十五烷基相当于本文所描述的



部分,其中 X 是 13 个碳的烷基链, Y 是氢, Z 是 $-C(=O)OH$ 。

[0239] 类似地,(4-甲基羧基)丁基、(3-羧基)丙基、(6-羧基)己基、(2-羧基)乙基、

5,6-二羟基己基、5,5-二乙氧基戊基和 5,5-二甲氧基戊基,相当于

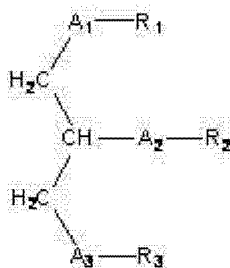


部分,其中 Z 是 $-C(=O)OH$ (对于(3-羧基)丙基、(6-羧基)己基和(2-羧基)乙基),其中 Z 是 $-CH(OR')_2$ (对于 5,5-二乙氧基戊基和 5,5-二甲氧基戊基),或其中 Z 是 $-OH$ (对于 5,6-二羟基己基)。

[0240] 上文所描述的一些氧化的脂质的特征在于;它们在其 1 位包括硫原子且在其 2 和 3 位包括氧原子。

[0241] 由此,按照本发明的一些实施方案,提供了由下式代表的化合物:

[0242]



[0243] 或其可药用盐,其中:

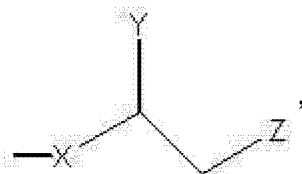
[0244] (i) A_1 是 S, A_2 和 A_3 各自是 O;

[0245] (ii) R_1 和 R_2 各自独立地选自长度为 2-28 个碳的烷基链,和

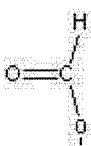
[0246]



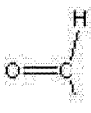
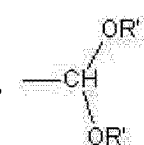
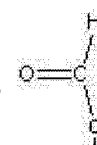
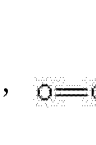
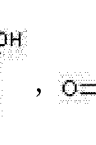
[0247] 条件是, R_1 和 R_2 中的至少一个是



[0248] 其中 X 是 C_{1-25} 链, Y 选自:

[0249]  , -OH, -H, 烷基, 烷氧基, 卤素, 乙酰氧基和芳香官能团 ;和

[0250] Z 选自 :

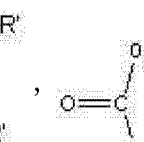
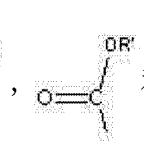
[0251]  ,  ,  ,  ,  和 -OH,

[0252] 而 R' 是 C₁₋₄ 烷基 ;和

[0253] (iii) R₃ 选自 H, 酰基, 烷基, 磷酸基(phosphate), 胆碱磷酸, 磷酸乙醇胺, 磷酸乙醇胺 -N- 戊二酸, 磷酸丝氨酸和磷酸肌醇。

[0254] 按照一些实施方案, R₁ 是长度为 2-28 个碳的烷基链。

[0255] 按照本发明的一些实施方案, 上文所描述的变量 Z 选自 :

[0256]  ,  ,  和 -OH。

[0257] 按照本发明的任选的实施方案, 变量 Y 选自 H 和 -OH。在一些实施方案中, 当 Z 是 -OH 和 / 或 -O-C(=O)H 时, Y 是 -OH。在一些实施方案中, 当 Z 是 -C(=O)H、-CH(OR')₂、-C(=O)OH 和 / 或 -C(=O)OR' 时, Y 是 H。

[0258] 按照示范性的实施方案, R' 是饱和的非取代的 C₁₋₄ 烷基。任选, R' 选自乙基和甲基。

[0259] 按照任选的实施方案, 本文所描述的长度为 2-28 个碳的烷基链是饱和的, 除非另外具体表明。任选, 烷基链是非取代的, 除非另外具体表明。

[0260] 按照任选的实施方案, 本文所描述的变量 X 是长度为 1 至 25 个碳原子的饱和烷基链, 除非另外具体表明。任选, 烷基链是非取代的, 除非另外具体表明。

[0261] 贯穿本文使用的术语“烷基”是指饱和或不饱和脂肪烃, 包括直链和支链基团。优选, 烷基具有 1 至 20 个碳原子。不论什么时候, 本文陈述的一个数值范围, 例如“1-20”, 其意思是该基团(在此处的情况下为烷基)可以包含 1 个碳原子、2 个碳原子、3 个碳原子, 等等, 至多并且包括 20 个碳原子。更优选, 烷基是具有 1 至 10 个碳原子的中等大小的烷基。除非另有陈述, 否则最优选, 烷基是具有 1 至 4 个碳原子的低级烷基。烷基可以是取代或非取代的烷基。当取代时, 取代基团可以是, 例如, 环烷基, 芳基, 杂芳基, 杂脂环, 卤素, 羟基, 烷氧基, 芳氧基, 巯基, 硫代烷氧基, 硫代芳氧基, 氰基, 硝基, 叠氮化物, 磺酰基, 亚磺酰基, 磺酰胺, 膦酰基, 氧膦基(phosphinyl), 氧代, 羰基, 硫代羰基, 脲, 硫脲, O-氨基甲酰基, N-氨基甲酰基, O-硫代氨基甲酰基, N-硫代氨基甲酰基, C-酰胺基, N-酰胺基, C-羧基, O-羧基和氨基, 这些术语如本文所定义。在一些实施方案中, 烷基是非取代的烷基。

[0262] “环烷基”是指所有的碳单环或稠环(即, 共享相邻碳原子对的环)基团, 其中多个环中的一个不具有完全共轭的 π 电子系统。环烷基的例子是(但不限于)环丙烷, 环丁烷, 环戊烷, 环戊烯, 环己烷, 环己二烯, 环庚烷, 环庚三烯和金刚烷。环烷基可以是取代或未取代的环烷基。当取代时, 取代基团可以是, 例如, 烷基, 芳基, 杂芳基, 杂脂环, 卤素, 羟基, 烷

氧基,芳氧基,巯基,硫代烷氧基,硫代芳氧基,氰基,硝基,叠氮化物,磺酰基,亚磺酰基,磺酰胺,膦酰基,氧膦基(phosphinyl),氧代,羰基,硫代羰基,脲,硫脲,0-氨基甲酰基,N-氨基甲酰基,0-硫代氨基甲酰基,N-硫代氨基甲酰基,C-酰胺基,N-酰胺基,C-羧基,0-羧基和氨基,这些术语如本文所定义。

[0263] “芳基”本文还称为“芳香官能团”,是指具有完全共轭的 π 电子系统的全碳单环或稠合的多环(即,共享相邻碳原子对的环)基团。芳基的例子是(但不限于)苯基、萘基和蒽基。芳基可以是取代或未取代的芳基。当取代时,取代基团可以是,例如,烷基,环烷基,芳基,杂芳基,杂脂环,卤素,羟基,烷氧基,芳氧基,巯基,硫代烷氧基,硫代芳氧基,氰基,硝基,叠氮化物,磺酰基,亚磺酰基,磺酰胺,膦酰基,氧膦基(phosphinyl),氧代,羰基,硫代羰基,脲,硫脲,0-氨基甲酰基,N-氨基甲酰基,0-硫代氨基甲酰基,N-硫代氨基甲酰基,C-酰胺基,N-酰胺基,C-羧基,0-羧基和氨基,这些术语如本文所定义。

[0264] “杂芳基”是指环中具有一个或多个原子(例如,氮、氧和硫原子)、另外具有完全共轭 π 电子系统的单环或稠环(即,共享相邻原子对的环)基团。杂芳基的例子(但不限于)包括吡咯,呋喃,噻吩,咪唑,噻唑,吡唑,吡啶,嘧啶,喹啉,异喹啉和嘌呤。杂芳基可以是取代或未取代的杂芳基。当取代时,取代基团可以是,例如,烷基,环烷基,芳基,杂芳基,杂脂环,卤素,羟基,烷氧基,芳氧基,巯基,硫代烷氧基,硫代芳氧基,氰基,硝基,叠氮化物,磺酰基,亚磺酰基,磺酰胺,膦酰基,氧膦基(phosphinyl),氧代,羰基,硫代羰基,脲,硫脲,0-氨基甲酰基,N-氨基甲酰基,0-硫代氨基甲酰基,N-硫代氨基甲酰基,C-酰胺基,N-酰胺基,C-羧基,0-羧基和氨基,这些术语如本文所定义。

[0265] “杂脂环”基团是指环中具有一个或多个原子(例如氮、氧和硫原子)的单环或稠环基团。环还可以具有一个或多个双键。然而,环不具有完全共轭的 π 电子系统。杂脂环可以是取代或未取代的杂脂环。当取代时,取代基团可以是,例如,孤对电子,烷基,环烷基,芳基,杂芳基,杂脂环,卤素,羟基,烷氧基,芳氧基,巯基,硫代烷氧基,硫代芳氧基,氰基,硝基,叠氮化物,磺酰基,亚磺酰基,磺酰胺,膦酰基,氧膦基(phosphinyl),氧代,羰基,硫代羰基,脲,硫脲,0-氨基甲酰基,N-氨基甲酰基,0-硫代氨基甲酰基,N-硫代氨基甲酰基,C-酰胺基,N-酰胺基,C-羧基,0-羧基,和氨基,这些术语如本文所定义。代表性的例子是哌啶,哌嗪,四氢呋喃,四氢吡喃,吗啉等等。

[0266] “羟基”是指 -OH 基团。

[0267] “叠氮化物”基团是指 -N=N 基团。

[0268] “烷氧基”是指本文所定义的 -O- 烷基和 -O- 环烷基。

[0269] “芳氧基”是指本文所定义的 -O- 芳基和 -O- 杂芳基。

[0270] “巯基”是指 -SH 基团。

[0271] “硫代烷氧基”是指本文所定义的 -S- 烷基和 -S- 环烷基。

[0272] “硫代芳氧基”是指本文所定义的 -S- 芳基和 -S- 杂芳基。

[0273] “羰基”或“酰基”是指 -C(=O)-R 基团,其中 R 是本文所定义的氢,烷基,烯基,环烷基,芳基,杂芳基(通过环碳键合)或杂脂环(通过环碳键合)。

[0274] “醛”基团是指其中 R 是氢的羰基。

[0275] “硫代羰基”是指 -C(=S)-R 基团,其中 R 如本文所定义。

[0276] “C-羧基”是指 -C(=O)-O-R 基团,其中 R 如本文所定义。

- [0277] “O-羧基”是指 $\text{RC}(=\text{O})-\text{O}-$ 基团,其中 R 如本文所定义。
- [0278] “乙酰氧基”是指 $\text{CH}_3\text{C}(=\text{O})-\text{O}-$ 。
- [0279] “氧代”基团是指 $=\text{O}$ 基团。
- [0280] “羧酸”基团是指 C-羧基,其中 R 是氢。
- [0281] “卤素”或“卤代”基团是指氟、氯、溴或碘。
- [0282] “亚磺酰”基团是指 $-\text{S}(=\text{O})-\text{R}$ 基团,其中 R 如本文所定义。
- [0283] “磺酰基”是指 $-\text{S}(=\text{O})_2-\text{R}$ 基团,其中 R 如本文所定义。
- [0284] “磺酰胺”基团是指 $-\text{S}(=\text{O})_2-\text{NR}_2$ 基团或 $\text{RS}(=\text{O})_2-\text{NR}-$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0285] “O-氨基甲酰基”是指 $-\text{OC}(=\text{O})-\text{NR}_2$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0286] “N-氨基甲酰基”是指 $\text{ROC}(=\text{O})-\text{NR}-$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0287] “O-硫代氨基甲酰基”基团是指 $-\text{OC}(=\text{S})-\text{NR}_2$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0288] “N-硫代氨基甲酰基”基团是指 $\text{ROC}(=\text{S})-\text{NR}-$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0289] “氨基”是指 $-\text{NR}_2$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0290] “C-酰胺基”是指 $-\text{C}(=\text{O})-\text{NR}_2$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0291] “N-酰胺基”是指 $\text{RC}(=\text{O})-\text{NR}-$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0292] “脲”基团是指 $-\text{NRC}(=\text{O})-\text{NR}_2$ 基团,其中每个 R 如本文所定义。
- [0293] “硝基”是指 $-\text{NO}_2$ 基团。
- [0294] “氰基”是指 $-\text{C}\equiv\text{N}$ 基团。
- [0295] 术语“膦酰基”或“膦酸酯”描述了 $-\text{P}(=\text{O})(\text{OR})_2$ 基团,其中 R 如上文所定义。
- [0296] 术语“phosphinyl(氧磷基)”描述了 $-\text{PR}_2$ 基团,其中每个 R 如上文所定义。
- [0297] 术语“硫脲”描述了 $-\text{NR}-\text{C}(=\text{S})-\text{NR}-$ 基团,其中每个 R 如上文所定义。
- [0298] 本发明实施方案进一步包括上文所描述化合物的任何可药用盐、前体药物、水合物和溶剂化物。
- [0299] 术语“前体药物”是指体内转变为活性化合物(活性母体药物)的药剂。前体药物典型地可用于促进母体药物的给予。它们可以例如通过口服而可被生物利用,而母体药物不能。与母体药物相比,前体药物在药物组合物中还具有高溶解性。前体药物还常常用于获得活性化合物在体内的持续释放。前体药物的例子(但不限于)具有一个或多个羧酸部分的本文所描述的化合物,其以酯形式(“前体药物”)给予。这种前体药物是体内被水解,由此提供游离化合物(母体药物)。选择的酯可以影响该药物的溶解特性和水解速度。
- [0300] 短语“可药用盐”是指母体化合物的带电荷物种和它的反离子,其典型地用于改变母体化合物的溶解特性和/或减轻母体化合物对有机体的任何显著的刺激,同时不会消除所给予化合物的生物活性和性能。可药用盐的例子(但不限于)是羧酸根阴离子和阳离子,例如但不限于铵、钠、钾等等。
- [0301] 术语“溶剂化物”是指可变化学计量(例如,二-、三-、四-、五-、六-等等)的复合物,其由溶质(本实施方案的化合物)和溶剂形成,使得溶剂不妨碍溶质的生物活性。合适溶剂包括,例如,乙醇,乙酸,等等。
- [0302] 术语“水合物”是指上文所定义的溶剂化物,其中溶剂是水。
- [0303] 正如下文所详述的那样,本发明实施方案新设计的化合物产生高度有利的免疫调

节活性,并因此可以用于各种治疗应用中。在治疗应用中使用这些化合物包括:给予其本身,或作为药物组合物的一部分给予,在药物组合物中,这些化合物与合适载体或赋形剂混合。

[0304] 由此,按照本发明实施方案的另一个方面,提供了药物组合物,其包含本文所描述的任何化合物作为活性组分和可药用载体。

[0305] 本文使用的“药物组合物”是指一种或多种本文所描述的活性组分与其它化学组分(例如,生理学合适的载体和赋形剂)的制剂。药物组合物的目的是便于将化合物给予有机体。

[0306] 本文中,术语“活性组分”是指具有生物效应的上文所描述的化合物(氧化的脂质)。

[0307] 在下文中,可以互换使用的短语“生理学可接受的载体”和“可药用载体”指的是不会对有机体产生显著刺激、并且不会消除所给予化合物的生物活性和性能的载体或稀释剂。助剂包括在这些短语项下。

[0308] 本文中,术语“赋形剂”是指加入到药物组合物中的惰性物质,以便进一步便于给予活性组分。赋形剂的例子包括(但不限于)碳酸钙,磷酸钙,各种糖和淀粉类型,纤维素衍生物,凝胶,植物油和聚乙二醇。

[0309] 在“Remington's Pharmaceutical Sciences”(Mack Publishing Co., Easton, PA)最近版本中可以得到配制和给予药物的技术,将其结合到本文中作为参考。

[0310] 合适的给药途径可以例如包括下列给药途径:口服,直肠,透粘膜,特别是经鼻、肠或肠胃外递送,包括肌内、皮下和髓内注射以及鞘内、直接心室内、静脉内、腹膜内、鼻内或眼内注射。

[0311] 或者,可以以局部而不是系统方式给予药物组合物,例如,将药物组合物直接注射到患者的组织区域中。

[0312] 在本发明的一个任选实施方案中,将药物组合物设计成通过粘膜给药可以调节免疫和/或炎症性响应的形式。

[0313] 在本发明的另一个实施方案中,将药物组合物设计成通过口服给药可以调节免疫和/或炎症性响应的形式。

[0314] 任选,将本发明实施方案的药物组合物设计成鼻部或腹膜内给药的形式,如下文所详述。

[0315] 可以利用本领域众所周知的方法来制备本发明实施方案的药物组合物,例如,利用常规混合、溶解、制粒、糖锭制备、研磨、乳化、形成胶囊、包埋或冷冻干燥方法。

[0316] 由此,可以用常规方式配制按照本发明实施方案使用的药物组合物,使用一种或多种生理学可接受的载体,包括赋形剂和助剂,便于将活性组分加工为制剂,可以使用药学赋形剂和助剂。合适制剂取决于所选择的给药途径。

[0317] 对于注射,可以将药物组合物的活性组分配制在水溶液中,例如,配制在生理学相容的缓冲液中,例如 Hank's 溶液、Ringer's 溶液或生理盐缓冲液。对于透粘膜给予,在制剂中使用适合于渗入屏障的渗透剂。这种渗透剂在本领域通常是已知的。

[0318] 对于口服给药,可以容易地通过活性化合物与本领域众所周知的可药用载体混合来配制药物组合物。这种载体能够使药物组合物配制为片剂,丸剂,糖锭,胶囊剂,液剂,凝

胶剂,糖浆剂,膏剂,混悬剂,等等,用于患者口服摄入。口服使用的药理学制剂可以使用固体赋形剂制备,任选将得到的混合物研磨,并将颗粒的混合物加工(如果需要的话,在加入合适的助剂之后),得到片剂或糖锭核。尤其合适的赋形剂是填料,例如糖,包括乳糖,蔗糖,甘露糖醇,或山梨糖醇;纤维素制剂,例如,玉米淀粉,麦淀粉,米淀粉,马铃薯淀粉,凝胶,黄耆树胶,甲基纤维素,羟基丙基甲基-纤维素,羧甲基纤维素钠;和/或生理学可接受的聚合物,例如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。如果需要的话,可以加入崩解剂,例如,交联的聚乙烯吡咯烷酮,琼脂或海藻酸或其盐,例如海藻酸钠。

[0319] 糖锭母核拥有合适的包衣。为了这种目的,可以使用浓缩糖液,其可以任选含有阿拉伯树胶,滑石粉,聚乙烯吡咯烷酮,卡波姆凝胶,聚乙二醇,二氧化钛,漆溶液和合适的有机溶剂或溶剂混合物。可以将染料或色素加入到片剂或糖锭包衣中,用于鉴别或表征活性化合物剂量的不同组合物。

[0320] 可以口服使用的药物组合物包括推入配合的明胶制成的胶囊剂,以及由明胶和增塑剂(例如甘油或山梨糖醇)制成的软的密封胶囊剂。推入配合的胶囊剂可以含有活性组分与填料(例如乳糖)、粘合剂(例如淀粉)、润滑剂(例如滑石粉或硬脂酸镁)和任选的稳定剂的混合物。在软胶囊中,活性组分可以溶解或悬浮在合适液体中,例如脂肪族的油,液体石蜡,或液体聚乙二醇。另外,可以加入稳定剂。所有的口服制剂应该具有适合于所选择的给药途径的剂量。

[0321] 对于口腔含化给药,组合物可以采取常规方式配制的片剂或锭剂。

[0322] 对于鼻吸入给药,按照本发明实施方案使用的活性组分可以方便地以气溶胶喷射给予的形式递送,用加压包装或雾化器,借助于合适的发射剂,例如二氯二氟甲烷,三氯氟甲烷,二氯四氟乙烷或二氧化碳。在加压气雾剂的情况下,可以通过提供阀门来确定剂量单位,以便递送可计量的数量。可以配制用于分配器的例如明胶的胶囊和筒,使其含有化合物与合适粉末基料例如乳糖或淀粉的粉末混合物。

[0323] 可以将本文所描述的药物组合物配制为肠胃外给药形式,例如通过快速浓注或连续输液。注射用制剂可以被呈现于单位剂型中,例如小瓶或多剂量容器(任选加入防腐剂)。组合物可以是在油或含水赋形剂中的悬浮液、溶液或乳液形式,并且可以包含调配试剂,例如悬浮、稳定和/或分散剂。

[0324] 肠胃外给药的药物组合物包括水溶性形式的活性制剂的水溶液。另外,可以制备活性组分的混悬液作为合适的油或水基注射悬浮液。合适的亲脂性溶剂或赋形剂包括脂肪族的油,例如芝麻油,或合成脂肪酸酯,例如油酸乙酯、甘油三酯或脂质体。水性注射悬浮液可以含有能够提高悬浮液粘度的物质,例如,羧甲基纤维素钠,山梨糖醇或葡聚糖。任选,混悬剂也可以含有合适的稳定剂或能够提高活性组分溶解性的试剂,以便制备高浓度溶液。

[0325] 或者,活性组分可以以粉末形式存在,在使用之前,与合适赋形剂例如无菌的无热原的水基溶液进行组合。

[0326] 还可以将本发明实施方案的药物组合物配制为直肠用组合物的形式,例如栓剂或保留灌肠剂,使用例如常规栓剂基料,例如可可脂和/或其它甘油酯。

[0327] 适合用于本发明实施方案的背景的药物组合物包括这样的组合物:其中包含的活性组分数量可有效获得预定目的。更具体地说,治疗有效量是指可有效预防、减轻或改善病症(例如,动脉粥样硬化)的症状或延长所治疗患者的存活的活性组分的量。

[0328] 治疗有效量的确定在本领域技术人员能力范围之内,特别是根据本文所提供的详细公开内容来看。

[0329] 对于在本发明实施方案的方法中使用的任何制剂,可以用体外和细胞培养试验来初始估算治疗有效量或剂量。例如,可以用动物模型配制剂量,以便获得所需要的浓度或滴度。这种信息可用于更准确地确定人使用的剂量。

[0330] 本文所描述的活性组分的毒性和治疗效能可以利用标准体外药理学方法、在细胞培养物中或在实验动物中(例如,在下文的实施例部分中所举例说明的那些)来测定。可以在配制用于人类的剂量范围中使用由这些体外和细胞培养试验和动物研究所获得的数据。根据所使用的剂型和所使用的给药途径,剂量可以变化。可以由独立的医生根据病人情况来选择确切的制剂、给药途径和剂量。(参见,例如,Finigl 等人 1975, in "The Pharmacological Basis of Therapeutics", Ch. 1 p.1)。

[0331] 可以独立地调节剂量数量和间隔,以便提供足够诱导(induce)或抑制炎症(例如,血管生成)的活性组分的血浆或脑水平(最小有效浓度,MEC)。每个制剂的 MEC 是变化的,但可以用体外数据估算。获得 MEC 所必需的剂量取决于个体特性和给药途径。检测试验可用于测定血浆浓度。

[0332] 根据所治疗病症的严重程度和响应性,剂量可以是单一或多次给药,疗程持续几天至几个星期,或直到有效治愈或疾病状态得到减轻为止。

[0333] 当然,给予的组合物的数量取决于所治疗的患者、疾病的严重程度、给药方式、处方医生的判断,等等。

[0334] 如果需要的话,本发明实施方案的组合物可以存在于包装或分配器装置中,例如 FDA 批准的试剂盒,其可以包含一个或多个含有活性组分的单位剂型。包装可以,例如,包括金属或塑料薄膜包装,例如泡罩包装。包装或分配装置可以带着给药说明书。包装或分配器还可以带有与容器有关的注意事项,按照政府机构规定形式来生产、使用或销售药物,该注意事项反映了机构批准了该组合物形式可用于人或兽用给药。这种注意事项,例如,可以是美国食品与药物管理局批准的处方药物的标签或批准产品的插页。还可以制备包含本文所描述制剂的组合物(用相容的药理学载体配制),放入合适容器中,并标明所治疗的指明的病症,如下文进一步详述。

[0335] 由此,在本发明的任选实施方案中,将药物组合物包装在包装材料中,并以印刷的形式在包装材料中或在包装材料上做出标记,用于治疗或预防与内源性的氧化的脂质相关的炎症。与这种炎症有关的疾病和病症的代表性例子的列表提供于下文中。

[0336] 或者或另外,将药物组合物包装在包装材料中,并以印刷的形式在包装材料中或在包装材料上做出标记,用于降低选自白细胞间介素 -12 和白细胞间介素 -23 的细胞因子的水平,和 / 或用于治疗疾病或病症,在这种疾病或病症中,降低选自白细胞间介素 -12 和白细胞间介素 -23 的细胞因子的水平是有利的。

[0337] 正如下文进一步详细描述的那样,本发明实施方案的药物组合物可以进一步包含可有效用于治疗或预防本文所描述炎症的其它化合物。

[0338] 正如在随后的实施例部分中所详细描述的那样,已经发现,本发明实施方案的新设计化合物的代表性例子可有效调节与免疫应答和与炎症有关的细胞因子的水平。这些结果表明,这些化合物可有效抑制与内源性氧化的脂质有关的免疫应答和炎症。

[0339] 由此,按照本发明实施方案的另一个方面,提供了治疗或预防与内源性氧化的脂质相关的炎症的方法。通过给予需要的患者治疗有效量的一种或多种本文所描述的氧化的脂质,可以实施按照本发明实施方案的该方面的方法。

[0340] 本文使用的短语“内源性的氧化的脂质”是指由于炎症及其它细胞或体液所介导的过程而在体内存在或形成的一种或多种氧化的脂质。

[0341] 术语“方法”是指完成所给定任务的方式、手段、技术和措施,包括但不限于:化学、药理学、生物学、生物化学和医学领域的工作人员所已知的、或容易用已知的方式、手段、技术和措施由他们来开发的那些方式、手段、技术和措施。

[0342] 本文使用的短语“治疗或预防”包括消除、基本上抑制、减缓或逆转疾病的发展、基本上改善疾病的临床症状或基本上预防疾病的临床症状的出现。

[0343] 适合于这种治疗的患者的例子包括患有与下文所详述的炎症有关的疾病或病症的患者。按照本发明实施方案的合适的个体患者包括哺乳动物,例如犬科动物,猫科动物,羊科动物,猪科动物,马科动物和牛科动物。任选,按照本发明实施方案的个体患者是人。

[0344] 本文使用的短语“与内源性的氧化的脂质有关的炎症”描述的是与体内形成或存在的一种或多种氧化的脂质(例如,氧化 LDL,氧化膜脂,等等)有关的炎症。

[0345] 炎症是身体对伤害的保护性响应。在介导炎症反应的过程中,一些细胞因子起到关键作用,其中有白细胞间介素 12 和 23 (IL-12 和 IL-23)。过度的炎症时常是有害的,涉及或导致很多疾病和病症。正如上文所详细说明的那样,过度的炎症性响应典型地与氧化的脂质表位有关。

[0346] 由此,按照任选的本发明的实施方案,提供了降低患者中选自白细胞间介素 -12 和白细胞间介素 -23 的细胞因子的水平的方法。

[0347] 按照本发明的其它任选的实施方案,提供了治疗疾病或病症的方法,在这种疾病或病症中,降低选自白细胞间介素 -12 和白细胞间介素 -23 的细胞因子的水平是有利的。

[0348] 通过给予需要的患者治疗有效量的一种或多种本文所描述的氧化的脂质,可以实施上述方法。

[0349] 按照本发明实施方案的另一个方面,提供了至少一种本文所描述的氧化的脂质在制备药物中的用途。本文描述了药物的任选的制剂。

[0350] 在一些实施方案中,该药物用于治疗或预防与内源性的氧化的脂质有关的炎症,如本文进一步所详述。

[0351] 在一些实施方案中,该药物用于降低患者中选自白细胞间介素 -12 和白细胞间介素 -23 的细胞因子的水平。

[0352] 在一些实施方案中,该药物用于治疗疾病或病症,在这种疾病或病症中,降低选自白细胞间介素 -12 和白细胞间介素 -23 的细胞因子的水平是有利的。

[0353] 本文所描述的氧化的脂质的抗炎症效果可以用于治疗或预防炎症有关的疾病或病症,在这种疾病或病症中,涉及内源性氧化 LDL 或任何其它内源性氧化的脂质。这种疾病和病症包括,例如,与噬斑形成有关的疾病或病症,包括但不限于:动脉粥样硬化,动脉粥样硬化性心血管疾病,脑血管疾病,周围性血管疾病,狭窄,再狭窄和支架内狭窄,以及自身免疫疾病或病症,神经变性疾病或病症,增殖疾病或病症和老化过程。

[0354] 由此,与炎症有关的疾病或病症代表性的例子(其因而也与内源性的氧化的脂质

有关,并因此能用本发明实施方案的方法治疗)包括,例如,特发性的炎症性疾病或病症,慢性炎症性疾病或病症,急性炎症性疾病或病症,自身免疫性疾病或病症,感染性疾病或病症,炎症性的恶性病或病症,炎症性的移植相关的疾病或病症,炎症性的退行性疾病或病症,与超敏反应有关的疾病或病症,炎症性的心血管疾病或病症,炎症性的脑血管疾病或病症,外周血管疾病或病症,炎症性的腺疾病或病症,炎症性的胃肠疾病或病症,炎症性的皮肤疾病或病症,炎症性的肝病或病症,炎症性的神经系统疾病或病症,炎症性的肌骨骼疾病或病症,炎症性的肾病或病症,炎症性的生殖疾病或病症,炎症性的系统疾病或病症,炎症性的结缔组织疾病或病症,炎症性的肿瘤,坏疽,炎症性的植入物相关的疾病或病症,炎症性的老化过程,免疫缺陷疾病或病症,增殖疾病和病症和炎症性的肺疾病或病症,如下文所详述。

[0355] 超敏反应的非限制性例子包括 I 型超敏反应, II 型超敏反应, III 型超敏反应, IV 型超敏反应, 速发型超敏反应, 抗体介导的超敏反应, 免疫复合物介导的超敏反应, T 淋巴细胞介导的超敏反应, 延迟型超敏反应, 辅助病毒(helper) T 淋巴细胞介导的超敏反应, 细胞毒性 T 淋巴细胞介导的超敏反应, TH1 淋巴细胞介导的超敏反应和 TH2 淋巴细胞介导的超敏反应。

[0356] 炎症性的心血管疾病或病症的非限制性例子包括: 闭塞性疾病或病症, 动脉粥样硬化, 心脏瓣膜疾病, 狭窄, 再狭窄, 支架内狭窄, 心肌梗塞, 冠状动脉的动脉疾病, 急性冠状动脉综合症, 充血性心力衰竭, 心绞痛, 心肌缺血, 血栓, 韦格纳肉芽肿, 高安氏动脉炎, 川崎症, 抗凝血因子 VIII 自身免疫性疾病或病症, 引起坏死的小血管血管炎, 显微镜下多血管炎, Churg 和 Strauss 综合症, 免疫缺乏局灶性引起坏死的肾小球肾炎, 新月体性肾小球肾炎, 抗磷脂综合症, 抗体引起的心力衰竭, 血小板减少性紫癜, 自身免疫性溶血性贫血, 心脏自身免疫, 查加斯氏疾病或病症, 和抗辅助性 T 淋巴细胞自身免疫。

[0357] 狭窄是血管系统的闭塞性疾病, 通常由粥样斑块和血小板活性增加所引起, 极大地影响冠脉血管。

[0358] 再狭窄是渐进性的再堵塞, 常常在狭窄血管系统中的堵塞降低之后发生。在血管系统的不闭合要求支架的机械性支撑的病例中, 可能出现支架内狭窄, 使所治疗的血管再封闭。

[0359] 脑血管疾病或病症的限制性例子包括中风, 脑血管炎症, 脑出血和椎动脉机能不全。

[0360] 外周血管疾病或病症的非限制性例子包括坏疽, 糖尿病性血管病变, 缺血性肠疾病, 血栓, 糖尿病性视网膜病和糖尿病性肾病。

[0361] 自身免疫性疾病或病症的非限制性例子包括由免疫应答(例如, 自身抗体或细胞介导的对自身抗原的免疫应答, 等等)所引起的所有疾病。代表性的实例是慢性类风湿性关节炎, 幼年型类风湿性关节炎, 系统性红斑狼疮, 硬皮病, 混合结缔组织病, 结节性动脉周围炎, 多肌炎/皮肤肌炎, Sjogren's 综合症, Bechet's 疾病, 多发性硬化, 自身免疫糖尿病, 桥本氏病, 牛皮癣, 原发性粘液性水肿, 恶性贫血, 重症肌无力, 慢性活动型肝炎, 自身免疫性溶血性贫血, 特发性血小板减少性紫癜, 葡萄膜炎, 系统性血管炎和肝素引起的血小板减少症。

[0362] 炎症性腺疾病或病症的非限制性例子包括胰腺疾病或病症, I 型糖尿病, 甲状腺病

或病症, Graves' 疾病, 甲状腺炎, 自发性自身免疫甲状腺炎, 桥本甲状腺炎, 特发性粘液性水肿, 卵巢自身免疫, 自身免疫性抗精子不育症, 自身免疫性前列腺炎和 I 型自身免疫性多腺综合症。

[0363] 炎症性胃肠疾病或病症的非限制性例子包括大肠炎, 回肠炎, 克罗恩病, 慢性炎症性肠道病, 炎症性肠综合症, 慢性炎症性肠病, 乳糜泻, 溃疡性结肠炎, 溃疡, 皮肤溃疡, 褥疮性溃疡, 胃溃疡, 消化性溃疡, 口腔溃疡, 鼻咽溃疡, 食管溃疡, 十二指肠溃疡和胃肠溃疡。

[0364] 炎症性皮肤病疾病或病症的非限制性例子包括痤疮, 自身免疫性大疱皮肤病, 寻常天疱疮, 大疱类天疱疮, 落叶状天疱疮, 接触性皮炎和药疹。

[0365] 炎症性肝脏疾病或病症的非限制性例子包括自身免疫性肝炎、肝硬化和胆汁性肝硬化。

[0366] 炎症性神经疾病或病症的非限制性例子包括: 多发性硬化, 阿尔海默氏疾病, 帕金森氏症, 重症肌无力, 运动原神经病, 急性感染性多发性神经炎, 自身免疫性神经病, Lambert-Eaton 无力综合征, 副肿瘤神经疾病或病症, 副肿瘤小脑萎缩, 非副肿瘤僵人综合征, 渐进性的小脑萎缩, Rasmussen's 脑炎, 肌萎缩性侧索硬化, Sydeham 舞蹈病, 抽动-秽语综合症, 自身免疫性内分泌病变, 免疫介导性神经病, 获得性神经性肌强直, 多发性关节硬化症, 亨丁顿舞蹈症, AIDS 相关的痴呆, 肌萎缩性侧索硬化 (AML), 多发性硬化, 中风, 炎症性的视网膜疾病或病症, 炎症性的眼睛疾病或病症, 视神经炎, 海绵状脑, 偏头痛, 头痛, 集束性头痛和全身肌强直综合征。

[0367] 炎症性的结缔组织疾病或病症的非限制性例子包括自身免疫性肌炎, 原发性 Sjogren's 综合症, 平滑肌自身免疫性疾病或病症, 肌炎, 腱炎, 韧带炎症, 软骨炎, 关节炎, 滑液炎症, 腕管综合征, 关节炎, 类风湿性关节炎, 骨关节炎, 强直性脊柱炎, 骨架炎症, 自身免疫性耳朵疾病或病症和内耳的自身免疫性疾病或病症。

[0368] 炎症性的肾疾病或病症的非限制性例子包括自身免疫性间质性肾炎和 / 或肾癌。

[0369] 炎症性的生殖疾病或病症的非限制性例子包括重复性流产, 卵巢囊肿或月经相关的疾病或病症。

[0370] 炎症性系统疾病或病症的非限制性例子包括系统性红斑狼疮, 系统性硬化, 脓毒性休克, 中毒性休克综合症和恶病体质。

[0371] 感染性疾病或病症的非限制性例子包括慢性感染性疾病或病症, 亚急性感染性疾病或病症, 急性感染性疾病或病症, 病毒性疾病或病症, 细菌性疾病或病症, 原生动物性疾病或病症, 寄生性疾病或病症, 霉菌性疾病或病症, 支原体疾病或病症, 坏疽, 败血症, 朊病毒疾病或病症, 流感, 肺结核, 疟疾, 获得性免疫缺乏综合症和严重的急性呼吸性综合症。

[0372] 炎症性的移植相关的疾病或病症的非限制性例子包括移植排斥, 慢性移植排斥, 亚急性移植排斥, 急性移植排斥, 高急性移植排斥和移植物抗宿主疾病或病症。示范性的植入物包括假体植入物, 乳房填充物, 硅氧烷植入物, 牙齿植入物, 阴茎植入物, 心脏植入物, 人造关节, 骨折修复装置, 骨替代植入物, 给药植入物, 导管, 起搏器, 人造心脏, 人造心脏阀门, 药物释放植入物, 电极和呼吸管。

[0373] 炎症性的肿瘤的非限制性例子包括恶性肿瘤, 良性肿瘤, 实质固态瘤, 转移性肿瘤和非实质固态瘤。

[0374] 炎症性肺疾病或病症的非限制性例子包括哮喘, 变应性哮喘, 肺气肿, 慢性阻塞性

肺病或病症,结节病和支气管炎。

[0375] 增殖疾病或病症的例子是癌。

[0376] 已经报道了磷脂和磷脂代谢物涉及治疗或预防疾病和综合症,例如,衰老的氧化应激疾病 (Onorato JM 等人 *Ann N Y Acad Sci* 1998 Nov 20;854:277-90),类风湿性关节炎 (RA) (Paimela L 等人 *Ann Rheum Dis* 1996 Aug; 55(8):558-9),幼年型类风湿性关节炎 (Savolainen A 等人 1995; 24(4):209-11),炎症性肠病 (IBD) (Sawai T 等人 *Pediatr Surg Int* 2001 May; 17(4): 269-74) 和肾癌 (Noguchi S 等人 *Biochem Biophys Res Commun* 1992 Jan 31; 182(2):544-50),并由此进一步支持氧化磷脂的氧化的脂质类似物在治疗或预防这些疾病或病症中的有益作用。

[0377] 按照本发明的实施方案的方法,可以通过各种途径给予患者氧化的脂质,包括,例如,口服,直肠,透粘膜、尤其是经鼻、肠或肠胃外递送,包括肌内、皮下和髓内注射以及鞘内注射,直接心室内注射,静脉内,腹膜内,鼻内或眼内途径。然而,正如贯穿本文所详细描述并且在随后的实施例部分中进一步说明的那样,优选的给药途径包括口服、粘膜、鼻、真皮内(皮下)和腹膜内途径。

[0378] 由此,在一个实施方案中,以长期或交替性给药方案,一至三次,每周,腹膜内给予 0.1-100 mg/kg 本文所描述的氧化的脂质,其在合适载体中,例如但不局限于 PBS 或甘油。

[0379] 在另一个实施方案中,以长期或交替性给药方案,一至三次,每周,经鼻给予 0.1-100 mg/kg 本文所描述的氧化的脂质,其在合适载体中,例如但不局限于 PBS 或甘油。

[0380] 在又一个实施方案中,以长期或交替性给药方案,一至三次,每周,皮下地给予 0.1-100 mg/kg 本文所描述的氧化的脂质,其在合适载体中,例如但不局限于 PBS 或甘油。

[0381] 在又一个实施方案中,以长期或交替性给药方案,一至三次,每周,口服给予 0.1-100 mg/kg 本文所描述的氧化的脂质,其在合适载体中,例如但不局限于 PBS 或甘油。

[0382] 本文所描述的化合物和方法可以进一步包括给予一种或多种其它化合物,这种化合物能够治疗或预防与上文所描述的内源性氧化的脂质相关的炎症。

[0383] 按照本发明实施方案的方法可以因此包括:与治疗有效量的一种或多种这种其它化合物共同给予氧化的脂质,或在给予氧化的脂质之前给予,或伴行给予,或在给予氧化的脂质之后给予,同时,除了本文所描述的化合物之外,按照本发明实施方案的化合物组合还可以包括这种其它的化合物。

[0384] 能够治疗或预防与上文所描述的内源性氧化的脂质相关的炎症、并因此可在本发明实施方案的背景中使用的其它化合物的代表性例子包括但不限于:HMGC_oA 还原酶抑制剂(他汀类),粘膜佐剂,皮质类固醇,甾体抗炎药物,非甾体抗炎药物,镇痛药,生长因子,毒素,胆固醇酯转移蛋白(CETP)抑制剂,过氧化物酶体,增殖活化受体(PPAR)激动剂,抗动脉粥样硬化药物,抗增殖药剂,弹性酶(ezetimide),烟酸,鲨烯抑制剂,ApoE Milano, HSPs, β -2-糖蛋白-I 和其任何衍生物和类似物。

[0385] HMGC_oA 还原酶抑制剂(他汀类)是众所周知的药物,通过抑制能够调节胆固醇生成速度的酶和通过肝使存在于血液中的 LDL-胆固醇的廓清率升高,其可有效地降低 LDL-胆固醇含量。通常处方的他汀类的非限制性的例子包括阿托伐他汀,氟伐他汀,洛伐他汀,普伐他汀和西伐他汀。

[0386] 依泽替米贝是第一个新一类的胆固醇吸收抑制剂,其可有效和选择性地抑制饮食

和胆的胆固醇在肠上皮细胞的纹缘处的吸收,不影响甘油三酯或脂溶性维生素的吸收。由此,依泽替米贝可降低总胆固醇至肝的输送,其次,引起 LDL 受体的表达提高,使 LDL-C 从血浆中的去除增加。

[0387] 过氧化物酶体是存在于几乎所有真核细胞中的单膜细胞器。过氧化物酶体的最重要的代谢过程之一是长链和极长链脂肪酸的 β -氧化。过氧化物酶体还参与胆汁酸合成,胆固醇合成,缩醛磷脂合成,氨基酸代谢和嘌呤代谢。

[0388] 烟酸是已知可降低总胆固醇、LDL-胆固醇和甘油三酯水平、同时提高 HDL-胆固醇含量的药剂。有三种类型的烟酸药物:立即释放、控时释放和延长释放的烟酸药物。当以远远超过维生素需要的剂量给予时,烟酸或烟碱酸(水溶性的 B 维生素)增加所有的脂蛋白。

[0389] 鲨烯(结构上与 β -胡萝卜素相似的一类异戊二烯化合物)是在胆固醇的合成过程中的中间代谢物。在人中,可以吸收大约 60% 的饮食鲨烯。它在血清中输送,通常与极低密度脂蛋白结合,并且在人组织中普遍存在,在皮肤中的浓度最大,此处它是皮肤表面脂质的主要部分之一。鲨烯抑制剂(例如,单加氧酶和合酶)充当胆固醇生物合成抑制剂。

[0390] 增殖活化受体 (PPAR) 激动剂,例如贝特类,是在脂质和葡萄糖代谢中起到重要作用的核受体总科的脂肪酸活化成员,并且与肥胖症相关的新陈代谢病(例如高脂质血症、胰岛素抗性和冠状动脉病)有关。贝特类通常可有效降低升高的血浆甘油三酯和胆固醇,并充当 PPAR 激动剂。贝特类的最肯定的效果包括降低血浆富含甘油三酯的脂蛋白 (TRLs)。在个体中,LDL 胆固醇 (LDL-C) 的水平通常随着基本血浆浓度的升高而降低,并且当基本血浆浓度降低时, HDL 胆固醇 (HDL-C) 水平通常增加。常用处方贝特类的非限制性例子包括苯扎贝特 (Benzafibrate)、吉非贝齐 (gemfibrozil) 和非诺贝特。

[0391] 通过降低积聚在巨噬细胞和动脉壁内的胆固醇酯,并由此降低泡沫细胞形成和影响胆固醇吸收,胆固醇酯转移蛋白 (CETP) 抑制剂在动脉粥样硬化形成中起到重要作用。目前最有前途的已知的 CETP 抑制剂是 avisimibe。

[0392] ApoA-I Milano 典型地用作与磷脂的重组体复合物 (ETC-216),并且引起冠状动脉粥样硬化的显著退化。

[0393] 已经证明,共同给予粘膜佐剂对预防传染剂通过粘膜表面侵入是高度有利的。在粘膜免疫应答诱导的最初阶段,通过独特的抗原取样细胞 (M 细胞,位于感应位点的卵泡相关的上皮细胞 (FAE) 中),可以实现口服或经鼻给予抗原的吸收。在成功吸收之后,抗原立即被处理,并且通过下面的树状细胞 (DCs) 来呈现。

[0394] 非甾体抗炎药物的非限制性例子包括:昔康 (Oxicam),例如吡罗昔康,异噻噻酰胺,替诺昔康,舒多昔康和 CP-14,304;水杨酸盐,例如阿司匹林,disalcid,贝诺酯,三柳胆镁 (trilisate),safapryn,solprin,二氟尼柳和芬度柳;乙酸衍生物,例如双氯芬酸,芬氯酸,消炎痛,舒林酸,甲苯酰吡酸,伊索克酸,呋罗芬酸,硫平酸,齐多美辛,阿西美辛 (acematacin),芬替酸,佐美酸,clindanac,奥昔平酸 (oxepinac),联苯乙酸和酮咯酸;芬那酸,例如甲芬那酸 (mefenamic),甲氯芬那酸 (meclofenamic),氟芬那酸 (flufenamic),尼氟灭酸 (niflumic) 和托灭酸 (tolfenamic);丙酸衍生物,例如布洛芬,萘普生,苯噻洛芬,氟比洛芬,酮洛芬,非诺洛芬,芬布芬,吲哚洛芬,吡咯洛,卡洛芬,奥沙普秦,普拉洛芬,咪洛芬,硫洛芬,舒洛芬,阿明洛芬和泰普菲;吡唑类,例如苯丁唑酮,羟保泰松,非普拉

宗,阿扎丙宗和三甲保泰松。

[0395] 甾体抗炎药物的非限制性例子包括但不限于:皮质类甾醇,例如氢化可的松,羟基去炎松, α -甲基地塞米松,磷酸地塞米松,二丙酸氯地米松,戊酸氯倍他索,地奈德,去羟米松,醋酸去氧皮质酮,地塞米松,二氯松,双乙酸二氟拉松,戊酸二氟可龙,氟氢缩松,氟氯奈德,氟氢可的松,特戊酸氟地塞米松,醋酸氟轻松,醋酸氟轻松,氟可丁 (flucortine butylesters), 氟可龙,醋酸氟泼尼定 (氟甲叉龙), 氟氢缩松,哈西缩松,醋酸氢化可的松,丁酸氢化皮质酮,甲基强的松龙,去炎松缩丙酮,可的松,可托多松,氟轻松,氟氢可的松,双醋二氟松 (difluorosone diacetate), fluradrenolone, 氟氢可的松,双醋二氟松 (difluorosone diacetate), fluradrenolone acetone, 甲羟孕酮, amcinafel, 安西非特, 倍他米松和其余的酯, 氯泼尼松, chlorprednisone acetate, clocortelone, clescinolone, 二氯松, 二氟泼尼酯 (diflurprednate), 氟氯奈德, 氟尼缩松, 氟米龙, 氟培龙, 氟泼尼龙, 戊酸氢化可的松, 环戊丙酸氢化可的松, 氢可松氨酯, 甲泼尼松, 泼拉米松, 氢化泼尼松, 脱氢可的松, 二丙酸氯地米松, 去炎松, 和其混合物。

[0396] 镇痛药 (止痛药) 的非限制性例子包括:阿司匹林及其它水杨酸盐 (例如胆碱或水杨酸镁), 布洛芬, 酮洛芬, 萘普生钠和醋氨酚。

[0397] 生长因子是具有许多功能 (包括调节粘着分子生成, 改变细胞增生, 增加血管形成, 增加胶原合成, 控制骨代谢和改变细胞迁移到给定区域中) 的激素。生长因子的非限制性例子包括胰岛素样生长因子-1 (IGF-1), 转化生长因子- β (TGF- β), 骨成型蛋白 (BMP) 等等。

[0398] 毒素的非限制性例子包括霍乱菌毒素, 其还充当助剂。

[0399] 抗增殖剂的非限制性例子包括:烷基化剂, 例如氮芥, 氮丙啶和甲基三聚氰胺, 烷基磺酸盐, 亚硝基脲和三氮烯; 代谢拮抗剂, 例如叶酸类似物, 嘧啶类似物和嘌呤类似物; 天然产物, 例如长春花生物碱, 表鬼臼脂素, 抗生素, 酶, 紫杉烷 (taxane) 和生物反应调节物; 其它药剂, 例如, 铂配位络合物, 蒽二酮, 蒽环霉素, 取代的脲, 甲基胍衍生物或肾上腺皮质抑制剂; 或激素或拮抗剂, 例如, 肾上腺类固醇, 孕酮, 雌激素, 抗雌激素, 雄激素, 抗雄激素或促性腺激素释放激素类似物。化疗剂的具体例子包括, 例如, 氮芥, 表鬼臼脂素, 抗生素, 铂配位络合物, 博来霉素, 多柔比星, 太平洋紫杉醇, 依托泊苷, 4-OH 环磷酰胺和顺铂。

[0400] HSP 家族由大约 25 种具有高度保守结构的蛋白组成, 这些蛋白通过它们的分子量进行辨别。几乎所有的人都对微生物热休克蛋白 60 (HSP60) 具有细胞和体液免疫反应。因为在微生物 (细菌和寄生物) 和人 HSP60 之间存在高度抗原同源性, 所以, 对微生物免疫的 '成本' 可能是与人 HSP60 (通过应激动脉的内皮细胞表达) 的交叉反应性的危险。针对改变的自体同源 HSP60 的真性自身免疫还可以启动这种过程 (Wick 等人 Atherosclerosis as an autoimmune disease: an update. TRENDS in Immunology. 2001; 22(12):665-669)。在一些实验性自身免疫疾病 (关节炎, I 型糖尿病) 中, HSP 作为靶向自体抗原已被涉及。已经证明抗 HSP65 以及抗 HSP60 抗体与人的动脉粥样硬化病变有关。在兔子和小鼠中所进行的研究显示, 形成 HSP65 所引起的免疫应答 (通过用重组蛋白或用富含 HSP65 的结核分枝杆菌制剂进行免疫) 可以增加动脉粥样硬化形成。因为自身免疫过程指向 HSP65 作为合适的抗原候选物, 已经使用通过诱导粘膜 "免疫耐受作用" 形成的无应答状态, 以便阻断这些反应, 我们的团队报道, 与摄食 BSA 或 PBS 的小鼠相比较, 早期

动脉粥样硬化在摄食 HSP65 的小鼠中得到减弱 (Harats 等人, Oral tolerance with heat shock protein 65 attenuates mycobacterium tuberculosis induced and high fat diet driven atherosclerosis lesions. J Am Coll Cardiol. 2002;40:1333-1338), 这种现象进一步得到 Maron 的支持, 其证明了用 HSP 接种鼻子可以降低与动脉粥样硬化有关的炎性过程 (Maron 等人, Mucosal administration of heat shock protein-65 decreases atherosclerosis and inflammation in aortic arch of low density lipoprotein receptor-deficient mice. Circulation. 2002; 106: 1708-1715)。

[0401] β -2-糖蛋白 I (β 2GPI) 是磷脂结合蛋白, 显示其可作为促血栓形成抗磷脂抗体的靶向。近来已经证明其可驱动免疫介导的反应, 并增加鼠的动脉粥样硬化。对 β -2-GPI 的 β -抗体具有活化单核和内皮细胞的能力, 并且可以在有加速动脉粥样硬化倾向的小鼠中引起对 β 2GPI 的免疫应答。当将 β 2GPI-反应性淋巴结和脾脏细胞转入 LDL-受体缺乏的小鼠中时, 它们促进脂肪纹的形成, 验证了对 β 2GPI-特异性淋巴细胞的直接硬化 (proatherogenic) 作用。通过预先口服摄食抗原而引起对 β 2GPI 的免疫耐受性, 可以导致动脉粥样硬化病变程度的显著降低。由此, 在动脉粥样硬化的斑块中, β 2GPI 是候选参与者, 并且可以用作斑块发展的免疫调节剂。在针对人蛋白免疫的小鼠中, 口服摄食 β 2GPI 可以抑制淋巴结细胞对 β 2GPI 的反应性。在 β 2GPI 耐受的小鼠 (针对 β 2GPI 免疫) 的淋巴结细胞中, 一旦用相应的蛋白引发, 可以上调 IL-4 和 IL-10 的生成。由此, 口服 β 2GPI 是抑制小鼠动脉粥样化形成的有效方法 (George 等人, Suppression of early atherosclerosis in LDL-receptor deficient mice by oral tolerance with beta2-glycoprotein I. Cardiovasc Res. 2004; 62(3): 603-9)。

[0402] 本文所描述的氧化的脂质可以按照化学领域已知的任何合适方法来制备。例如, 本文所描述的磷脂可以按照国际专利申请 PCT/IL05/000735 (公开号 WO 06/006161) 或美国专利申请 11/650, 973 (公开号 2007-0112211) 所描述的方法来制备。

[0403] 应该理解, 本发明的某些特征 (为了清楚, 在独立实施方案的上下文中对其进行描述) 还可以提供于单一实施方案的组合中。反之, 本发明的各种特征 (为了简便起见, 在单一实施方案的上下文中对其进行描述) 还可以单独提供, 或以任何合适的亚组合形式或当合适时在本发明任何其它描述的实施方案中来提供。不认为在各种实施方案的上下文中所描述的某些特征是那些实施方案的基本特征, 除非该实施方案在没有那些要素的情况下不能实行。

[0404] 在下面的实施例中对上文所描述的和下面权利要求部分所要求的本发明的各种实施方案和方面建立了实验支持。

实施例

[0405] 现在参考下列实施例, 其与上述说明书一起, 以非限制性方式举例说明本发明的一些实施方案。

[0406] *材料和方法*

[0407] *材料:*

[0408] 从 Bio-Lab 得到乙酸 (冰的);

[0409] 从 Sigma 得到龙胆紫;

- [0410] 从 Bio-Lab 得到二硫苏糖醇 (DTT) ;
- [0411] 从 Biological Industries (Israel) 得到胎牛血清 (热失活) ;
- [0412] 从 Bio-Lab 得到甲醇 (绝对) ;
- [0413] 从 Sigma-Aldrich 得到 MOG 肽 35-55 ;
- [0414] 从 Peprotech (Israel) 得到小鼠 GM-CSF (粒细胞 - 巨噬细胞菌落 - 刺激因子) ;
- [0415] 从 Biological Industries (Israel) 得到青霉素 / 链霉素溶液 ;
- [0416] 从 Biological Industries (Israel) 得到红血细胞溶解缓冲液 ; 和
- [0417] 从 Biological Industries (Israel) 得到含有 L- 谷酰胺的 RPMI-1640 介质。
- [0418] 从 Corning 得到 COSTAR® 无菌 24 孔组织培养物处理的平皿。
- [0419] 如下制备磷酸盐缓冲盐水 (PBS) : 用重蒸馏的水将不含钙或镁的 Dulbecco's 磷酸盐缓冲盐水 10x 浓缩液 (Biological Industries, Israel) 进行稀释。
- [0420] 将细胞在 37°C、在具有 5% CO₂ 的氛围中培养。
- [0421] 使用 Tecan SUNRISE 读盘机和 Magellan Version 6.3 数据采集软件进行光谱测定。使用 Tecan SpectraFluor 595 nm 带通滤波器, 测定 595 nm 的吸收。
- [0422] 对于体外试验, 将被试验化合物溶解在乙醇中, 达到 100 mg/ml 的浓度, 而后在 PBS 中稀释至 1 mg/ml 的浓度。
- [0423] **酪氨酸磷酸化试验 :**
- [0424] 在小鼠的巨噬细胞或骨髓获得的细胞 (BMDCs) 中试验酪氨酸磷酸化作用。
- [0425] 在巯基醋酸盐刺激之后, 从 7-8 周大的 C57BL/6 雌性小鼠的腹膜中分离小鼠初级巨噬细胞。在 RPMI-1640 介质中, 用 0.5% 胎牛血清 (FBS) 使细胞预先饥饿过夜。使用冷的 RPMI-1640, 通过从雌性 SJL 小鼠的股骨和胫骨当中冲洗骨髓, 分离小鼠初级骨髓获得的细胞。制备细胞悬液, 使用红细胞溶解缓冲液除去红细胞, 并在含有磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 和 0.5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的缓冲液中、在 4°C 用小鼠 B220 和 CD90 微粒 (Miltenyi Biotech) 培养 15 分钟。然后洗涤细胞, 再悬浮在相同的缓冲液中, 并在 Midi-Macs 分离装置上、通过 LD 或 LS 柱 (Miltenyi Biotech) 消耗 B 和 T 细胞。计数消耗的 (depleted) 骨髓细胞, 洗涤并以 10⁶ 个细胞 /ml 的浓度播种在 RPMI-1640 介质中, 该介质中含有 L- 谷酰胺, β - 巯基乙醇, 10% 胎牛血清, 抗生素 (青霉素 / 链霉素) 和 2 ng/ml 小鼠粒细胞 - 巨噬细胞菌落 - 刺激因子 (GM-CSF)。每隔一天替换介质。在培养后的第 5-6 天, 收集细胞, 计数并播种 (10⁶ 个细胞 /ml) 在介质中 24 小时, 而后在 RPMI-1640 介质中用 0.5% 胎牛血清 (FBS) 饥饿过夜。
- [0426] 然后, 在含有 1% 乙醇的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中, 用 1、10 或 20 μ g/ml 的试验化合物处理巨噬细胞或 BMDCs 10 分钟。用 1 或 20 μ g/ml 磷脂酰胆碱或溶剂 (含有 1% 乙醇的 PBS) 处理用作阴性对照。用 1、10 或 20 μ g/ml CI-201 (1- 十六烷基 -2-(4- 羧基) 丁基 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸) 处理用作阳性对照。
- [0427] 然后, 使用单克隆抗磷酸酪氨酸抗体, 通过 Western 印迹观察含有磷酸化酪氨酸的蛋白。进行 ERK1/2 或 α - 微管蛋白的 Western 印迹, 作为蛋白加载的对照物。
- [0428] **体外毒性试验 :**
- [0429] 将巯基醋酸盐诱出的小鼠腹膜巨噬细胞洗涤、计数并一式三份地播种 (2x10⁵ 至 3x10⁵ 个细胞 / 孔, 在 24 孔平皿中) 在含有 RPMI-1640、L- 谷酰胺、10% FBS 和抗生素 (青霉素 / 链霉素) 的介质中。恢复 24 小时之后, 将试验化合物 (或对照物) 加入到细胞介质

中,剂量为 2、10、20、50、100 或 150 $\mu\text{g/ml}$,通过用溶剂补充体积,使所有处理中所加入的体积保持相等。

[0430] 在加入化合物之后,额外培养细胞 24 小时,而后洗涤细胞,并用 10% 甲醇 /10% 乙酸溶液固定,用龙胆紫 (0.4%, 在 20% 乙醇中) 染色。通过在 595 nm 测定吸光度,测定细胞数量。用赋形剂 (含有 1% 乙醇的 PBS) 培养的细胞用作对照物,将处理样品中的细胞数量对其进行归一化。

[0431] 数据以平均值 $\pm$ 标准偏差的形式提供。使用 student's t - 检验,计算相对于赋形剂处理的细胞的统计显著性,认为 p 值小于 0.05 是统计显著性的。

[0432] 体外 *IL12/23p40* 生成试验:

[0433] 从雌性 C57BL 小鼠的股骨和胫骨得到骨髓产生细胞 (BMDCs),培养,并在培养 5-6 天后以 10^6 个细胞 /ml 的浓度播种 (如上文酪氨酸磷酸化试验中所描述的方法)。

[0434] 然后以 1、2.5、5、10 或 20 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度将试验化合物加入到细胞中,保持 1 小时。通过用 10 $\mu\text{g/ml}$ 肽聚糖 (PGN) 培养 24 小时,使细胞活化,用于 *IL12/23p40* 生成。利用 ELISA 测定上清液中的细胞因子生成。不含试验化合物的活化细胞用作对照物。

[0435] 体外 *IL12/23 p40 mRNA* 表达试验:

[0436] 如上文所描述,制备由骨髓获得细胞的培养物。在培养后的 5-6 天,用小鼠 CD11c 微粒,在 MS 或 LS 柱 (Miltenyi Biotech) 上使细胞培养物中的 CD11c+ 树状细胞富集 (>90%)。用单独的 10 $\mu\text{g/ml}$ 肽聚糖或在 20 $\mu\text{g/ml}$ 试验化合物 (活化之前 1 小时加入) 存在下刺激 CD11c+ 树状细胞 1、2 和 3 小时。使用 RNeasy 微型试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA),从细胞中提取 RNA。对于 cDNA 制备,在 70 $^{\circ}\text{C}$,将 1 μg 的 RNA 与 Oligo dT 混合 10 分钟,第一链缓冲液。在 42 $^{\circ}\text{C}$,加入二硫苏糖醇和 dNTP 和 super-script 逆转录酶 (SS-II) (Invitrogen, Carlsbad, CA),保持 50 分钟,并通过在 70 $^{\circ}\text{C}$ 额外培养 15 分钟来结束反应。使用 LightCycler Taqman master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) 进行所有实时 PCR 反应,并在 LightCycler 设备 (Roche) 上运行。将准备好的带有引物的探针组用于 *IL12/23 p40* 和 *GAPDH* 试验 (Applied Biosystems, 分别为试验 #Mm01288992_m1 和 Mm99999915_g1),后面的试验用来归一化 RNA 水平。20 $\mu\text{g/ml}$ CI-201 和磷脂酰胆碱 (PC) 分别用作阳性和阴性对照。

[0437] 体内髓鞘质少突神经胶质细胞糖蛋白 (MOG) 引发的实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 试验:

[0438] 在免疫之前 5 天,开始连续 5 天口服给予 C57BL/6 小鼠标明数量的试验化合物 (最终体积 200 μl)。

[0439] 为了 EAE 诱导,皮下用含有 1.5 mg/ml MOG 肽 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) 和 2.5 mg/ml CFA (完全 Freund's 助剂) 的乳剂使小鼠免疫 (100 μl 乳剂注射到每个侧腹中)。免疫之后立即和 48 小时腹膜内给予百日咳毒素 (500 ng, 在 500 μl PBS 中)。

[0440] 通过平均临床评分来评价 EAE 的发作。

[0441] 体内胶原引发的关节炎 (CIA) 试验:

[0442] 通过在尾根部 (第 0 天) 注射含有完全 Freund's 助剂 (CFA) 的胶原,使 DBA/1 雄性小鼠免疫,引发关节炎,并在侧腹加强接种 (第 21 天)。跟踪小鼠的关节炎发展,直到第 36 天为止。在第 22 天开始通过填喂法给予试验化合物和对照物质,并以每天为基础进行

(每周6次)。

[0443] 通过关节炎临床评分来评价关节炎的发作。

[0444] 体内动脉粥样硬化病变试验：

[0445] 口服给予12-16周大的LDL-RD雄性小鼠0.2 ml的PBS或含有标明数量试验化合物的PBS，一天一次，隔日给予，进行5次处理。用西餐刺激小鼠5周，而后杀死。

[0446] 或者，口服给予14-16周大的ApoE KO小鼠0.2 ml的PBS或含有标明数量试验化合物的PBS，一天一次，隔日给予，进行5次处理，到8周结束的时候杀死。

[0447] 按照先前所描述方法[Paigen等人, Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. Atherosclerosis 1987;68:231-240]，进行少许改变，通过计算主动脉窦中的病变大小，将动脉粥样硬化病变进行定量。简要地说，从动物中取出心脏和主动脉，并小心地清除外周油脂。将心脏包埋在最佳切削温度(OCT)的凝胶中，并冷冻。沿着主动脉窦(400 μm)，用3-8个油红O-染色的连续切片(10 μm厚)测定主动脉窦病变。使用电脑分析方法(Image Pro Plus software[version 4.5.1.29], Medical Cybernetics Corporation)，计算病变面积。

[0448] 实施例1

[0449] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-202)和1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺

[0450] 按照下文所描述方法，使用(R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料，合成(R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和(R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。使用相同的方法，但用(S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料，合成(S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺和(S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0451] (S)-1-十六烷基-甘油的合成：将11克(R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、20克粉末氢氧化钾和27.96克十六烷基溴在150 ml甲苯中回流搅拌6小时，同时共沸蒸馏除去形成的水。将溶剂的体积逐渐减少到大约40 ml。将反应混合物冷却至室温，加入100 ml水，用75 ml二氯甲烷将反应混合物提取三次。用50 ml水洗涤合并的有机相，减压除去溶剂。将残余物溶解在200 ml的90:10:5(体积/体积)甲醇:水:浓盐酸的混合物中，并将得到的溶液回流2小时。冷却至室温后，加入100 ml水。用100 ml二氯甲烷提取产物三次，连续用100 ml水、100 ml饱和碳酸钠水溶液洗涤，再次用100 ml水洗涤。然后减压除去溶剂，用己烷(200 ml)将产物结晶，得到21.69克纯(S)-1-十六烷基-甘油，将其在干燥器中减压干燥。产率是82%。

[0452] (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油的合成：将20克(S)-1-十六烷基-甘油和21.29克三苯基氯甲烷溶解在369 ml干燥四氢呋喃(THF)和93 ml干燥乙腈中。加入17.75 ml三乙胺，并将反应混合物回流17小时。将反应混合物冷却至室温，倾倒在冰(100克)上，转入分液漏斗中，并用甲基叔丁基醚提取。用200 ml水、200 ml稀(1.5%)硫酸(两次)、200 ml水、200 ml饱和碳酸氢钠水溶液和用200 ml水(再次)连续地洗涤有机相。用无水硫酸钠干燥有机相，减压除去溶剂，得到36.86克粗品残余物。将该残余物溶解在热己烷(200 ml)中，并在4℃将得到的溶液冷却过夜。将沉淀的产物过滤，得到30.71克

(R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油。

[0453] (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油的合成:将 19.94 克 1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油、6.98 克 6-溴-1-己烯和 15 克粉末氢氧化钾在 350 ml 己烷中搅拌,并回流 8 小时,同时共沸蒸馏除去形成的水。将反应混合物冷却至室温,转入分液漏斗中,用 200 ml 水洗涤两次,然后减压除去溶剂。将残余物溶解在 150 ml 己烷中,并用 200 ml 水再洗涤两次。将有机溶液在 4℃保持过夜,在此期间,出现副产物的沉淀。过滤,减压除去溶剂,得到 19.86 克 (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油。产率是 86.6%。

[0454] (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油的合成:在配备温度计和滴液漏斗的三颈圆底烧瓶中,将 150.16 克 (702 mmol) 高碘酸钠悬浮在 500 ml 水中。加入 7.21 克 (85.8 mmol) 碳酸氢钠和 2.47 克 (15.6 mmol) 高锰酸钾,并将该悬浮液加热至 40℃的温度。将 50 克 (78 mmol) (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油溶解在 500 ml 叔丁醇中,并在 1 小时期间内将该溶液加入到高碘酸钠和高锰酸钾的混合物中。将 (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油加入到高碘酸钠和高锰酸钾中之后,将该反应混合物在 40℃的温度下加热 3 小时。1.5 小时之后,加入额外 0.62 克 (3.9 mmol) 高锰酸钾,以便使该反应混合物保持粉红色。在 3 小时期间的最后,将反应混合物冷却至室温,转入分液漏斗中,用 200 ml 己烷提取。用 15 克 Na₂S₂O₅ 的 100 ml 水溶液洗涤有机相。将稀盐酸 (0.65 ml 浓 HCl 在 13 ml 水中) 加入到有机相中,并减压蒸馏 200 ml 溶剂。将残余的澄清溶液加热至 80℃的温度,保持 6 小时,蒸馏出 250 ml 额外体积的溶剂。用 100 ml 水和 10 ml 30% NaOH 溶液处理残余物,得到 12 的 pH 值。过滤沉淀的三苯基甲醇,并用 10 ml 水洗涤 4 次。用 50 ml 己烷和 50 ml 乙酸乙酯的混合物提取滤液,除去残余的三苯基甲醇及其它杂质。在水相中,用 8.45 ml (101.4 mmol) 浓盐酸将 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油的钠盐质子化。将得到的游离羧酸用 100 ml 己烷提取。蒸干,并与 100 ml 己烷共同蒸发,得到 27.00 克粗品 (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油。通过将粗品溶解在 7 ml 丙酮和 68 ml 己烷的混合物中,并冷却至 0℃,而使粗品进行结晶。过滤沉淀,用 7 ml 冷己烷洗涤两次,干燥。得到 20.90 克 (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油类白色固体。产率是 64.3%。

[0455] (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 15.0 克 (36.0 mmol) (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油溶解在 100 ml 甲醇中,并加入 3 ml 浓盐酸。将反应混合物在室温下搅拌过夜。加入三乙胺,直到反应混合物的 pH 值达到 7 为止。将溶液转入分液漏斗中,并用 200 ml 己烷提取两次。用水洗涤有机相。蒸干,并与 100 ml 己烷共同蒸发,得到 14.92 克 (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油。产率是 96.2%。

[0456] (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 2.88 克 (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油和 3 ml 三乙胺溶解在 30 ml THF 中。用 15 分钟的时间将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 2 ml POCl₃ 的 20 ml 四氢呋喃溶液中,同时搅拌。继续额外搅拌 10 分钟,同时冷却,并在室温下额外搅拌 45 分钟。将反应混合物进行冰冷却,并用 20 分钟的时间逐滴加入 1.21 ml 乙醇胺和 5.6 ml 三乙胺的 50 ml THF 溶液。继续搅拌 10 分钟,同时冷却,并在室温下过夜。过滤反应混合物,减压除去溶

剂。将得到的残余物溶解在 24 ml 乙酸和 10 ml 水的混合物中,并加热到 70℃,保持 1 小时。用 50 ml 氯仿提取混合物三次,用 50 ml 水洗涤有机相两次,减压除去溶剂,得到 4.0 克 (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺黄色蜡。

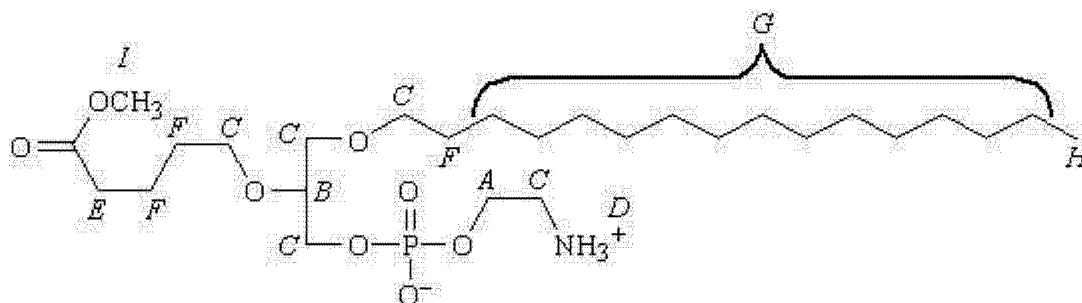
[0457] 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的 NMR 特征:

[0458] 将 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的样品溶解在氘化氯仿 (CDCl_3) 中。然后在 300 MHz 测定光谱。通过 ^1H 和 ^{13}C NMR 光谱两者来测定样品。

[0459] 结果显示了 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0460] 按照 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下。

[0461]



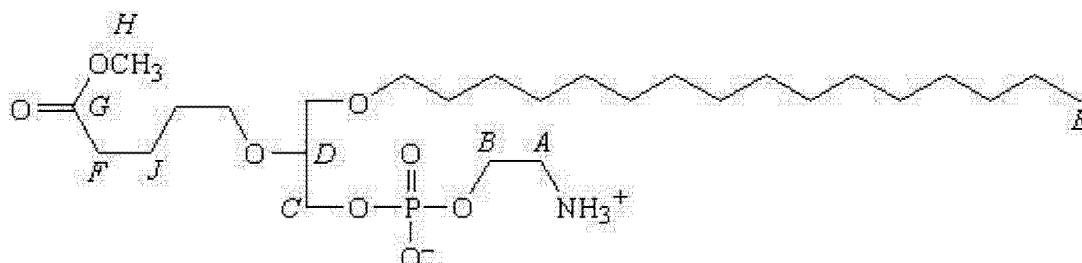
[0462] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 7.28 ppm)

[0463]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
6.905	3H, br, s	D
4.200	2H, br, s	A
3.594	3H, s	I
3.336 – 3.562	10H, m, 5xCH ₂	C
3.291 – 3.313	1H, m	B
2.250–2.299	2H, t, J=7.35Hz	E
1.454–1.620	6H, m, 3xCH ₂	F
1.185	26H, m, 13xCH ₂	G
0.807	3H, t, 1xCH ₃ , J=6.75Hz	H

[0464] 按照 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0465]



[0466] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 77.0 ppm)

[0467]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
174.08	G

79.00	D
72.01	
70.38	
70.13	
66.25-66.34	C
62.34-62.43	B
51.61	H
40.42-40.51	A
33.87	F
32.05	
29.81	
29.65	
29.47	
26.20	
22.77	
21.74	J
20.74	
14.00	E

[0468] 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征：

[0469] 对 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($C_{27}H_{56}NO_8P$) 的计算质量是 553.7092。

[0470] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI+-MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=554$ 的分子离子，相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$ 。由此，质谱与 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的化学结构一致。

[0471] (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-202) 的合成：将 3.5 克 (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 100 ml 8:2(v/v) 甲醇:10% 氢氧化钠溶液的混合物中。在室温下搅拌混合物 5 小时。通过加入磷酸二氢钠和甲酸，将反应的 pH 值调节至 4。加入水 (100 ml) 和氯仿 (100 ml)。提取之后，分离各相，从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中，用硫酸钠干燥，过滤，减压除去溶剂，得到 3.0 克粗品 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。将粗品用硅胶 (120 克) 色谱纯化。用氯仿:甲醇和水的混合物 (体积比 60:35:5) 洗脱产物。从含有期望产物的馏份中减压除去溶剂，将残余物溶解在氯仿中，用硫酸钠干燥，减压除去溶剂，得到 2.11 克纯 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺蜡。用五氧化二磷减压干燥该蜡。

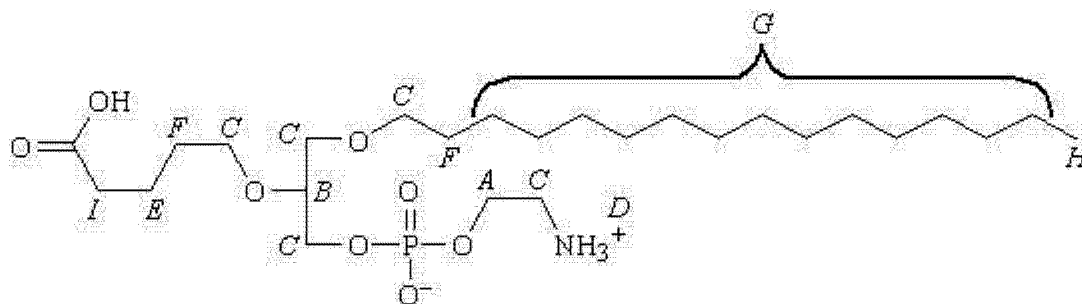
[0472] CI-202 的 NMR 特征：

[0473] 将 CI-202 的样品溶解在氘化氯仿 ($CDCl_3$) 中。然后在 300 MHz 测定光谱。通过 1H 和 ^{13}C NMR 光谱两者来测定样品。

[0474] 结果显示了 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-202) 的结构单元的预期信号，并由此完全支持该结构。

[0475] 按照 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 1H 峰的归属如下。

[0476]



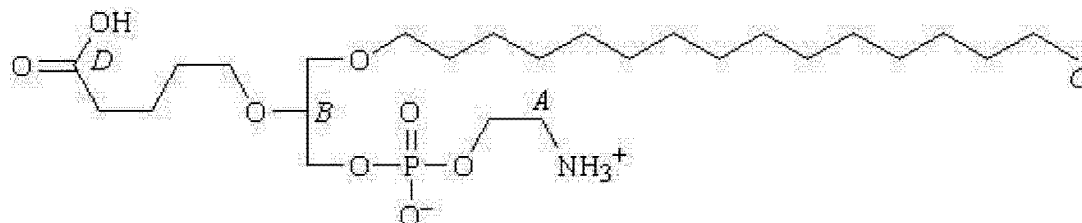
[0477] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.26 ppm)

[0478]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
8.140	3H, br, s	D
4.144	2H, br, s	A
3.838-4.037	2H, m	C
3.612-3.697	2H, m	C
3.385 — 3.530	6H, m, 3xCH ₂	C
3.256	1H, br, s	B
2.302-2.348	2H, t, CH ₂ , J=6.9Hz	I
1.672-1.710	2H, m	E
1.518-1.606	4H, m, 2xCH ₂	F
1.254	26H, m, 13xCH ₂	G
0.879	3H, t, 1xCH ₃ , J=6.75Hz	H

[0479] 按照 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下：

[0480]



[0481] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.004 ppm)

[0482]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
177.16	D
77.868	B
71.776	
70.218	
69.814	
66.161	
62.205	
40.533	A
33.818	
31.916	
29.714	
29.664	
29.549	
29.359	
29.156	

26.080	
22.679	
21.732	
14.109	C

[0483] *CI-202 的质谱特征：*

[0484] 对 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($C_{26}H_{54}NO_8P$) 的计算质量是 539.36。

[0485] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=538$ 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 $[M-H]^-$ 。由此, 该质谱与 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-202) 的化学结构一致。

[0486] *体外 IL12/23p40 生成：*

[0487] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-202 对 IL12/23 p40 的体外生成的影响。

[0488] 如图 1 所示, CI-202 以剂量依存方式抑制由骨髓所获得细胞生成 IL12/23 p40。

[0489] *IL12/23p40 mRNA 表达：*

[0490] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-202 对体外 IL12/23 p40 mRNA 表达的影响。

[0491] 如图 2 所示, 在整个测试期间 (给予 CI-202 之后 2-4 小时), CI-202 抑制 IL12/23 p40 mRNA 表达, 并且 CI-202 所产生的抑制可与 CI-201 所产生的相比拟。

[0492] *酪氨酸磷酸化作用：*

[0493] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-202 在初级巨噬细胞中对体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[0494] 如图 3 所示, 用 $10 \mu\text{g/ml}$ ($18.5 \mu\text{M}$) CI-202 处理, 可以诱导酪氨酸磷酸化作用, 而接触 $20 \mu\text{g/ml}$ ($37 \mu\text{M}$) CI-202, 导致磷酸酪氨酸水平降低。这些变化与 $10 \mu\text{g/ml}$ ($17 \mu\text{M}$) 和 $20 \mu\text{g/ml}$ ($34 \mu\text{M}$) 阳性对照 CI-201 分别引起的效果非常相似。

[0495] *CI-202 的毒性：*

[0496] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 评价 CI-202 的毒性。

[0497] 如图 4A 和 4B 所示, 只在高于 $50 \mu\text{g/ml}$ 的剂量下检测到 CI-202 的显著毒性, CI-202 的 LD_{50} 位于 50 和 $100 \mu\text{g/ml}$ 之间。

[0498] *髓鞘质少突神经胶质细胞糖蛋白 (MOG) 引起的实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 的发展：*

[0499] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 在小鼠中, 测定 CI-202 对体内髓鞘质少突神经胶质细胞糖蛋白 (MOG) 引起的实验性自身免疫脑脊髓炎 (EAE) 的影响。

[0500] 如图 5 所示, 给予 4 mg/kg 的 CI-202 可以延迟疾病发作, 并且降低 EAE 的临床表现。

[0501] *胶原引起的关节炎 (CIA) 的发展：*

[0502] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 在小鼠中, 测定 CI-202 对体内胶原引起的关节炎的发展的影响。

[0503] 如图 6 所示, 在整个研究期间, 给予 0.4 mg/kg 的 CI-202 显著地降低关节炎严重程度。相对于对照小鼠, 峰值关节炎临床评分降低 42%。

[0504] 实施例 2

[0505] 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-203)

[0506] 按照下文所描述方法,合成 (R)-1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸,使用 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法,合成 (S)-1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸,但用 (S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[0507] (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油的合成:按照实施例 1 所述,制备 (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油,其使用 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇,首先制备 (S)-1-十六烷基-甘油。

[0508] (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-3-三苯甲基-甘油的合成:将 5 克 (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油和 2 mL 7-溴-庚酸乙酯溶解在 70 mL 苯中。加入 23 克粉末 KOH,并将反应混合物回流搅拌 14 小时,同时通过共沸蒸馏除去反应中形成的水。将反应混合物冷却至室温,用 70 mL 水洗涤三次,并用硫酸钠干燥。减压除去溶剂,将得到的残余物溶解在 25 mL 热己烷中,并将溶液冷却至 4°C 过夜。过滤沉淀的副产物,减压除去溶剂,得到 5 克 (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-3-三苯甲基-甘油白色固体。

[0509] (S)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-甘油的合成:将 5 克 (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-3-三苯甲基-甘油溶解在 90 mL 乙醇中。慢慢地加入 20 mL 浓盐酸,并将混合物搅拌和回流 4 小时。将反应混合物冷却至室温,倾倒在冰上,用 100 mL 二乙醚提取三次。用 100 mL 水、100 mL 饱和碳酸氢钠溶液洗涤有机相,再次用 100 mL 水洗涤,用硫酸钠干燥。过滤硫酸钠后,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在热正己烷中,然后将混合物在 4°C 保持过夜。过滤沉淀后,减压除去溶剂,得到 3.1 克黄色油。用硅胶柱 (140 克) 色谱纯化残余物。用 300 mL 的 CHCl_3 :乙酸乙酯 (6:4 v/v) 洗脱产物。减压除去溶剂,得到 1.34 克无色油。在减压下用五氧化二磷干燥,得到 (S)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-甘油无色固体。

[0510] (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 1.34 克 (S)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-甘油和 1.2 mL 三乙胺溶解在 15 mL THF 中。在 15 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 0.8 mL POCl_3 的 10 mL THF 溶液中。在冷却下,将该溶液额外搅拌 10 分钟,并在室温下额外搅拌 45 分钟。将反应混合物在冰中冷却,并用 15 分钟的时间逐滴加入 0.52 mL 乙醇胺和 2.4 mL 三乙胺的 25 mL THF 溶液。继续搅拌反应混合物 10 分钟,同时在冰浴中冷却,而后在室温下过夜。过滤反应混合物,并减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 24 mL 乙酸和 10 mL 水的混合物中,而后加热到 70°C 的温度,保持 1 小时。然后用 50 mL 氯仿提取混合物三次,并用 50 mL 水洗涤两次。减压除去溶剂,得到 1.87 克 (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺黄色油。

[0511] (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成:将 1.87 克 (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 50 mL 异丙醇和 18 mL 二氯甲烷的混合物中。用 5 分钟的时间逐滴加入 2.17 克碳酸钾的 10 mL 水溶液,同时在 35-40°C 的温度下保持反应。在 40°C 的温度下,用 10 分钟时间逐滴加入 1.52 mL 硫酸二甲酯的 10 mL 异丙醇溶液。在 40°C 的温度下保持反应 90 分钟,而后加入

水,并用 50 ml 氯仿提取该混合物两次。用 50 ml 水洗涤有机相,减压除去溶剂,得到 1.8 克 (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸蜡。

[0512] (R)-1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-203) 的合成: 将 1.8 克 (R)-1-十六烷基-2-(6-乙基羧基)己基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸溶解在 50 ml 甲醇中。加入 10% 氢氧化钠溶液,并在室温下搅拌反应混合物 5 小时。通过加入磷酸二氢钠将反应的 pH 值调节至 4-5 的范围。加入 70 ml 水和 70 ml 氯仿。分离水和有机相,并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,过滤,减压除去溶剂,得到 1.29 克白蜡。用硅胶 (62 克) 色谱纯化残余物。用 CHCl_3 :甲醇:水 (体积比 60:35:5) 洗脱产物。减压除去溶剂之后,将残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,减压除去溶剂,得到 1.0 克 (R)-1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸白蜡。

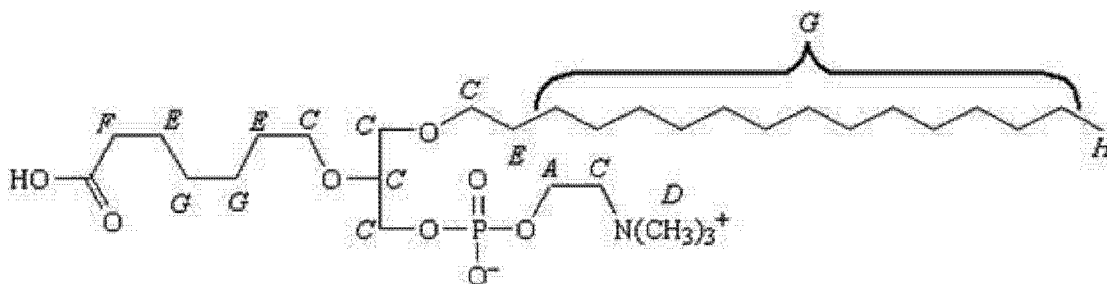
[0513] 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征:

[0514] 将样品溶解在氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 300 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱。

[0515] 结果显示了 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0516] 按照 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0517]

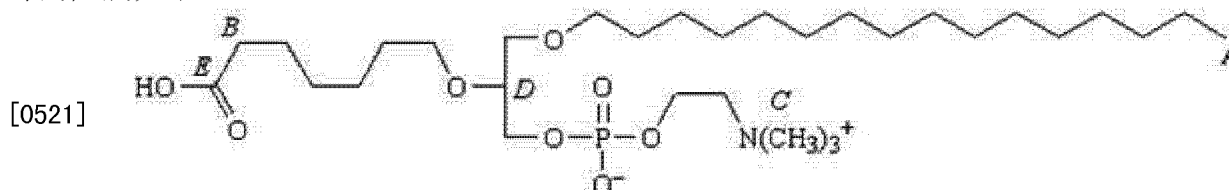


[0518] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.260 ppm)

[0519]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.279	2H, br, s	A
3.375-3.539	11H, m, $5 \times \text{CH}_2 + \text{CH}$	C
3.242	9H, s, $3 \times \text{CH}_3$	D
2.302	2H, t, CH_2 , $J=6.15\text{Hz}$	F
1.543-1.556	6H, m	E
1.256-1.374	30H, m, $15 \times \text{CH}_2$	G
0.879	3H, t, $1 \times \text{CH}_3$, $J=6.75\text{Hz}$	H

[0520] 按照 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:



[0522] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.002 ppm)

[0523]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
176.60	E
78.166	D
71.749	
70.368	
70.116	
65.972	
59.777	
54.390	C
34.120	B
31.925	
29.732	
29.597	
29.526	
29.368	
28.412	
26.109	
25.373	
24.665	
22.685	
14.111	A

[0524] 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的质谱特征:

[0525] 对 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸 ($C_{31}H_{64}NO_8P$) 的计算质量是 609.82。

[0526] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=609$ 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 $[M-H]^-$ 。由此, 该质谱与 1-十六烷基-2-(6-羧基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[0527] 体外 IL12/23 p40 生成:

[0528] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-203 对 IL12/23 p40 的体外生成的影响。

[0529] 如图 7 所示, CI-203 以剂量依存方式抑制由骨髓所获得细胞生成 IL12/23 p40。

[0530] 酪氨酸磷酸化作用:

[0531] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-203 对在骨髓所获得细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。测试 CI-203 的 R 对映体和外消旋 CI-203 两者。CI-201 的 R 对映体和 S 对映体两者用作对照物。

[0532] 如图 8 所示, 用 $20 \mu\text{g/ml}$ ($33 \mu\text{M}$) (R)-CI-203 和外消旋 CI-203 两者处理, 可以导致磷酸酪氨酸水平降低, 而用 $1 \mu\text{g/ml}$ ($1.7 \mu\text{M}$) CI-203 处理则没有明显的影响。(R)-CI-203 和外消旋 CI-203 的影响与 CI-201 的 R 和 S 对映体两者所引发的影响相似。

[0533] CI-203 的毒性:

[0534] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 评价 CI-203 的毒性。

[0535] 如图 9A 和 9B 所示, 只在高于 $100 \mu\text{g/ml}$ 的剂量时观察到 CI-202 的显著毒性, CI-203 的 LD_{50} 位于 50 和 $100 \mu\text{g/ml}$ 之间。

[0536] 实施例 3

[0537] 1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-209)

[0538] 按照下文所描述的方法,使用 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料,合成 (R)-1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。使用相同的方法,合成 (S)-1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸,但用 (S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[0539] (S)-1-十二烷基-甘油的合成:将 11 克 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、20.6 克粉末氢氧化钾和 24.08 克十二烷基溴在 300 ml 苯中搅拌并回流 14 小时,同时共沸蒸馏除去所形成的水。然后将反应混合物冷却至室温,并加入 150 ml 水。然后用 150 ml 甲基叔丁基醚 (MTBE) 提取反应混合物三次,用 100 ml 水洗涤合并的有机相,然后减压除去溶剂,得到 29.71 克浅棕色油。将该残余物溶解在 100 ml 甲醇中。加入 6 ml 浓盐酸,并将得到的溶液回流,直到得到澄清溶液为止,而后冷却至室温,加入 100 ml 水。用 150 ml 氯仿提取产物,连续地用 150 ml 水、150 ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤,并再次用 150 ml 水洗涤。用无水 Na_2SO_4 干燥溶剂,过滤,减压除去,得到 23.77 克粗品。在 4℃ 用 200 ml 己烷将粗品再结晶,得到 19.83 克纯 (S)-1-十二烷基-甘油白色晶体。

[0540] (R)-1-十二烷基-3-三苯甲基-甘油的合成:将 19.83 克 (S)-1-十二烷基-甘油和 21.0 克三苯基氯甲烷加入到 250 ml 干燥四氢呋喃 (THF) 和 60 ml 干燥乙腈的混合物中。加入 22 ml 干燥三乙胺,并在氮气氛围中将反应混合物回流 17 小时。然后将反应混合物冷却至室温,加入 5 ml 三乙胺和 10 克冰。将混合物转入分液漏斗中,并用 100 ml MTBE 提取。连续地用 150 ml 水、150 ml 稀 (1.5%) H_2SO_4 、150 ml 水、150 ml 浓碳酸氢钠水溶液洗涤,并再次用 150 ml 水洗涤。然后用无水 Na_2SO_4 干燥溶液,减压除去溶剂。将残余物 (40.63 克棕色油) 溶解在 200 ml 乙酸乙酯中,并冷却至 -20℃,保持几天。将混合物在 -10℃ 的温度下离心,并倾倒掉母液。将固体在室温下熔融,并通过硅胶柱 (195 克) 色谱纯化。用氯仿和己烷的混合物、而后 9:1 (v/v) 氯仿:乙酸乙酯的混合物洗脱出 18.57 克纯 (R)-1-十二烷基-3-三苯甲基-甘油。产率是 48.5%。

[0541] (S)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-甘油的合成:将 18.57 克 (R)-1-十二烷基-3-三苯甲基-甘油、4 ml 的 6-溴-1-己烯和 22.57 克粉末氢氧化钾在 100 ml 苯中搅拌并回流 9 小时,同时共沸蒸馏除去形成的水。将反应混合物冷却至室温,加入 100 ml 水,并将溶液转入分液漏斗中。用 50 ml 二乙醚提取溶液四次,从合并的有机相中减压除去溶剂,得到 19.31 克残余物。将残余物溶解在 100 ml 甲醇中,然后加入 6ml 浓 HCl (37%)。将反应混合物回流 4 小时,冷却至室温,并在此温度下搅拌 96 小时。通过减压除去溶剂,将反应混合物浓缩至大约 50 ml,并加入 50 ml 水。将溶液转入分液漏斗中,并用 100 ml MTBE 提取两次。然后减压除去溶剂。将残余物 (18.85 克) 溶解在己烷中,并将得到的溶液在冰浴中冷却 30 分钟。过滤沉淀,用冷己烷洗涤,并从滤液中减压除去溶剂。将残余物 (15.23 克) 再次溶解在热己烷中,并冷却至 4℃ 过夜。过滤并从滤液中除去溶剂后,用硅胶 (77.34 克) 色谱纯化滤液。用氯仿和乙酸乙酯的 1:1 (v/v) 混合物进行洗脱,而后用纯氯仿洗脱,然后用含有 3% 丙酮的氯仿洗脱。得到 10.03 克纯 (S)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-甘油。产率是 78.1%。

[0542] (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 5.75 克 (S)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油 (在干燥器中用 P_2O_5 干燥) 和 3.11 ml 三乙

胺溶解在 50 ml THF 中。在 30 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 1.7 ml POCl_3 的 20 ml THF 溶液中。在冷却下,继续额外搅拌 30 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。然后将反应混合物在冰浴中冷却,然后用 15 分钟的时间逐滴加入 1.3 ml 乙醇胺和 3.3 ml 三乙胺的 30 ml THF 溶液。在冰浴中,继续搅拌 30 分钟,而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,并从滤液中减压除去溶剂。将残余物溶解在 36 ml 乙酸和 15 ml 水的混合物中,并加热到 70°C ,保持 1 小时,冷却至室温。用 50 ml 氯仿:甲醇的 2:1(v/v) 混合物提取溶液两次,用稀碳酸氢钠溶液洗涤,减压除去溶剂,得到 8.54 克粗品。用硅胶(55 克)色谱纯化该粗品。用氯仿、而后用氯仿与 2.5%-40% 甲醇的混合物洗脱出 4.99 克纯 (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。产率是 63.85%。

[0543] (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成:将 4.99 克 (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 35 ml 甲醇和 100 ml 二氯甲烷的混合物中。加入 10 克碳酸钾的 20 ml 水溶液。然后在 1 小时期间内逐滴加入 2.5 ml 硫酸二甲酯,并在室温下将反应搅拌过夜。用薄层色谱测定,在反应混合物中还有一些起始原料。加入额外 1 ml 的硫酸二甲酯,并将反应混合物加热至 40°C ,保持 5 小时。然后将反应混合物冷却至室温,加入 100 ml 水,而后用 100 ml 氯仿:甲醇的 2:1(v/v) 混合物提取混合物三次。从有机相中减压除去溶剂,得到 5.8 克粗品 (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。

[0544] (R)-1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-209)的合成:将 2.76 克碳酸氢钠加入到 5.18 克 (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的 100 ml 水溶液中。然后加入 20.4 克高碘酸钠的 100 ml 水溶液。将 270 mg 高锰酸钾的 82 ml 水溶液放在滴液漏斗中,需要逐滴加入,以保持反应混合物的粉红色。在反应期间,总共加入 58 ml 高锰酸盐溶液。在室温下搅拌反应混合物过夜。通过加入 20 克磷酸二氢钠、而后 3 ml 80% 磷酸,将反应的 pH 值调节至大约 4。用 50 ml 氯仿:甲醇的 2:1 混合物提取反应混合物三次,并从有机相中减压除去溶剂。将残余物溶解在氯仿中,并用水洗涤。用无水 Na_2SO_4 干燥有机溶液,减压除去溶剂,得到 4.89 克粗品。用硅胶(58.2 克)色谱纯化该粗品。用氯仿、而后用氯仿与 10%-60% 甲醇的混合物洗脱出 1.81 克纯 (R)-1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。产率是 33.76%。

[0545] 合成 CI-209 的另外的合成途径进行如下:

[0546] (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-3-乙酰基-甘油的合成:将按照上文所描述方法制备的 (R)-1-十二烷基-3-三苯甲基-甘油(67 克)、6-溴-1-己烯(26.14 克)和粉末 KOH(35 克)在苯(200 ml)中搅拌并回流 9 小时,同时共沸蒸馏除去形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 100 ml。将反应混合物冷却至室温,加入水(150 ml)。将溶液转入分液漏斗中,并用二乙醚(3x150 ml)提取。将合并的有机相用水(3x150 ml)洗涤,而后减压除去溶剂。将残余物(78 克)溶解在乙酸(200 ml)中,并在冰浴中冷却该溶液。向该冷却溶液中加入 40 ml 乙酸酐(40 ml)和 1 ml 70% 高氯酸的混合物。使反应混合物达到室温,而后在室温下搅拌过夜。加入冰,而后加入二乙醚(400 ml)和水(400 ml)。分离有机相,并减压除去溶剂。将残余物溶解在热己烷中,并在 4°C 的温度下保存该溶液过夜。过滤沉淀的副产物,并从滤液中减压除去溶剂,得到 55 克油状褐色产物。用硅胶柱(350 克)色谱纯化粗品。用氯仿:己烷的 1:1(v/v) 混合物(1500 ml)、而后氯仿(1500 ml)洗脱出

纯 (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-3-乙酰基-甘油。从含有产物的馏份中除去溶剂,得到 52 克产物。

[0547] (S)-1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油的合成:将高碘酸钠(150 克)、高锰酸钾(2.5 克)和碳酸氢钠(10 克)悬浮在水(500 ml)中。用 1 小时将 (R)-1-十二烷基-2-(5'-己烯基)-3-乙酰基-甘油(52 克)的叔丁醇(500 ml)溶液加入到该水悬浮液中,然后在室温下搅拌反应混合物过夜。通过硅藻土垫过滤混合物,将其进一步用叔丁醇洗涤。用己烷(3x100 ml)提取该溶液。用亚硫酸氢钠水溶液(15 克,在 100 ml 水中)、而后用水(100 ml)洗涤合并的有机相两次。减压浓缩溶剂,用 100 ml 水和 10ml 30% NaOH 处理,达到 12 的 pH 值。在室温下搅拌该混合物过夜。用己烷:MTBE 的 8:2(v/v) 混合物(200ml)提取该混合物,以便除去残余杂质。用 HCl(6 ml)将该碱性水溶液酸化至 pH1,而后用己烷:乙酸乙酯的 7:3(v/v) 混合物(3 x 100 ml)提取。用硫酸钠干燥合并的有机相,减压除去溶剂。用硅胶柱(500 克)色谱纯化残余物(30 克黄色油)。用氯仿:己烷的 1:1(v/v) 混合物(1000 ml)、而后用氯仿(1000 ml)、而后用氯仿:乙酸乙酯的混合物(9:1 至 1:1, v/v)洗脱出纯 (S)-1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油。从含有产物的馏份中除去溶剂,得到 13.4 克产物。

[0548] (S)-1-十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 (S)-1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油(13.38 克)溶解在 100 ml 甲醇中,并加入 2 ml 浓盐酸。在室温下搅拌反应混合物 5 小时。加入水(50 ml),并将该溶液转入分液漏斗中,用氯仿(3 x 100 ml)提取。将合并的有机相用水(100 mL)、浓碳酸氢钠(100 mL)洗涤,并再次用水(100 ml)洗涤。用无水 Na₂SO₄ 干燥,减压蒸发溶剂,得到 13.9 克粗品残余物。用硅胶柱(200 克)色谱纯化残余物。用氯仿、而后用氯仿:乙酸乙酯的混合物(9:1 至 7:3, v/v)洗脱出纯 (S)-1-十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油。从含有产物的馏份中除去溶剂,得到 10.7 克纯产物。

[0549] (R)-1-十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成:将 10.7 克 (S)-1-十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油(通过与苯共沸蒸馏来进行干燥)和 5.2 ml 干燥三乙胺溶解在 THF(50 ml)中。在 90 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 POCl₃(3.2 ml)的 50 ml THF 溶液中,同时搅拌。在冷却下,继续额外搅拌 15 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。然后将反应混合物在冰浴中冷却,然后用 60 分钟时间逐滴加入乙醇胺(22 ml)和三乙胺(7.2 ml)的 50 ml THF 溶液,同时搅拌。在冰浴中,继续搅拌 30 分钟,而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,并从滤液中减压除去溶剂。将残余物(14 克黄色油)溶解在乙酸(120 ml)和水(50 ml)的混合物中,加热到 70℃,保持 1 小时,并冷却至室温。用氯仿:甲醇的 2:1(v/v) 混合物(3 x 100 ml)提取溶液,用水(2 x 100 ml)洗涤合并的有机相,减压除去溶剂,得到 15 克 (R)-1-十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺橙色油。将 (R)-1-十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(14 克)溶解在异丙醇(100 ml)和二氯甲烷(55 ml)的混合物中。逐滴加入碳酸钾(22 克)的水(100 ml)溶液,同时保持反应混合物在 35-40℃。在 40℃,逐滴加入硫酸二甲酯(14 ml)的异丙醇(50 ml)溶液。在 40℃ 搅拌混合物 2 小时,冷却至室温,并在室温下搅拌过夜。加入水(80 ml),并用氯仿(3 x 100 ml)提取混合物。用水(100 ml)洗涤合并的有机相,减压除去溶剂,得到粗品 (R)-1-十二烷基-2-(4-甲基

羧基) 丁基 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸 (14.6 克) 橙色蜡。

[0550] (R)-1- 十二烷基 -2-(4- 羧基) 丁基 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸 (CI-209) 的合成: 将 (R)-1- 十二烷基 -2-(4- 甲基羧基) 丁基 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸 (14.6 克) 溶解在 8:2(v/v) 甲醇:10% NaOH 溶液 (100 ml) 中, 并在室温下搅拌反应混合物 5 小时。通过加入磷酸二氢钠和甲酸, 将反应的 pH 值调节至 5。加入水 (150 ml)、氯仿 (150 ml) 和甲醇 (50 ml)。分离水和有机相, 并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中, 用硫酸钠干燥, 过滤, 减压除去溶剂, 得到 15 克蜡。用硅胶 (224 克) 色谱纯化该蜡。用氯仿 (600 ml)、而后用氯仿: 甲醇的 8:2(v/v) 混合物 (600 ml)、而后用氯仿: 甲醇: 水的混合物 (60:35:5, v/v) 洗脱产物。从含有所需要的产物的馏份中减压除去溶剂之后, 将残余物溶解在氯仿中, 用硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 得到 10.5 克 (R)-1- 十二烷基 -2-(4- 羧基) 丁基 -sn- 甘油基 -3- 胆碱磷酸白蜡。

[0551] 1- 十二烷基 -2-(4- 羧基) 丁基 - 甘油基 -3- 胆碱磷酸的 NMR 特征:

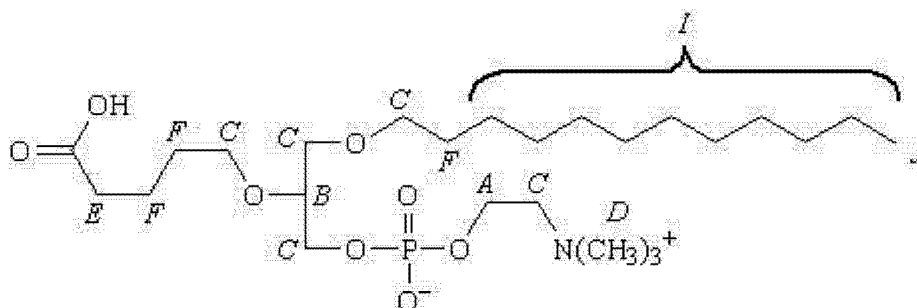
[0552] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 300 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱。

[0553] 结果显示了 1- 十二烷基 -2-(4- 羧基) 丁基 - 甘油基 -3- 胆碱磷酸的结构单元的预期信号, 并由此完全支持该结构。

[0554] 按照 1- 十二烷基 -2-(4- 羧基) 丁基 - 甘油基 -3- 胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0555] ^1H NMR

[0556]



[0557] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.282 ppm)

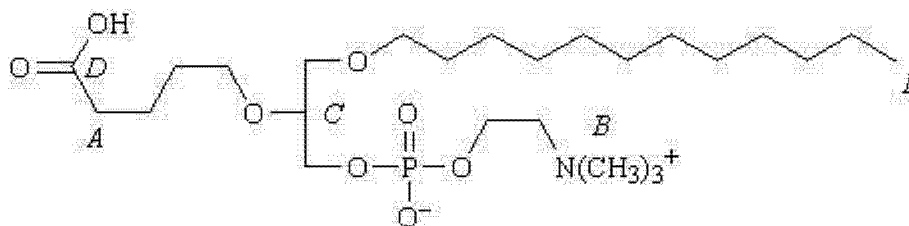
[0558]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.264	2H, br, s	A
3.775	1H, m	B
3.381 — 3.671	10H, m, $5 \times \text{CH}_2$	C
3.251	9H, s, $3 \times \text{CH}_3$	D
2.261	2H, t,	E
1.535 — 1.582	6H, m $3 \times \text{CH}_2$	F
1.258	18H, m, $9 \times \text{CH}_2$	I
0.880	3H, t, $1 \times \text{CH}_3$, $J=6.6\text{Hz}$	J

[0559] 按照 1- 十二烷基 -2-(4- 羧基) 丁基 - 甘油基 -3- 胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0560] ^{13}C NMR

[0561]



[0562] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)=78.020 ppm)

[0563]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
178.51	D
78.446	C
72.200	
70.535 – 70.642	
66.805 – 66.812	
65.997 – 66.070	
59.515 – 59.580	
54.419	B
35.578	A
32.310	
30.015	
29.892	
29.730	
26.449	
23.037	
22.685	
14.224	E

[0564] 1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的质谱特征：

[0565] 对 1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 ($\text{C}_{25}\text{H}_{52}\text{NO}_8\text{P}$) 的计算质量是 525.3431。

[0566] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=524$ 的分子离子，相当于去质子化的分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。由此，该质谱图与 1-十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[0567] 体外 IL12/23 p40 生成：

[0568] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容，测定 CI-209 对 IL12/23 p40 的体外生成的影响。

[0569] 如图 10 所示，CI-209 以剂量依存方式抑制由骨髓所获得细胞生成 IL12/23 p40。

[0570] 酪氨酸磷酸化作用：

[0571] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容，测定 CI-209 对原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[0572] 如图 11 所示，用 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的 CI-209 处理，可以导致磷酸酪氨酸水平提高，而用 $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ 的 CI-201 处理，导致磷酸酪氨酸水平降低。

[0573] CI-209 的毒性：

[0574] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容，评价 CI-209 的毒性。

[0575] 如图 9A 和 9B 所示，在进行两个实验中，在任何试验剂量下没有观察到 CI-209 的毒性。由此，CI-209 的 LD_{50} 超过 $150\text{ }\mu\text{g/ml}$ ($286\text{ }\mu\text{M}$)。

[0576] 实施例 4

[0577] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸 (CI-210)

[0578] 按照下文所描述方法合成 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸, 使用 (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺作为起始原料。使用相同的方法合成 (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸, 但用 (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺作为起始原料。

[0579] 在上文实施例 1 中描述了 (R)-和 (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成。

[0580] 将 1.85 克 (3.33 mmol) (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 175 ml 二氯甲烷中, 并加入 1.39 ml 三乙胺。在 15 分钟期间内将该溶液逐滴加入到 0.42 克戊二酐的 175 ml 二氯甲烷溶液中。加入完成之后, 在室温下搅拌反应混合物 1 小时。加入 20 克磷酸氢二钠的 100ml 水溶液, 并大力搅拌反应混合物 20 分钟。将反应混合物转入分液漏斗中, 分离各相, 并用 100 ml 氯仿提取水相两次。用无水 Na_2SO_4 干燥合并的有机相, 减压除去溶剂。得到 1.16 克粗品, 用硅胶 (60 克) 纯化。用 200 ml 氯仿、而后用氯仿: 甲醇的混合物 (比例 9:1、8:2 和 7:3 (v/v))、而后用 200 ml 氯仿: 甲醇 (1:1 体积比) 从柱中洗脱出产物。从含有产物的馏份中减压除去溶剂, 将残余物溶解在氯仿中, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 减压除去溶剂, 得到 131.4 mg 纯 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸 (CI-210) 类白色蜡。

[0581] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸的 NMR 特征:

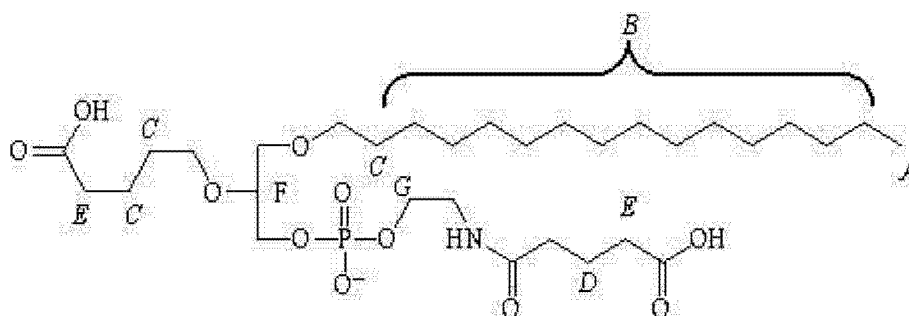
[0582] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 300 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱。

[0583] 结果显示了 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸的结构单元的预期信号, 并由此完全支持该结构。

[0584] 按照 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0585] ^1H NMR

[0586]

[0587] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.28 ppm)

[0588]

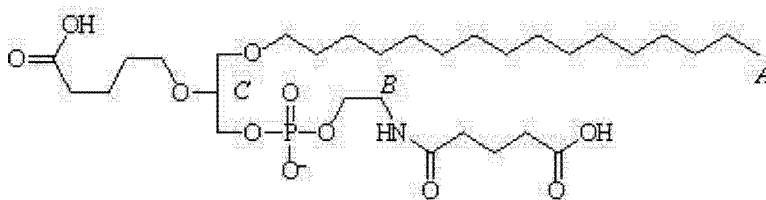
δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
3.945	2H, br, s	G
3.896	1H, br, s	F

3.585 — 3.608	4H, m, 2xCH ₂	
3.385 — 3.431	4H, m, 2xCH ₂	
3.058 — 3.130	2H, m, CH ₂	
2.332	4H, m, 2xCH ₂	E
1.933	2H, m, CH ₂	D
1.533 — 1.673	6H, m, 3xCH ₂	C
1.255	26H, m, 13xCH ₂	B
0.879	3H, t, 1xCH ₃ , J=6.45Hz	A

[0589] 按照 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸的结构所观察到的 ¹³C 峰的归属如下：

[0590] ¹³C NMR

[0591]



[0592] ¹³C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl₃) = 77.062 ppm)

[0593]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
177.78	
177.37	
174.31	
78.656	C
71.836	
70.343	
69.841	
65.463 — 65.790	
64.541 — 64.861	
45.732	B
35.075	
33.872	
33.213	
31.951	
30.938	
29.748	
29.698	
29.572	
29.391	
29.084	
26.142	
22.710	
21.566	
20.985	
14.128	A

[0594] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸的质谱特征：

[0595] 对 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸 (C₃₁H₅₉NO₁₁P) 的计算质量是 652.7746。

[0596] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=652$ 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 $[M-H]^-$ 。由此, 该质谱与 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺-N-戊二酸 (CI-210) 的化学结构一致。

[0597] 体外 IL12/23 p40 生成:

[0598] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-210 对 IL12/23 p40 的体外生成的影响。

[0599] 如图 13 所示, CI-210 以剂量依存方式抑制由骨髓所获得细胞生成 IL12/23 p40。

[0600] 酪氨酸磷酸化作用:

[0601] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-210 对在原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[0602] 如图 14 所示, 用 $20 \mu\text{g/ml}$ 的 CI-210 处理, 可以导致磷酸酪氨酸水平提高, 而用 $20 \mu\text{g/ml}$ 的 CI-201 处理, 导致磷酸酪氨酸水平降低。

[0603] CI-210 的毒性:

[0604] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 评价 CI-210 的毒性。

[0605] 如图 15A 和 15B 所示, 在 $100 \mu\text{g/ml}$ ($156.6 \mu\text{M}$) 的剂量下或更高的剂量下观察到 CI-210 的显著毒性, CI-210 的 LD_{50} 是大约 $150 \mu\text{g/ml}$ ($235 \mu\text{M}$)。

[0606] 实施例 5

[0607] 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-216) 和 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-215)

[0608] 按照下文所描述的方法, 合成 (R)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和 (R)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸, 使用 (R)-(-)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法, 合成 (S)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺和 (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸, 但用 (S)-(+)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[0609] (S)-1-十八烷基-甘油的合成: 将 20 ml (R)-(-)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、27 克粉末氢氧化钾和 59 克 1-溴十八烷在 250 ml 苯中搅拌并回流 6 小时, 同时共沸蒸馏除去形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 200 ml 。然后将反应混合物冷却至室温, 并在此温度下搅拌过夜。加入 200 ml 水, 用 200 ml 二乙醚提取反应混合物两次, 并用 200 ml 水洗涤合并的有机相, 然后减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 100 ml 90:10:5(v/v) 甲醇:水:浓盐酸的混合物中, 并将得到的溶液回流 1 小时, 而后冷却至室温, 加入 200 ml 水。用 200 ml 氯仿提取产物两次, 连续地用 200 ml 水、 200 ml 饱和碳酸钠水溶液洗涤, 并再次用 200 ml 水洗涤。然后减压除去溶剂, 并用 500 ml 己烷将粗品结晶, 得到 39.5 克纯 (S)-1-十八烷基-甘油, 在减压下, 将其在干燥器中用氧化磷干燥。

[0610] (R)-1-十八烷基-3-三苯甲基-甘油的合成: 将 39 克 (113 mmol) (S)-1-十八烷基-甘油和 40 克 (137 mmol) 三苯基氯甲烷加入到 500 ml 干燥 THF 和 130 ml 干燥乙腈的混合物中。加入 32 ml 干燥三乙胺, 并将反应混合物回流 17 小时。然后将反应混合物冷却至室温, 倾倒在冰 (1 kg) 上, 转入分液漏斗中, 并用 200 ml 二乙醚提取两次。连续地用 200 ml 水、 100 ml 稀 (1.5%) H_2SO_4 (两次)、 200 ml 水、 200 ml 浓碳酸氢钠水溶液洗涤, 并

再次用 200 ml 水洗涤。然后用无水硫酸钠干燥溶液,减压除去溶剂。将残余物(棕色油)溶解在 250 ml 乙酸乙酯中,并冷却至 -20°C 过夜。在 -10°C 的温度下将混合物离心(每分钟转数 3,500 转 (3500RPM)),然后倾倒掉母液。将残余固体溶解在己烷中,并冷冻 ($5\pm 3^{\circ}\text{C}$) 过夜。过滤沉淀,得到 50 克纯 (R)-1-十八烷基-3-三苯甲基-甘油。

[0611] (R)-1-十八烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油的合成:将 50 克 (89.2 mmol) (R)-1-十八烷基-3-三苯甲基-甘油和 18 克 (102 mmol) 5-己烯基-1-甲磺酸酯溶解在 150 ml 苯中。加入 20 克粉末 KOH,并将反应混合物搅拌和回流 6 小时,同时通过共沸蒸馏除去反应中形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 50 ml。将反应混合物冷却至室温,并加入 200 ml 水。用 200 ml 二乙醚提取混合物三次,用 200 ml 水洗涤合并的有机相三次,减压除去溶剂,得到 50 克 (R)-1-十八烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油橙色油。

[0612] (S)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油的合成:将 145 克 NaIO_4 溶解在 500 ml 水中。向此溶液中加入 14 克 K_2CO_3 和 2.4 克 KMnO_4 ,并将该悬浮液加热至 40°C 的温度。在 1.5 小时期间逐滴加入 50 克 (R)-1-十八烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油的 500 ml 叔丁醇溶液,并将该混合物额外加热 4 小时。根据需要加入额外量的 KMnO_4 溶液,保持粉红色。将反应混合物冷却至室温,并在此温度下搅拌过夜。以份额方式加入亚硫酸氢钠,直到粉红色以及而后的褐色消失,并且反应混合物变成黄色。在室温下搅拌此溶液 30 分钟之后,逐滴加入 100 ml 10% 硫酸,并将该溶液转入分液漏斗中,用 200 ml 己烷提取三次。用 15 克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的 100 ml 水溶液洗涤有机相两次,而后用 200 ml 水洗涤。通过减压除去大约 500 ml 溶剂,将有机相浓缩。向残余溶液中加入 15 ml 水和 1.5 ml 浓盐酸,并将得到的混合物回流 6 小时,然后冷却至室温,通过减压除去溶剂再次浓缩。通过加入 100 ml 水和 10 ml 30% NaOH 溶液,将残余物的 pH 值调节至 12。过滤沉淀,用 10 ml 水洗涤四次。用 100 ml 己烷:乙酸乙酯的 1:1(v/v) 混合物提取滤液。通过加入 8 ml 浓盐酸,将水相酸化至 pH1,而后用 100 ml 己烷提取。用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,在 $5\pm 3^{\circ}\text{C}$,用 1:9(v/v) 丙酮:己烷混合物将粗品重结晶过夜,得到 19 克纯 (S)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油类白色固体。

[0613] (S)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油的合成:将 17 克 (S)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油溶解在 100 ml 甲醇中。加入 2 ml 浓 HCl (37%),并在室温下搅拌反应混合物过夜。减压除去溶剂,并将 100 ml 水加入到所得到的残余物中。将混合物用 70 ml 氯仿提取三次。合并的有机相用 70 ml 水、70 ml 碳酸氢钠的浓缩液洗涤,并再次用 70 ml 水洗涤。然后用硫酸钠干燥溶液,过滤,减压蒸发,得到 14 克 (S)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油白蜡。

[0614] (R)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 7 克 (S)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油(通过与苯共沸蒸馏将其干燥)和 7 ml 三乙胺溶解在 60 ml THF 中。在 30 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 4.3 ml POCl_3 的 40 ml THF 溶液中。在冷却下,继续额外搅拌 15 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。然后将反应混合物在冰浴中冷却,然后用 30 分钟的时间逐滴加入 3 ml 乙醇胺和 13 ml 三乙胺的 60 ml THF 溶液。在冰浴中,继续搅拌 15 分钟,而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 72 ml 乙酸和 30 ml 水的混合物中,

并加热到 70℃ 的温度,保持 1 小时。用 80 mL 氯仿三次提取混合物,并用 100 mL 水洗涤两次。减压除去溶剂,得到 10 克 (R)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺黄色油。

[0615] (R)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-216) 的合成:将 3 克 (R)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 100 mL 甲醇:10% 氢氧化钠水溶液的 8:2(v/v) 混合物中,并在室温下搅拌反应混合物 5 小时。然后通过加入甲酸,将反应混合物的 pH 值调节至大约 4。然后加入 100 mL 水和 100 mL 氯仿。分离各相,并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,过滤,然后减压除去溶剂。用硅胶 (55 克) 色谱纯化得到的残余物 (3 克)。使用氯仿和己烷的混合物、而后用氯仿和甲醇的混合物和最终氯仿、甲醇和水的混合物从柱中洗脱出 760 mg 的 (R)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0616] 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的 NMR 特征:

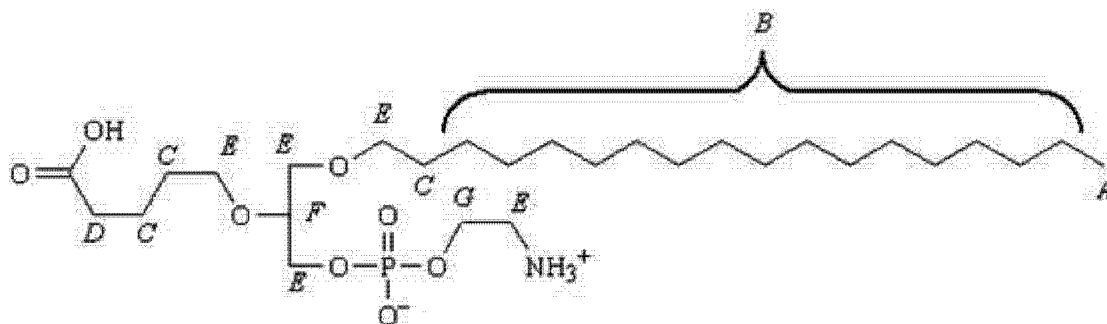
[0617] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 600 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱。

[0618] 结果显示了 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0619] 按照 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0620] ^1H NMR

[0621]



[0622] ^1H NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 7.341 ppm)

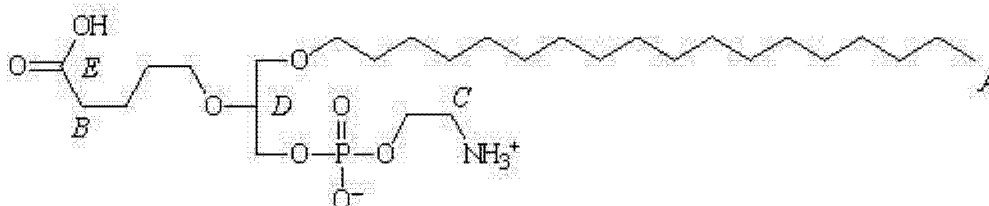
[0623]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.113	2H, brs	G
3.858	1H, m	F
3.670	2H, m, CH_2	E
3.614	2H, m, CH_2	E
3.562	2H, m, CH_2	E
3.480	2H, t, $J=5.7\text{Hz}$, CH_2	E
3.422	2H, m, CH_2	E
2.334	2H, t, $J=7.2\text{Hz}$, CH_2	D
1.692	2H, tt, $J=7.2\text{Hz}$, CH_2	C
1.604	2H, tt, $J=6.6\text{Hz}$, CH_2	C
1.545	2H, tt, $J=6.6\text{Hz}$, CH_2	C
1.259-1.312	30H, m, $15 \times \text{CH}_2$	B
0.881	3H, t, $J=7.2\text{Hz}$, CH_3	A

[0624] 按照 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的¹³C 峰的归属如下:

[0625] ¹³C NMR

[0626]



[0627] ¹³C NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl₃) = 77.281 ppm)

[0628]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
177.251	E
78.072	D
71.962	
70.306	
70.005	
66.007	
61.995	
40.537	C
34.061	B
32.030	
29.815	
29.764	
29.727	
29.645	
29.459	
29.314	
26.178	
22.778	
21.877	
14.140	A

[0629] 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征:

[0630] 对 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (C₂₈H₅₈NO₈P) 的计算质量是 567。

[0631] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 得到的质谱显示了具有 m/z=566 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 [M-H]⁻。正离子电喷雾离子化质谱 (ESI+-MS) 显示了具有 m/z=590 的分子离子, 相当于阳离子化分子离子 [M+Na]⁺。由此, 该质谱与 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-216) 的化学结构一致。

[0632] (R)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成: 将 6 克 (R)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 50 ml 异丙醇和 18 ml 二氯甲烷的混合物中, 并将该混合物加热到 35-40℃ 范围的温度。逐滴加入 7.5 克碳酸钾的 10 ml 水溶液, 同时保持温度在 35-40℃。然后在 40℃ 的温度下, 逐滴加入 5 ml 硫酸二甲酯的 10 ml 异丙醇溶液。将反应在 40℃ 保持 2 小时, 而后在室温下保持过夜。加入 100 ml 水, 而后用 100 ml 二氯甲烷提取混合物三次。用 100 ml 水洗涤有机相, 减压除

去溶剂,得到 6 克 (R)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸黄色油。

[0633] (R)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-215) 的合成: 将 6 克 (R)-1-十八烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸溶解在 100 ml 的 8:2(v/v) 甲醇:10% 氢氧化钠水溶液的混合物中,并在室温下搅拌反应混合物 5 小时。然后通过加入甲酸,将反应混合物的 pH 值调节至大约 4。然后加入 100 ml 水和 100 ml 氯仿。分离各相,并从有机相中减压除去溶剂。将残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,过滤,然后减压除去溶剂。用硅胶 (112 克) 色谱纯化得到的残余物 (5.3 克)。使用氯仿和己烷的混合物、而后用氯仿和甲醇的混合物、最后用氯仿、甲醇和水的混合物洗脱产物。从含有产物的馏份中减压除去溶剂,得到 2.8 克 (R)-1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-215) 白蜡。

[0634] 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征:

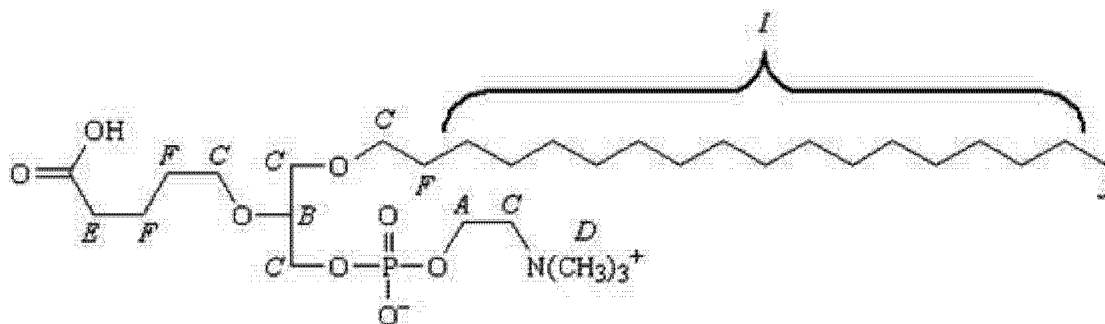
[0635] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 600 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱。

[0636] 结果显示了 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0637] 按照 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0638] ^1H NMR:

[0639]



[0640] ^1H NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 7.343 ppm)

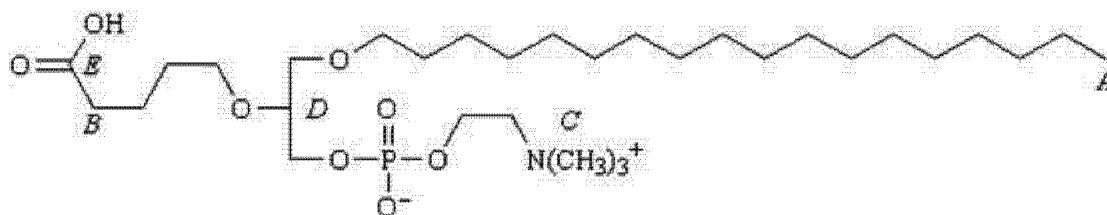
[0641]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.267	2H, br, s	A
3.775	1H, m	B
3.657	2H, m, CH_2	C
3.623	2H, m, CH_2	C
3.505 – 3.562	4H, m, CH_2	C
3.413	2H, m, CH_2	C
3.227	9H, s, $3 \times \text{CH}_3$	D
2.358	2H, dt, $J_1=7.2\text{Hz}$, $J_2=3\text{Hz}$	E
1.699	2H, tt CH_2	F
1.602	2H, tt CH_2	F
1.542	2H, tt CH_2	F
1.259 – 1.312	30H, m, $15 \times \text{CH}_2$	I
0.881	3H, t, $1 \times \text{CH}_3$, $J=7.2\text{Hz}$	J

[0642] 按照 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下：

[0643] ^{13}C NMR:

[0644]



[0645] ^{13}C NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 77.285 ppm)

[0646]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
176.580	E
78.216	D
71.936	
70.477	
69.961	
66.613	
65.926	
59.155	
54.424	C
34.117	B
32.026	
29.802	
29.767	
29.750	
29.717	
29.625	
29.452	
29.346	
26.164	
22.774	
22.073	
14.133	A

[0647] 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的质谱特征：

[0648] 对 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 ($\text{C}_{31}\text{H}_{64}\text{NO}_8\text{P}$) 的计算质量是 609。

[0649] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI+MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=610$ 的分子离子，相当于质子化的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。由此，该质谱与 1-十八烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-215) 的化学结构一致。

[0650] 体外 IL12/23 p40 生成：

[0651] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容，测定 CI-216 对 IL12/23 p40 的体外生成的影响。

[0652] 如图 16 所示，20 $\mu\text{g/ml}$ 的 CI-216 可以抑制由骨髓所获得细胞生成 IL12/23 p40。

[0653] 酪氨酸磷酸化作用：

[0654] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容,测定 CI-215 和 CI-216 对在原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[0655] 如图 17 所示,用 10 μ g/ml (17 μ M) 的 CI-215 处理,可以导致磷酸酪氨酸水平提高,而用 20 μ g/ml (34 μ M) 的 CI-215 处理,导致磷酸酪氨酸水平降低。

[0656] 类似地,如图 18 所示,用 10 μ g/ml (15 μ M) 的 CI-216 处理,可以诱导酪氨酸磷酸化作用,而接触 20 μ g/ml (30 μ M) 的 CI-216,导致磷酸酪氨酸水平降低。这些变化与用 10 μ g/ml (17 μ M) 和 20 μ g /ml (34 μ M) 阳性对照 CI-201 分别引起的效果非常相似。

[0657] 实施例 6

[0658] 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-206) 和 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-205)

[0659] 按照下文所描述的方法,合成 (R)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和 (R)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸,使用 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法,合成 (S)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺和 (S)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-胆碱磷酸,但用 (S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[0660] (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油的合成:按照实施例 1 所述,制备 (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油,首先制备 (S)-1-十六烷基-甘油,使用 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇。

[0661] (R)-1-十六烷基-2-(4'-戊烯基)-3-三苯甲基-甘油的合成:将 7.35 克 (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油和 1.87 ml 5-溴-1-戊烯溶解在 150 ml 苯中。加入 3 克粉末 KOH,并将反应混合物搅拌和回流 10 小时,同时共沸蒸馏除去所形成的水。蒸馏苯,直到几乎干燥为止。将反应混合物冷却至室温,加入 100 ml 二乙醚,用水 (3 x 50 ml) 洗涤该混合物,并用硫酸钠干燥。减压除去溶剂。将得到的残余物 (7.8 克) 溶解在 20 ml 己烷中,并冷却至 4°C 过夜。过滤除去沉淀的副产物,减压除去溶剂,得到 7.75 克产物黄色油。

[0662] (R)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-3-三苯甲基-甘油的合成:将 7.75 克 (R)-1-十六烷基-2-(4'-戊烯基)-3-三苯甲基-甘油溶解在 280 ml 叔丁醇中。加入 3.2 克碳酸钾的 90 ml 水溶液。然后加入 50 ml 34 克高碘酸钠在 250 ml 水中的溶液和 2 ml 470 mg 高锰酸钾在 10 ml 水中的溶液。搅拌该混合物,并在 10 分钟期间内加入高碘酸盐溶液的剩余部分。根据需要加入额外量的高锰酸盐溶液,以保持粉红色。将混合物加热至 40°C,保持 4.5 小时,冷却至室温,并在室温下搅拌过夜。以份额方式加入亚硫酸氢钠,混合物变成褐色,而后固体消失,颜色变成黄色。然后搅拌该混合物 30 分钟,并逐滴加入 25 ml 10% 硫酸溶液。用二乙醚 (3 x 100 mL) 提取该溶液。用 50 ml 水洗涤合并的有机相,用 20 ml 亚硫酸氢钠溶液 (在 20 ml 水中用 5 克亚硫酸氢钠制备) 洗涤两次,用 50 ml 水洗涤两次,然后用硫酸钠干燥,过滤,减压蒸发,得到 11 克产物黄色蜡。

[0663] (S)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油的合成:将 11 克 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-3-三苯甲基-甘油溶解在 100 ml 甲酸中,并在室温下搅拌该混合物 2 小时。然后减压除去甲酸。加入 100 ml 甲苯:己烷的 1:1 溶液,并在室温下搅拌该混合物。用 100

ml 甲醇 :10% NaOH 水溶液的 8:2(v/v) 混合物提取该溶液两次。用磷酸二氢钠酸化该碱性溶液,直到 pH 值在 4-5 范围内为止。加入 100 ml 二乙醚和 100 ml 水,分离各相,用 100 ml 二乙醚洗涤水相两次。然后用 100 ml 水和 100 ml 盐水洗涤合并的有机相,用硫酸钠干燥,过滤,减压除去溶剂,得到 8 克产物。用丙酮 :己烷的 1:9 混合物将产物结晶,得到 2.4 克 (S)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油。

[0664] (S)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-甘油的合成: 将 2.4 克 (S)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油溶解在 50 ml 甲醇中。加入 1 ml 浓 HCl,并在室温下搅拌混合物 6 小时,而后在 4℃ 保持过夜。减压除去溶剂,加入 50 ml 水,用 50 ml 氯仿提取该混合物三次。用 50 ml 水、50 ml 浓碳酸氢钠洗涤有机相,并再次用 50 ml 水洗涤。用硫酸钠干燥混合物,过滤,减压除去溶剂,得到 2.9 克产物,在减压下将其用五氧化二磷干燥。

[0665] (R)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成: 将 2.9 克 (S)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-甘油和 3 ml 三乙胺溶解在 30 ml THF 中。在 15 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 2 ml POCl₃ 的 20 ml THF 溶液中。在冷却下,继续额外搅拌 10 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。用 15 分钟时间将 1.3 ml 乙醇胺和 6 ml 三乙胺的 50 ml THF 溶液逐滴加入到冰冷却下的反应混合物中。在 0℃,继续搅拌 10 分钟,而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,减压除去溶剂。将残余物溶解在 24 ml 乙酸和 10 ml 水的混合物中,并加热到 70℃,保持 1 小时。用 50 mL 氯仿三次提取混合物,并用 50 ml 水洗涤两次。减压除去溶剂,得到 3.8 克 (R)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺棕色油。

[0666] (R)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-206) 的合成: 将 0.8 克 (R)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 20 ml 8:2(v/v) 甲醇 :10% 氢氧化钠水溶液中。加入 10% 氢氧化钠溶液,并在室温下搅拌混合物过夜。通过加入磷酸二氢钠将反应混合物的 pH 值调节至 4-5 的范围。加入 50 ml 水和 50 ml 氯仿。分离各相,并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,过滤,减压除去溶剂,得到 684 mg 粗品残余物。用硅胶 (30 克) 色谱纯化该残余物。用氯仿 :甲醇 :水的混合物 (体积比 60:35:5) 洗脱产物。减压除去溶剂,将残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,减压除去溶剂,得到 314 mg (R)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺白蜡,在减压下将其用五氧化二磷干燥。

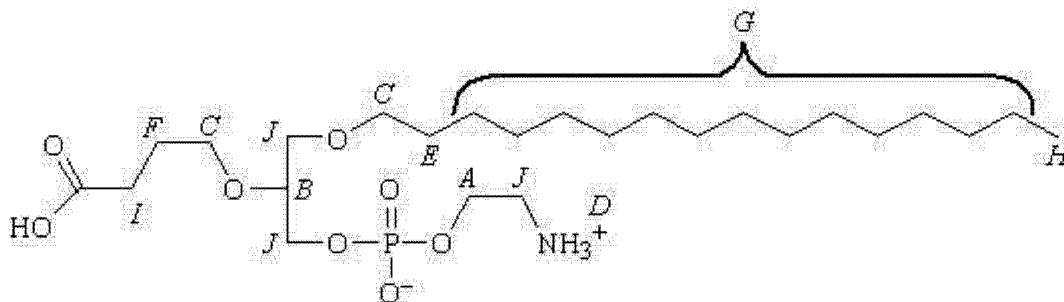
[0667] 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的 NMR 特征:

[0668] 将样品溶解在氘化氯仿 (CDCl₃) 中。在 300 MHz 测定 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 光谱。

[0669] 结果显示了 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-206) 的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0670] 按照 CI-206 的结构所观察到的 ¹H 峰的归属如下:

[0671]



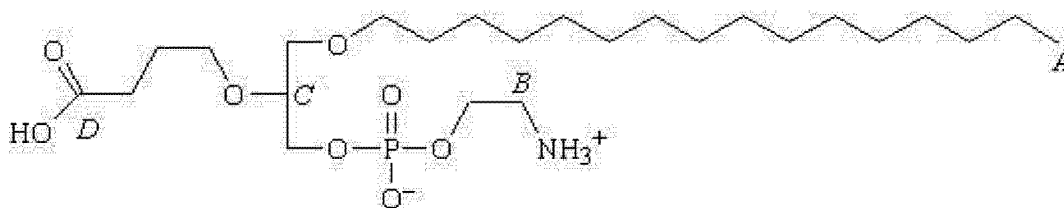
[0672] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.338 ppm)

[0673]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.137	2H, br, s	A
3.828–3.900	1H, m	B
3.620–3.726	6H, m	J
3.371–3.489	4H, m, $2\times\text{CH}_2$	C
2.302–2.518	2H, m	I
1.838–1.895	2H, m	F
1.525–1.574	2H, m	E
1.258	26H, m, $13\times\text{CH}_2$	G
0.881	3H, t, $1\times\text{CH}_3$, $J=6.75\text{Hz}$	H

[0674] 按照 CI-206 的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下：

[0675]



[0676] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.256 ppm)

[0677]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
176.760	D
77.850–77.951	C
71.938	
70.268	
69.376	
66.045	
62.068	
40.408	B
35.035	
32.017	
30.886	
29.803	
29.698	
29.631	
29.456	
26.150	
25.231	
22.774	
22.149	

14.160

A

[0678] 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征:

[0679] 对 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($C_{25}H_{52}NO_8P$) 的计算质量是 525.6560。

[0680] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=524$ 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 $[M-H]^-$ 。由此, 该质谱与 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-206) 的化学结构一致。

[0681] (R)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成: 将 2.8 克 (R)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 50 ml 异丙醇和 18 ml 二氯甲烷的混合物中。逐滴加入 3.7 克碳酸钾的 10 ml 水溶液, 同时将反应混合物保持在 35-40°C 的温度范围内。在 40°C, 在 5 分钟期间内逐滴加入 2.52 ml 硫酸二甲酯的 10 ml 异丙醇溶液。然后在 40°C 保持反应混合物 90 分钟, 冷却至室温, 并在室温下搅拌过夜。加入水, 将混合物用 50 ml 氯仿提取三次。用 50 ml 水洗涤有机相, 减压除去溶剂, 得到 3 克 (R)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸棕色油。

[0682] (R)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-205) 的合成: 将 3 克 (R)-1-十六烷基-2-(3-甲基羧基)丙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸溶解在 50 ml 甲醇:10% 氢氧化钠水溶液的 8:2 (v/v) 混合物中, 并在室温下搅拌混合物过夜。通过加入磷酸二氢钠将反应的 pH 值调节至 4-5 的范围。加入 50 ml 水和 50 ml 氯仿, 并将得到的溶液转入分液漏斗中。分离各相, 并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中, 用硫酸钠干燥, 过滤, 减压除去溶剂, 得到 2.3 克粗品残余物。用硅胶 (110 克) 色谱纯化该残余物。用氯仿:甲醇:水 (体积比 60:35:5) 洗脱产物。减压除去溶剂之后, 将残余物溶解在氯仿中, 用硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 得到 677mg (R)-1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-205) 白蜡, 在减压下将其用五氧化二磷干燥。

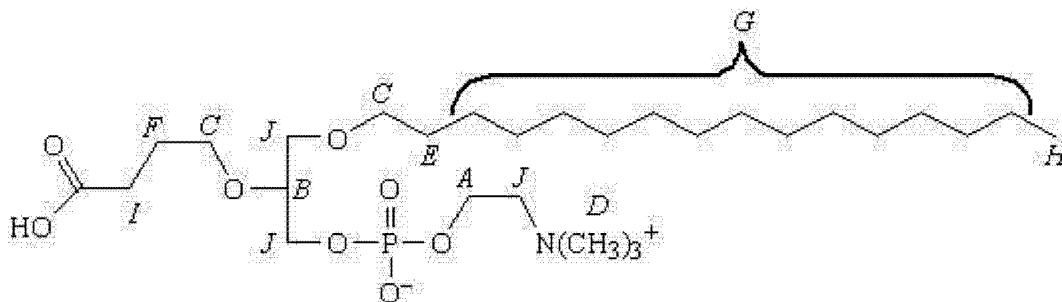
[0683] 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征:

[0684] 将样品溶解在氘化氯仿 ($CDCl_3$) 中。在 300 MHz 测定 1H NMR 和 ^{13}C NMR 光谱。

[0685] 结果显示了 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号, 并由此完全支持该结构。

[0686] 按照 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 1H 峰的归属如下:

[0687]



[0688] 1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 ($CDCl_3$)) = 7.338 ppm)

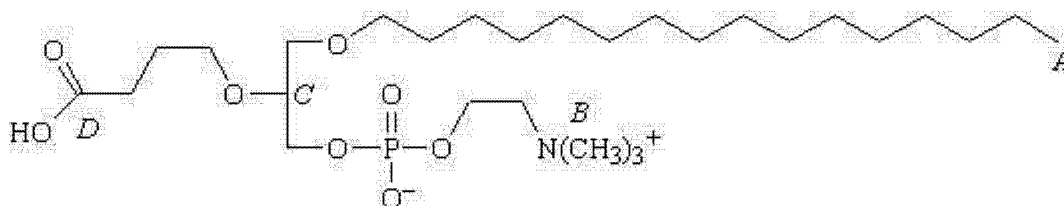
[0689]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
----------------	----	-----------

4.272	2H, br, s	A
3.940-3.995	1H, m	B
3.583 - 3.728	6H, m	J
3.377-3.482	4H, m, 2xCH ₂	C
3.241	9H, s, 3xCH ₃	D
2.304-2.510	2H, m	I
1.801-1.904	2H, m	F
1.517-1.560	2H, m	E
1.256	26H, m, 13xCH ₂	G
0.880	3H, t, 1xCH ₃ , J=6.75Hz	H

[0690] 按照 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的¹³C 峰的归属如下:

[0691]



[0692] ¹³C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl₃)=77.231 ppm)

[0693]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
176.790	D
78.082-78.186	C
71.888	
70.389	
69.298	
66.494	
65.922	
59.115-59.178	
54.327	B
31.992	
31.280	
29.772	
29.732	
29.673	
29.598	
29.431	
26.115	
25.462	
22.753	
14.148	A

[0694] 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征:

[0695] 对 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (C₂₈H₅₈NO₈P) 的计算质量是 567.7358。

[0696] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 进行的质谱显示了具有 m/z=566 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 [M-H]⁻。由此, 该质谱与 1-十六烷基-2-(3-羧基)丙基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[0697] 酪氨酸磷酸化作用：

[0698] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容，测定 CI-205 和 CI-206 对在原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[0699] 如图 19 所示，用 20 μ g/ml CI-206 处理可以导致磷酸酪氨酸水平降低。

[0700] 类似地，如图 20 所示，用 20 μ g/ml 的 CI-205 处理，可以导致磷酸酪氨酸水平降低，与用 20 μ g/ml 阳性对照 CI-201 处理一样。

[0701] CI-205 和 CI-206 的毒性：

[0702] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容，评价 CI-205 和 CI-206 的毒性。

[0703] 如图 21A 和 21B 所示，在 50 μ g/ml 的剂量下或更高的剂量下检测到 CI-206 的显著毒性，CI-206 的 LD₅₀ 位于 50 和 100 μ g/ml 之间。

[0704] 如图 22A 和 22B 所示，在两个实验中，在 100 μ g/ml 的剂量下检测到 CI-205 的显著毒性，只在一个实验中，在 20-50 μ g/ml 的剂量下检测到其显著的毒性，CI-205 的 LD50 位于 50 和 100 μ g /ml 之间。

[0705] 实施例 7

[0706] 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-207)和1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺

[0707] 按照下文所描述的方法，合成(R)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸和(R)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺，使用(R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法，合成(S)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸和(S)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺，但用(S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[0708] (S)-1-辛基-甘油的合成：将 21 ml (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、29 克粉末氢氧化钾和 32 ml 1-溴辛烷在 150 ml 苯中搅拌并回流 6 小时，同时共沸蒸馏除去形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 100ml。然后将反应混合物冷却至室温，并加入 200 ml 水。然后用 150 ml 二乙醚提取反应混合物三次，用 100 ml 水洗涤合并的有机相，然后减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 100 ml 90:10:5(v/v) 甲醇：水：浓盐酸的混合物中，并将得到的溶液回流 2 小时，而后冷却至室温，加入 100 ml 水。用 100 ml 氯仿提取产物三次，连续地用 150 ml 水、150 ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤，并再次用 100 ml 水洗涤。用无水 Na₂SO₄ 干燥溶剂，过滤，减压除去，得到 34 克 (S)-1-辛基-甘油。

[0709] (R)-1-辛基-3-三苯甲基-甘油的合成：将 34 克 (S)-1-辛基-甘油和 61 克三苯基氯甲烷加入到 500 ml 干燥 THF 和 130 ml 干燥乙腈的混合物中。加入 46 ml 干燥三乙胺，并将反应混合物回流 17 小时。然后将反应混合物冷却至室温，倾倒在冰(1 千克)上。将混合物转入分液漏斗中，并用 200 ml 二乙醚提取三次。连续地用 150 ml 水、100 ml 稀(1.5%)H₂SO₄(两次)、200 ml 水、200 ml 浓碳酸氢钠水溶液洗涤，并再次用 200 ml 水洗涤。然后用无水 Na₂SO₄ 干燥溶液，减压除去溶剂。将得到的残余物(80 克棕色油)溶解在 500 ml 热己烷中，并在 4℃ 的温度下保持过夜。过滤沉淀，并从滤液中减压除去溶剂。将得到的残余物用硅胶色谱纯化。将得到的纯 (R)-1-辛基-3-三苯甲基-甘油用含有 10% 己烷的氯仿、含有 5% 己烷的氯仿、而后用含有乙酸乙酯(5% 和 10%) 的氯仿的混合物洗脱。产率是

73%。

[0710] *(R)*-1-辛基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基甘油的合成:将 18.7 克 (*R*)-1-辛基-3-三苯甲基-甘油、5.5 克 6-溴-1-己烯和 22 克粉末氢氧化钾在 100 ml 苯中搅拌并回流 9 小时,同时共沸蒸馏除去形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 30ml。将该反应混合物冷却至室温,加入 100 ml 水。将得到的混合物转入分液漏斗中,并用二乙醚提取。用 200 ml 水洗涤合并的有机相两次,减压除去溶剂,得到 20.2 克 (*R*)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基甘油。

[0711] *(S)*-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油的合成:将 20.2 克 (*R*)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基甘油溶解在 100 ml 甲醇中,加入 10 ml 浓盐酸 (32%),并将得到的反应混合物回流 4 小时。将反应混合物冷却至室温,并在室温下搅拌过夜。加入 100ml 水,并用 100 ml 二乙醚提取该溶液两次。用 100 ml 水、100 ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤合并的有机相,并再次用 100 ml 水洗涤。减压除去溶剂。将得到的残余物 (20.1 克) 溶解在 250 ml 己烷中,并将得到的溶液在 4℃ 的温度下保存 96 小时,导致大部分三苯基甲醇沉淀。过滤并从滤液中除去溶剂后,用硅胶 (91.4 克) 色谱纯化剩余产物 (12 克)。用氯仿、而后用含有 5% 丙酮的氯仿洗脱纯 (*S*)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油 (5.7 克)。产率是 52%。

[0712] *(R)*-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 4.9 克 (*S*)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油 (将其在干燥器中用 P_2O_5 干燥) 和 2.65 ml 三乙胺溶解在 40 ml THF 中。在 30 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷冷却下的 1.4 ml $POCl_3$ 的 20 ml THF 溶液中,同时搅拌。在冷却下,继续额外搅拌 30 分钟,并在室温下额外搅拌 45 分钟。然后将反应混合物在冰浴中冷却,然后用 15 分钟的时间逐滴加入 1.1 ml 乙醇胺和 2.8 ml 三乙胺的 30 ml THF 溶液,同时搅拌。在冰浴中,继续搅拌 35 分钟,而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,用 15 ml THF 洗涤固体两次,并从滤液中减压除去溶剂。将得到的残余物 (5.6 克) 溶解在 36 ml 乙酸和 15 ml 水的混合物中,并加热到 70℃ 的温度,保持 1 小时。冷却至室温后,将该溶液转入分液漏斗中,用氯仿:甲醇的 2:1 (v/v) 混合物提取两次,用稀碳酸氢钠溶液洗涤,然后减压除去溶剂,得到 4.6 克粗品 (*R*)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。用硅胶 (59 克) 色谱纯化该粗品。用氯仿、而后用氯仿和 10%-40% 甲醇的混合物洗脱出 2.6 克纯产物。产率是 75.9%。

[0713] *(R)*-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成:将 2.1 克 (*R*)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 100 ml 乙醇 (含有 6 克碳酸钾) 溶液中。加入 8 ml 硫酸二甲酯,并将反应混合物加热至 40℃ 的温度,保持 6 小时。将反应混合物冷却至室温,并加入 100 ml 水。然后用 100 ml 氯仿提取该混合物两次。从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂。用硅胶 (59 克) 色谱纯化该粗品。用氯仿、而后用氯仿与 20%-60% 甲醇的混合物洗脱出 2.0 克纯 (*R*)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。产率是 86.4%。

[0714] *(R)*-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-207) 的合成:将 172 mg 碳酸氢钠的 17 ml 水溶液加入到 700 mg (*R*)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的 28 ml 水溶液中。然后加入 3.0 克高碘酸钠的 28 ml 水溶液。将 40 mg 高锰酸钾的 12 ml 水溶液放在滴液漏斗中,并根据保持反应混合物的粉红色的需要,逐滴加入到反应混合物中。在反应期间,加入大约一半的高锰酸盐溶液。在室温下搅拌 3 小时之后,加入 6

克磷酸二氢钠,并将反应混合物用 50 ml 氯仿:甲醇的 2:1(v/v) 混合物提取三次。用无水 Na_2SO_4 干燥合并的有机相,减压除去溶剂,得到 360mg 粗品。用硅胶(12.23 克)色谱纯化该粗品。用氯仿、而后用氯仿与 10%-60% 甲醇洗脱出 119mg 纯 (R)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。

[0715] 使用按照上文所描述方法制备的 (S)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油,另一个合成方法进行如下:

[0716] (S)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 77 克 NaIO_4 溶解在 300 ml 水中。向此溶液中加入 9 克 NaHCO_3 和 1.26 克 KMnO_4 ,并将该悬浮液加热至 40°C 。在 1 小时期间内,将 21 克 (S)-1-辛基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油的 300 ml 叔丁醇溶液逐滴加入到反应混合物中,并将该混合物额外加热 3 小时。根据保持粉红色的需要加入额外量的 KMnO_4 溶液。将反应混合物冷却至室温,并通过硅藻土过滤,用叔丁醇洗涤硅藻土。逐滴加入 100 ml 10% 硫酸溶液,并将该溶液转入分液漏斗中,用 200 ml 己烷提取三次。用 20 克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的 100ml 水溶液洗涤有机相,而后用 200 ml 水洗涤。通过减压除去溶剂而将有机相浓缩,直到体积减少到大约 150 ml 为止。将 15 ml 水和 2 ml 浓 HCl 加入到剩余溶液中,并将得到的混合物回流 6 小时,然后冷却至室温,通过减压除去溶剂而再次浓缩。通过加入 100 ml 水和 10 ml 30% NaOH 溶液,将残余物的 pH 值调节至 12。过滤沉淀,用 20 ml 水洗涤四次。用 100 ml 己烷:乙酸乙酯的 1:1(v/v) 混合物提取滤液。通过加入 10 ml 浓 HCl 将水相酸化至 pH1,并用 100 ml 己烷提取三次。用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,得到 7.4 克粗品黄色油。用硅胶(100 克)色谱纯化该粗品。用氯仿、而后用氯仿与 5%-50% 乙酸乙酯洗脱出 4.8 克纯 (S)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油。产率是 39.7%。

[0717] (S)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 1.14 克 (S)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油溶解在 20 ml 二氯甲烷中。加入 748 mg 二苯基重氮甲烷(如 J. Organic Chem. (1959) 24:560-561 所述制备),并在室温下将暗红色反应混合物搅拌大约 3 小时,直到溶液变成无色为止。减压除去溶剂。用硅胶(43 克)色谱纯化残余物(1.9 克)。用氯仿、而后用氯仿与 5%-20% 乙酸乙酯洗脱出 1.08 克纯 (S)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油。产率是 61.4%。

[0718] (R)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 1 克 (S)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油(通过与苯共沸蒸馏进行干燥)和 0.885 ml 三乙胺溶解在 30 ml THF 中。在 15 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 0.235 ml POCl_3 的 20 ml THF 溶液中,同时搅拌。在冷却下,继续额外搅拌 15 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。然后将反应混合物在冰浴中冷却,然后用 15 分钟的时间逐滴加入 0.154 ml 乙醇胺和 0.885 ml 三乙胺的 50 ml THF 溶液,同时搅拌。在冰浴中,继续搅拌 15 分钟,而后在室温下搅拌过夜。将反应混合物过滤,并减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 24 ml 乙酸和 10 ml 水的混合物中,并加热到 70°C ,保持 1 小时。用 80 ml 氯仿提取混合物三次,并用 50 ml 水洗涤两次。减压除去溶剂,产生 1.12 克 (R)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺黄色油。

[0719] (R)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成:将 1.12 克 (R)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 65 ml 甲醇和 18 ml 二氯甲烷的混合物中,并将该混合物加热至 $35-40^\circ\text{C}$ 范围内的温度。逐滴加

入 1.3 克碳酸钾的 10 ml 水溶液,同时将反应混合物保持在 35-40℃ 的温度范围内。然后在 40℃,逐滴加入 7.2 ml 硫酸二甲酯的 10 ml 甲醇溶液。将反应混合物在 40℃ 的温度下保持 2 小时,而后再在室温下过夜。加入 50 ml 水,然后用 50 ml 氯仿提取该混合物三次。用 50 ml 水洗涤有机相,减压除去溶剂,得到 1 克 (R)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸黄色油。

[0720] (R)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-207) 的合成:将气态 HCl 鼓入冰冷却下的 1 克 (R)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的 40 ml 氯仿溶液中 90 分钟。将得到的溶液在冰浴中额外搅拌 2 小时。然后通过加入磷酸二氢钠,将反应混合物的 pH 值调节至大约 6。加入 50 ml 水,并用 60 ml 氯仿提取该混合物三次。用 60 ml 水洗涤合并的有机相,减压除去溶剂,得到 0.370 克 (R)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。产率是 50.2%。

[0721] (R)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将气态 HCl 鼓入冰冷却下的 5 克 (R)-1-辛基-2-(4-二苯甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(按照上文所述制备)的 40 ml 氯仿溶液中 90 分钟。加入 HCl 完毕后,在冰冷却浴中额外搅拌反应混合物 2 小时。通过加入磷酸氢二钠水溶液,将反应混合物的 pH 值调节至 6。用氯仿 (3 x 50 ml) 提取混合物,用水 (100 ml) 洗涤合并的有机相。减压除去溶剂,得到 3.5 克棕色油。用硅胶 (68.5 克) 色谱纯化该油。用氯仿、而后用氯仿:甲醇的 8:2(v/v) 混合物、而后用氯仿:甲醇:水的 700:26:45(v/v) 混合物洗脱产物。从含有所需要的产物的馏份中减压除去溶剂之后,将得到的残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,减压除去溶剂,得到 150mg (R)-1-辛基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸胆黄色蜡。

[0722] 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-207) 的 NMR 特征:

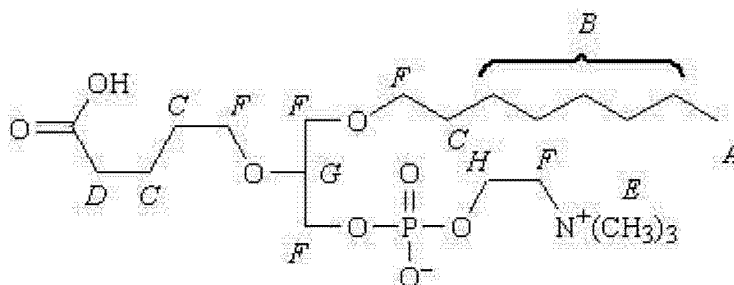
[0723] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇 (CD_3OD) 的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。然后在 300 MHz 测定光谱。利用 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱两者测定样品。

[0724] 结果显示了 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0725] 按照 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0726] ^1H NMR

[0727]



[0728] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.33 ppm)

[0729]

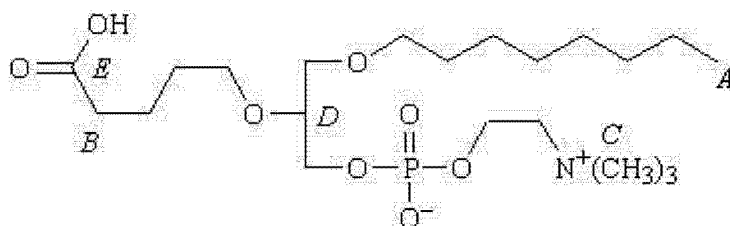
δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.268	2H, brs	H
3.942 - 3.969	1H, m	G

3.394 — 3.673	10H, m, 5xCH ₂	F
3.234	9H, s, 3xCH ₃	E
2.307	2H, t, J=7.2Hz	D
1.518 — 1.652	6H, m, 3xCH ₂	C
1.270	10H, m, 5xCH ₂	B
0.879	3H, t, 1xCH ₃ , J=6.75Hz	A

[0730] ¹³C NMR

[0731] 按照 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ¹³C 峰的归属如下：

[0732]



[0733] ¹³C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl₃) = 76.99 ppm)

[0734]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
177.530	E
77.895	D
71.646	
69.964	
69.762	
65.207	
65.642	
59.013	
54.080	C
34.629	B
31.664	
29.404	
29.273	
29.179	
29.101	
25.856	
22.482	
22.009	
13.890	A

[0735] 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的质谱特征：

[0736] 对 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (C₂₁H₄₄NO₈P) 的计算质量是 469。

[0737] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 进行的质谱显示了具有 m/z=468 的分子离子，相当于去质子化的分子离子 [M-H]⁻。由此，该质谱与 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[0738] 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的 NMR 特征：

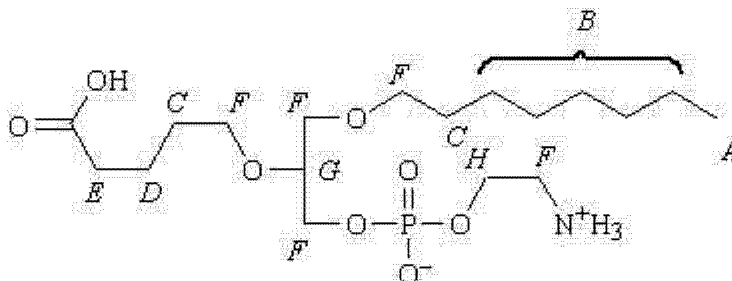
[0739] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇 (CD₃OD) 的氘化氯仿 (CDCl₃) 中。然后在 600 MHz 测定光谱。利用 ¹H 和 ¹³C NMR 谱两者测定样品。

[0740] 结果显示了 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0741] 按照 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0742] ^1H NMR

[0743]



[0744] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 7.361 ppm)

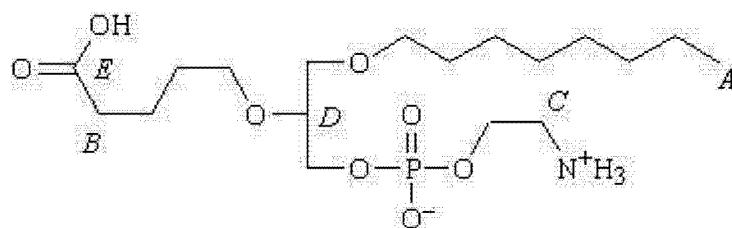
[0745]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.136	2H, brs	H
3.883 – 3.901	1H, m	G
3.420 – 3.766	10H, m, $5 \times \text{CH}_2$	F
2.344	2H, t, $J=7.2\text{Hz}$	E
1.673–1.719	2H, m, CH_2	D
1.588–1.632	2H, m, CH_2	C
1.527 – 1.561	2H, m, CH_2	C
1.272–1.290	10H, m, $5 \times \text{CH}_2$	B
0.882	3H, t, $1 \times \text{CH}_3$, $J=6.9\text{Hz}$	A

[0746] ^{13}C NMR

[0747] 按照 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0748]



[0749] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 79.344 ppm)

[0750]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
178.820	E
77.895	D
79.996	
73.980	
72.367	
72.066	
68.205	
64.103	

42.529	C
35.874	B
33.953	
32.948	
31.699	
31.557	
31.471	
31.383	
31.327	
28.162	
27.320	
24.785	
23.819	
23.691	
16.123	A

[0751] 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征：

[0752] 对 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($C_{18}H_{38}NO_8P$) 的计算质量是 427。

[0753] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=426$ 的分子离子，相当于去质子化的分子离子 $[M-H]^-$ 。使用正离子电喷雾离子化质谱 (ESI+-MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=428$ 的分子离子，相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$ ，和具有 $m/z=450$ 的离子，相当于阳离子化的分子离子 $[M+Na]^+$ 。由此，该 MS 谱与 1-辛基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的化学结构一致。

[0754] 实施例 8

[0755] 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-208)

[0756] 按照下文所描述的方法，由 (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油合成 (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。使用相同的方法，由 (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油合成 (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸。

[0757] (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油和 (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油的合成描述在实施例 1 中。

[0758] (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-208) 的合成：用 25 分钟的时间，将 8.60 克 (19.97 mmol) (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油（如实施例 1 所述制备）和 2.63 克 (26 mmol) 三乙胺的 500 ml THF 溶液逐滴加入到冰冷却下的 3.90 克 (26 mmol) $POCl_3$ 的 100 ml THF 溶液中。在冰浴中，继续额外搅拌 10 分钟，而后在室温下额外搅拌 45 分钟。在强烈搅拌下，将 1.6 ml 乙醇胺和 6.4 ml 三乙胺的 500 ml THF 溶液逐滴加入到冰冷却下的反应混合物中。在冰浴中，继续额外搅拌 10 分钟，而后继续在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物，并减压除去溶剂。将残余物溶解在 24 ml 乙酸和 100 ml 水的混合物中，并加热到 70℃，保持 1 小时。将反应混合物冷却至室温，并用 250 ml 二氯甲烷提取两次。然后减压除去溶剂。将残余物溶解在 500 ml 异丙醇和 180 ml 二氯甲烷的混合物中。加入 50 克碳酸钾的 100 ml 水溶液，以便得到高于 11 的 pH 值。将溶液在 35-40℃ 的温度范围内保持，以便在此期间用 45 分钟时间逐滴加入 11.15 克甲苯磺酸甲酯的 100ml 异丙醇溶液。额外 90 分钟之后，用盐酸酸化混合物。加入 100 ml 水和

550 ml 二氯甲烷, 分离各相。用 100 ml 水洗涤有机相, 减压除去溶剂。将粗品用硅胶柱色谱纯化。用氯仿、而后用氯仿、甲醇和水的混合物洗脱出 11.0 克 (18.46 mmol) (R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸。产率是 92.45%。

[0759] 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-208) 的 NMR 特征:

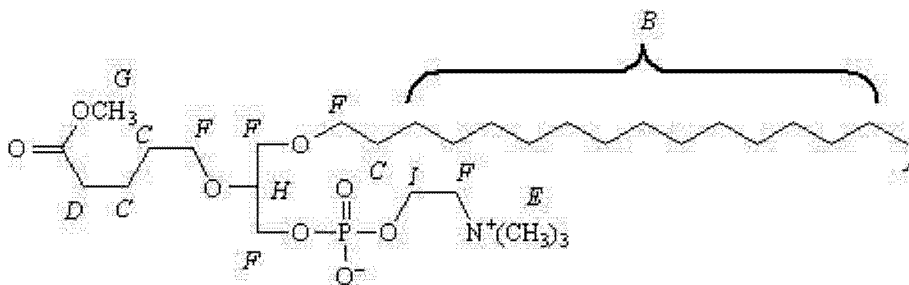
[0760] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇 (CD_3OD) 的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。然后在 300 MHz 测定光谱。利用 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱两者测定样品。

[0761] 结果显示了 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号, 并由此完全支持该结构。

[0762] 按照 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0763] ^1H NMR

[0764]



[0765] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.27 ppm)

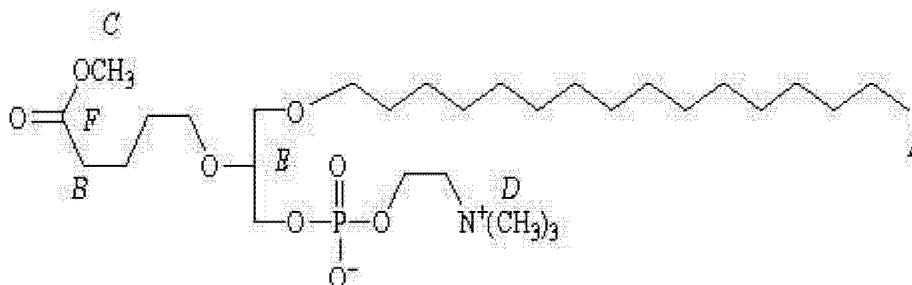
[0766]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.303	2H, brs	I
3.821 – 3.840	1H, m	H
3.648	3H, s, 1xCH ₃	G
3.383 – 3.606	10H, m, 5xCH ₂	F
3.340	9H, s, 3xCH ₃	E
2.334	2H, t, J=7.5Hz	D
1.530 – 1.657	6H, m, 3xCH ₂	C
1.253	26H, m, 13xCH ₂	B
0.879	3H, t, 1xCH ₃ , J=6.3Hz	A

[0767] ^{13}C NMR

[0768] 按照 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0769]



[0770] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.03 ppm)

[0771]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
174.23	F
77.97	E
71.74	
70.65	
69.84	
66.16	
65.40	
59.44	
54.35	D
51.51	C
33.66	B
31.93	
29.74	
29.62	
29.47	
29.38	
26.14	
22.70	
21.68	
14.13	A

[0772] 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-208) 的质谱特征:

[0773] 对 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 ($C_{30}H_{62}NO_8P$) 的计算质量是 595.79。

[0774] 使用快速原子轰击 (FAB+) 进行的质谱显示了具有 $m/z=596.324$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$ 。该 MS 谱与 1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[0775] 酪氨酸磷酸化作用:

[0776] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-208 对在原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[0777] 如图 23 所示, 用 $20 \mu g/ml$ 的 CI-208 处理, 可以导致磷酸酪氨酸水平降低, 其比用 $20 \mu g/ml$ 的 CI-201 对照物处理所引起的降低更强。

[0778] CI-208 的毒性:

[0779] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 评价 CI-208 的毒性。

[0780] 如图 24A 和 24B 所示, 在 $50 \mu g/ml$ 的剂量下或更高的剂量下检测到 CI-208 的毒性, 在 $20 \mu g/ml$ 的剂量下, 只在两个实验的一个实验中检测到毒性。CI-208 的 LD_{50} 看来似乎位于 50 和 $100 \mu g/ml$ 之间。

[0781] 实施例 9

[0782] 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-213) 和 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-214)

[0783] 按照下文所描述的方法, 合成 (R)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸和 (R)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油

基-3-磷酸乙醇胺,使用(R)-(+)-3-苄氧基-丙二醇作为起始原料。使用相同的方法,合成(S)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸和(S)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸,但用(S)-(-)-3-苄氧基-丙二醇作为起始原料。

[0784] *1-三苯甲基-3-苄基-sn-甘油的合成*: 将5克(27.44 mmol)(R)-(+)-3-苄氧基-丙二醇和10克(35.87 mmol)三苯基氯甲烷加入到100 ml干燥THF和25 ml干燥乙腈中。加入8 ml干燥三乙胺,并将反应混合物回流17小时。将反应混合物冷却至室温,倾倒在冰(100克)上,转入分液漏斗中,并用100 ml二乙醚提取三次。连续地用100 ml水、100 ml稀(1.5%)硫酸(两次)、100 ml水、100 ml浓碳酸氢钠溶液洗涤,并再次用100 ml水洗涤。用无水硫酸钠干燥有机相,减压除去溶剂,得到11克1-三苯甲基-3-苄基-sn-甘油黄色油。产率是94%。

[0785] *1-三苯甲基-2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油的合成*: 将11克1-三苯甲基-3-苄基-sn-甘油和5.7克5-己烯基-1-甲烷磺酸酯溶解在110 ml苯中。加入6克粉末KOH,并将反应混合物搅拌和回流12小时,同时通过共沸蒸馏除去反应中形成的水。将反应混合物冷却至室温,用100 ml水洗涤三次。用无水Na₂SO₄干燥有机相,减压除去溶剂。将残余物溶解在150 ml热己烷中,冷却,并在4℃保持过夜,在此期间,出现副产物的沉淀。过滤,从滤液中减压除去溶剂,得到13克1-三苯甲基-2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油棕色油。

[0786] *2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油的合成*: 将13克1-三苯甲基-2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油溶解在100 ml甲醇中。加入4 ml浓盐酸(37%),并将该溶液回流4小时。将反应混合物冷却至室温,倾倒在冰(100克)上,转入分液漏斗中,并用100 ml二乙醚提取三次。用100 ml水、100 ml饱和碳酸氢钠溶液连续地洗涤有机相,并再次用100 ml水洗涤。用无水硫酸钠干燥有机相,减压除去溶剂,得到14.5克粗品。用硅胶(150克)柱色谱纯化该粗品。用二氯甲烷、而后用二氯甲烷和乙酸乙酯的混合物洗脱出3.17克2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油。产率是46.8%。

[0787] *1-(15'-羧基)十五烷基-2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油的合成*: 将3克2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油溶解在100 ml苯中。加入3克KOH,并通过共沸蒸馏将反应混合物干燥2小时。在3小时期间内,向该混合物中逐滴加入5.35克叔丁基-16-溴十六烷酸酯的100 ml苯溶液。加入完毕后,将反应混合物额外回流12小时。将溶剂的体积逐渐地减少到大约20 ml。将反应混合物冷却至室温,加入100 ml水和100 ml叔丁醇。通过加入浓HCl,将反应混合物的pH值调节至大约1。将混合物在室温下搅拌2小时,用100 ml二乙醚提取三次。用100 ml水分次洗涤合并的有机相,直到pH值是中性为止。用无水Na₂SO₄干燥,减压除去溶剂,得到6克棕色油。将该油溶解在100 ml己烷:乙酸乙酯的1:1(v/v)混合物中。用100 ml甲醇:10% NaOH水溶液的8:2(v/v)混合物提取该溶液两次。通过加入NaH₂PO₄,将该碱性溶液酸化至pH4-5。加入100 ml二乙醚和100 ml水,然后分离各相。用100 ml二乙醚提取水相两次,并与有机相合并。用100 ml水和100 ml盐水洗涤有机相。用无水Na₂SO₄干燥,减压除去溶剂,得到5.3克1-(15'-羧基)十五烷基-2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油黄色油。产率是90%。

[0788] *1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-3-苄基-sn-甘油的合成*: 将5.3

克 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(5'-己烯基)-3-苄基-sn-甘油溶解在 130 ml 叔丁醇中,并加入 1.2 克碳酸氢钠的 40 ml 水溶液。然后加入 54 mg KMnO_4 的 1 ml 水溶液。将 20 克 NaIO_4 溶解在 115 ml 水中,然后在 10 分钟期间内将此溶液加入到反应混合物中。根据保持反应的粉红色的需要,加入额外数量的 216 mg KMnO_4 的 4 ml 水溶液。在室温下继续搅拌 6 小时,而后将反应混合物在 4℃ 保持过夜。加入亚硫酸氢钠,直到反应混合物的颜色变成浅黄色为止。搅拌混合物 30 分钟,逐滴加入 25 ml 10% 硫酸溶液,并用 100 ml 二乙醚提取该混合物三次。连续地用 100 ml 水、100 ml 含有 25 克亚硫酸氢钠(在 100 ml 水中)的溶液(两次)和 100 ml 水(两次)洗涤合并的有机相。用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,得到 5.3 克粗品 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-3-苄基-sn-甘油黄色蜡。

[0789] *(S)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油的合成*:将 5.0 克 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-3-苄基-sn-甘油溶解在 50 ml 甲醇中,并加入 10 ml 的 85% 甲酸。加入 5 克钯黑,并在氮气氛围中将反应混合物加热到 60℃,保持 24 小时。将反应混合物冷却至室温,并通过硅藻土过滤。用甲醇、而后用水洗涤硅藻土。将洗涤液与滤液合并,并从滤液中减压除去溶剂。将残余物(5 克)溶解在 10 ml 10% 氢氧化钠水溶液和 40 ml 甲醇的混合物中,并在室温下将得到的混合物搅拌 2 小时。用 50 ml 己烷:甲苯的 1:1(v/v) 混合物洗涤反应混合物。通过加入磷酸二氢钠,将反应混合物的 pH 值调节至 5,然后用 50 ml 氯仿提取混合物三次。用 50 ml 盐水洗涤有机相,用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂。用 9:1(v/v) 己烷:丙酮混合物将粗品(4 克)重结晶,得到 3 克 (S)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油无色固体。产率是 72%。

[0790] *(S)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油的合成*:将 3 克 (S)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油溶解在 50 ml 甲醇中。加入 1 ml 浓盐酸(37%),并在室温下搅拌反应混合物过夜。将反应混合物减压浓缩至大约 10 ml,加入 50 ml 水,然后用 50 ml 氯仿提取混合物三次。连续地用 50 ml 水、50 ml 浓碳酸氢钠溶液和 50 ml 水洗涤合并的有机相。用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,得到 3 克 (S)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油黄色油。

[0791] *(R)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成*:将 2.8 克 (S)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油和 2.5 ml 干燥三乙胺溶解在 30 ml THF 中。在 20 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 POCl_3 (1.65 ml) 的 20 ml THF 溶液中,同时搅拌。在冰浴中,继续额外搅拌 10 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。用 60 分钟时间将 1.1 ml 乙醇胺和 6 ml 三乙胺的 50 ml THF 溶液逐滴加入到冰冷却下的反应混合物中,同时搅拌。在冰浴中,继续额外搅拌 10 分钟,而后继续在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 24 ml 乙酸和 100 ml 水的混合物中,并加热到 70℃,保持 1 小时。将反应混合物冷却至室温,用 50 ml 氯仿提取三次,用 50 ml 水洗涤有机相两次。减压除去溶剂,得到 4 克粗品 (R)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺棕色油。

[0792] *(R)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-214)的合成*:将 1.5 克 (R)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 50 ml 甲醇:10% 氢氧化钠水溶液的 8:2(v/v) 混合

物中,并将得到的混合物在室温下搅拌 5 小时。通过加入磷酸二氢钠和甲酸,将反应的 pH 值调节至 4。加入 100 ml 水和 100 ml 氯仿。提取之后,分离各相,并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,得到 500 mg 粗品 (R)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-磷酸乙醇胺。用硅胶 (15 克) 色谱纯化粗品。用 100 ml 氯仿、而后用 100 ml 氯仿:甲醇混合物 (9:1 和 8:2 体积比)、而后用 200 ml 氯仿:甲醇:水混合物 (70:26:4 和 60:35:5 体积比) 进行洗脱。从含有所需要的产物的馏份中减压除去溶剂,将残余物溶解在氯仿中,用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,得到 88 mg 纯 (R)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-214) 黄色蜡。

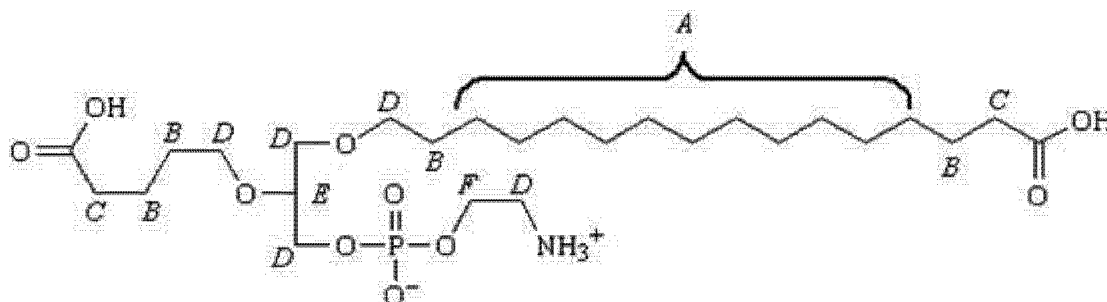
[0793] 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的 NMR 特征:

[0794] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。然后在 300 MHz 测定光谱。

[0795] 结果显示了 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0796] ^1H NMR

[0797]



[0798] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.44 ppm)

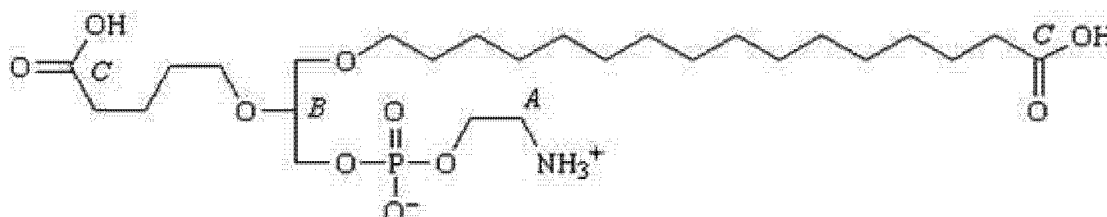
[0799]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.37	2H, br, s	F
3.93 – 3.98	1H, m	E
3.42 – 3.85	10H, m, $5 \times \text{CH}_2$	D
2.27 – 2.36	4H, m, $2 \times \text{CH}_2$	C
1.54–1.70	8H, m, $4 \times \text{CH}_2$	B
1.27	22H, m, $11 \times \text{CH}_2$	A

[0800] ^{13}C NMR

[0801] 按照 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0802]



[0803] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)=77.614 ppm)

[0804]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
177.250	C
177.125	C
78.174	B
72.097	
70.388	
70.199	
65.850	
61.841	
40.788	A
34.424	
34.228	
29.851	
29.698	
29.527	
29.392	
26.289	
25.198	
21.945	

[0805] 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征:

[0806] 对 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($\text{C}_{26}\text{H}_{52}\text{NO}_{10}\text{P}$) 的计算质量是 569.6655。

[0807] 使用电喷雾离子化质谱 (ESMS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=568$ 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

[0808] 另外, 通过正离子电喷雾离子化质谱 (ES+MS) 观察到具有 $m/z=570$ 的分子阳离子, 相当于质子化的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。

[0809] 由此, 该 MS 谱与 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的化学结构一致。

[0810] (R)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成: 将 1.2 克 (R)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 60 ml 甲醇和 20 ml 二氯甲烷的混合物中。加入 2 克碳酸钾的 10 ml 水溶液, 将该溶液加热, 并保持在 35-40°C 的温度范围内。逐滴加入 1.25 ml 硫酸二甲酯的 10ml 甲醇溶液。加入完毕后, 将反应混合物在 40°C 额外搅拌 90 分钟, 然后冷却至室温, 并在室温下搅拌过夜。加入 100 ml 水, 并用 100 ml 氯仿提取三次。用 100 ml 水洗涤合并的有机相, 减压除去溶剂, 得到 900 mg (R)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸棕色油。

[0811] (R)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-213) 的合成: 将 1.88 克 (R)-1-(15'-甲基羧基)十五烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸溶解在 50 ml 甲醇:10% 氢氧化钠水溶液的 8:2 (v/v) 混合物中, 并将得到的混合物在室温下搅拌 5 小时。通过加入磷酸二氢钠和甲酸, 将反应的 pH 值调节至 4。加入 100 ml 水和 100 ml 氯仿。分离各相, 并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余

物溶解在氯仿中,用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,得到 860 mg 粗品 (R)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-胆碱磷酸。用硅胶 (20 克) 色谱纯化粗品。用 100 ml 氯仿、而后用 100 ml 氯仿:甲醇混合物 (9:1 和 8:2 体积比)、而后用 200 ml 氯仿:甲醇:水混合物 (70:26:4 和 60:35:5 体积比) 进行洗脱。从含有所需要的产物的馏份中减压除去溶剂,将残余物溶解在氯仿中,用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,得到 105 mg 纯 (R)-1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-213) 黄色蜡。

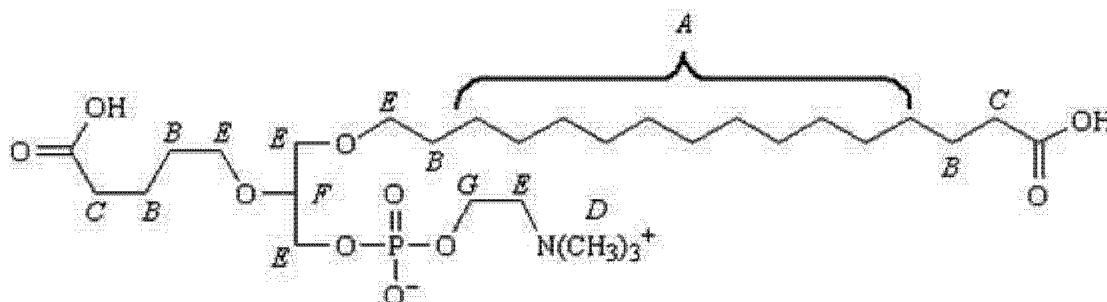
[0812] 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征:

[0813] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 300 MHz 测定光谱。

[0814] 结果显示了 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0815] ^1H NMR

[0816]



[0817] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.38 ppm)

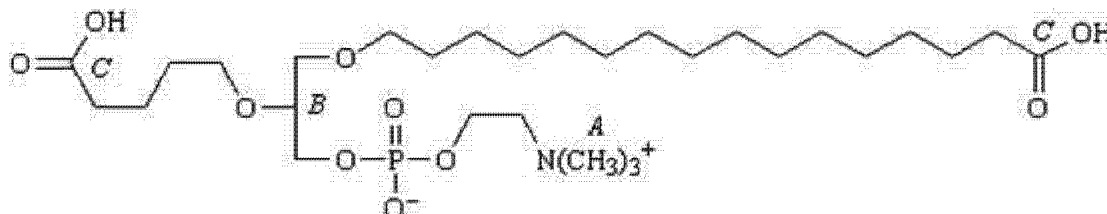
[0818]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.27	2H, br, s	G
3.94-4.00	1H, m	F
3.36 - 3.89	10H, m, $5 \times \text{CH}_2$	E
3.23	9H, s, $3 \times \text{CH}_3$	D
2.26 - 2.37	4H, m, $2 \times \text{CH}_2$	C
1.52-1.72	8H, m, $4 \times \text{CH}_2$	B
1.26	22H, m, $11 \times \text{CH}_2$	A

[0819] ^{13}C NMR

[0820] 按照 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0821]



[0822] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.35 ppm)

[0823]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
176.90	C
176.72	C

78.21	B
71.92	
70.37	
70.01	
66.58	
65.87	
59.14	
54.34	A
34.31	
34.07	
29.66	
29.56	
29.52	
29.36	
29.24	
26.12	
25.06	
21.98	

[0824] 1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征:

[0825] 对1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸($C_{29}H_{58}NO_{10}P$)的计算质量是611.7453。

[0826] 使用电喷雾离子化质谱(ES/MS)进行的质谱显示了具有 $m/z=610$ 的分子离子,相当于离子 $[M-H]^-$ 。

[0827] 另外,正离子电喷雾离子化质谱(ES+/MI)显示了具有 $m/z=612$ 的分子离子,相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$,伴有具有 $m/z=634$ 的分子阳离子,相当于阳离子化离子 $[M+Na]^+$ 。

[0828] 由此,该MS谱与1-(15'-羧基)十五烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[0829] CI-213和CI-214的毒性:

[0830] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容,评价CI-213和CI-214的毒性。

[0831] 如图25A和25B所示,在测试剂量范围内(即,至多 $150\mu g/ml$, $245.2\mu M$),CI-213没有清楚地显示出显著毒性。在 $100\mu g/ml$ ($163.5\mu M$)的剂量下,只在一个实验中检测到细胞数目统计上显著的降低。

[0832] 类似地,如图26A和26B所示,在测试剂量范围内(即,至多 $150\mu g/ml$, $263.3\mu M$),CI-214没有清楚地显示出显著毒性。在 $100\mu g/ml$ ($175.5\mu M$)的剂量下,只在一个实验中检测到细胞数目统计上显著的降低。

[0833] 这些结果表明,CI-213和CI-214两者的 LD_{50} 高于 $150\mu g/ml$ 。

[0834] 实施例10

[0835] 1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-217)

[0836] 按照下文所描述方法,合成(R)-1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸,使用(R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法,合成(S)-1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸,但用(S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[0837] *(S)*-1-十六烷基-sn-甘油的合成:将 40 克 (R)-(-)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、80 克粉末氢氧化钾和 100 克十六烷基溴在 350 ml 苯中搅拌并回流 7 小时,同时共沸蒸馏除去形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 50 ml。将反应混合物冷却至室温,加入 300 ml 冰冷冷却的水,用 150 ml 二氯甲烷提取混合物 4 次。用水洗涤合并的有机相,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 500 ml 甲醇:水:浓盐酸的 90:10:5(v/v) 混合物中,并将得到的溶液回流 2 小时。冷却至室温后,加入 200 ml 水。用 200 ml 氯仿提取产物三次,连续地用 200 ml 水、200 ml 饱和碳酸钠水溶液洗涤,并再次用 200 ml 水洗涤。减压除去溶剂,在 4℃ 用 450 ml 石油醚将产物结晶,得到 69.93 克纯 (*S*)-1-十六烷基-sn-甘油。产率是 73%。

[0838] 1-十六烷基-3-三苯甲基-甘油的合成:将 18.47 克 (*S*)-1-十六烷基-sn-甘油和 19 克三苯基氯甲烷溶解在 250 ml 干燥 THF 和 58 ml 干燥乙腈的混合物中。加入 17 ml 三乙胺,并将反应混合物回流 17 小时。将反应混合物冷却至室温,倾倒在冰 (20 克) 和三乙胺 (5 ml) 上,转入分液漏斗中,并用二乙醚提取。连续地用 200 ml 水、200 ml 稀 (1.5%) 硫酸 (两次)、200 ml 水、200 ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤,并再次用 200 ml 水洗涤。用无水硫酸钠干燥有机相,减压除去溶剂,得到 41.79 克粗品残余物。将该残余物溶解在 300 ml 乙酸乙酯中,并冷却 (在 -20℃) 过夜。在 -10℃ 将混合物离心 (每分钟转数 3,500 转),然后倾倒掉母液。将得到的固体熔融,并溶解在己烷中,并冷冻 (5±3℃) 过夜。过滤沉淀,得到 18.97 克纯 (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-sn-甘油类白色固体。

[0839] 3-己烯基-1-甲磺酸酯的合成:在冰浴中,将 20 ml 顺式-3-己烯-1-醇和 40 ml 干燥三乙胺的混合物在 100 ml 干燥二氯甲烷中冷却。用 75 分钟的时间逐滴加入 20 ml 甲磺酰氯的 50 ml 二氯甲烷溶液,然后在 4℃ 保持该混合物 2 小时。加入冰 (50 克),在室温下搅拌该混合物 30 分钟,而后用 100 ml 氯仿提取两次。用 50 ml 水、50 ml 10% 硫酸水溶液、50 ml 水、50 ml 10% 碳酸氢钠水溶液洗涤有机相,而后用 50 ml 水洗涤两次。用无水 Na₂SO₄ 干燥溶剂,并减压除去。用硅胶 (85.37 克) 色谱纯化得到的残余物 (34.90 克)。用氯仿和己烷的 1:1(v/v) 混合物洗脱,得到 18.83 克 3-己烯基-1-甲磺酸酯。

[0840] (*S*)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-甘油的合成:将 10.60 克 (R)-1-十六烷基-3-三苯甲基-sn-甘油溶解在 50 ml 苯和 50 ml 石油醚的混合物中。加入 16.65 克粉末 KOH,并在氮气氛围中将反应混合物加热至回流。用 10 小时的时间将 10 ml 3-己烯基-1-甲磺酸酯的 50 ml 苯和 200 ml 石油醚溶液逐滴加入到该回流反应混合物中,同时共沸蒸馏除去在反应中形成的水。加入完毕后,继续搅拌 2 小时。将反应混合物冷却至室温,并加入 200 ml 水。用 200 ml 二乙醚提取混合物三次,用 200 ml 水洗涤合并的有机相三次,减压除去溶剂,得到 11.88 克粗品 (R)-1-十六烷基-2-(3-己烯基)-3-三苯甲基-sn-甘油。将 1-十六烷基-2-(3-己烯基)-3-三苯甲基-甘油溶解在 100 ml 甲醇中,加入 4 ml 浓 HCl,并将得到的溶液回流 4 小时。加入 100ml 水,并用 100 ml 二乙醚提取该混合物四次。用 100 ml 水洗涤合并的有机相,用无水 Na₂SO₄ 干燥,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在己烷中,并在 4℃ 保存过夜。过滤沉淀,减压除去溶剂,得到 10.08 克粗品。用硅胶 (95.91 克) 色谱纯化该产物。用己烷和氯仿的 1:1(v/v) 混合物、而后用氯仿、而后用氯仿与 2% 丙酮洗脱出 3.71 克的产物 (*S*)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-sn-甘油。

[0841] (*R*)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 2.08 克

(S)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-sn-甘油(在干燥器中用 P_2O_5 干燥)和 1.2 ml 三乙胺溶解在 60 ml THF 中。在 55 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 0.84 ml $POCl_3$ 和 0.7 ml 三乙胺的 40 ml THF 溶液中,同时搅拌。在冷却下,继续额外搅拌 10 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。然后将反应混合物在冰浴中冷却,然后用 25 分钟的时间逐滴加入 0.55 ml 乙醇胺和 2.0 ml 三乙胺的 15 ml THF 溶液。在冰浴中,继续搅拌 30 分钟,而后在室温下搅拌过夜。额外加入 0.18 ml 乙醇胺,并在室温下搅拌反应混合物 2 小时。过滤反应混合物,从滤液中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 48 ml 乙酸和 20 ml 水的混合物中,并加热到 $70^\circ C$,保持 1 小时,冷却至室温。用 100 ml 氯仿:甲醇的 2:1(v/v) 混合物提取溶液三次,用稀碳酸氢钠溶液和 100 ml 水洗涤,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,得到 2.57 克 (R)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0842] (R)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成:将 6.8 克碳酸钾加入到 2.54 克 (R)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的 100 ml 甲醇和 100 ml 二氯甲烷溶液中。然后逐滴加入 3 ml 硫酸二甲酯,并在室温下搅拌反应混合物 7 小时。加入额外 1 ml 的硫酸二甲酯,并将反应混合物在室温下搅拌过夜。将 26.4 克磷酸二氢钠加入到反应混合物中,然后加入 100 ml 水,然后用 100 ml 氯仿:甲醇的 2:1(v/v) 混合物提取该混合物三次。用 100 ml 水洗涤合并的有机相,减压除去溶剂,得到 3.44 克粗品 (R)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。

[0843] (R)-1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(CI-217)的合成:将 3.4 克 (R)-1-十六烷基-2-(3'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的 200 ml 水溶液加热至 $35^\circ C$,并加入 4.33 克碳酸氢钠。然后将 13.5 克高碘酸钠的 90 ml 水溶液放入滴液漏斗中,并逐滴加入。将 180 mg 高锰酸钾的 10 ml 水溶液放在第二个滴液漏斗中,根据保持反应混合物的粉红色的需要来逐滴加入。总共加入大约 4 ml 高锰酸盐溶液。在 $35-40^\circ C$,将反应混合物搅拌 5 小时,而后在室温下搅拌过夜。通过加入磷酸二氢钠,而后加入磷酸(80%),将反应的 pH 值调节至大约 3。用 100 ml 氯仿提取反应混合物三次,并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,并用 50 ml 亚硫酸氢钠溶液洗涤两次、而后用 50 ml 水洗涤。用无水 Na_2SO_4 干燥有机溶液,减压除去溶剂,得到 2.78 克粗品。用硅胶(30.89 克)色谱纯化粗品。用己烷与 20%-50% 氯仿的混合物、而后用氯仿、而后用氯仿与 10%-80% 甲醇的混合物洗脱出 1.98 克纯 (R)-1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。

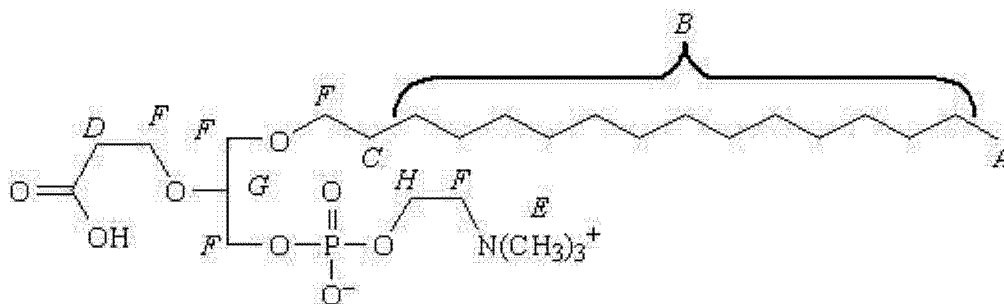
[0844] 1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征:

[0845] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇的氘化氯仿($CDCl_3$)中。在 600 MHz 测定光谱。

[0846] 结果显示了 1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0847] 1H NMR

[0848]



[0849] ^1H NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.27 ppm)

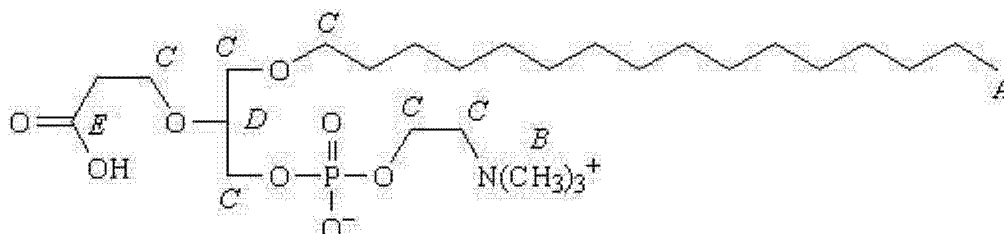
[0850]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.052	2H, br, s	H
3.72	1H, m	G
3.66	2H, m, CH_2	F
3.469	2H, m, CH_2	F
3.400	2H, m, CH_2	F
3.299	2H, m, CH_2	F
3.227	2H, m, CH_2	F
3.012	9H, s, $3 \times \text{CH}_3$	E
2.351	2H, m, CH_2	D
1.347	2H, m, CH_2	C
1.059	26H, m, $13 \times \text{CH}_2$	B
0.675	3H, t, $J=7.2\text{Hz}$, CH_3	A

[0851] ^{13}C NMR

[0852] 按照 1-十六烷基-2-(2-(2-羧基)乙基)-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0853]



[0854] ^{13}C NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.817 ppm)

[0855]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
173.126	E
78.990	D
72.220	C
70.695	C
66.932	C
66.584	C
66.271	C
59.509	C
54.487	B
35.945	
35.651	
32.291	

30.040	
29.880	
29.707	
26.432	
23.013	
14.211	A

[0856] 1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸的质谱特征:

[0857] 对 1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸 ($C_{27}H_{56}NO_8P$) 的计算质量是 554。

[0858] 使用电喷雾离子化质谱 (ES⁺MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=553$ 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 $[M-H]^-$ 。

[0859] 另外, 通过正离子电喷雾离子化质谱 (ESI⁺-MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=555$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$, 伴有具有 $m/z=577$ 的分子离子, 相当于阳离子化的分子离子 $[M+Na]^+$ 。

[0860] 由此, 该 MS 谱与 1-十六烷基-2-(2-羧基)乙基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[0861] 酪氨酸磷酸化作用:

[0862] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 CI-217 对在原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[0863] 如图 17 所示, 用 $20 \mu\text{g/ml}$ ($36 \mu\text{M}$) 的 CI-217 处理, 可以导致磷酸酪氨酸水平降低, 而用 $10 \mu\text{g/ml}$ ($18 \mu\text{M}$) 的 CI-217 处理, 具有很小的影响。这些结果与用 $20 \mu\text{g/ml}$ ($34 \mu\text{M}$) 和 $10 \mu\text{g/ml}$ ($17 \mu\text{M}$) 阳性对照 CI-201 分别处理的效果非常相似。

[0864] 实施例 11

[0865] 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-219) 和 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (CI-220)

[0866] 按照下文所描述方法, 合成 (R)-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸和 (R)-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺, 使用 (R)-(-)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法, 合成 (S)-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸和 (S)-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺, 但用 (S)-(+)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[0867] (S)-1-二十烷基-sn-甘油的合成: 将 8.6 ml (76.08 mmol) (R)-(-)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、15 克粉末氢氧化钾和 27.5 g (76.08 mmol) 1-溴二十烷在 150 ml 苯中搅拌并回流 6 小时, 同时共沸蒸馏除去形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 70 ml 。然后将反应混合物冷却至室温, 并加入 150 ml 水。然后用 150 ml 二乙醚提取反应混合物三次, 用 100 ml 水洗涤合并的有机相, 然后减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 105 ml 甲醇: 水: 浓盐酸的 90:10:5 (v/v) 混合物中, 并将得到的溶液回流, 直到溶液清澈为止。然后将溶液冷却至室温, 并加入 100 ml 水。用 150 ml 氯仿提取产物, 连续地用 150 ml 水、 150 ml 饱和碳酸钠水溶液洗涤, 并再次用 150 ml 水洗涤。然后减压除去溶剂, 用 200 ml 己烷将产物结晶, 得到 21.0 g 纯 1-二十烷基-sn-甘油, 在减压下将其在干燥器

中用氧化磷干燥。产率是 81.5%。

[0868] *(R)*-1-二十烷基-3-三苯甲基-sn-甘油的合成:将 20 克 1-二十烷基-sn-甘油和 18 克三苯基氯甲烷加入到 400 ml 干燥四氢呋喃 (THF) 和 100 ml 干燥乙腈的混合物中。加入 15 ml 干燥三乙胺,并将反应混合物回流 17 小时。然后将反应混合物冷却至室温,倾倒在冰 (500 克) 上,转入分液漏斗中,并用 200 ml 二乙醚提取三次。连续地用 150 ml 水、150 ml 稀 (1.5%) H_2SO_4 (两次)、150 ml 水、150 ml 浓碳酸氢钠水溶液洗涤,并再次用 150 ml 水洗涤。然后用无水硫酸钠干燥溶液,减压除去溶剂。将得到的残余物 (棕色油) 溶解在 300 ml 乙酸乙酯中,并冷却 (-20°C) 过夜。在 -10°C 将混合物离心 (每分钟转数 3,500 转),然后倾倒掉母液。将得到的固体溶解在己烷中,并冷冻 ($5\pm 3^\circ\text{C}$) 过夜。过滤沉淀,得到 26.0 克纯 *(R)*-1-二十烷基-3-三苯甲基-sn-甘油类白色固体。产率是 79%。

[0869] *(R)*-1-二十烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-sn-甘油的合成:将 26 克 *(R)*-1-二十烷基-3-三苯甲基-sn-甘油和 10 克 5-己烯基-1-甲烷磺酸酯溶解在 150 ml 苯中。加入 12 克粉末 KOH,并将反应混合物搅拌和回流 6 小时,同时通过共沸蒸馏除去反应中形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 75 ml。将反应混合物冷却至室温,并加入 200 ml 水。用 150 ml 二乙醚提取混合物三次,用 150 ml 水洗涤合并的有机相三次,并减压除去溶剂。用硅胶柱 (200 克) 纯化得到的残余物 (28 克棕色油)。用氯仿洗脱出 28 克产物浅黄色油。产率是 87.5%。

[0870] *(S)*-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 70 克 NaIO_4 溶解在 250 ml 水中。向此溶液中加入 6 克 NaHCO_3 和 1.2 克 KMnO_4 ,并将该悬浮液加热至 40°C 。在 90 分钟期间逐滴加入 25 克 *(R)*-1-二十烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-sn-甘油的 250 ml 叔丁醇溶液,并额外加热该混合物 6 小时。根据保持粉红色的需要加入额外量的 KMnO_4 溶液。将反应混合物冷却至室温,并通过硅藻土过滤,然后用 50 ml 叔丁醇洗涤硅藻土。逐滴加入 100 ml 10% 硫酸溶液,并将该溶液转入分液漏斗中,用 200 ml 己烷提取三次。用 20 克 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ 的 100ml 水溶液洗涤有机相,而后用 100 ml 水洗涤。通过减压除去大约 400 ml 溶剂,将有机相浓缩。向剩余溶液中加入 15 ml 水和 2 ml 浓 HCl,并将得到的混合物回流 6 小时。然后将该混合物冷却至室温,并通过减压除去溶剂而再次浓缩。通过加入 100 ml 水和 10 ml 30% NaOH 溶液,将残余物的 pH 值调节至 12。过滤沉淀,用 20 ml 水洗涤四次。用 100 ml 己烷:乙酸乙酯的 1:1(v/v) 混合物提取滤液。通过加入 10 ml 浓 HCl 将水相酸化至 pH1,然后用 100 ml 己烷提取三次。用无水 Na_2SO_4 干燥,减压除去溶剂,而后在 $5\pm 3^\circ\text{C}$ 用 1:9(v/v) 丙酮:己烷混合物将粗品过夜重结晶,得到 9.0 克纯 *(S)*-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油。产率是 53.1%。

[0871] *(S)*-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 8.9 克 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油溶解在 50 ml 甲醇中。加入 1 ml 浓 HCl (32%),并在室温下搅拌反应混合物过夜。减压除去溶剂,并将 50 ml 水加入到所得到的残余物中。将混合物用 50 ml 氯仿提取三次。用 50 ml 水、50 ml 饱和碳酸氢钠溶液洗涤合并的有机相,并再次用 50 ml 水洗涤。然后用硫酸钠干燥溶液,过滤,减压蒸发,得到 8.9 克 *(S)*-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油白蜡。

[0872] *(R)*-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 8.9 克 1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油 (通过与苯共沸蒸馏进行干燥) 和

8 ml 三乙胺溶解在 70 ml THF 中。在 30 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 5.36 ml POCl_3 的 40 ml THF 溶液中,同时搅拌。在冷却下,继续额外搅拌 30 分钟,并在室温下额外搅拌 45 分钟。然后将反应混合物在冰浴中冷却,然后用 30 分钟的时间逐滴加入 3.5 ml 乙醇胺和 16 ml 三乙胺的 50 ml THF 溶液,同时搅拌。在冰浴中,继续搅拌 30 分钟,而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,减压除去溶剂。将得到的残余物(14 克黄色油)溶解在乙酸(72 ml)和水(30 ml)的混合物中,加热到 70°C ,保持 1 小时。用 150 mL 氯仿将所得到的混合物提取三次,并用 150 ml 水洗涤两次。减压除去溶剂,得到 13 克 (R)-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺黄色油。

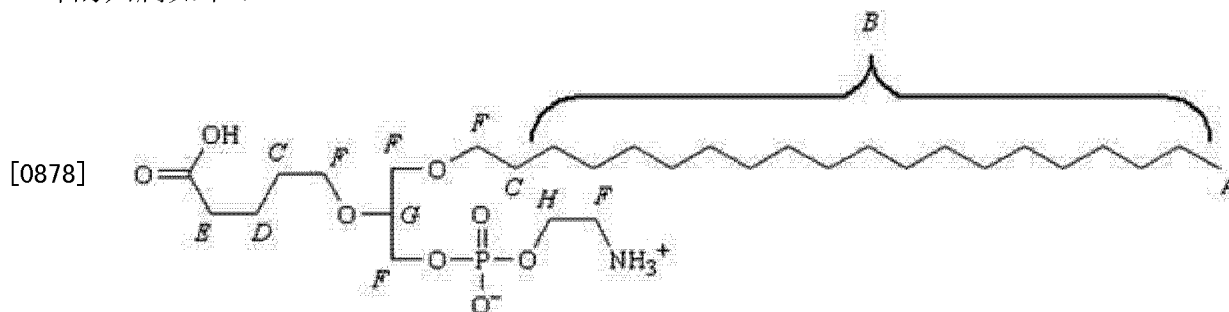
[0873] (R)-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-220)的合成:将 4 克 (R)-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 100 ml 甲醇:10% 氢氧化钠水溶液的 8:2(v/v) 混合物中,并在室温下搅拌反应混合物过夜。然后通过加入甲酸,将反应混合物的 pH 值调节至大约 4。然后加入 150 ml 水和 150 ml 氯仿。分离各相,并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,过滤,然后减压除去溶剂。用硅胶(70 克)色谱纯化得到的残余物。使用氯仿和己烷的混合物、而后用氯仿和甲醇的混合物和最终用氯仿、甲醇和水的混合物从柱中洗脱出 835 mg 的 (R)-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(CI-220)。产率是 21%。

[0874] 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的 NMR 特征:

[0875] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇(CD_3OD)的氘化氯仿(CDCl_3)中。然后在 600 MHz 测定光谱。利用 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱两者测定样品。

[0876] 结果显示了 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0877] 按照 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:



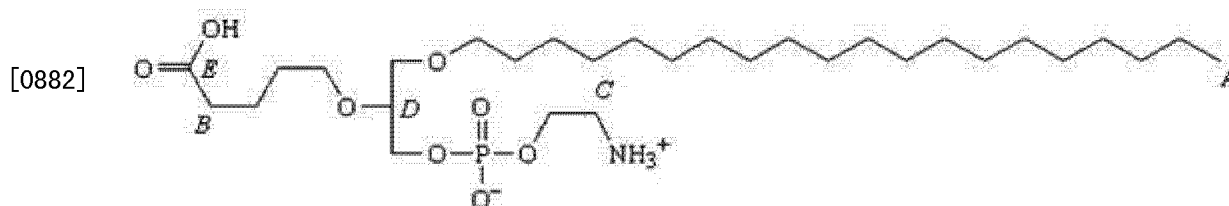
[0879] ^1H NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.357 ppm)

[0880]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.107	2H, br, s	H
3.858 – 3.876	1H, m	G
3.398 – 3.745	10H, m, $5 \times \text{CH}_2$	F
2.346	2H, t, $J=7.2\text{Hz}$	E
1.666 – 1.737	2H, m	D
1.599 – 1.631	2H, m	C
1.535 – 1.569	2H, m	C
1.260	34H, m, $17 \times \text{CH}_2$	B

0.882	3H, t, 1xCH ₃ , J=6.9Hz	A
-------	------------------------------------	---

[0881] 按照 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的¹³C 峰的归属如下：



[0883] ¹³C NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl₃) = 77.318 ppm)

[0884]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
177.352	E
78.023 – 78.075	D
71.977	
70.293	
70.019	
65.968	
61.913	
40.525	C
34.108	B
32.045	
29.825	
29.778	
29.730	
29.659	
29.476	
29.320	
26.186	
22.794	
21.884	
14.154	A

[0885] 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征：

[0886] 对 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (C₃₀H₆₂NO₈P) 的计算质量是 595.42。

[0887] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 进行的质谱显示了具有 m/z=594 的分子离子, 相当于去质子化的离子 [M-H]⁻。

[0888] 使用正离子电喷雾离子化质谱 (ESI+-MS) 进行的质谱显示了具有 m/z=596 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 [M+H]⁺, 伴有具有 m/z=618 的分子离子, 相当于阳离子化的分子离子 [M+Na]⁺。

[0889] 由此, 该 MS 谱与 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的化学结构一致。

[0890] (R)-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成：将 9 克 (R)-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 40 ml 异

丙醇和 18 ml 二氯甲烷的混合物中,并将该混合物加热至 35-40℃。逐滴加入 10.3 克碳酸钾的 20 ml 水溶液,同时保持反应混合物在 35-40℃。然后在 40℃,逐滴加入 7.2 ml 硫酸二甲酯的 10 ml 异丙醇 (10ml) 溶液。在 40℃保持反应混合物 2 小时,而后再在室温下过夜。加入 150 ml 水,并用 150 ml 氯仿提取该混合物三次。用 150 ml 水洗涤有机相,减压除去溶剂,得到 8 克 (R)-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸蜡。

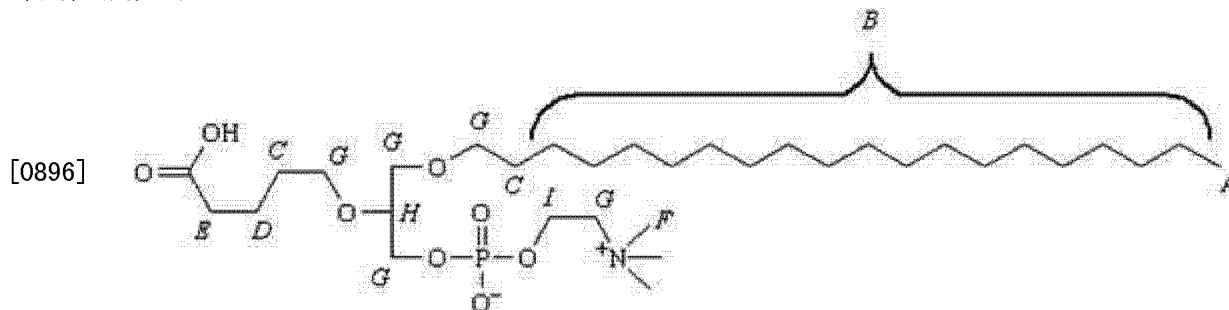
[0891] (R)-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (CI-219) 的合成: 将 8 克 (R)-1-二十烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸溶解在 100 ml 甲醇:10% 氢氧化钠水溶液的 8:2(v/v) 混合物中,并在室温下搅拌反应混合物 5 小时。然后通过加入磷酸二氢钠、而后加入甲酸,将反应混合物的 pH 值调节至大约。然后加入 100 ml 水和 150 ml 氯仿。分离各相,并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,过滤,然后减压除去溶剂。用硅胶 (150 克) 色谱纯化得到的残余物 (7.5 克)。使用氯仿、而后用氯仿和甲醇的混合物、最后用氯仿、甲醇和水的混合物洗脱产物。从含有产物的馏份中减压除去溶剂,得到 4 克 (R)-1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸白色固体。产率是 51.1%。

[0892] 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征:

[0893] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇 (CD_3OD) 的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。然后在 600 MHz 测定光谱。利用 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱两者测定样品。

[0894] 结果显示了 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0895] 按照 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:



[0897] ^1H NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.246 ppm)

[0898]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.264	2H, br, s	I
3.834 — 3.872	1H, m	H
3.404 — 3.679	10H, m, 5x CH_2	G
3.224	9H, s, 3x CH_3	F
2.188	2H, dt, $J_1=2.4\text{Hz}$, $J_2=7.2\text{Hz}$	E
1.503 — 1.561	2H, m	D
1.431 — 1.465	2H, m	C
1.359 — 1.394	2H, m	C
1.095 — 1.136	34H, m, 17x CH_2	B
0.716	3H, t, 1x CH_3 , $J=7.2\text{Hz}$	A

[0899] 按照 1-二十烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C

[0910] 如图 28 所示,用 20 μ g/ml 的 CI- 219 处理,可以导致磷酸酪氨酸水平降低,而用 10 μ g/ml 的 CI- 219 处理,具有很小的影响(如果有的话)。20 μ g/ml CI-219 的影响与 20 μ g/ml CI-201 的影响相似。

[0911] 类似地,如图 29 所示,用 20 μ g/ml 的 CI- 220 处理,可以导致磷酸酪氨酸水平降低,而用 10 μ g/ml 的 CI- 220 处理,具有很小的影响(如果有的话)。20 μ g/ml CI-220 的影响与 20 μ g/ml CI-201 的影响相似。

[0912] 实施例 12

[0913] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯(CI-201-PA)

[0914] 按照下文所描述方法,由(S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油合成(R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸酯。使用相同的方法,由(R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油合成(S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯。

[0915] (S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油和(R)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-甘油的合成描述在实施例 1 中。

[0916] (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸酯的合成:用 20 分钟的时间,将按照实施例 1 所描述方法制备的(S)-1-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油(1.44 克)和三乙胺(1.5 ml)(在 THF(15 ml)中)溶液逐滴加入到冰冷却下的 POCl₃(1 ml)的 THF(15 ml)溶液中,同时搅拌。在冷却下,继续额外搅拌 30 分钟,并在室温下额外搅拌 1 小时。减压蒸发溶剂。将得到的残余物溶解在冰冷却下的饱和碳酸氢钠溶液(100 ml)中,并在冰浴中搅拌反应混合物 45 分钟。通过加入 HCl(32%),将溶液的 pH 值调节至 4-5 的范围。用氯仿(3 x 50 ml)提取混合物,用水(50 ml)洗涤有机相,减压除去溶剂。将混合物溶解在氯仿中,并用硅胶(30 克)纯化。使用氯仿、而后用氯仿与 10%-50% 甲醇的混合物洗脱出 470 mg 纯 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯。

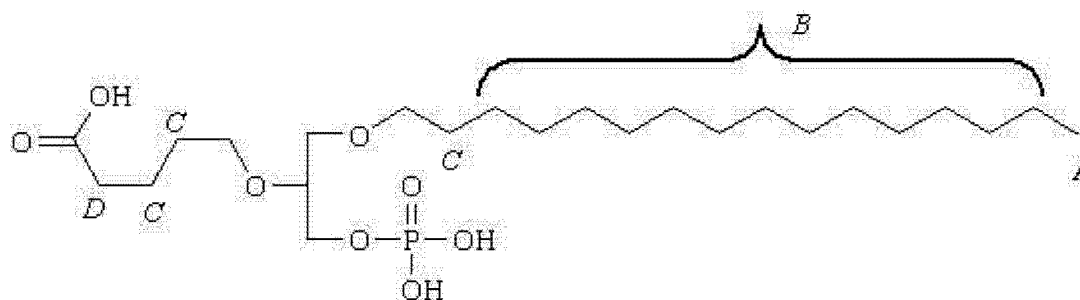
[0917] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯(CI-201-PA)的 NMR 特征:

[0918] 将样品溶解在氘化氯仿(CDCl₃)中。然后在 300 MHz 测定 ¹H NMR 和 ¹³C NMR 谱。

[0919] 结果显示了 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0920] 按照 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯的结构所观察到的 ¹H 峰的归属如下:

[0921]



[0922] ¹H NMR(300 MHz, 参比溶剂(CDCl₃)=7.29 ppm)

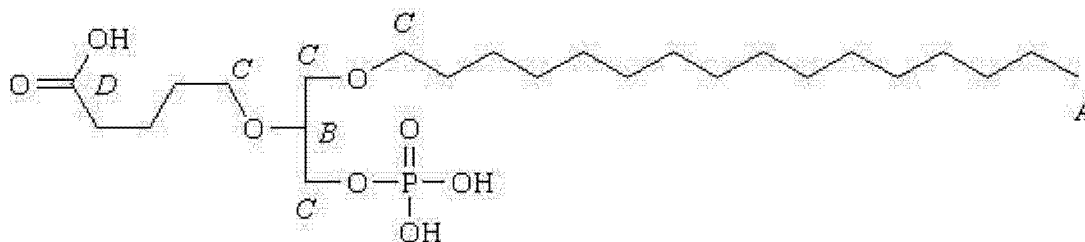
[0923]

δ [ppm]	说明	归属(参见上式)
----------------	----	----------

3.900	2H, m	
3.658 – 3.680	3H, m, CH ₂ and CH	
3.413	4H, m, 2xCH ₂	
2.336	2H, m	D
1.539–1.609	6H, m, 3xCH ₂	C
1.255	26H, m, 13xCH ₂	B
0.880	3H, t, 1xCH ₃ , J=6.75Hz	A

[0924] 按照 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯的结构所观察到的 ¹³C 峰的归属如下：

[0925]



[0926] ¹³C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl₃) = 77.113 ppm)

[0927]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
178.54	D
78.057	B
71.791	C
70.624	C
69.837	C
65.271	C
33.931	
33.766	
31.970	
30.952	
29.775	
29.649	
29.413	
29.048	
26.156	
22.729	
21.571	
14.138	A

[0928] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯的质谱特征：

[0929] 对 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯 (C₂₄H₄₉O₈P) 的计算质量是 496.3165。

[0930] 使用电喷雾离子化质谱 (ES/MS) 进行的质谱显示了具有 m/z=495 的分子离子，相当于去质子化的离子 [M-H]⁻。由此，该 MS 谱与 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸酯 (CI-201-PA) 的化学结构一致。

[0931] CI-201-PA 的毒性：

[0932] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容，评价 CI-201-PA 的毒性。

[0933] 如图 30 A 和 30B 所示，在 20 μg/ml 或更高的剂量下检测了 CI-201-PA 的毒性，

LD₅₀ 大约为 50 μg/ml。在 10 μg/ml 的浓度下,只在两个实验的一个实验中观察到毒性。

[0934] 实施例 13

[0935] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(1-S-CI-201)和 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(1-S-CI-202)

[0936] 按照下文所描述的方法,合成 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸和 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺,使用 (R)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇对甲苯磺酸酯作为起始原料。使用相同的方法,合成 3-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-1-胆碱磷酸和 3-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-1-磷酸乙醇胺,使用 (S)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇对甲苯磺酸酯作为起始原料。

[0937] 1-S-十六烷基-sn-甘油的合成:将 48 ml 的 1-十六烷硫醇在 150 ml 苯中搅拌并回流,同时通过共沸蒸馏除去水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 125 ml。加入 58 ml 乙醇钠的乙醇溶液,并在氮气氛围中将该混合物搅拌 30 分钟。加入 30 克 (R)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇对甲苯磺酸酯的 100 ml 干燥苯溶液,并将混合物回流 3 小时。将反应混合物冷却至室温,并在室温下搅拌过夜。将反应混合物倾倒在冰上,用 150 ml 二乙醚提取三次。用 150 ml 水洗涤有机相两次,用硫酸钠干燥,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 100 ml 9:1:0.5(v/v) 甲醇:水:浓 HCl 的混合物中,并将得到的溶液回流 2 小时,而后冷却至室温。将反应混合物倾倒在冰上,用 200 ml 氯仿提取三次,然后用 200 ml 水、200 ml 饱和碳酸钠溶液洗涤,并再次用 200 ml 水洗涤。减压除去溶剂,得到 70 克橙色固体。用 400 ml 己烷将残余物重结晶两次,得到 30 克 1-S-十六烷基-sn-甘油(30 g)白色固体。

[0938] 1-S-十六烷基-3-三苯甲基-sn-甘油的合成:将 28 克 1-S-十六烷基-甘油和 31 克氯三苯甲烷放入到 370 ml 干燥 THF 和 100 ml 干燥乙腈的混合物中。加入 25 ml 干燥三乙胺,并将反应混合物回流 17 小时。然后将反应混合物冷却至室温,倾倒在冰(1 千克)上,转入分液漏斗中,并用 200 ml 二乙醚提取三次。用 200 ml 水、200 ml 稀硫酸(1.5%)(两次)、200 ml 水、200 ml 浓碳酸氢钠溶液和 200 ml 水洗涤。然后用无水硫酸钠干燥溶液,减压除去溶剂,得到 60 克棕色油。将该油溶解在 150 ml 乙酸乙酯中,并将得到的溶液在 -20℃ 保持过夜。然后将混合物离心(在 -10℃),并倾倒掉母液。在 4℃,用己烷将获得的固体重结晶。过滤后,得到 36 克 1-S-十六烷基-3-三苯甲基-sn-甘油白色固体。

[0939] 1-S-十六烷基-2-(4-叔丁基-羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 10 克 1-S-十六烷基-3-三苯甲基-sn-甘油溶解在 150 ml 苯和 50 ml 石油醚的混合物中,然后加入 20.48 克粉末 KOH。将反应混合物搅拌并回流。用大约 10 小时的时间,将 10 ml 戊酸叔丁基酯的 200 ml 石油醚溶液逐滴加入到该回流溶液中,同时共沸蒸馏除去形成的水。加入完毕后,将反应混合物额外回流 1 小时,以便减少溶剂的体积。然后将反应混合物冷却至室温,并加入 100 ml 冰冷却的水和 20 ml 甲酸的混合物。然后用 100 ml 氯仿提取反应混合物两次,用硫酸钠干燥,减压除去溶剂,得到 15.65 克浅棕色油。将得到的油溶解在 160 ml 甲基叔丁基醚(MTBE)和 20 ml 甲醇的混合物中。加入 3 ml 浓 HCl,并将得到的溶液回流 4 小时,然后冷却至室温,并在室温下搅拌过夜。用 100 ml 饱和碳酸钠水溶液洗涤反应混合物,用硫酸钠干燥,减压除去溶剂,得到 14.10 克浅棕色油。用硅胶柱(91 克)色谱纯化该油。使

用己烷、而后己烷和氯仿的混合物、而后氯仿和丙酮从柱中洗脱产物。减压除去溶剂,得到 6.84 克 1-S-十六烷基-2-(4-叔丁基-羧基)丁基-sn-甘油。

[0940] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 6.84 克 1-S-十六烷基-2-(4-叔丁基-羧基)丁基-sn-甘油溶解在 80 ml 乙醇中。加入 3.7 克 KOH 的 5ml 水溶液,并将混合物搅拌和回流 6 小时。将混合物冷却至室温后,加入 16 ml 水和 100 ml 己烷:乙酸乙酯的 8:2(v/v) 混合物。分离各相,并将 50 ml 水和 5 ml 甲酸加入到有机相中。用氯仿提取,用硫酸钠干燥,减压除去溶剂,得到 3.89 克 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油浅棕色油。

[0941] 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 3.89 克 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油溶解在 100 ml 甲醇中,并加入 1 ml 浓盐酸。将反应混合物在室温下搅拌过夜,并用 100 ml 氯仿提取两次。用 50 ml 水洗涤有机相两次,用硫酸钠干燥,然后减压除去溶剂,得到 3.75 克残余物。用硅胶柱(49 克)色谱纯化该残余物。使用氯仿、而后氯仿和丙酮的混合物从柱中洗脱产物。减压除去溶剂,得到 2.94 克纯 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油。

[0942] 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 2.83 克 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油和 1.7 ml 三乙胺溶解在 20 ml 苯和 120 ml THF 的混合物中。在 60 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 1.14 ml POCl₃ 和 0.98 ml 三乙胺的 20 ml THF 溶液中,同时搅拌。在冷却下,继续额外搅拌 10 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。然后用 40 分钟时间将 1.02 ml 乙醇胺和 2.8 ml 三乙胺的 50 ml THF 溶液逐滴加入到冰冷却下的反应混合物中。在 0℃,继续搅拌 10 分钟,而后在室温下搅拌过夜。然后过滤反应混合物,减压除去溶剂。将残余物(4.23 克)溶解在 48 ml 乙酸和 20 ml 水的混合物中,并加热到 70℃,保持 1 小时。然后用 50 ml 的 2:1(v/v) 的氯仿:甲醇混合物将溶液提取三次,减压除去有机溶剂,得到 4.05 克粗品 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0943] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成:将 0.97 克 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 50 ml 甲醇中。加入 7 ml 10% 氢氧化钠溶液,并在室温下将得到的溶液搅拌 8 小时。加入 2 ml 甲酸,然后用 50 ml 氯仿提取该混合物三次。减压除去合并的有机溶剂,得到 0.70 克蜡样残余物。用硅胶(32 克)色谱纯化该残余物。使用氯仿、而后氯仿和甲醇的混合物从柱中洗脱产物。减压除去溶剂,得到 0.625 克纯 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺(1-S-CI-202)。

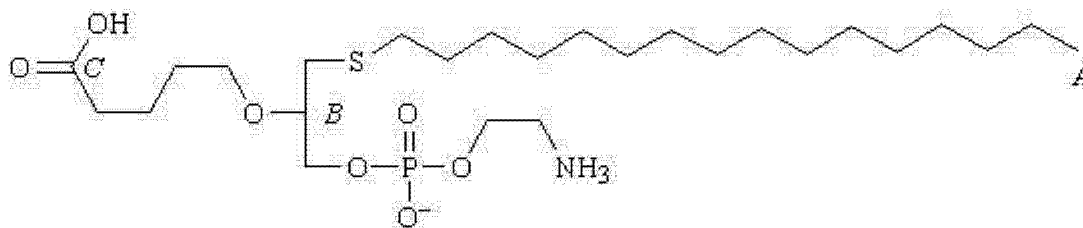
[0944] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(1-S-CI-202) 的 NMR 特征:

[0945] 利用 ¹³C NMR 谱测定样品。

[0946] 结果显示了 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(1-S-CI-202) 的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0947] 按照 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺(1-S-CI-202) 的结构所观察到的 ¹³C 峰的归属如下:

[0948]



[0949] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 77.724 ppm)

[0950]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
179.382	C
78.616	B
69.824	
66.630	
62.304	
53.954	
40.447	
35.308	
33.130	
32.680	
32.072	
29.877	
29.514	
29.165	
22.824	
22.277	
14.179	A

[0951] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (1-S-CI-201) 的质谱特征:

[0952] 对 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{NO}_7\text{PS}$) 的计算质量是 555.75。

[0953] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI-MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=554$ 的分子离子, 相当于去质子化的离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

[0954] 使用正离子电喷雾离子化质谱 (ESI+-MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=556$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 和具有 $m/z=578$ 的离子, 相当于阳离子化的分子离子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

[0955] 由此, 该 MS 谱与 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (1-S-CI-202) 的化学结构一致。

[0956] 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成: 将 3.48 克 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺溶解在 35 ml 甲醇和 100 ml 二氯甲烷的混合物中。加入 10 克碳酸钾的 20 ml 水溶液。然后加入 3.5 ml 的硫酸二甲酯, 并将反应在室温下搅拌过夜。通过加入 1 ml 甲酸, 将反应的 pH 值调节至 4。用 75 ml 2:1(v/v) 氯仿: 甲醇混合物提取该混合物三次, 而后除去溶剂, 得到 3.72 克粗品 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。

[0957] (R)-1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成: 将 3.72 克 1-S-十六烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸溶解在 100 ml 甲醇

中。加入 10 ml 10% 氢氧化钠溶液,并在室温下将得到的溶液搅拌过夜。加入 1.2 ml 甲酸,用 100 ml 2:1(v/v) 氯仿:甲醇混合物提取该混合物三次。减压除去合并的有机溶剂,得到 2.92 克残余物。用硅胶(54 克)色谱纯化 2.46 克该残余物。使用氯仿和己烷的混合物、而后氯仿、而后氯仿和甲醇的混合物从柱中洗脱产物。减压除去溶剂,得到 1.21 克纯 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(1-S-CI-201)。

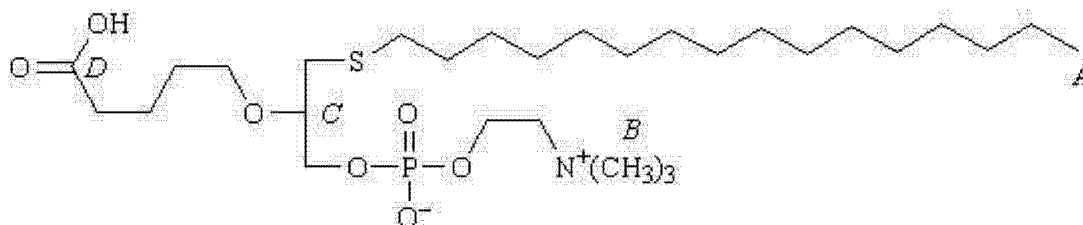
[0958] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(1-S-CI-201)的 NMR 特征:

[0959] 利用 ^{13}C NMR 谱测定样品。

[0960] 结果显示了 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(1-S-CI-201)的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0961] 按照 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(1-S-CI-201)的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0962]



[0963] ^{13}C NMR(300 MHz, 参比溶剂(CDCl_3))=75.948 ppm)

[0964]

δ [ppm]	归属(参见上式)
175.904	D
76.958	C
68.150	
64.677-64.749	
57.613-57.676	
52.612	B
52.185	
33.133	
31.379	
31.076	
30.314	
28.096	
27.745	
27.345	
21.069	
20.499	
12.427	A

[0965] 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸(1-S-CI-201)的质谱特征:

[0966] 对 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸($\text{C}_{29}\text{H}_{60}\text{NO}_7\text{PS}$)的计算质量是 597。

[0967] 使用电喷雾离子化质谱(ESMS)进行的质谱显示了具有 $m/z=596$ 的分子离子,相当于去质子化的离子 $[\text{M}-\text{H}]^-$ 。

[0968] 使用正离子电喷雾离子化质谱 (ESI+-MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=598$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$, 和具有 $m/z=620$ 的离子, 相当于阳离子化的分子离子 $[M+Na]^+$ 。

[0969] 由此, 该 MS 谱与 1-S-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (1-S-CI-201) 的化学结构一致。

[0970] 酪氨酸磷酸化作用:

[0971] 按照上文所描述的内容, 测定 1-S-CI-201 和 1-S-CI-202 对在原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[0972] 如图 31 所示, 用 $20 \mu\text{g/ml}$ ($34 \mu\text{M}$) 的 1-S-CI-201 处理, 可以导致磷酸酪氨酸水平降低, 与 $20 \mu\text{g/ml}$ ($34 \mu\text{M}$) 阳性对照 CI-201 一样。然而, 用 $10 \mu\text{g/ml}$ ($17 \mu\text{M}$) 的 1-S-CI-201 处理, 具有很小的影响 (如果有的话), 而 $10 \mu\text{g/ml}$ ($34 \mu\text{M}$) CI-201 导致磷酸酪氨酸水平提高。

[0973] 如图 32 所示, 用 $20 \mu\text{g/ml}$ ($36 \mu\text{M}$) 的 1-S-CI-202 处理, 可以导致磷酸酪氨酸水平降低, 而用 $10 \mu\text{g/ml}$ ($18 \mu\text{M}$) 的 1-S-CI-202 处理, 导致磷酸酪氨酸水平提高。这些结果与 $10 \mu\text{g/ml}$ 和 $20 \mu\text{g/ml}$ 的各自的 CI-201 和 CI-202 分别得到的结果非常相似。

[0974] 实施例 14

[0975] 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸 (*di-OH*)

[0976] 按照下文所描述的方法, 合成 (R)-1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-*sn*-甘油基-3-胆碱磷酸, 使用 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法, 合成 (S)-1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸, 使用 (S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[0977] 1-十六烷基-*sn*-甘油的合成: 将 19.4 克 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、49 克粉末 KOH 和 4.8 克十六烷基溴在 500 ml 甲苯 (500ml) 中搅拌并回流 6 小时, 同时共沸蒸馏除去形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 100 ml, 并将反应混合物冷却至室温。将冷却的反应混合物溶解在 500 ml 二氯甲烷中, 用 200 ml 水洗涤两次, 减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 500 ml 90:10:5 (v/v) 的甲醇:水:浓 H_2SO_4 的混合物中, 并将得到的溶液回流 30 分钟, 而后冷却至室温, 用 500 ml 二氯甲烷提取。用 100 ml 水洗涤提取物两次, 用 100 ml 5% 碳酸钠水溶液洗涤, 并再次用 100 ml 水洗涤, 直到中性为止。减压除去溶剂, 在 4°C 用己烷将粗品重结晶, 得到 35.3 克纯 1-十六烷基-*sn*-甘油。产率是 76%。

[0978] 1-十六烷基-3-三苯甲基-*sn*-甘油的合成: 在氮气氛围中, 将 35.3 克 1-十六烷基-*sn*-甘油、37.3 克三苯基氯甲烷和 22.44 克干燥三乙胺在 470 ml 干燥四氢呋喃和 120 ml 干燥乙腈的混合物中的溶液回流 15 小时。冷却至室温后, 过滤反应混合物。将滤液倾倒在冰 (500 克) 上, 而后用 200 ml 氯仿提取三次。依次用 500 ml 水、500 ml 0.15N HCl、500 ml 饱和 NaHCO_3 水溶液洗涤有机相, 并再次用水洗涤。用 Na_2SO_4 干燥提取物, 减压除去溶剂。将得到的黄色残余物溶解在 500 ml 温热己烷中, 并将得到的澄清溶液冷冻 ($5 \pm 3^\circ\text{C}$) 过夜。在这段时间, 出现沉淀。过滤沉淀后, 从滤液中减压除去溶剂, 得到 58.3 克 1-十六烷基-3-三苯甲基-*sn*-甘油。产率是 95%。

[0979] (*S*)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-*sn*-甘油的合成: 将 36.3 克 1-十六烷基-3-三

苯甲基-sn-甘油和 11.5 克 5-己烯基-甲磺酸酯(由 5-己烯-1-醇和甲磺酰氯在干燥吡啶中制备)溶解在 500 ml 甲苯中。加入 20 克粉末 KOH,并将反应混合物搅拌和回流 8 小时,同时共沸蒸馏除去所形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 100 ml,并将反应混合物冷却至室温。将冷却的反应混合物溶解在 500 ml 二氯甲烷中,用 200 ml 水洗涤两次,减压除去溶剂。将得到的 1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基甘油溶解在 500 ml 甲醇:水:浓(32%)HCl 的 90:10:5(v/v)混合物中,并将得到的溶液回流 3 小时。将反应混合物冷却至室温,加入 500 ml 水,而后用 250 ml 二氯甲烷提取该混合物三次。用 100 ml 水洗涤合并的有机相两次,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 250 ml 己烷中,并将得到的溶液在 -20℃保存 48 小时,导致大部分三苯基甲醇沉淀。过滤并从滤液中除去溶剂后,用硅胶色谱纯化剩余的产物。用 1:1(v/v)氯仿:石油醚洗脱出 11.65 克纯(S)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油。产率是 45%。

[0980] *(R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺的合成*:将 11.65 克 1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油和 3.23 克三乙胺溶解在 650 ml 干燥 THF 中。将此溶液逐滴加入到冰冷冷却下的 5.34 克三氯氧磷的 130 ml THF 溶液中,同时搅拌。以某种速度进行加入,以使反应温度不超过 15℃。在冷却下,继续额外搅拌 10 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。然后将反应混合物在冰浴中冷却,用 30 分钟的时间逐滴加入 2.10 ml 乙醇胺和 9.73 ml 三乙胺的 THF 溶液,同时搅拌。在冰浴中,继续搅拌 20 分钟,而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,减压除去溶剂。将得到的残余物(15.93 克)溶解在 240 ml 乙酸和 100 ml 水的混合物中。将得到的溶液在 70℃加热 1 小时,冷却至室温,并用 250 ml 氯仿:甲醇的 2:1(v/v)混合物提取两次。从有机相中减压除去溶剂,得到 12.50 克(R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。

[0981] *(R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成*:将(R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-3-磷酸乙醇胺溶解在 650 ml 异丙醇和 220 ml 二氯甲烷中。加入 66.5 克 K₂CO₃ 的 130 ml 水溶液,并将该反应混合物加热到 40℃。以不会使反应温度超过 35-40℃的这种速度,逐滴加入 13.3 ml 硫酸二甲酯的 130 ml 异丙醇溶液(用 45 分钟的时间)。加入完毕后,在 40℃继续搅拌 90 分钟。然后将反应混合物冷却至室温,用 500 ml 的氯仿:甲醇的 2:1(v/v)混合物提取三次,从有机相中减压除去溶剂,得到 12.50 克(R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。

[0982] *(R)-1-十六烷基-2-(5,6-二羟基-己基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成*:将 8.57 克(R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸溶解在 80 ml 甲酸中。加入 18.7 ml 30%过氧化氢,并在室温下搅拌反应混合物过夜。加入 250 ml 水,并将该溶液转入分液漏斗中,用 100 ml 氯仿:甲醇的 2:1(v/v)混合物提取 5 次。从有机相中减压除去溶剂,并将得到的残余物溶解在 150 ml 甲醇中。加入 55 ml 氢氧化钠水溶液(10%),并在室温下搅拌反应混合物 2 小时。加入 3 ml 冷却的浓 HCl(32%) 在 150 ml 水中的混合物,并将得到的溶液转入分液漏斗中,用 100 ml 氯仿:甲醇的 2:1(v/v)混合物将产物提取 5 次。从有机相中减压除去溶剂,并将得到的粗品用硅胶色谱纯化。用氯仿和 4%-60% 甲醇的混合物洗脱出 4.5 克纯(R)-1-十六烷基-2-(5,6-二羟基-己基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸(di-OH)。产率是 50%。

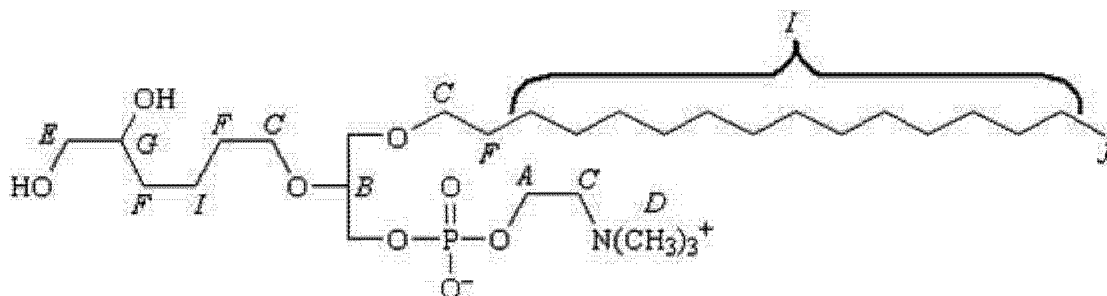
[0983] *1-十六烷基-2-(5,6-二羟基-己基)-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征*:

[0984] 将样品溶解在氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 300 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱。

[0985] 结果显示了 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[0986] 按照 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[0987]



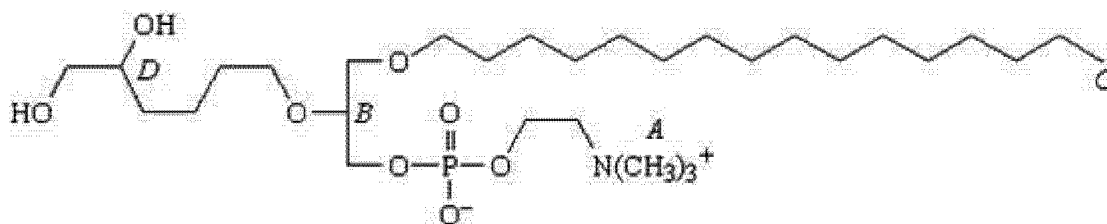
[0988] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.299 ppm)

[0989]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.300	2H, br, s	A
3.930	2H, m	E
3.880 – 3.898	1H, m	B
3.653 – 3.784	2H, m	G
3.477 – 3.566	10H, m, 5x CH_2	C
3.320	9H, s, 3x CH_3	D
1.506–1.532	6H, m, 3x CH_2	F
1.246	28H, m, 14x CH_2	I
0.872	3H, t, 1x CH_3 , J=6.75Hz	J

[0990] 按照 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[0991]



[0992] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.700 ppm)

[0993]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
78.691	B
72.734	
72.443	D
70.993	
70.661	
67.645	
66.843	
66.690	
60.067	

55.007	A
33.669	
33.512	
32.612	
30.586	
30.411	
30.258	
30.051	
26.779	
23.373	
23.176	
14.800	C

[0994] 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸的质谱特征:

[0995] 对 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸 ($C_{30}H_{64}NO_8P$) 的计算质量是 597.4370。

[0996] 使用快速原子轰击 (FAB+) 得到的质谱显示了具有 $m/z=598.400$ 的分子离子,相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$ 。由此,该质谱与 1-十六烷基-2-(5,6-二羟基)己基-甘油基-3-胆碱磷酸 (di-OH) 的化学结构一致。

[0997] di-OH 的毒性:

[0998] 按照上文所描述方法评价 di-OH 的毒性。

[0999] 如图 33A 和 33B 所示,在 $20 \mu g/ml$ 或更高剂量下检测到 di-OH 的毒性,di-OH 的 LD_{50} 在 20 和 $50 \mu g/ml$ 之间。

[1000] 动脉粥样硬化病变试验:

[1001] 如上文材料和方法部分中所述,在 LDL-RD 雄性小鼠中,测试 di-OH 抵御动脉粥样硬化病变的体内效能。以每个小鼠 1 mg 的剂量给予 Di-OH,相当于 60 mg/kg 的剂量。

[1002] 如图 34 所示,与对照物 (PBS) 相比较,1 mg/小鼠的 di-OH 可以使动脉粥样硬化病变面积降低 25%。

[1003] 这些结果表明,di-OH 可有效抵御动脉粥样硬化。

[1004] 实施例 15

[1005] 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸

[1006] 按照下文所描述方法,合成 (R)-1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸,使用 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法,合成 (S)-1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸,使用 (S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[1007] 1-(顺式-9-十六碳烯基)-sn-甘油的合成:将 5.32 克 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇、12.26 克粉末氢氧化钾和 10 克顺式-9-十六碳烯基-甲磺酸酯在 250 ml 苯中搅拌并回流 10.5 小时,同时共沸蒸馏除去所形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 50 ml。将反应混合物冷却至室温,加入 50 ml 水,并用 100 ml 二乙醚提取该混合物三次。用 100 ml 水洗涤合并的有机相,减压除去溶剂。将残余物 (12.01 克) 溶解在 200 ml 甲醇:水:浓盐酸的 90:10:3(v/v) 混合物中,并将得到的溶液在室温下搅拌过夜,而后回流 1 小时。冷却至室温后,加入 100 ml 水。用 75 ml 二乙醚提取产物三次,连续地用 100 ml 水、100 ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤,并再次用 100 ml 水洗涤。用 Na_2SO_4 干燥

之后,减压除去溶剂,得到 9.104 克粗品 1-(顺式-9-十六碳烯基)-sn-甘油。用硅胶(30 克)柱色谱纯化该粗品。用氯仿、而后用氯仿和 5% 甲醇的混合物洗脱出 9.07 克纯 1-(顺式-9-十六碳烯基)-甘油。产率是 91.8%。

[1008] *(S)*-1-(顺式-9-十六碳烯基)-3-三苯甲基-sn-甘油的合成:将 9.07 克 1-(顺式-9-十六碳烯基)-甘油溶解在干燥 THF(160 ml)和干燥乙腈(40 ml)的混合物中。加入 10.52 克三苯基氯甲烷和 10 ml 三乙胺,并将反应混合物回流 15 小时。将反应混合物冷却至室温,倾倒在冰(100 克)上,转入分液漏斗中,并用 100 ml 氯仿提取三次。连续地用 100 ml 水、100 ml 稀(1.0%)硫酸、100 ml 水、100 ml 饱和碳酸氢钠水溶液洗涤有机相,并再次用 100 ml 水洗涤。用无水硫酸钠干燥有机相,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在热己烷(100 ml)中,并将得到的溶液在 4℃冷却 36 小时。过滤沉淀的副产物,减压除去溶剂,得到 14.57 克粗品。用硅胶(200 克)色谱纯化粗品。用氯仿洗脱出 9.81 克纯 1-(顺式-9-十六碳烯基)-3-三苯甲基-sn-甘油。产率是 61.1%。

[1009] *(S)*-1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-叔丁基-羧基)丁基-sn-甘油的合成:将 8.83 克 1-(顺式-9-十六碳烯基)-3-三苯甲基-sn-甘油溶解在苯(170 ml)和石油醚(100 ml)的混合物中。加入粉末 KOH(23.1 克),并将反应混合物加热至温和回流状态。用 25 小时的时间逐滴加入戊酸叔丁基酯(20 ml)的石油醚(420 ml)溶液,同时共沸蒸馏除去所形成的水。冷却至室温后,通过加入甲酸(10 ml),将反应混合物的 pH 值调节至大约 6。用二乙醚(3 x 100 ml)提取混合物,用水(100 ml)洗涤有机相。减压除去溶剂,得到 17.72 克油状产物。将该残余物溶解在甲醇(50 ml)中,加入 4 ml 浓 HCl(32%),并将反应混合物回流 5.5 小时。冷却至室温后,加入 50 ml 水,并用二乙醚(3 x 50 ml)提取该混合物。将合并的有机相用水(50 ml)洗涤,减压除去溶剂,得到 14.26 克粗品。用硅胶(110 克)色谱纯化 2.93 克纯 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-叔丁基-羧基)丁基-sn-甘油。用氯仿:己烷(1:1 体积比)的混合物洗脱产物,而后用氯仿与至多 3% 乙酸乙酯的混合物洗脱。从含有所需要产物的馏份中减压除去溶剂。产率是 39.2%。

[1010] *(R)*-1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成:将 1.59 克 *(S)*-1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-叔丁基-羧基)丁基-sn-甘油(通过与苯共沸蒸馏进行干燥)和 0.7 ml 三乙胺溶解在 THF(45 ml)中。在 18 分钟期间内将该溶液逐滴加入到冰冷冷却下的 POCl_3 (0.5 ml)和三乙胺(0.05 ml)的 THF(20 ml)溶液中,同时搅拌。在冷却下,继续额外搅拌 10 分钟,而后在室温下额外搅拌 45 分钟。将反应混合物在冰浴中冷却,然后用 65 分钟的时间逐滴加入乙醇胺(0.38 ml)和三乙胺(3.25 ml)的 THF(54 ml)溶液,同时搅拌。在冷却期间,继续搅拌 10 分钟,而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物,用 THF(2 x 10 ml)洗涤,减压除去溶剂。将残余物(2.1 克)溶解在乙酸(48 ml)和水(20 ml)的混合物中,加热到 70℃,保持 1 小时。用二乙醚(2x50 ml)提取,用水(2x50 ml)洗涤,减压除去溶剂,得到 2.15 克粗品浅棕色油。将该油溶解在甲醇(35 ml)和二氯甲烷(100 ml)的混合物中。加入碳酸钾(10 克)的水(20 ml)溶液,并在室温下搅拌反应混合物 10 分钟。加入硫酸二甲酯(2.5 ml),并在室温下搅拌反应混合物 6 小时。加入额外 1 ml 的硫酸二甲酯,并将反应混合物在室温下搅拌 48 小时。用氯仿(3 x 50 ml)提取混合物,从合并的有机相中减压除去溶剂,得到 2.48 克蜡样产物。将该残余物溶解在甲醇(100 ml)中,加入氢氧化锂(0.19 g)的水(6 ml)溶液(pH ≈ 11),并在室温下搅拌反应

混合物过夜。通过加入甲酸将反应混合物的 pH 值调节至 4-5, 然后用氯仿 (3 x 100 ml) 提取该混合物。从合并的有机相中减压除去溶剂。薄层色谱分析显示大约 60% 转化率。将得到的残余物溶解在乙醇 (100 ml) 中, 加入氢氧化锂 (0.2 克) 的水 (5 ml) 溶液 (pH $\approx$ 11), 并在室温下搅拌反应混合物过夜。通过加入甲酸 (0.22 ml) 将反应混合物的 pH 值调节至 4-5, 然后用 2:1 (v/v) 氯仿: 甲醇 (3 x 100 ml) 提取该混合物。用无水 Na_2SO_4 干燥合并的有机相, 减压除去溶剂, 得到 2.18 克粗品。用氯仿、而后用氯仿与 10%-80% 甲醇的混合物洗脱出 1.14 克纯 (R)-1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基) 丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。

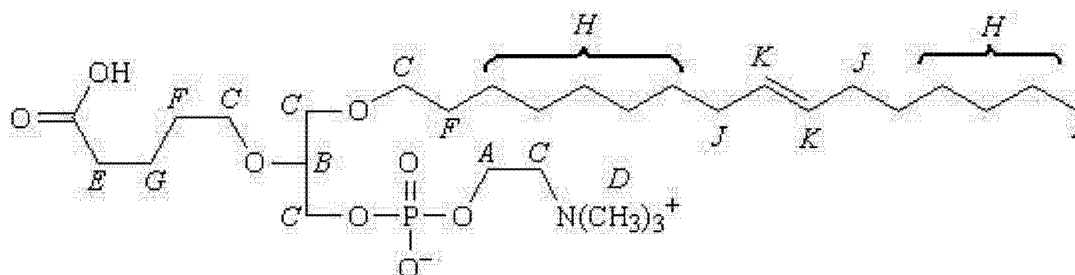
[1011] 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基) 丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征:

[1012] 将样品溶解在氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 300 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱。

[1013] 结果显示了 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基) 丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号, 并由此完全地支持 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基) 丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构。

[1014] 按照 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基) 丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[1015]



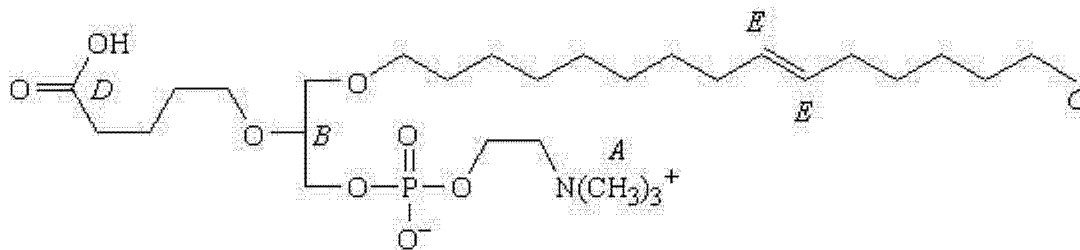
[1016] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.26 ppm)

[1017]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
5.340	2H 乙烯基, dt, $J_1=3.9\text{Hz}$, $J_2=1.5\text{Hz}$	K
3.896	2H, m	A
3.690	1H, m	B
3.400-3.626	10H, m, $5\times\text{CH}_2$	C
3.307	9H, s, $3\times\text{CH}_3$	D
2.335	2H, t=6.9Hz	E
1.983 - 2.023	4H, 烯丙基	J
1.6576 - 1.721	2H, m	G
1.526 - 1.622	4H, m, $2\times\text{CH}_2$	F
1.288	18H, m, $9\times\text{CH}_2$	H
0.884	3H, t, $1\times\text{CH}_3$, $J=7.2\text{Hz}$	I

[1018] 按照 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基) 丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[1019]



[1020] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl₃) = 77.257 ppm)

[1021]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
178.41	D
130.02	E
129.87	E
77.876	B
71.868	
70.200	
69.940	
65.439	
65.368	
52.725	A
33.896	
31.854	
29.838	
29.799	
29.669	
29.609	
29.568	
29.361	
29.146	
29.049	
27.273	
26.139	
22.724	
21.514	
14.137	C

[1022] 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的质谱特征:

[1023] 对 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 ($\text{C}_{29}\text{H}_{56}\text{NO}_8\text{P}$) 的计算质量是 579.3900。

[1024] 使用快速原子轰击 (FAB+) 得到的质谱显示了具有 $m/z=580.3995$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 。由此, 该质谱与 1-(顺式-9-十六碳烯基)-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[1025] 实施例 16

[1026] (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油

[1027] 如实施例 1 所述, 使用 (R)-(-)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料, 合成 (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油。还如实施例 1 所述, 使用 (S)-(+)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料, 合成 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油。

[1028] (S)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油的 NMR 特征：

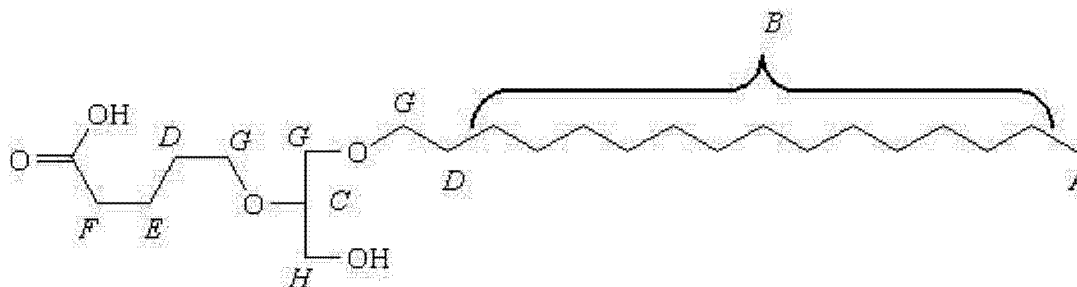
[1029] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇 (CD_3OD) 的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。然后在 600 MHz 测定谱。利用 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱两者测定样品。

[1030] 结果显示了 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油的结构单元的预期信号，并由此完全支持该结构。

[1031] 按照 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下：

[1032] ^1H NMR

[1033]



[1034] ^1H NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 7.26 ppm)

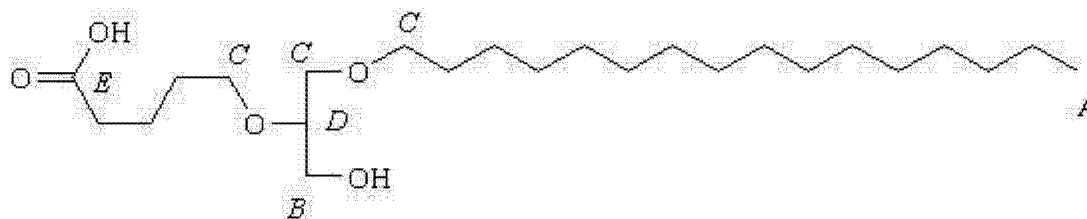
[1035]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
3.721	1H, m	C
3.655	2H, m	H
3.480 – 3.573	4H, m, 2xCH ₂	G
3.431	2H, m	G
2.403	2H, t, J=7.2Hz	F
1.750	2H, tt, CH ₂	E
1.653	2H, tt, CH ₂	D
1.555	2H, tt, CH ₂	D
1.254	26H, m, 13xCH ₂	B
0.880	3H, t, 1xCH ₃ , J=7.2Hz	A

[1036] ^{13}C NMR

[1037] 按照 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下：

[1038]



[1039] ^{13}C NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 77.014 ppm)

[1040]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
176.95	E
78.495	D
71.914	
70.921	
69.685	C
63.068	B

33.302	
31.937	
29.708	
29.682	
29.633	
29.609	
29.473	
29.372	
29.242	
26.099	
22.701	
21.609	
14.127	A

[1041] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油的质谱特征:

[1042] 对 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油 ($C_{24}H_{48}O_5$) 的计算质量是 416.635。

[1043] 使用电喷雾离子化质谱 (ES+MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=417.0$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$ 。由此, 该 MS 谱与 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油的化学结构一致。

[1044] 实施例 17

[1045] 1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸 (diMeAc) 和 1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸 (diEtAc)

[1046] 按照下文所描述方法, 由 (R)-1-十六烷基-2-(5,6-二羟基己基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸制备 (R)-1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸和 (R)-1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。使用相同的方法, 由 (S)-1-十六烷基-2-(5,6-二羟基己基)-甘油基-3-胆碱磷酸制备 (S)-1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸和 (S)-1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸。

[1047] (R)-1-十六烷基-2-(5,6-二羟基己基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸和 (S)-1-十六烷基-2-(5,6-二羟基己基)-甘油基-3-胆碱磷酸的合成方法描述在实施例 14 中。

[1048] (R)-1-十六烷基-2-(5'-氧代-戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的合成: 将 2 克高碘酸钠加入到冰冷却下的 (R)-1-十六烷基-2-(5',6'-二羟基己基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (2 克) 的水 (200 ml) 溶液中, 并在冷却下搅拌反应混合物 30 分钟, 并在室温下搅拌过夜。将反应混合物转入分液漏斗中, 用氯仿: 甲醇的 2:1 (v/v) 混合物 (3x100 ml) 提取, 从合并的有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中, 用无水 Na_2SO_4 干燥, 过滤, 然后减压除去溶剂。用硅胶 (21 克) 色谱纯化得到的粗品。用氯仿、而后用氯仿与 40%-60% 甲醇的混合物洗脱出 1.2 克纯 (R)-1-十六烷基-2-(5'-氧代-戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。产率是 63%。

[1049] (R)-1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (diEtAc) 的合成: 该反应在氮气氛围中进行。将 (R)-1-十六烷基-2-(5'-氧代-戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (50 mg, 0.088 mmol) 溶解在乙醇 (10 ml) 中。加入原甲酸三乙基酯 (0.053 ml, 0.0476 克, 0.32 mmol) 和 3 滴浓硫酸 (95-97%), 并在室温下搅拌反应混合物过夜。借助于二氯甲烷 (75 ml) 将该反应混合物转移至分液漏斗中。依次用水 (75 ml)、2.5% 碳酸氢钠

水溶液 (75 ml) 和水 (75 ml) 洗涤溶液, 用无水硫酸钠干燥。过滤并减压除去溶剂, 得到 50 mg (R)-1-十六烷基-2-(5', 5'-二乙氧基戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。产率是 88.4%。

[1050] (R)-1-十六烷基-2-(5', 5'-二甲氧基戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (diMeAc) 的合成: 该反应在氮气氛围中进行。将 (R)-1-十六烷基-2-(5'-氧代-戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (55 mg, 0.097 mmol) 溶解在甲醇 (10 ml) 中。加入原甲酸三甲基酯 (0.043 ml, 0.0414 克, 0.39 mmol) 和 3 滴浓硫酸 (95-97%), 并在室温下搅拌反应混合物过夜。加入二氯甲烷 (75 mL), 并将反应混合物转入分液漏斗中。依次用水 (75 ml)、2.5% 碳酸氢钠水溶液 (75 ml) 和再次用水 (75 ml) 洗涤溶液。用无水硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 得到 36.8 mg (R)-1-十六烷基-2-(5', 5'-二甲氧基戊基)-sn-甘油基-3-胆碱磷酸。产率是 62%。

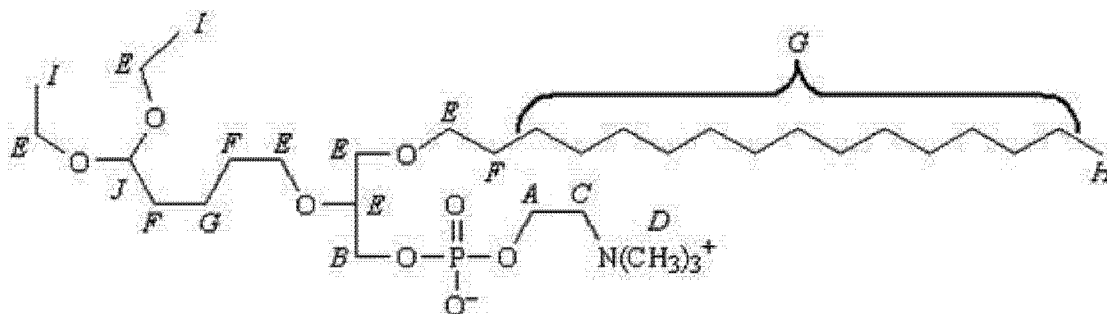
[1051] 1-十六烷基-2-(5', 5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸 (DiEtAc) 的 NMR 特征:

[1052] 将样品溶解在氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 300 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱。

[1053] 结果显示了 1-十六烷基-2-(5', 5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号, 并由此完全支持该结构。

[1054] 按照 1-十六烷基-2-(5', 5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[1055]



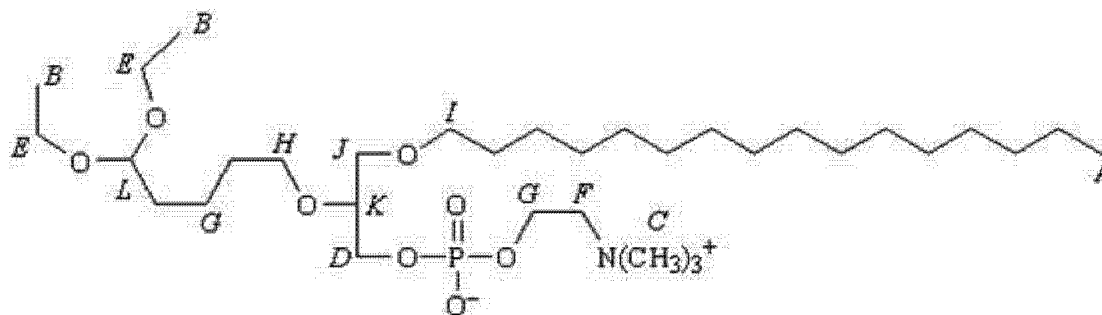
[1056] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.270 ppm)

[1057]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.459	1H, t, $J=5.6\text{Hz}$	J
4.309	2H, br, s	A
3.859	2H, t, $J=5.4\text{Hz}$	C
3.808	2H, br, s	B
3.430-3.679	11H, m, $5\times\text{CH}_2+\text{CH}$	E
3.388	9H, s, $3\times\text{CH}_3$	D
1.509-1.587	6H, m	F
1.256	28H, $14\times\text{CH}_2$	G
1.195	6H, t, $2\times\text{CH}_3$, $J=7.05\text{Hz}$	I
0.881	3H, t, $1\times\text{CH}_3$, $J=6.6\text{Hz}$	H

[1058] 按照 1-十六烷基-2-(5', 5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[1059]



[1060] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 77.0046 ppm)

[1061]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
102.980	L
78.2741	K
71.7498	J
71.0295	I
70.2381	H
65.5827	G
64.9656	F
61.0510	E
59.1392	D
54.6214	C
33.5956	
31.9161	
30.0866	
29.8112	
29.7010	
29.3441	
26.1672	
22.6671	
21.3484	
15.3929	B
14.0619	A

[1062] 1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸 (DiEtAc) 的质谱特征:

[1063] 对 1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸 ($\text{C}_{33}\text{H}_{70}\text{NO}_8\text{P}$) 的计算质量是 639.88。

[1064] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI+-MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=640$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 伴有具有 $m/z=662$ 的离子, 相当于阳离子化的分子离子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$, 和具有 $m/z=594$ 的离子, 相当于去乙氧基化的分子离子 $[\text{M}-\text{OEt}]^+$ 。由此, 该质谱与 1-十六烷基-2-(5',5'-二乙氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[1065] 1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸 (DiMeAc) 的 NMR 特征:

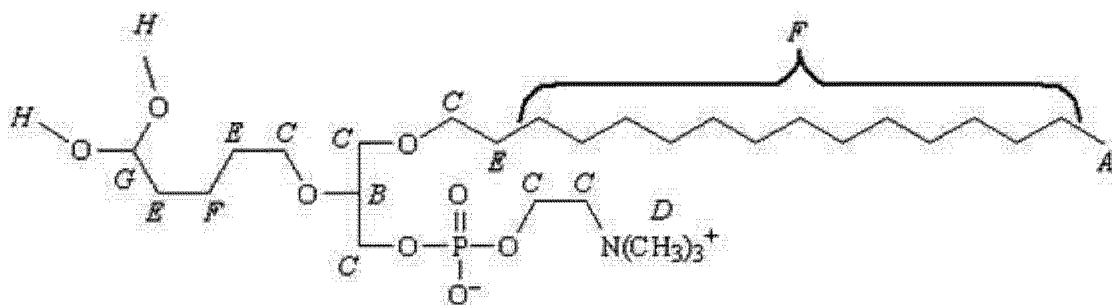
[1066] 将样品溶解在氘化氯仿 (CDCl_3) 中。在 300 MHz 测定 ^1H NMR 和 ^{13}C NMR 谱。

[1067] 结果显示了 1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸 (DiMeAc) 的结构单元的预期信号, 并由此完全支持该结构。

[1068] 按照 1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观

察到的 ^1H 峰的归属如下：

[1069]



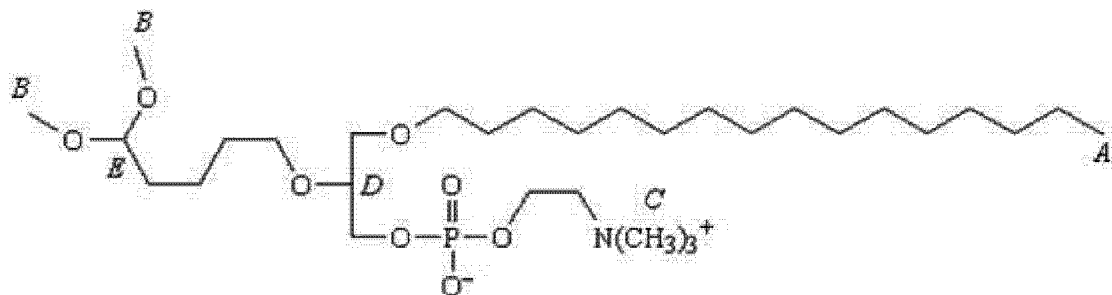
[1070] ^1H NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.28 ppm)

[1071]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.337	1H, t, $J=5.7\text{Hz}$	G
3.855	2H, br, s	A
3.834 — 3.855	4H, m, $2\times\text{CH}_2$	C
3.703	1H, m	B
3.529 — 3.591	4H, m	C
3.430–3.464	2H, m, CH_2	C
3.388	9H, s, $3\times\text{CH}_3$	D
3.302	6H, s, $2\times\text{CH}_3$	H
1.506–1.605	6H, m	E
1.256	28H, $14\times\text{CH}_2$	F
0.880	3H, t, $1\times\text{CH}_3$, $J=6.9\text{Hz}$	A

[1072] 按照 1-十六烷基-2-(5',5'-二甲氧基戊基)-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下：

[1073]



[1074] ^{13}C NMR (300 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.000 ppm)

[1075]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
104.50	E
78.133	D
71.686	
70.845	
70.121	
66.330	
64.974	
59.187	
54.411	C
52.721	B

52.692	B
32.324	
31.884	
29.963	
29.756	
29.554	
29.320	
26.112	
25.348	
22.646	
21.165	
14.071	A

[1076] 动脉粥样硬化病变试验：

[1077] 如上文材料和方法部分中所述，在 ApoE KO 小鼠中，测试 diMeAc 抵御动脉粥样硬化病变的体内效能。以每个小鼠 1 mg 的剂量给予 diMeAc，相当于 40 mg/kg 的剂量。

[1078] 如图 35 所示，与对照物 (PBS) 相比较，1 mg/ 小鼠的 diMeAc 可以使动脉粥样硬化病变面积降低 23%。

[1079] 这些结果表明，diMeAc 可有效抵御动脉粥样硬化。

[1080] diEtAc 的毒性：

[1081] 按照上文所描述方法评价 diEtAc 的毒性。

[1082] 如图 36A 和 36B 所示，在 20 μ g/ml 或更高剂量下，diEtAc 显示出毒性，diEtAc 的 LD₅₀ 在 20 和 50 μ g/ml 之间。在 10 μ g/ml 的浓度下，只在两个实验的一个实验中观察到毒性。

[1083] 实施例 18

[1084] 1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸丝氨酸 (VB-223)

[1085] 按照下文所描述方法，由 (S)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油制备 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸丝氨酸。使用相同的方法，由 (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-甘油制备 (S)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-甘油基-3-磷酸丝氨酸。

[1086] (S)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油和 (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-甘油的合成方法描述在实施例 14 中。

[1087] (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸酯的合成：将 1.0 克 (S)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-甘油（通过与苯共沸蒸馏进行干燥）和干燥吡啶（1 ml）溶解在 THF（60 ml）中。将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 POCl₃（0.3 ml）的 THF（12 ml）溶液中，同时搅拌。在冷却下，继续额外搅拌 3 小时。向该冷却的反应混合物中加入碳酸氢钠（2.44 克）的水（24 ml）溶液，并在冰浴中额外搅拌该混合物 30 分钟。通过缓慢地加入 10% 盐酸，将反应混合物的 pH 值调节至大约 1。用二乙醚（3 x 150ml）提取，用水（2 x 150 ml）洗涤合并的有机相，用无水 Na₂SO₄ 干燥，减压除去溶剂，得到 1.43 克 (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸酯。

[1088] (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸基-N-Boc-L-丝氨酸-二苯甲基酯的合成：将 1.30 克 (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸酯和 0.95 克 N-Boc-丝氨酸-二苯甲基酯（将其在干燥器中用 P₂O₅ 干燥）溶解在吡啶（30 ml）

中。加入 2,4,6-三异丙基苯磺酰氯 (2.99 克),并在氮气氛围中、在室温下搅拌反应混合物 20 小时。加入水 (50 mL),并将混合物转入分液漏斗中。用己烷:乙酸乙酯的 8:2(v/v) 混合物 (3 x 50 mL) 提取,用无水 Na₂SO₄ 干燥合并的有机相,减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在己烷:乙酸乙酯的 8:2(v/v) 混合物 (50 mL) 中,用冷却的稀乙酸 (5%) 洗涤。然后减压除去溶剂,得到 1.33 克粗品 (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸基-N-Boc-L-丝氨酸-二苯甲基酯。

[1089] (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸基-N-Boc-L-丝氨酸-二苯甲基酯的合成:将高碘酸钠 (3.0 克)、高锰酸钾 (0.05 克)、碳酸钠 (0.15 克) 和碳酸钾 (0.03 克) 溶解在水 (100 mL) 中。在室温下,在 30 分钟期间内,向此溶液中逐滴加入 (R)-1-十六烷基-2-(5'-己烯基)-sn-甘油基-3-磷酸基-N-Boc-L-丝氨酸-二苯甲基酯 (0.90 克) 的叔丁醇 (100 mL) 溶液。加入完毕后,在室温下搅拌反应混合物 2 小时。加入额外量的高锰酸钾 (0.02 克),并搅拌反应混合物 90 分钟。加入磷酸二氢钠 (10 克) 的水 (100 mL) 溶液,并用氯仿 (3 x 100 mL) 提取反应混合物。用盐水 (100 mL) 洗涤合并的有机相,减压除去溶剂,得到 1.02 克粗品 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸基-N-Boc-L-丝氨酸-二苯甲基酯。

[1090] (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸基-L-丝氨酸 (VB-223) 的合成:将 1.02 克 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸基-N-Boc-L-丝氨酸-二苯甲基酯溶解在二氯甲烷 (100 mL) 中。将该溶液在冰浴中冷却,并用 HCl 气体饱和 30 分钟。将反应混合物额外搅拌 1 小时。然后通过加入磷酸二氢钠的水溶液,将反应混合物中和,而后用氯仿:甲醇的 2:1(v/v) 混合物 (3 x 100 mL) 提取。用无水 Na₂SO₄ 干燥有机相,减压除去溶剂。用硅胶 (12.60 克) 色谱纯化得到的粗品 (0.72 克)。用己烷:氯仿的 1:1(v/v) 混合物、而后用氯仿、而后用氯仿与 10% 甲醇的混合物洗脱出 0.60 克纯 (R)-1-十六烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸基-L-丝氨酸。

[1091] 酪氨酸磷酸化作用:

[1092] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容,测定 VB-223 对在原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[1093] 如图 37 所示,用 5、10 和 20 μ g/mL (8.3、16.7 和 33.3 μ M) VB-223 处理,大概还用 1 μ g/mL (1.7 μ M) VB-223 处理,可以诱导酪氨酸磷酸化作用。

[1094] 实施例 18

[1095] 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸 (VB-221) 和 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (VB-222)

[1096] 按照下文所描述方法,合成 (R)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺和 (R)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸,使用 (R)-(-)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。使用相同的方法,合成 (S)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺和 (S)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸,但用 (S)-(+)-2,2-二甲基-1,3-二氧杂环戊烷-4-甲醇作为起始原料。

[1097] 甲磺酸 2-辛基-十二烷基酯:将 2-辛基-1-十二烷醇 (20 mL, 56.14 mmol) 和无水三乙胺 (16 mL, 112.28 mmol) 溶解在干燥二氯甲烷 (60 mL) 中。将该溶液冷却至 0°C,并

逐滴加入甲磺酰氯 (5.2 ml, 67.36 mmol) 的干燥二氯甲烷 (40 ml) 溶液。加入完毕后, 在 10℃ 搅拌该混合物 3 小时, 而后冷冻 (2-8℃) 过夜。将反应混合物倾倒在冰 (500 克) 上, 升温至室温, 并用醚 (3 x 150 ml) 提取。连续地用水 (150 ml)、2% H₂SO₄ (150 ml)、水 (150 ml)、饱和碳酸氢钠 (150 ml) 洗涤有机相, 并再次用水 (150 ml) 洗涤。用无水 Na₂SO₄ 干燥有机相, 减压除去溶剂, 得到 22.8 克甲磺酸 2-辛基-十二烷基酯黄色油。

[1098] *1-(2-辛基)十二烷基-甘油*: 将 (R)-(-)-2, 2-二甲基-1, 3-二氧杂环戊烷-4-甲醇 (8.3 ml, 66.59 mmol)、粉末氢氧化钾 (12 克) 和甲磺酸 2-辛基-十二烷基酯 (22.77 克, 60.50 mmol) 在苯 (250 ml) 中搅拌并回流 5 小时, 同时共沸蒸馏除去所形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 150 ml。将反应混合物冷却至室温, 并在室温下搅拌过夜。加入 200 ml 水, 并用二乙醚 (3 x 200 ml) 提取混合物。将合并的有机相用水 (200 ml) 洗涤, 并减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在 105 ml 甲醇: 水: 浓盐酸的 90:10:5 (v/v) 混合物中, 并将得到的溶液回流 30 分钟。冷却至室温后, 加入水 (100 mL)。用氯仿 (3 x 100 ml) 提取产物, 连续地用水 (100 ml)、饱和碳酸钠水溶液 (100 ml) 洗涤, 并再次用水 (100 ml) 洗涤。减压除去溶剂, 并将粗品用硅胶 (400 克) 柱色谱纯化。用氯仿、而后用氯仿和 10%-30% 乙酸乙酯的混合物洗脱出 17 克纯 1-(2-辛基)十二烷基-甘油无色油。产率是 75.5%。

[1099] *(S)-1-(2-辛基)十二烷基-3-三苯甲基-甘油*: 将 17 克 1-(2-辛基)十二烷基-甘油 (通过与苯共沸蒸馏进行干燥) 溶解在干燥 THF (400 ml) 和干燥乙腈 (160 ml) 的混合物中。加入三苯基氯甲烷 (15.8 克) 和干燥三乙胺 (14 ml), 并将反应混合物回流 17 小时。将反应混合物冷却至室温, 倾倒在冰 (1 千克) 上, 转入分液漏斗中, 并用二乙醚 (3 x 200 ml) 提取。连续地用水 (200 ml)、稀 (1.5%) 硫酸 (2 x 100 ml)、水 (200 ml)、浓碳酸氢钠水溶液 (200 ml) 洗涤合并的有机相, 并再次用水 (200 ml) 洗涤。用无水硫酸钠干燥有机相, 减压除去溶剂, 并将得到的粗品用硅胶 (350 克) 柱色谱纯化。用己烷、而后用己烷和氯仿 (50-100%) 的混合物洗脱出 26 克纯 (S)-1-(2-辛基)十二烷基-3-三苯甲基-甘油黄色油。产率是 92.7%。

[1100] *1-(2-辛基)十二烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油*: 将 1-(2-辛基)十二烷基-3-三苯甲基-甘油 (26 克, 42.28 mmol) 和 5-己烯基-1-甲磺酸酯 (9.4 克, 50.73 mmol) 溶解在苯 (150 ml) 中。加入粉末 KOH (17 克), 并将反应混合物加热到回流, 保持 5.5 小时, 同时共沸蒸馏除去所形成的水。将溶剂的体积逐渐地减少到大约 50 ml。将反应混合物冷却至室温后, 加入 200 ml 水, 并用二乙醚 (3 x 100 ml) 提取该混合物。将合并的有机相用盐水 (3 x 100 ml) 洗涤, 减压除去溶剂, 得到 22.8 克粗品。用硅胶 (300 克) 色谱纯化该粗品, 得到 21 克纯 1-(2-辛基)十二烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油。用氯仿洗脱出产物黄色油。产率是 71.2%。

[1101] *(S)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油*: 将高碘酸钠 (58 克)、高锰酸钾 (960 mg) 和碳酸钾 (7 克) 悬浮在水 (250 ml) 中。在 2.5 小时期间内, 逐滴加入 1-(2-辛基)十二烷基-2-(5'-己烯基)-3-三苯甲基-甘油 (21 克) 的叔丁醇 (250 ml) 溶液。然后搅拌反应混合物过夜 (根据保持粉红色的需要, 加入高锰酸盐溶液)。通过硅藻土垫过滤混合物, 进一步用叔丁醇洗涤该垫。逐滴加入 10 ml 稀硫酸 (10%), 然后将得到的溶液用己烷 (3 x 200 ml) 提取。用亚硫酸氢钠 (20 克) 的水溶液 (100 ml) 洗涤合并的有

机相两次、而后用水 (200 ml) 洗涤。减压浓缩溶剂至 150 ml 体积。加入 20 ml 水和 5 ml 浓 HCl, 并将得到的混合物回流 6 小时。冷却至室温后, 减压浓缩溶剂, 将得到的残余物用 30% 氢氧化钠 (10 ml) 和水 (100 ml) 的混合物处理, 使反应混合物达到 pH12。过滤沉淀的三苯基甲醇, 并用水 (4 x 10 ml) 洗涤。用己烷: 乙酸乙酯的 1:1 (v/v) 混合物 (100 ml) 提取滤液。用浓 HCl (10 ml) 将该碱性溶液酸化至 pH1, 并用己烷 (100 ml) 提取。用无水硫酸钠干燥有机溶液, 减压除去溶剂, 得到 8.5 克 (S)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-羧基) 丁基-甘油黄色油。产率是 60%。

[1102] (S)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4'-羧甲基) 丁基-甘油: 将 (S)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-羧基) 丁基-甘油 (8.39 克) 溶解在甲醇 (100 ml) 中。加入 2 ml 浓 HCl (32%), 并在室温下搅拌溶液过夜。加入水 (100 ml), 并用氯仿 (3 x 100 ml) 提取混合物。连续地用水 (100 ml)、浓碳酸氢钠溶液 (100 ml) 和水 (100 ml) 洗涤合并的有机相, 而后用无水硫酸钠干燥。减压除去溶剂, 得到 8.48 克 (S)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-甲基羧基) 丁基-甘油黄色油。产率是 98%。

[1103] (R)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-甲基羧基) 丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺: 将 (S)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4'-羧甲基) 丁基-甘油 (8.48 克) 和三乙胺 (7.3 ml) 溶解在干燥 THF (50 ml) 中。在 60 分钟期间内, 将该溶液逐滴加入到冰冷却下的 POCl₃ (4.85 ml) 的 THF (50 ml) 溶液中, 同时搅拌。在冷却下, 继续额外搅拌 15 分钟, 而后在室温下额外搅拌 45 分钟。将该反应混合物在冰中冷却, 然后用 60 分钟的时间逐滴加入乙醇胺 (3.2 ml) 和三乙胺 (15 ml) 的干燥 THF (50 ml) 溶液, 同时搅拌。在冰中, 继续搅拌 10 分钟, 而后在室温下搅拌过夜。过滤反应混合物, 减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在乙酸 (24 ml) 和水 (10 ml) 的混合物中, 加热到 70°C, 保持 1 小时。将反应混合物冷却至室温, 并用氯仿 (3 x 80 ml) 提取。将合并的有机相用水 (2 x 50 ml) 洗涤, 并减压除去溶剂。用硅胶 (220 克) 色谱纯化残余物 (11 克)。用氯仿、而后用氯仿与 5%-20% 甲醇的混合物、最后用 70:26:4 的氯仿: 甲醇: 水的混合物洗脱出 4.25 克纯 (R)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-甲基羧基) 丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺。产率是 40%。

[1104] (R)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-羧基) 丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (VB-222): 将 (R)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-甲基羧基) 丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (1.2 克) 溶解在 100 ml 的甲醇: 10% 氢氧化钠溶液的 8:2 (v/v) 混合物中。在室温下搅拌反应混合物过夜。通过加入磷酸二氢钠, 将反应的 pH 值调节至 5。加入水 (100 ml) 和氯仿 (100 ml)。分离各相, 并从有机相中减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中, 用硫酸钠干燥, 过滤, 然后减压除去溶剂。用硅胶 (23 克) 色谱纯化粗品 (1.2 克)。用 8:2 (v/v) 氯仿: 甲醇的混合物、而后用氯仿: 甲醇: 水 (体积比 70:26:4, 而后 60:35:5) 的混合物洗脱产物。从含有所需要的产物的馏份中减压除去溶剂, 将得到的残余物溶解在氯仿中, 用硫酸钠干燥, 减压除去溶剂, 得到 500 mg 纯 (R)-1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-羧基) 丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺蜡。产率是 42.65%。

[1105] 1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-羧基) 丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的 NMR 特征:

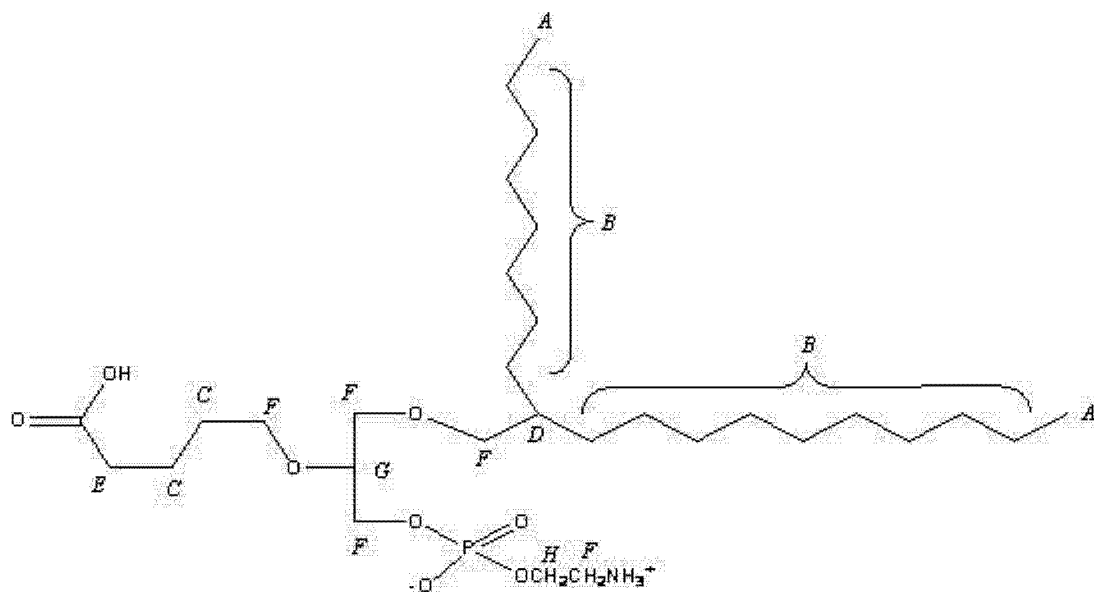
[1106] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇 (CD₃OD) 的氘化氯仿 (CDCl₃) 中。然后在 600 MHz 测定谱图。利用 ¹H 和 ¹³C NMR 谱两者测定样品。

[1107] 结果显示了 1-(2-辛基) 十二烷基-2-(4-羧基) 丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺

的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[1108] 按照 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[1109]



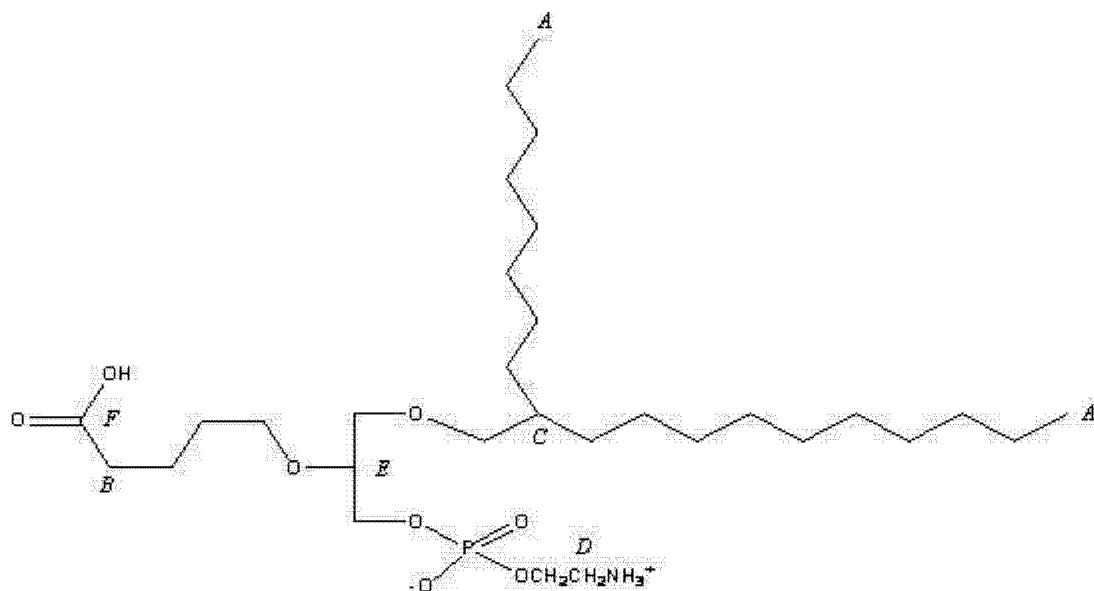
[1110] ^1H NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.313 ppm)

[1111]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.117	2H, br, s	H
3.835 – 3.844	1H, m	G
3.394 – 3.718	10H, m, 5xCH ₂	F
2.329	2H, m	E
1.680 – 1.700	1H, m	D
1.595 – 1.606	2H, m	C
1.533	2H, m	C
1.261–1.300	32H, m, 16xCH ₂	B
0.882	6H, t, 2xCH ₃ , J=6.9Hz	A

[1112] 按照 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[1113]



[1114] ^{13}C NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3) = 77.189 ppm)

[1115]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
177.505	F
78.1013 – 78.152	E
75.103	
71.013	
70.085	
66.144	
61.989	
40.344	D
38.229	C
33.945	B
31.999	
31.350	
31.305	
31.227	
30.191	
29.792	
29.743	
29.439	
29.291	
26.883	
22.751	
21.792	
21.661	
14.138	A

[1116] 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的质谱特征:

[1117] 对 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺 ($\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{NO}_8\text{P}$) 的计算质量是 595.42。

[1118] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI+-MS) 进行的质谱显示了具有 $m/z=596$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 伴有具有 $m/z=618$ 的分子离子, 相当于阳离子化的离子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ 。

[1119] 由此,该 MS 谱与 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-磷酸乙醇胺的化学结构一致。

[1120] (R)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸:

[1121] 将 (R)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-磷酸乙醇胺 (2.62 克) 溶解在异丙醇 (18 ml) 和二氯甲烷 (40 ml) 的混合物中。逐滴加入碳酸钾 (3 克) 的水 (10 ml) 溶液,同时将反应混合物保持在 35-40℃ 的温度下。在 40℃,逐滴加入硫酸二甲酯 (2.1 ml) 的异丙醇 (10 ml) 溶液。将反应混合物在 40℃ 保持 2 小时,然后冷却至室温,并在室温下搅拌过夜。加入水 (100 ml),并用氯仿 (3 x 100 ml) 提取混合物。用水 (100 ml) 洗涤合并的有机相,减压除去溶剂,得到 2.78 克 (R)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸白色蜡。

[1122] (R)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (VB-221): 将 (R)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-甲基羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 (2.78 克) 溶解在甲醇和 10% 氢氧化钠水溶液的 8:2 (v/v) 混合物 (100 ml) 中,并在室温下搅拌反应混合物过夜。通过加入磷酸二氢钠,将反应的 pH 值调节至 5。加入水 (100 ml) 和氯仿 (100 ml)。分离各相,并减压除去溶剂。将得到的残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,过滤,然后减压除去溶剂。用硅胶 (50 克) 色谱纯化残余物 (2.7 克)。用 8:2 (v/v) 氯仿:甲醇洗脱非极性杂质。然后用氯仿:甲醇:水 (体积比 70:26:4,而后 60:35:5) 的混合物洗脱产物。减压除去溶剂之后,将得到的残余物溶解在氯仿中,用硫酸钠干燥,减压除去溶剂,得到 800mg 纯 (R)-1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸白色蜡。产率是 29.4%。

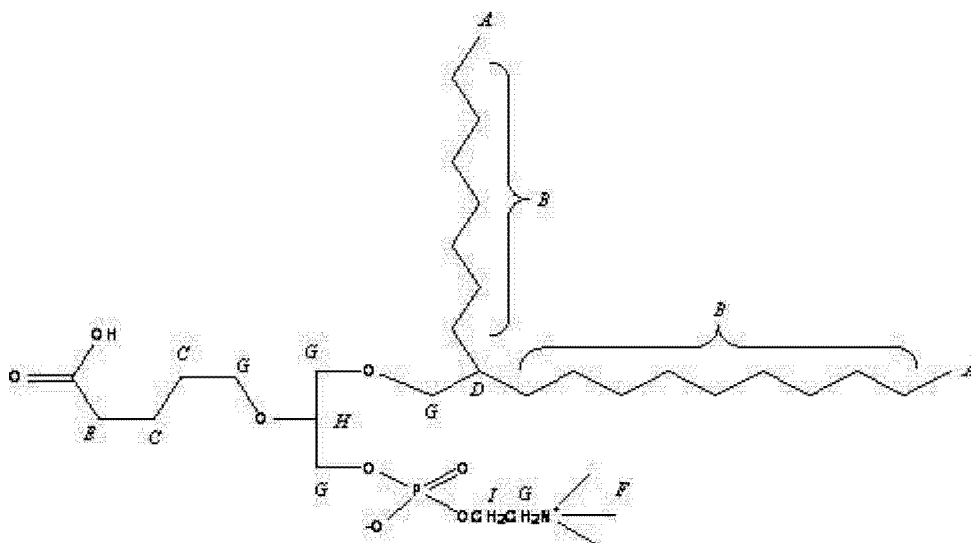
[1123] 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的 NMR 特征:

[1124] 将样品溶解在含有几滴氘化甲醇 (CD_3OD) 的氘化氯仿 (CDCl_3) 中。然后在 600 MHz 测定谱图。利用 ^1H 和 ^{13}C NMR 谱两者测定样品。

[1125] 结果显示了 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的结构单元的预期信号,并由此完全支持该结构。

[1126] 按照 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^1H 峰的归属如下:

[1127]



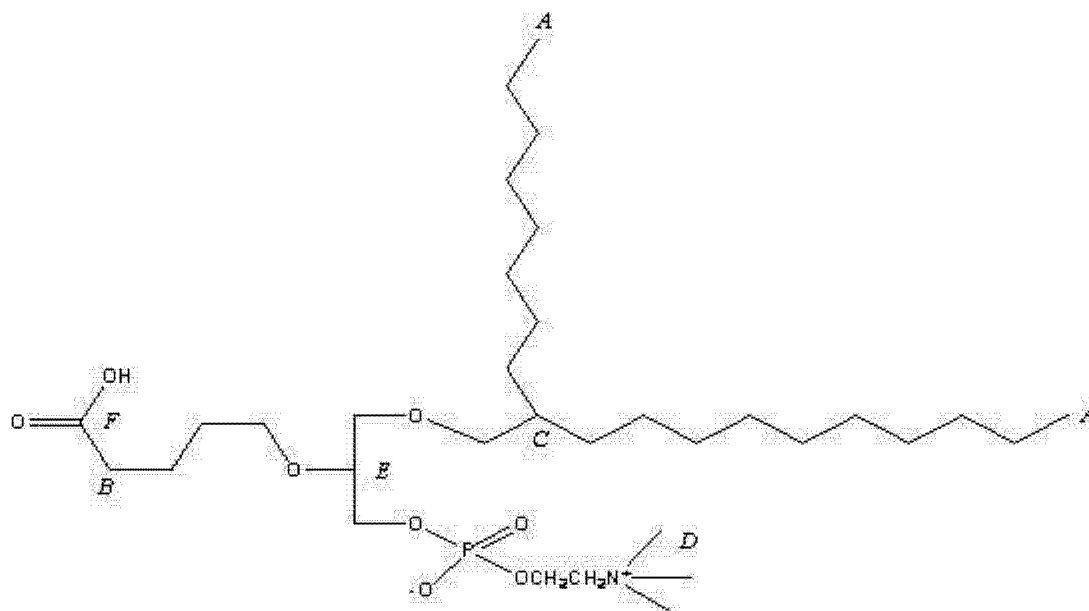
[1128] ^1H NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 7.352 ppm)

[1129]

δ [ppm]	说明	归属 (参见上式)
4.259	2H, br, s	I
3.983 — 3.983	1H, m	H
3.607 — 3.833	6H, m, $3\times\text{CH}_2$	G
3.432 — 3.493	2H, m	G
3.304 — 3.320	2H, m	G
3.281	9H, s, $3\times\text{CH}_3$	F
2.350	2H, m	E
1.875	1H, m	D
1.710	2H, m	C
1.602	2H, m	C
1.262 — 1.313	32H, m, $16\times\text{CH}_2$	B
0.883	6H, t, $2\times\text{CH}_3$, $J=6.9\text{Hz}$	A

[1130] 按照 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸的结构所观察到的 ^{13}C 峰的归属如下:

[1131]



[1132] ^{13}C NMR (600 MHz, 参比溶剂 (CDCl_3)) = 77.308 ppm)

[1133]

δ [ppm]	归属 (参见上式)
176.700	F
78.289 — 78.344	E
75.122	
71.137	
70.087	
66.662	
66.011–66.046	
59.052 — 59.086	
54.420	D
38.274	C
34.150	B
32.032	

31.397	
31.356	
30.216	
29.809	
29.766	
29.466	
29.370	
26.930	
22.782	
22.102	
14.142	A

[1134] 质谱特征：

[1135] 对 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-sn-甘油基-3-胆碱磷酸 ($C_{33}H_{68}NO_8P$) 的计算质量是 637.87。

[1136] 使用电喷雾离子化质谱 (ESI⁻MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=636$ 的分子离子, 相当于去质子化的分子离子 $[M-H]^-$ 。

[1137] 使用正离子电喷雾离子化质谱 (ESI⁺-MS) 得到的质谱显示了具有 $m/z=638$ 的分子离子, 相当于质子化的分子离子 $[M+H]^+$, 伴有具有 $m/z=660$ 的分子离子, 相当于阳离子化的分子离子 $[M+Na]^+$ 。

[1138] 由此, 该 MS 谱与 1-(2-辛基)十二烷基-2-(4-羧基)丁基-甘油基-3-胆碱磷酸的化学结构一致。

[1139] 酪氨酸磷酸化作用：

[1140] 按照上文材料和方法部分中所描述的内容, 测定 VB-221 和 VB-222 对在原发性巨噬细胞中的体外酪氨酸磷酸化作用的影响。

[1141] 如图 38 所示, 用 5、10 和 20 $\mu g/ml$ (8、16 和 32 μM) VB-221 处理, 可以诱导酪氨酸磷酸化作用。

[1142] 类似地, 如图 39 所示, 用 10 和 20 $\mu g/ml$ (16.8 和 33.6 μM) VB-222 处理, 可以诱导酪氨酸磷酸化作用。

[1143] 虽然已经结合具体实施方案描述了本发明, 但很明显, 许多备选方案、修饰和变体对本领域技术人员是显而易见的。相应地, 本文意在包括落在附加权利要求的精神和宽范围内的所有这种备选方案、修饰和变体。

[1144] 将本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请以其整体结合到本文中作为参考, 其程度如同每个单一的出版物、专利或专利申请是具体地和单独地注明以其整体结合到本文中作为参考那样。另外, 不应该将本申请中对任何参考文献的引证或确认理解为承认这种参考文献作为本发明现有技术是可获得的。至于部分标题的使用, 不应该将其理解为是必然限制性的。

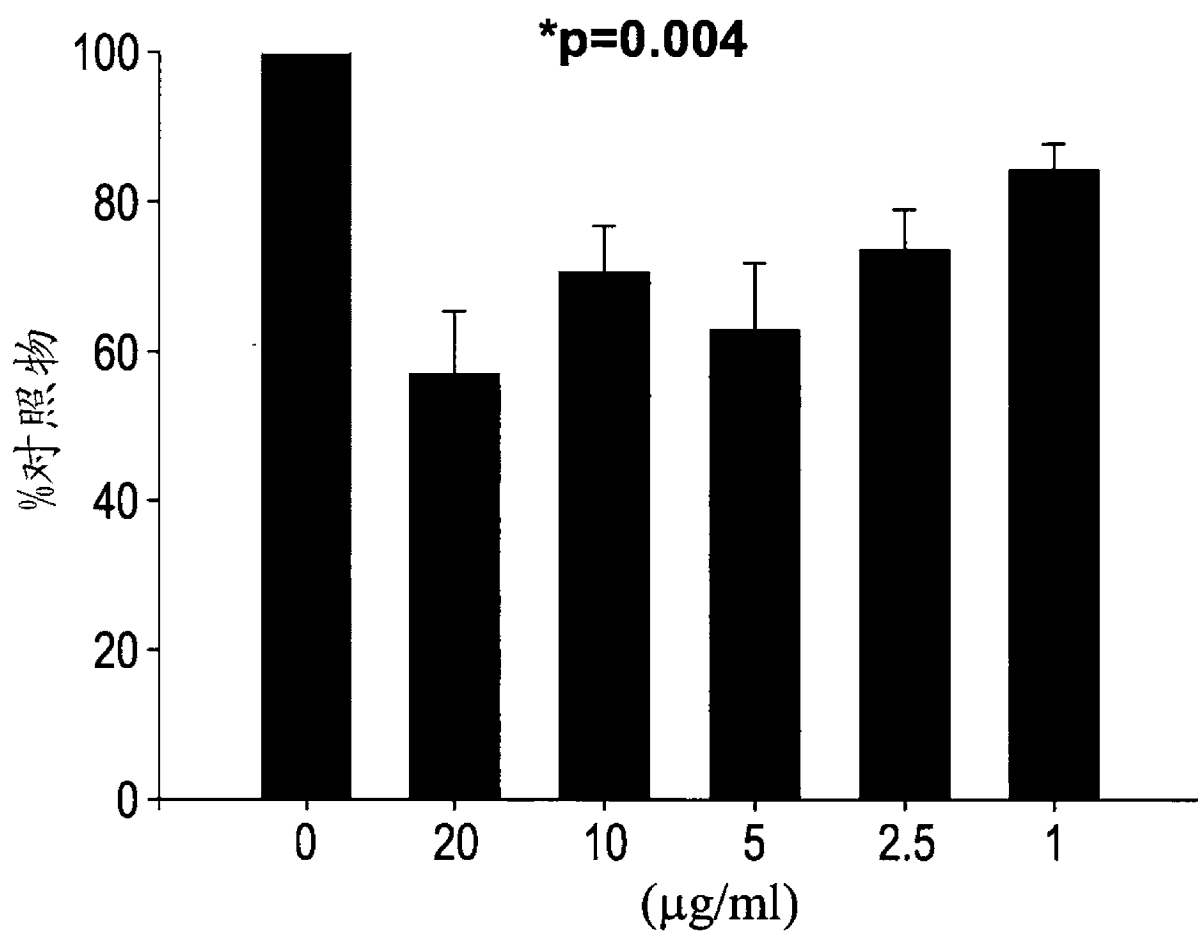


图 1

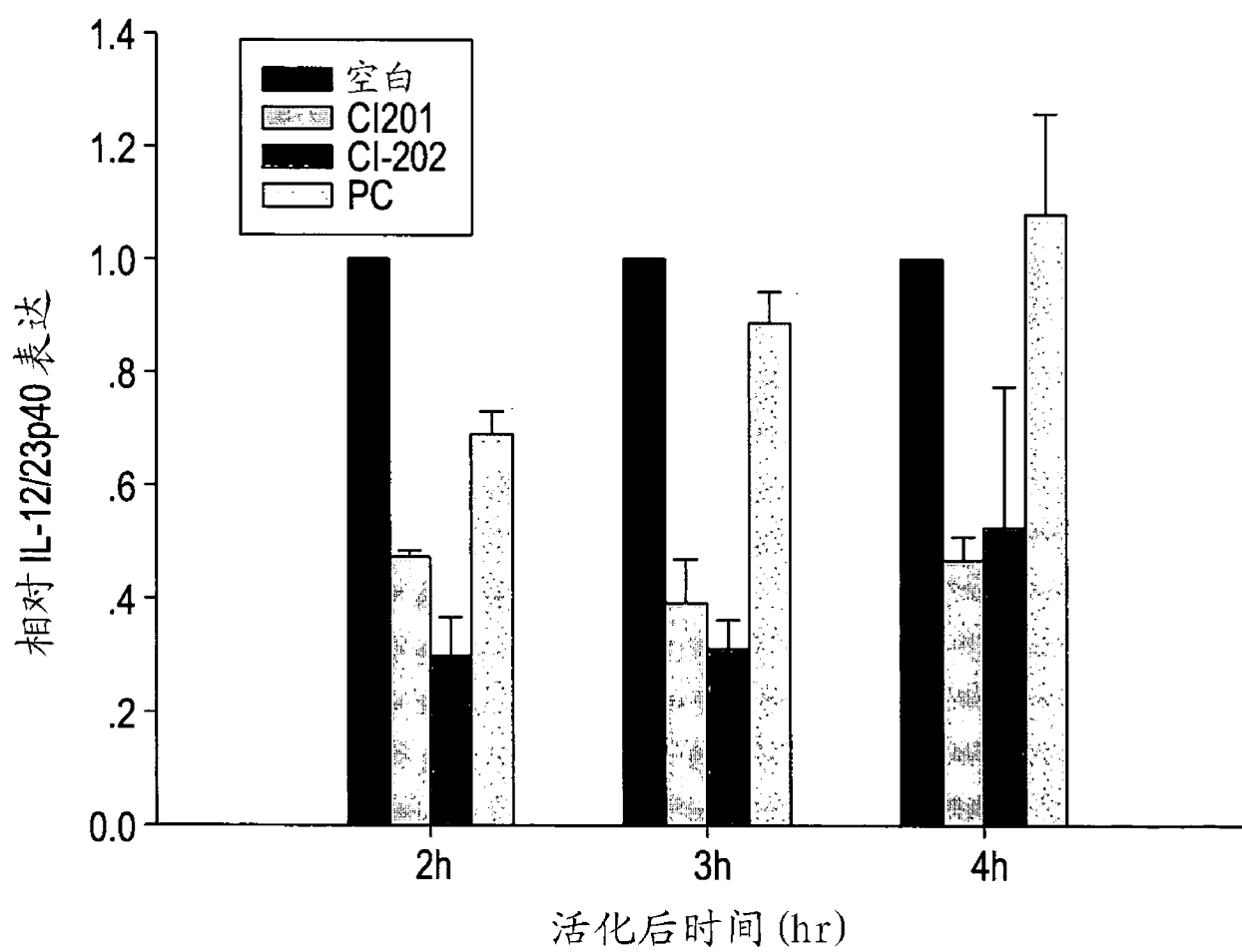


图 2

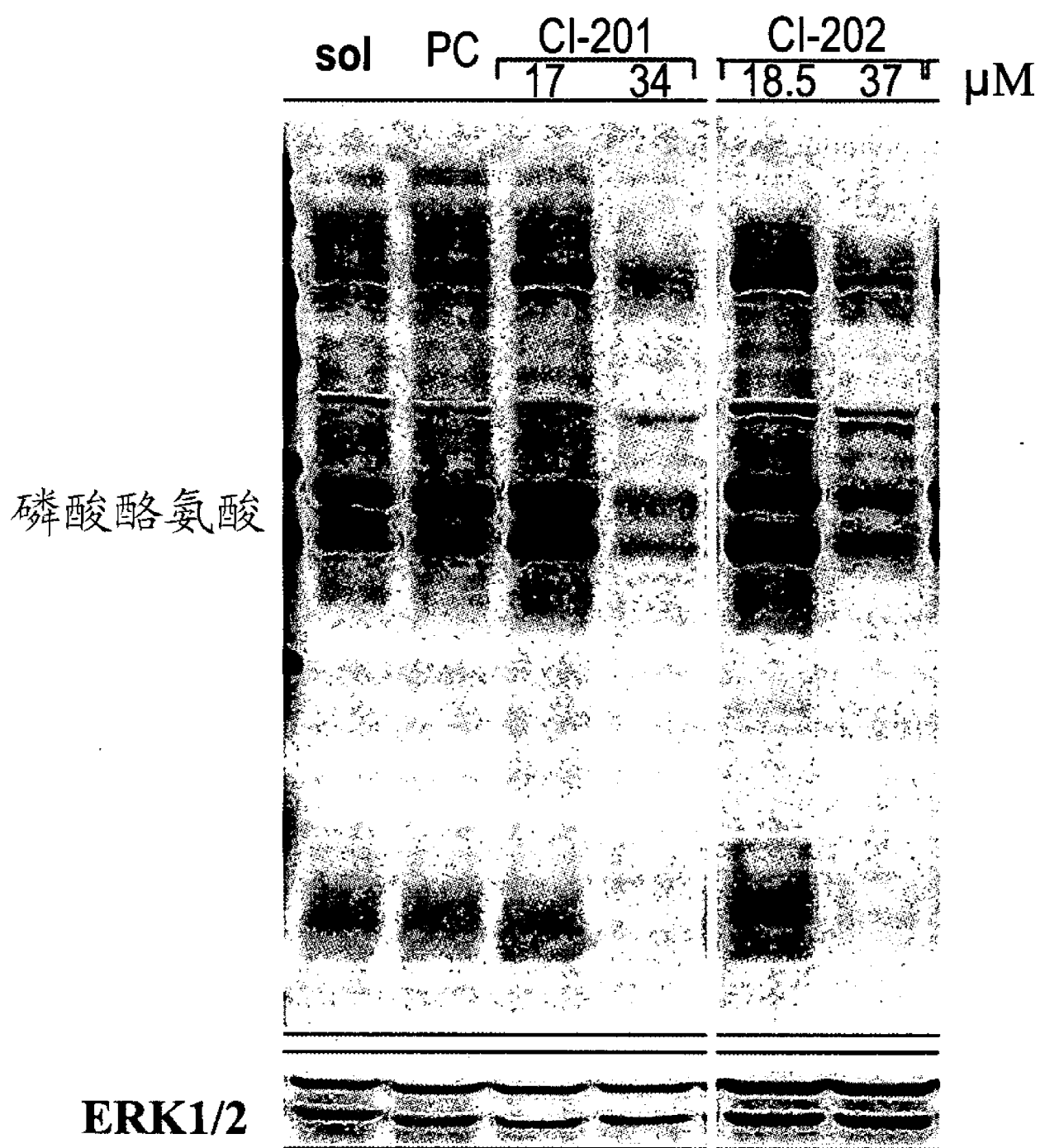


图 3

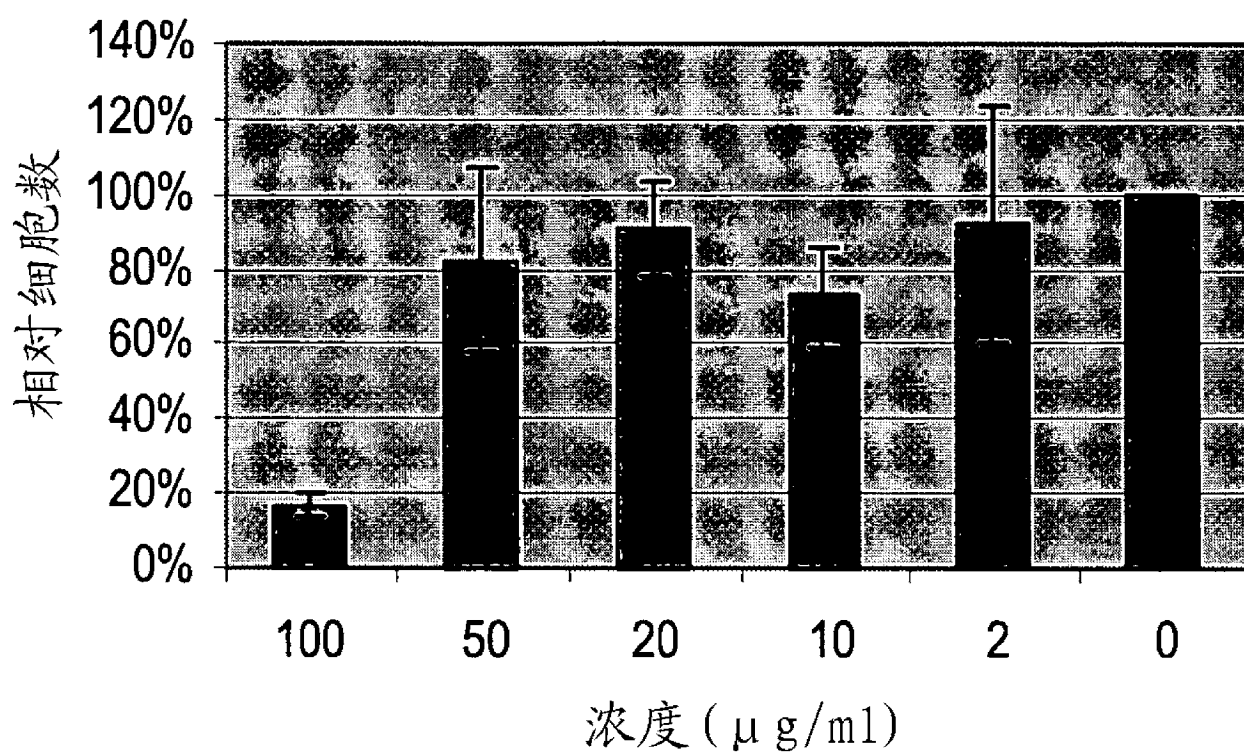


图 4A

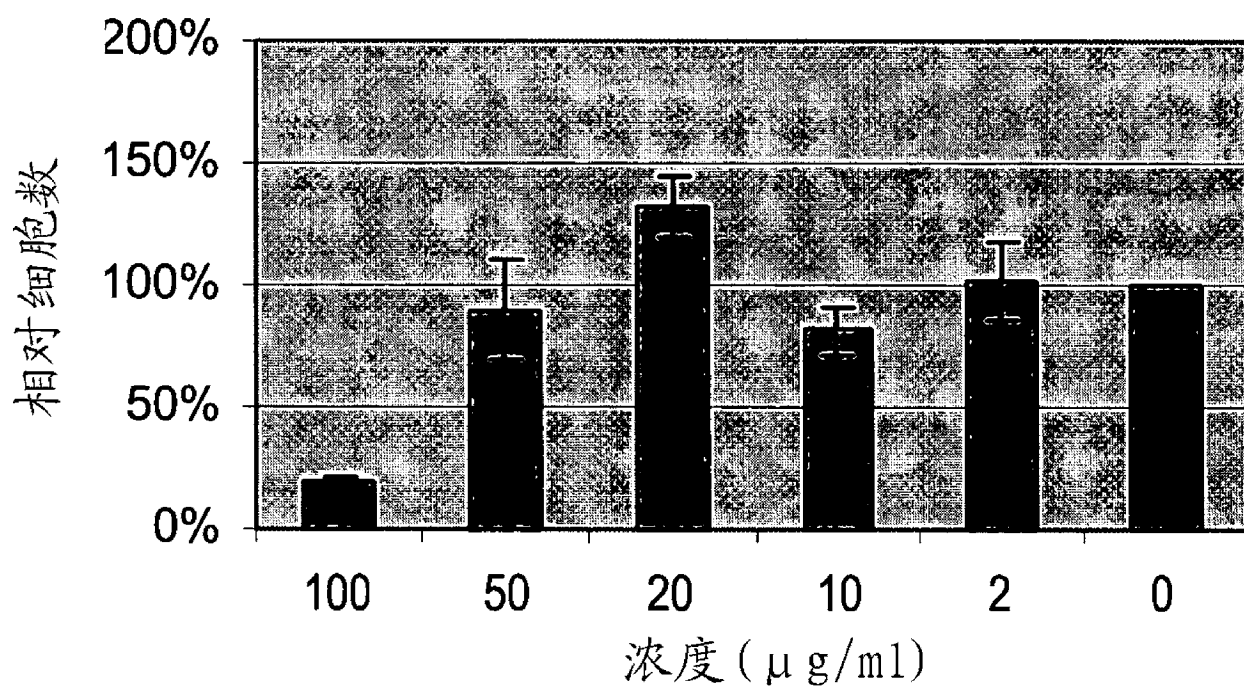


图 4B

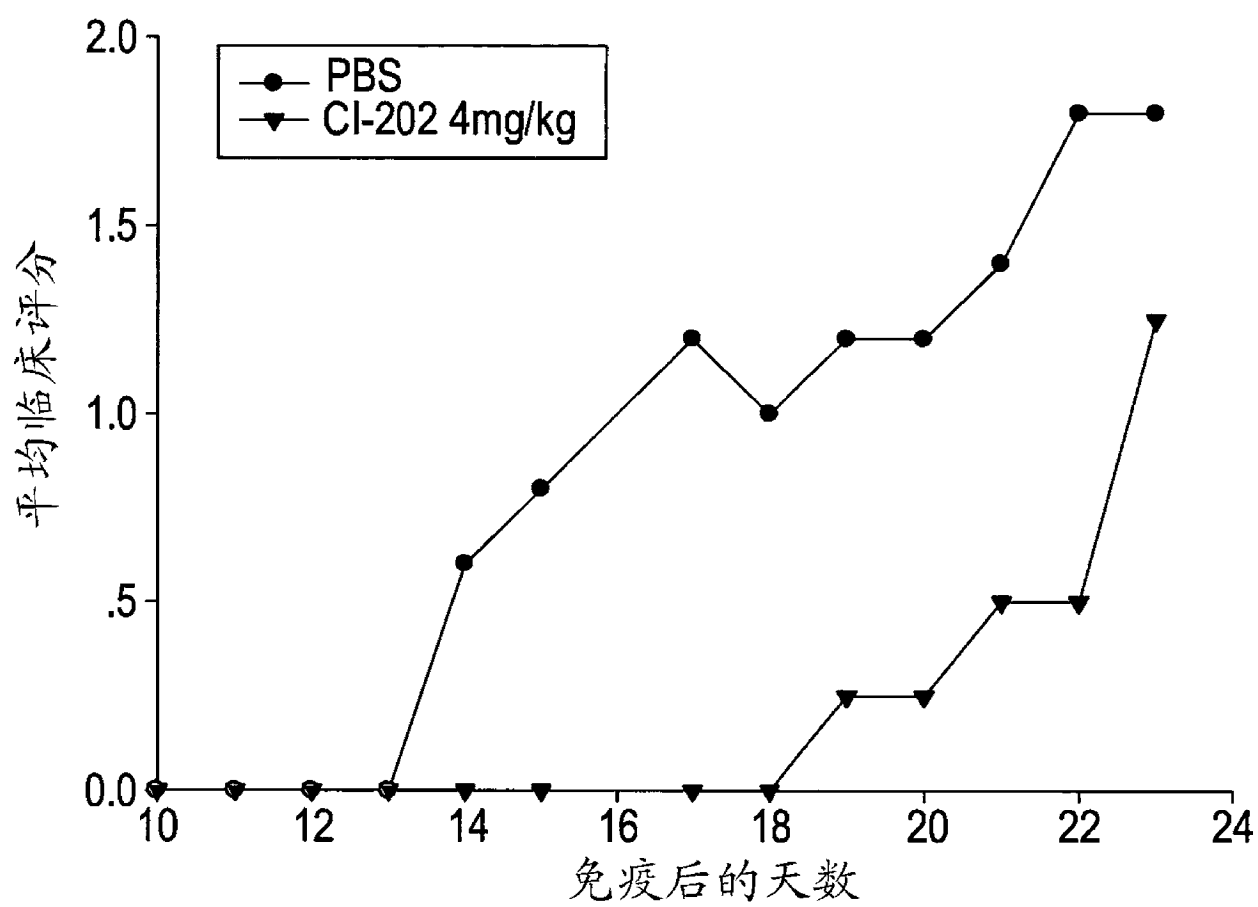


图 5

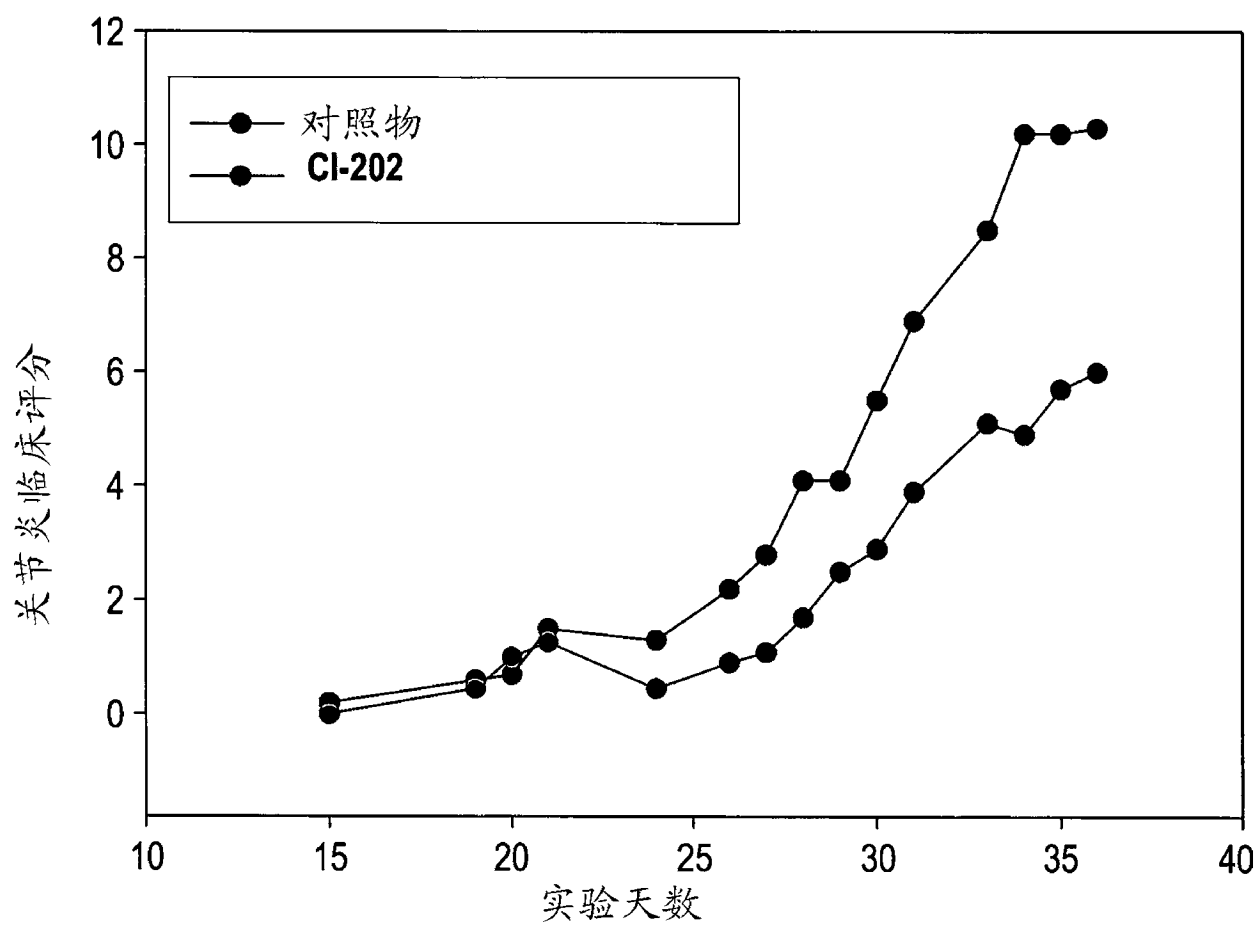


图 6

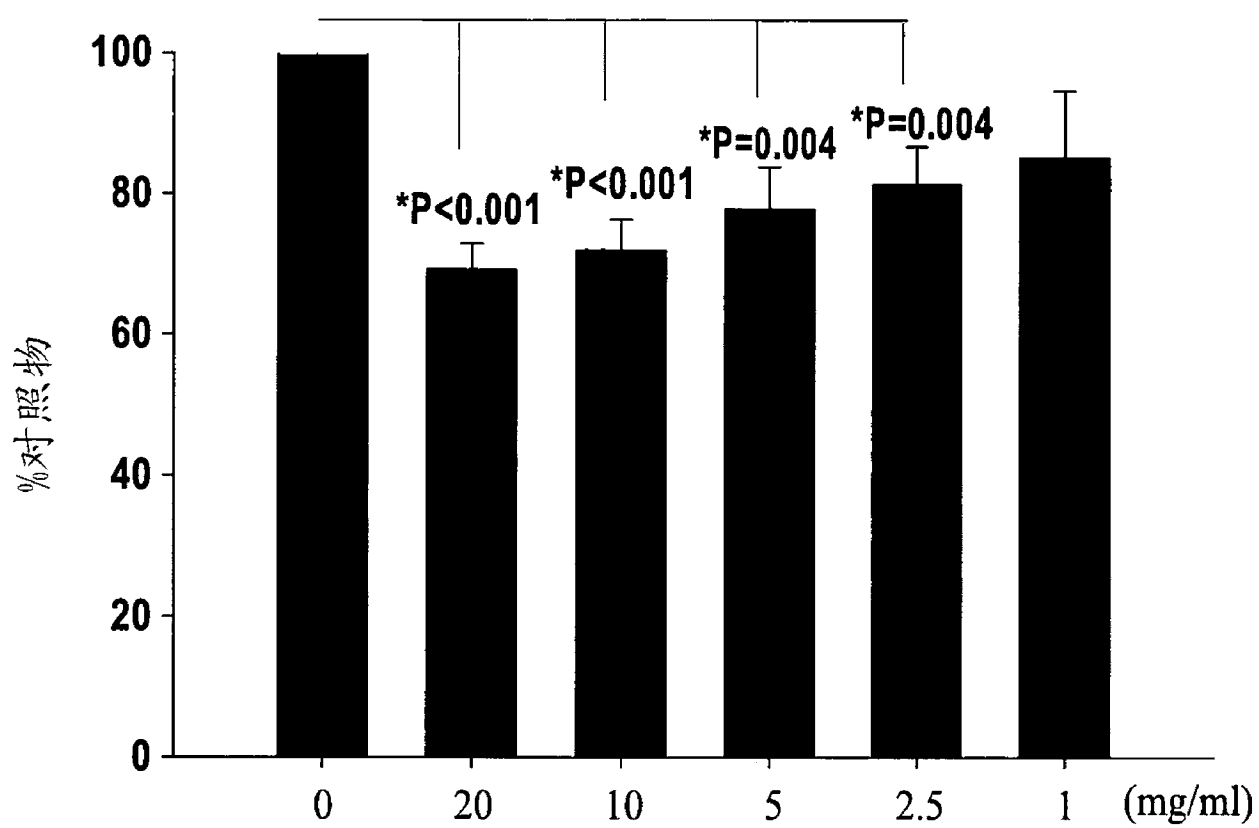


图 7

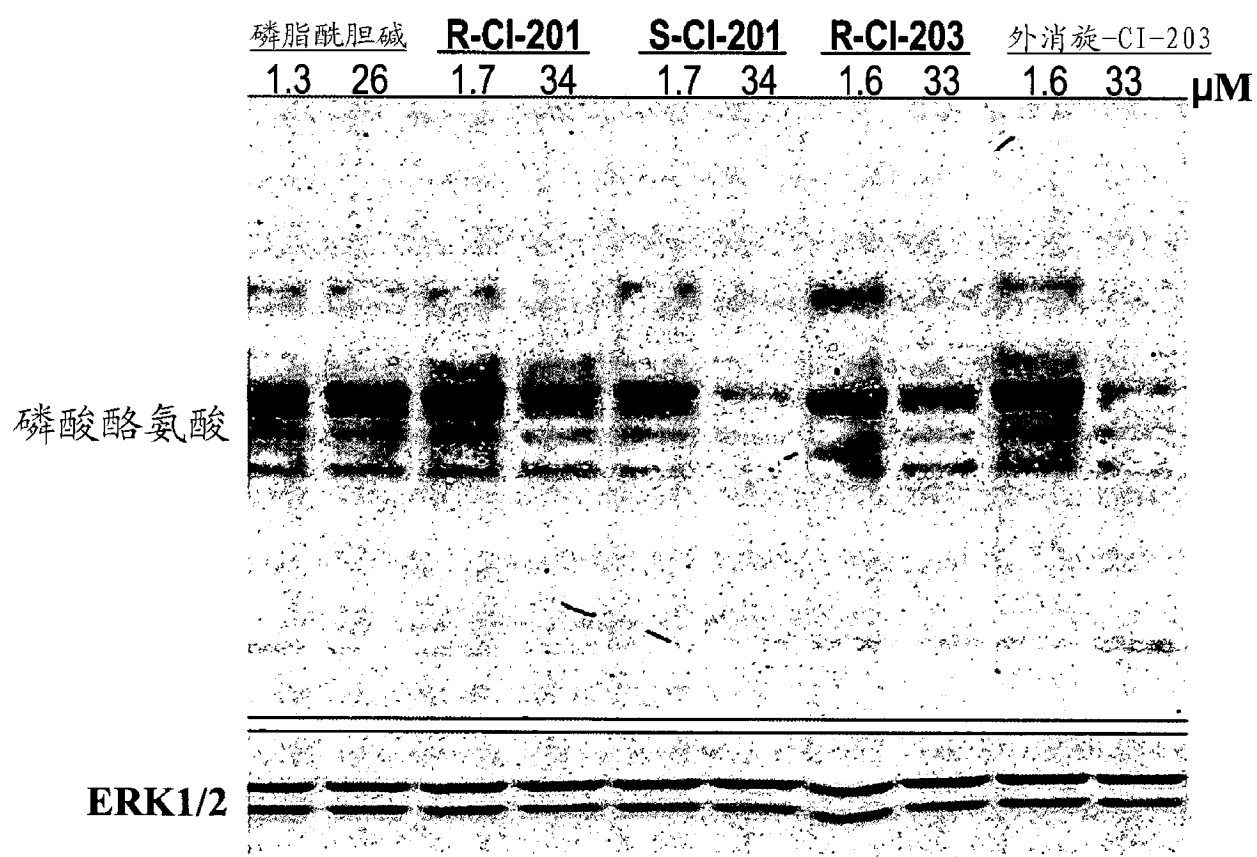


图 8

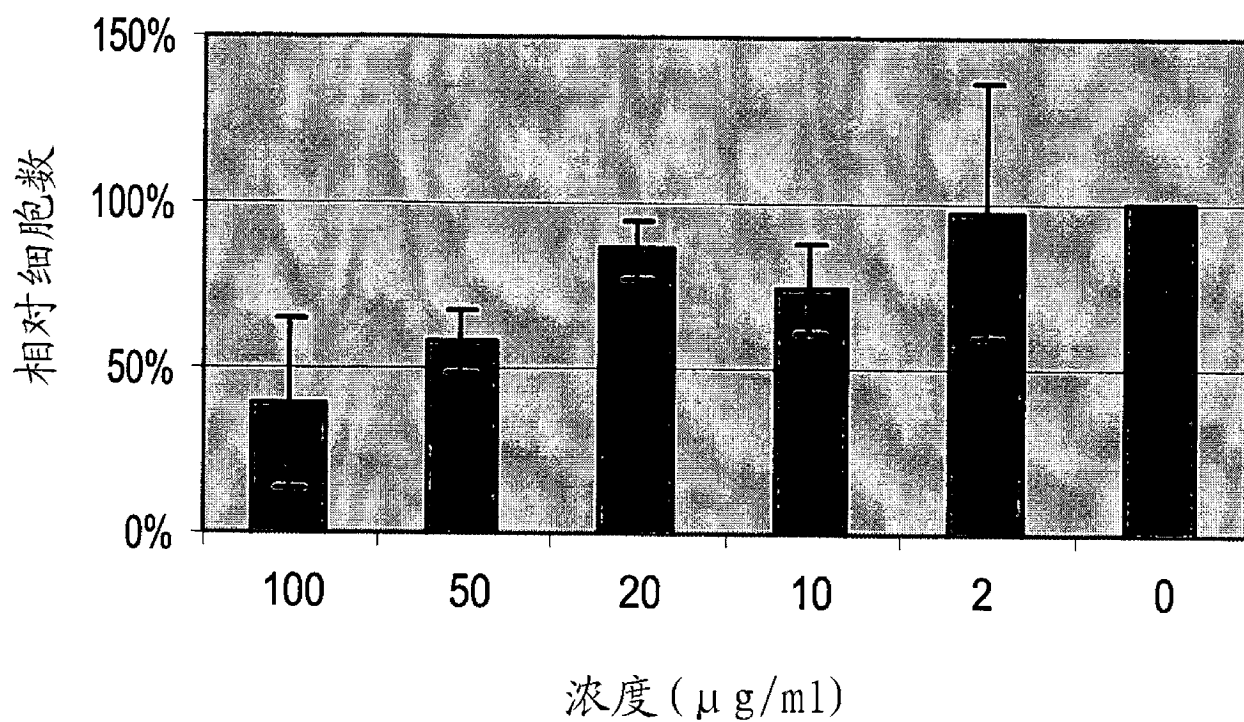


图 9A

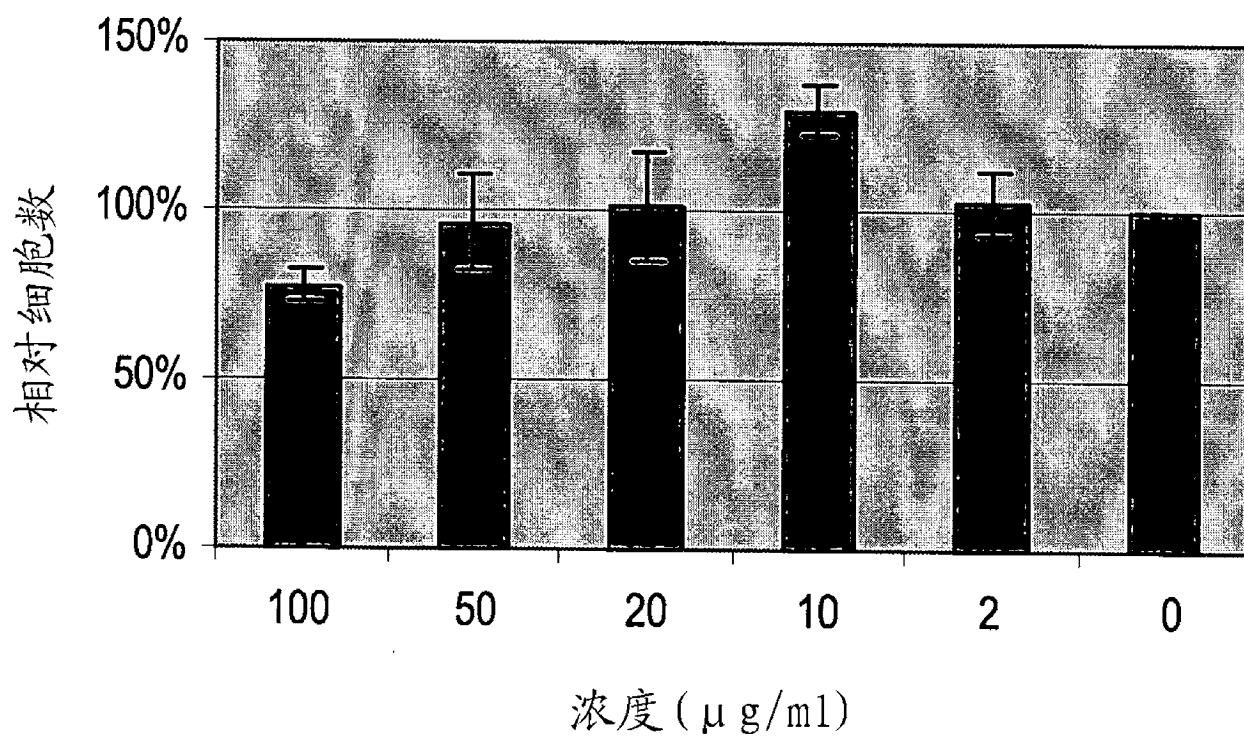


图 9B

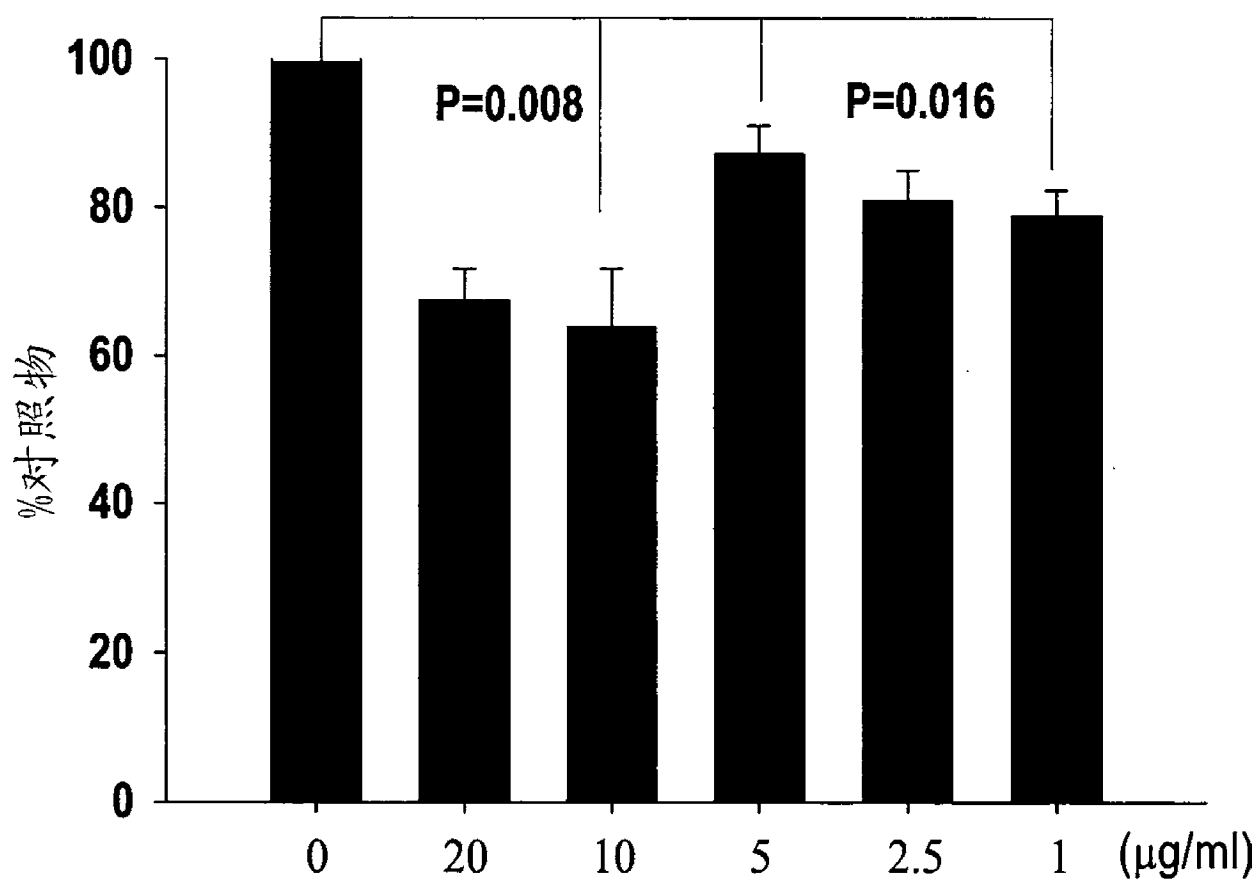


图 10

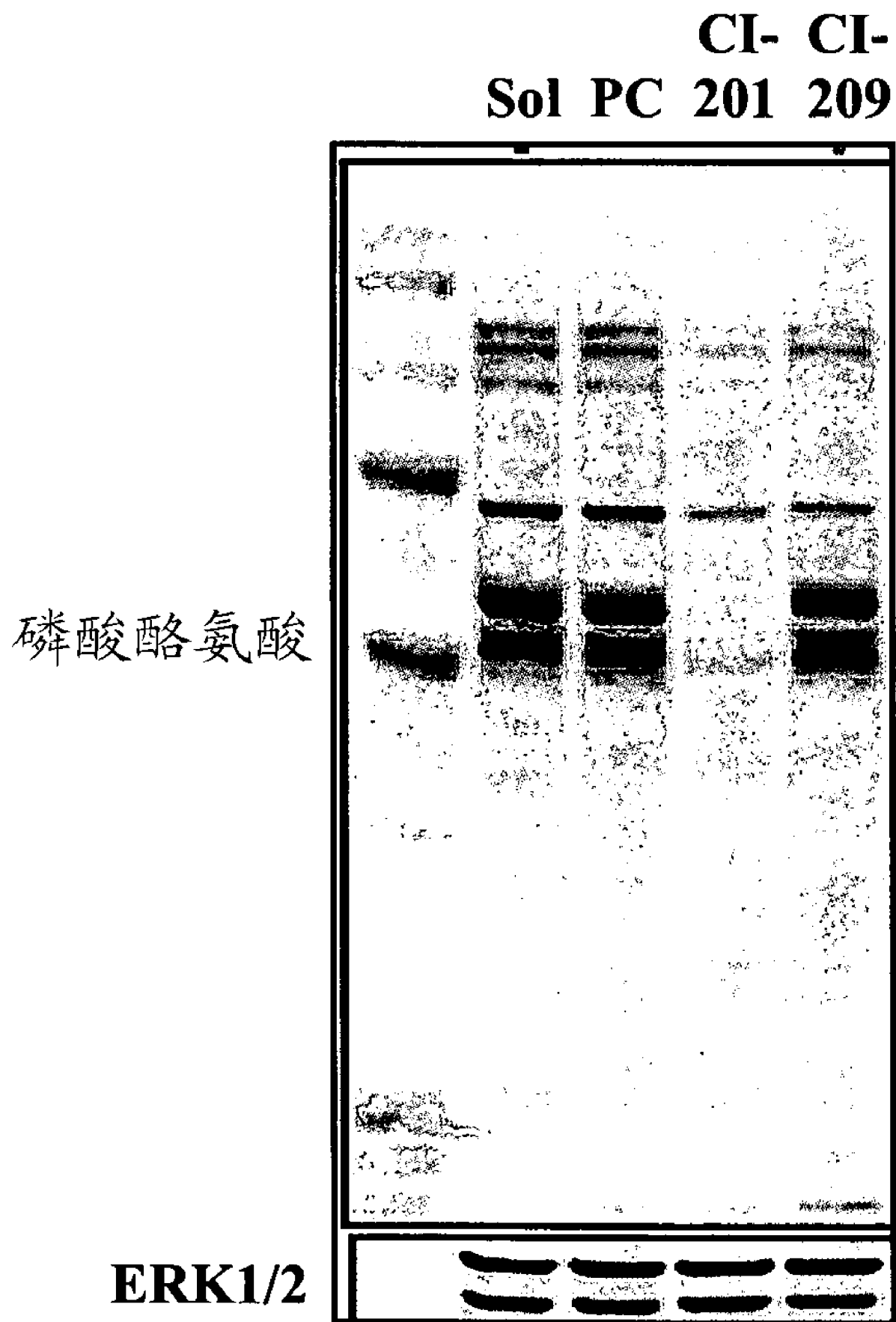


图 11

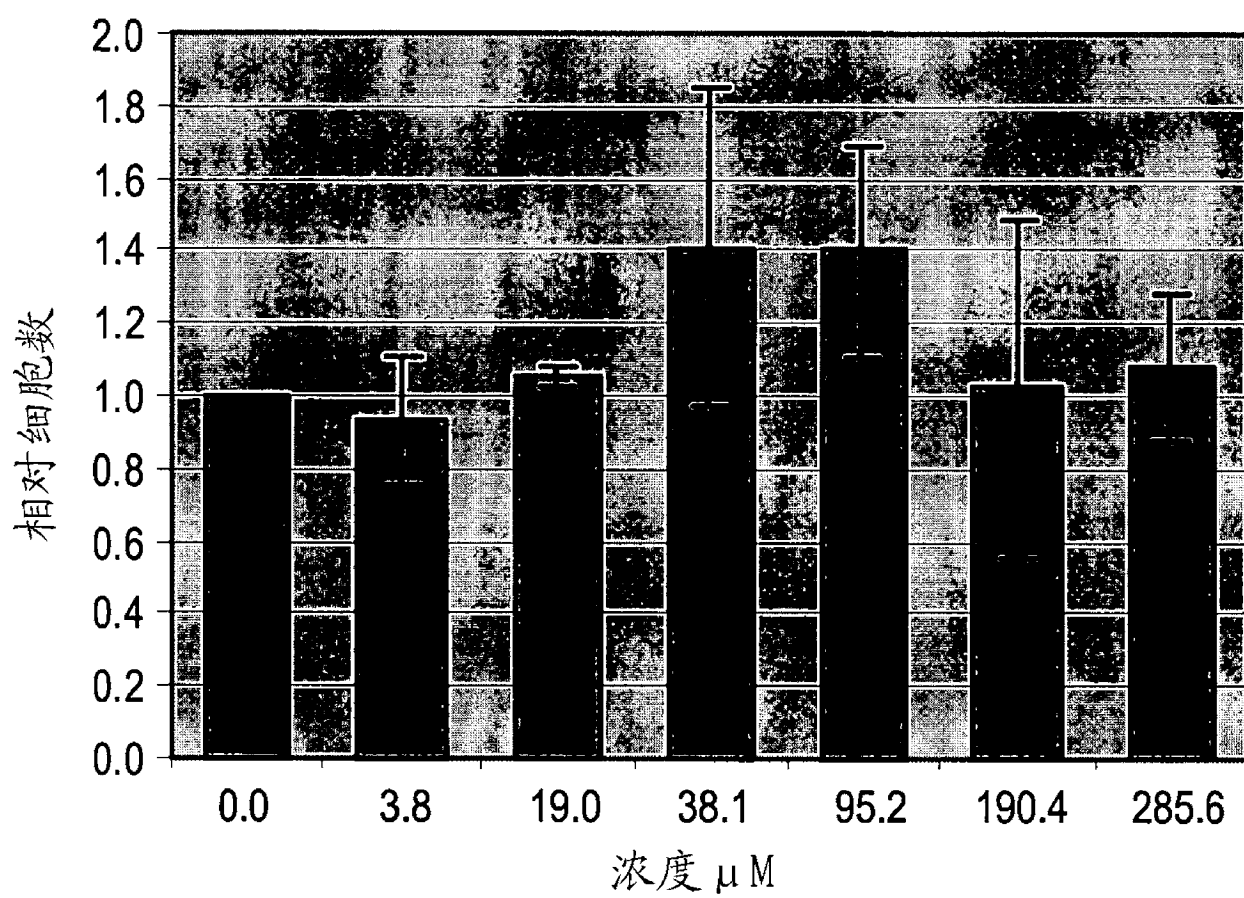


图 12A

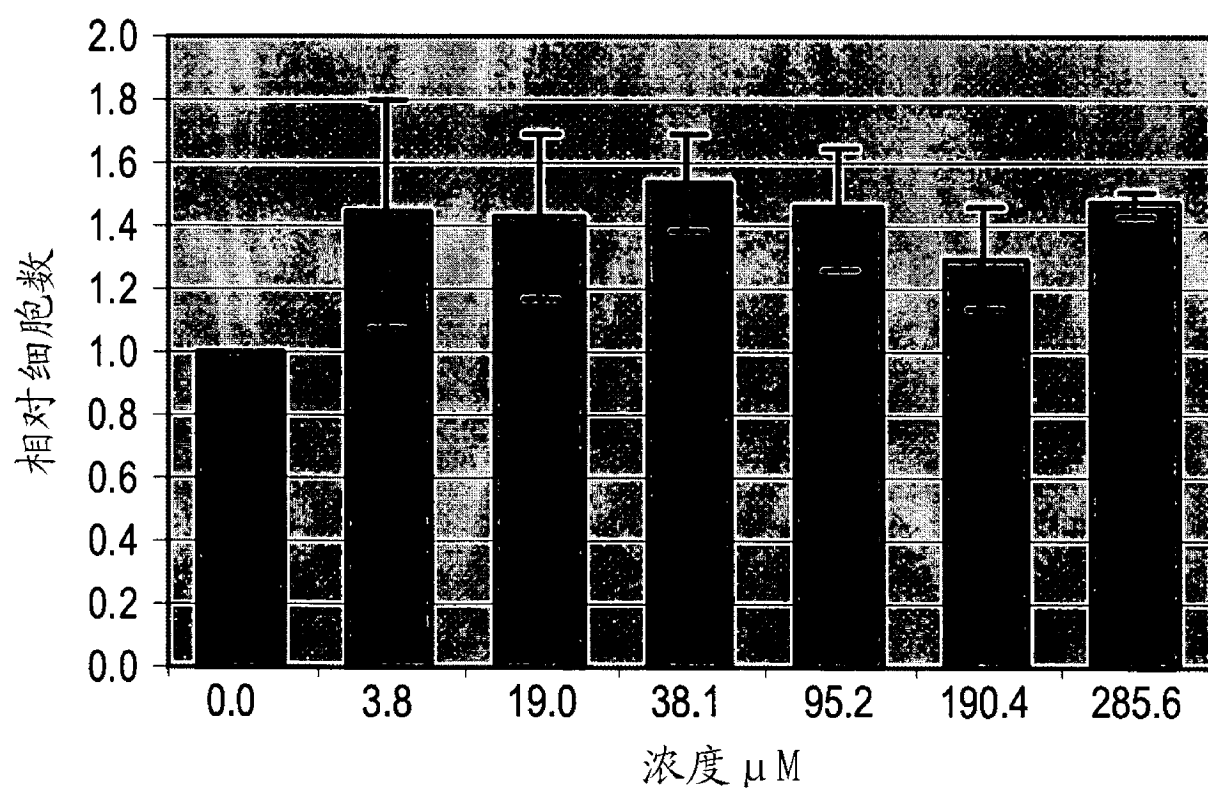


图 12B

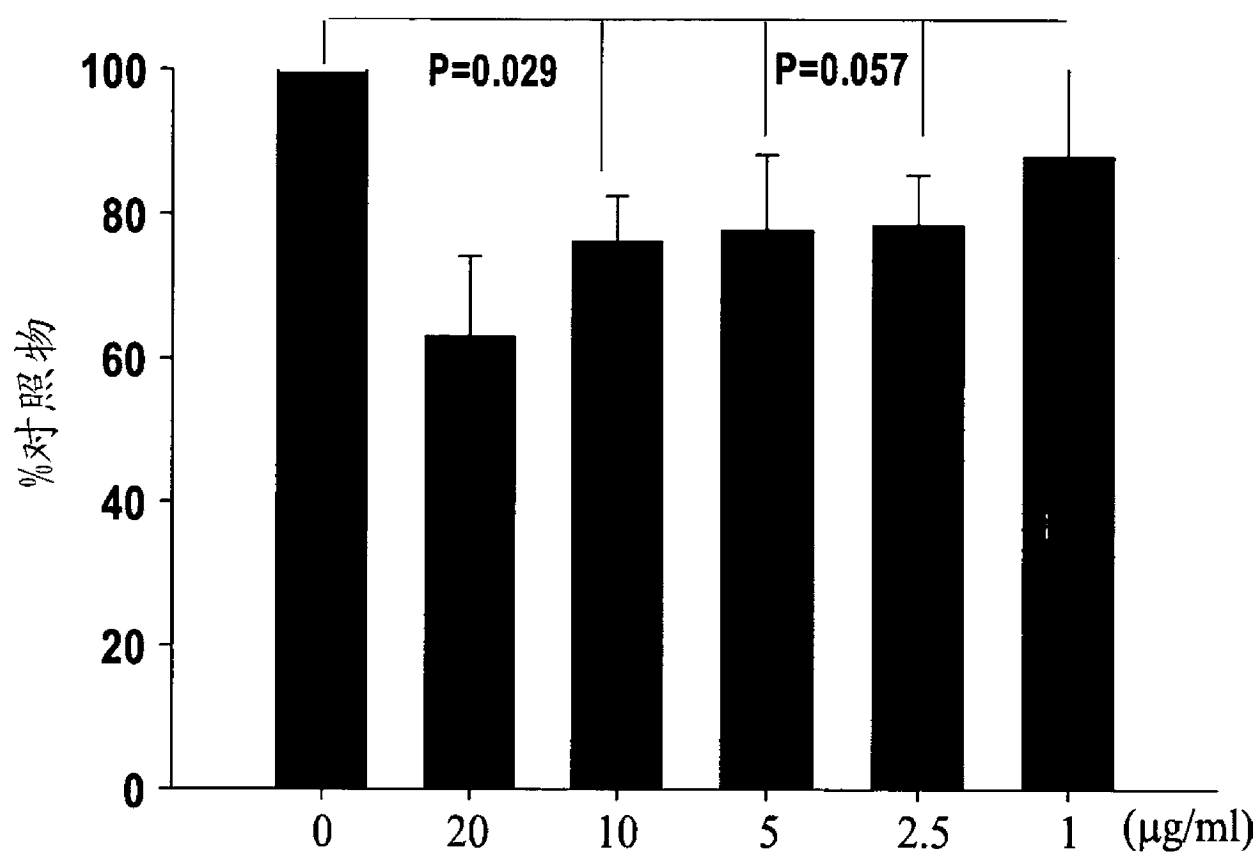


图 13

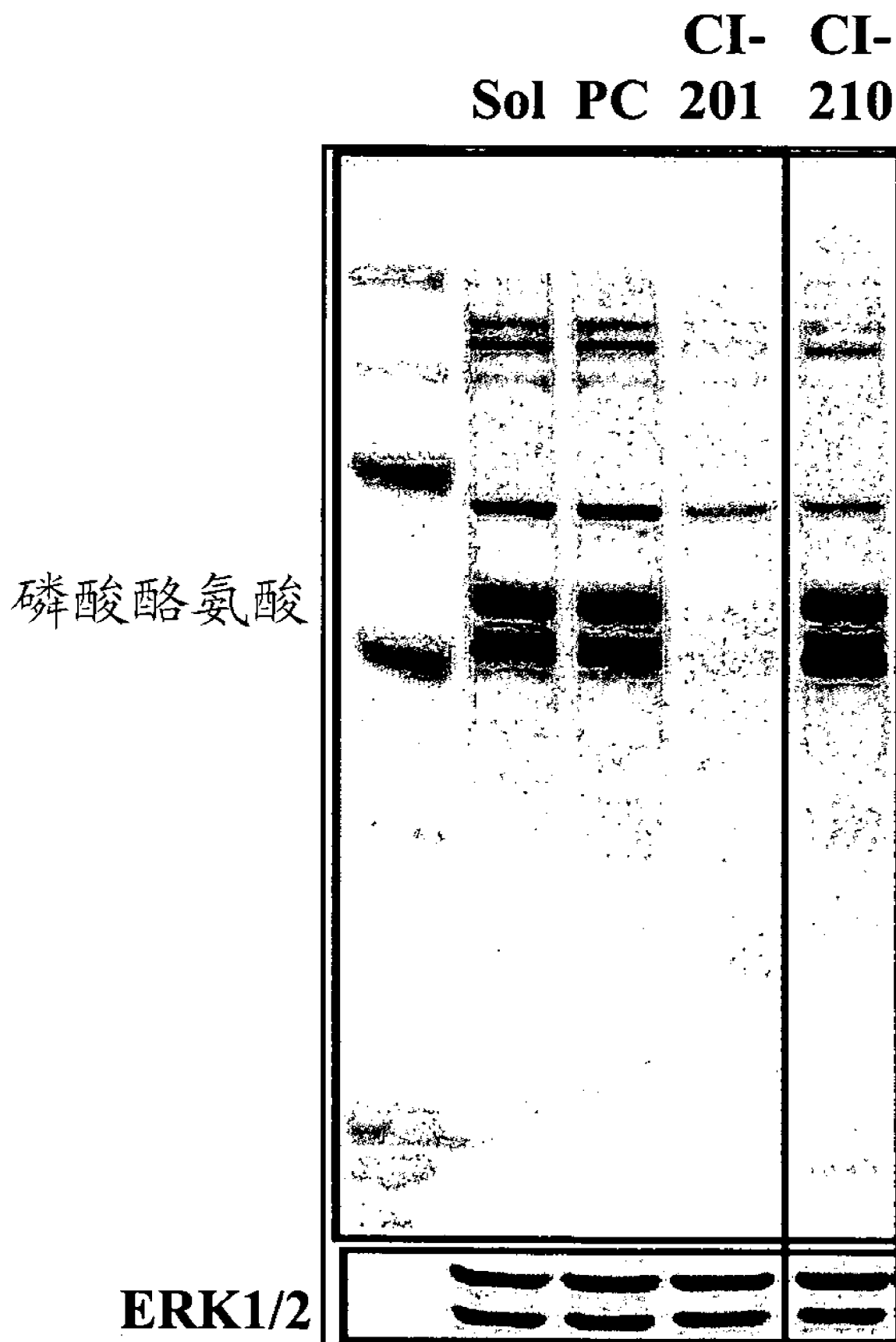


图 14

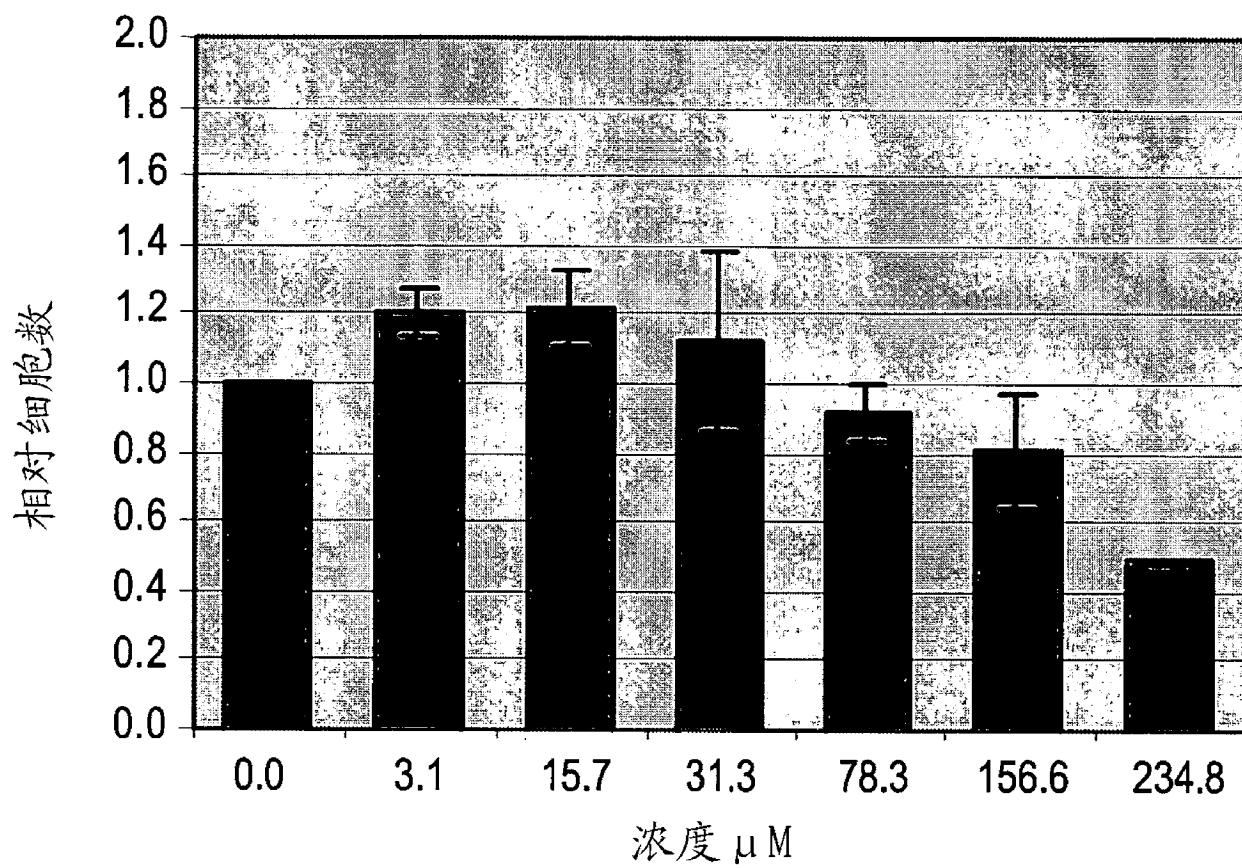


图 15A

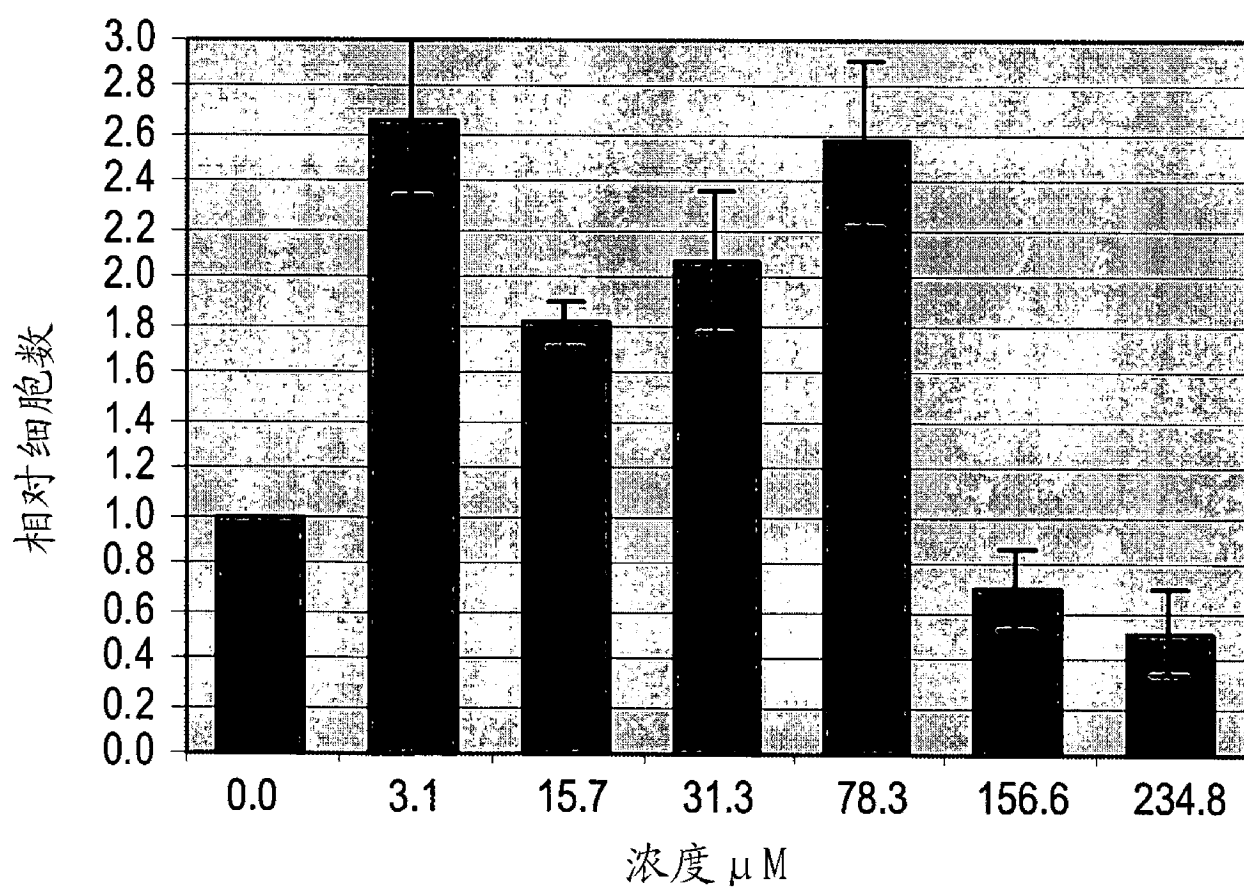


图 15B

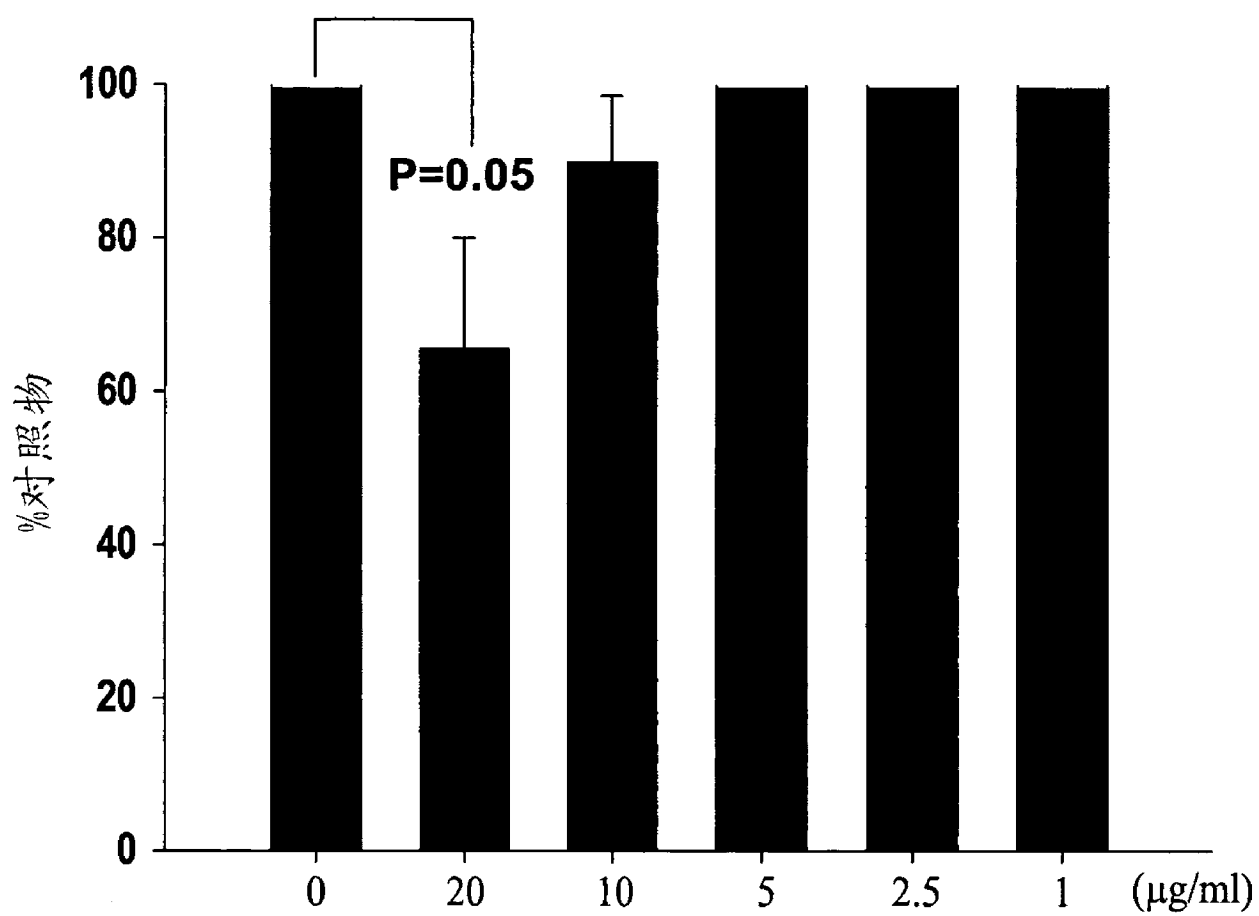


图 16

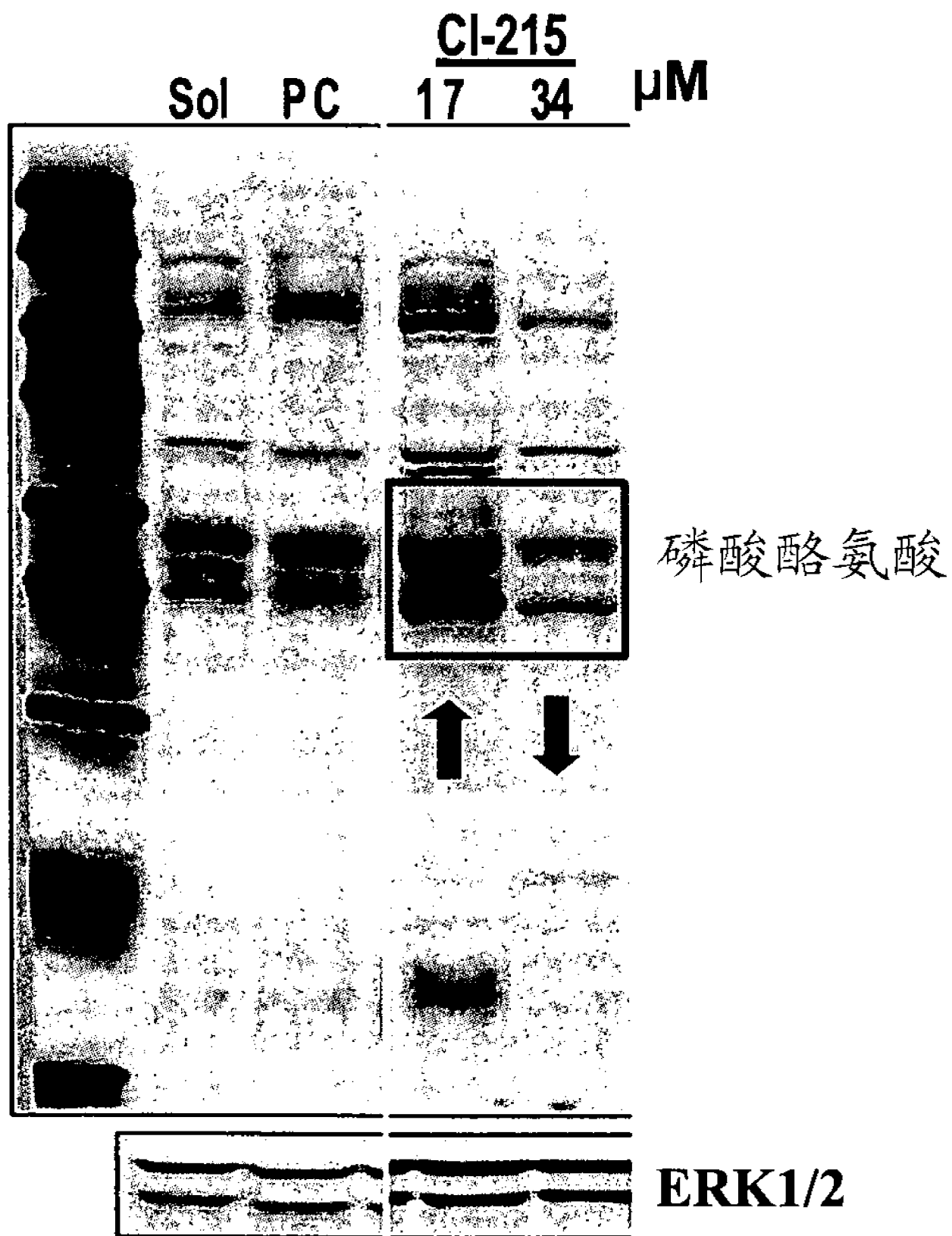


图 17

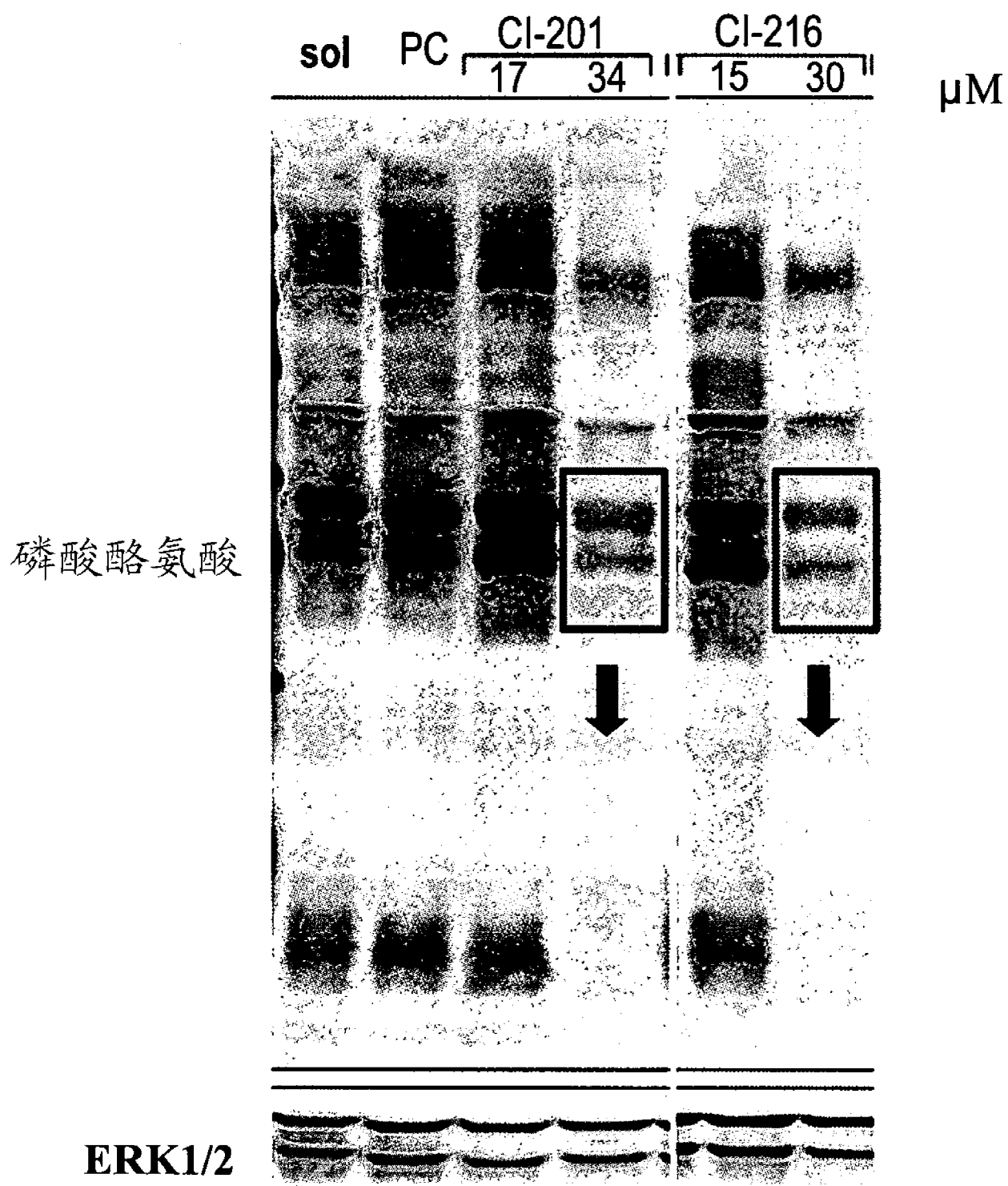


图 18

磷酸酪氨酸

ERK1/2

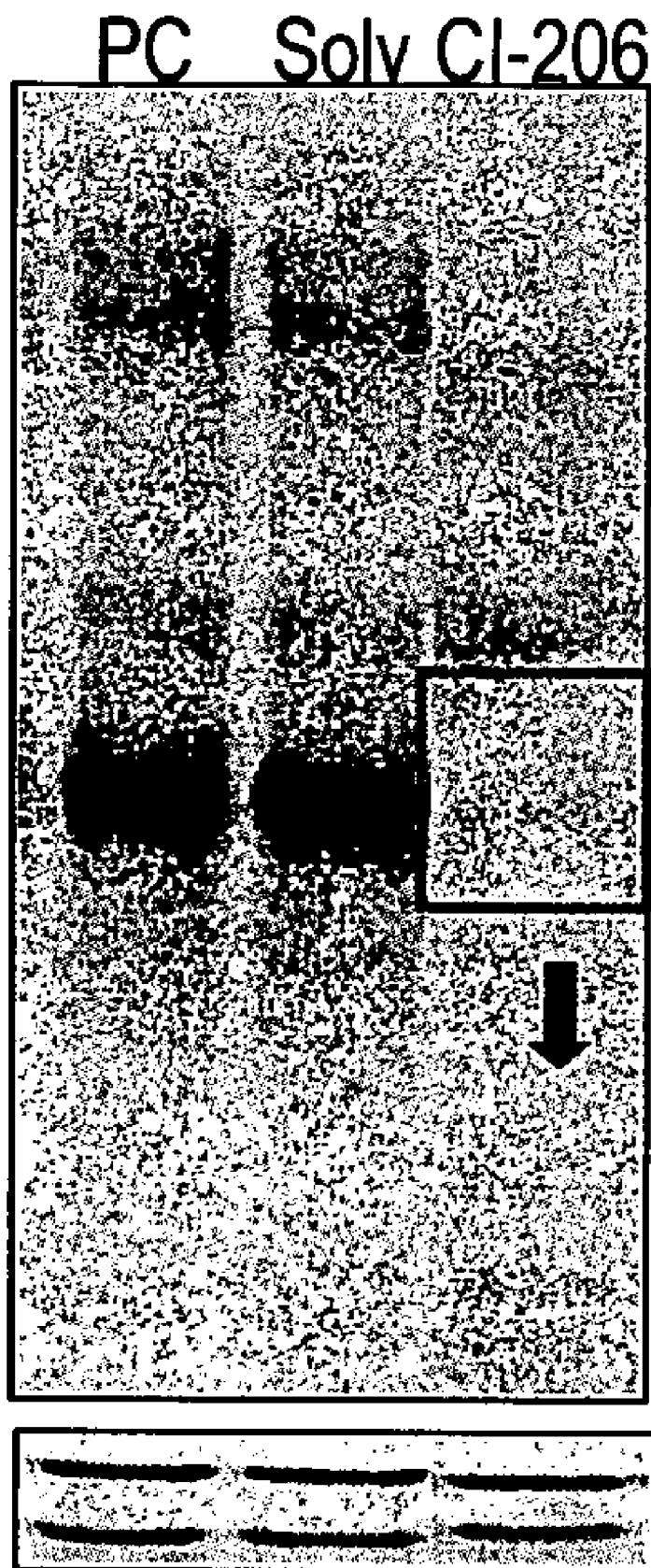


图 19

Solv PC CI-201 CI-205

磷酸酪氨酸

ERK1/2

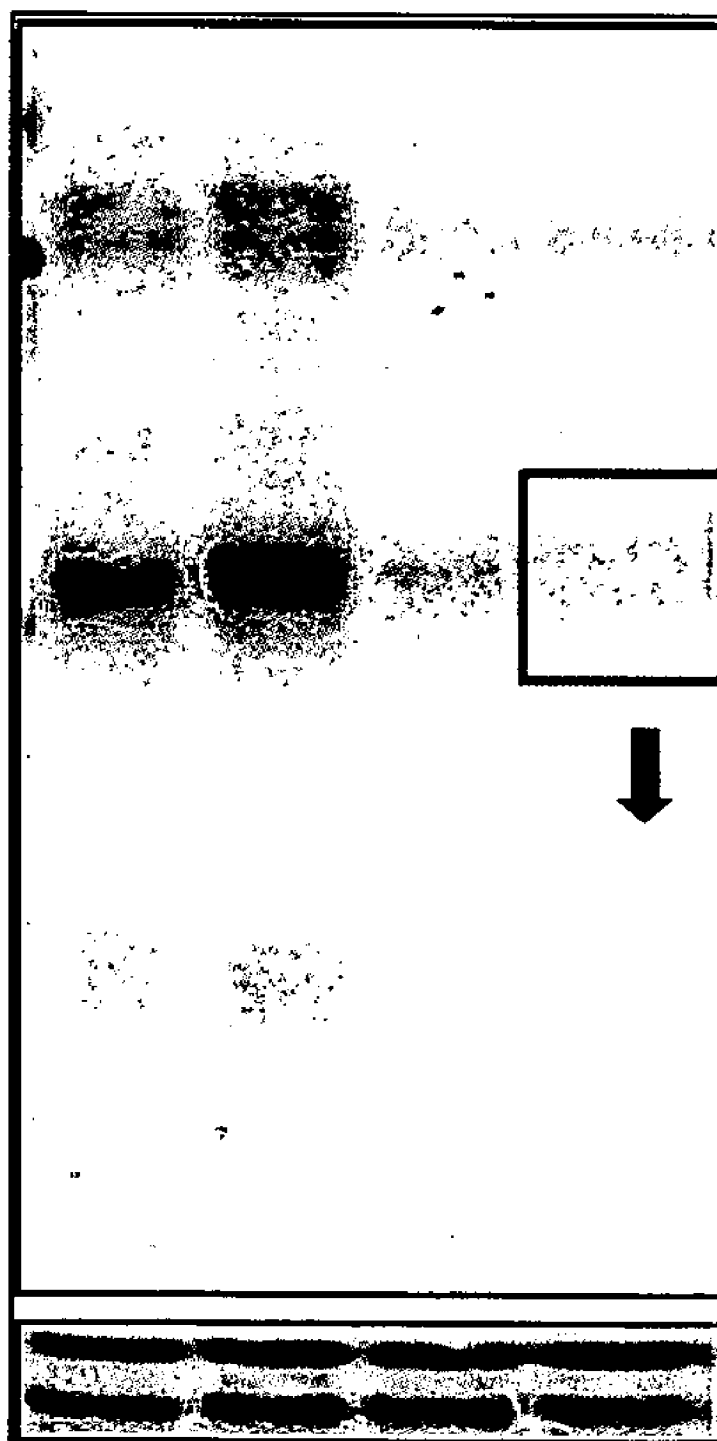


图 20

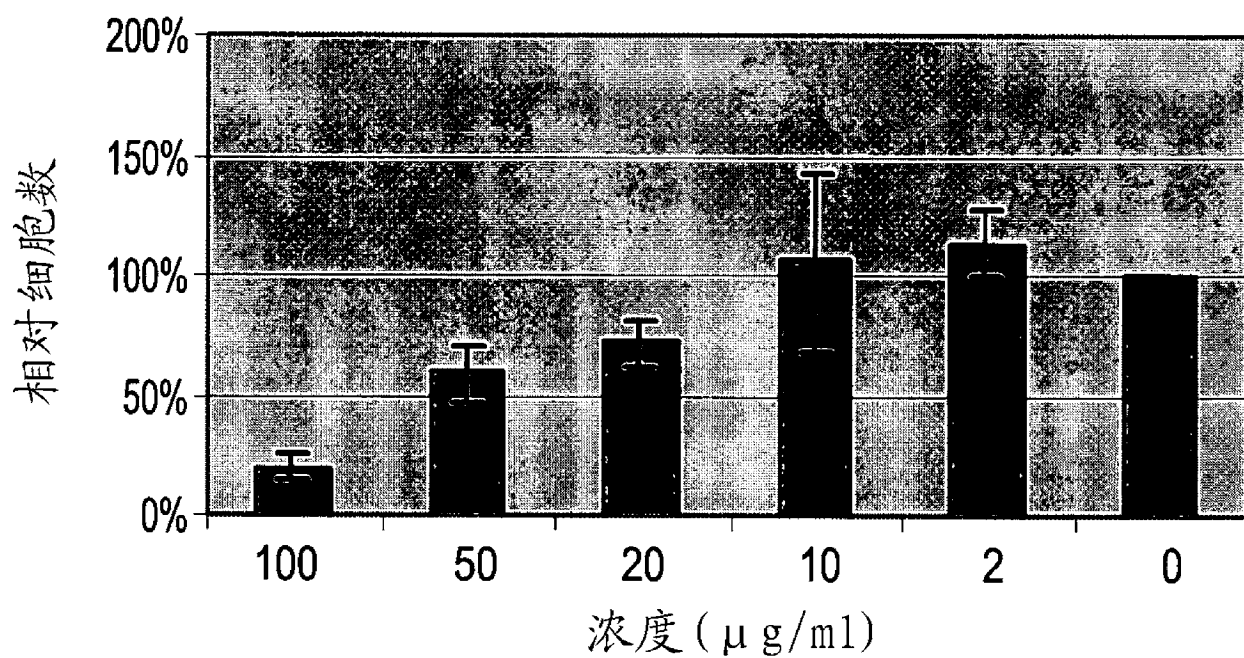


图 21A

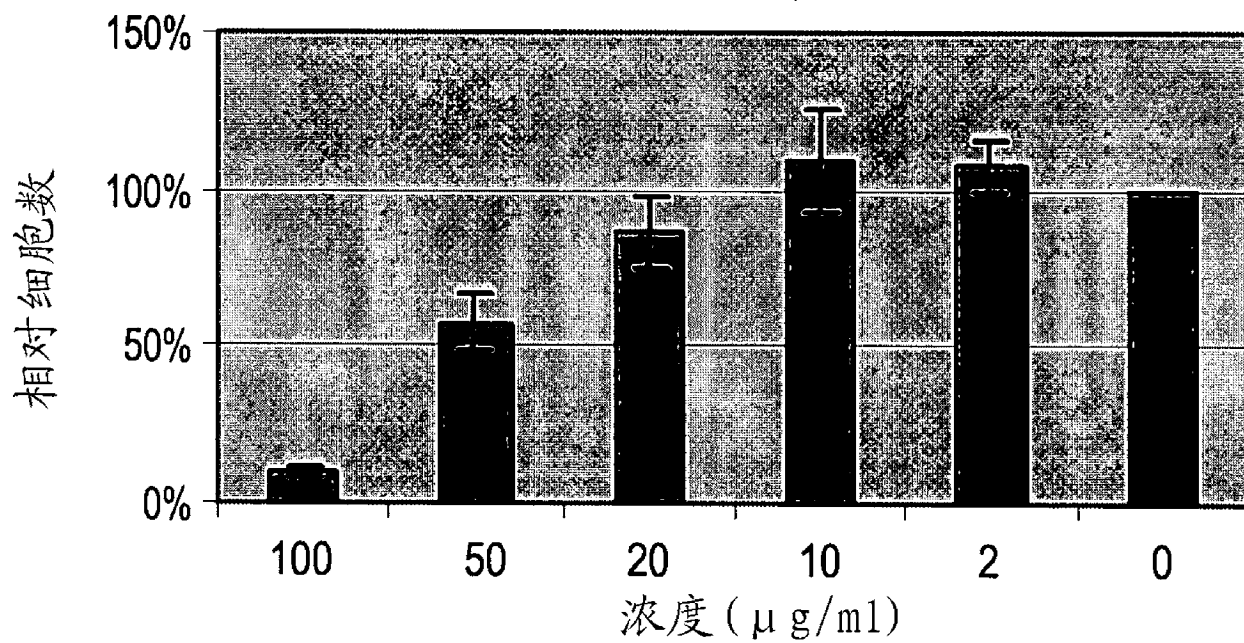


图 21B

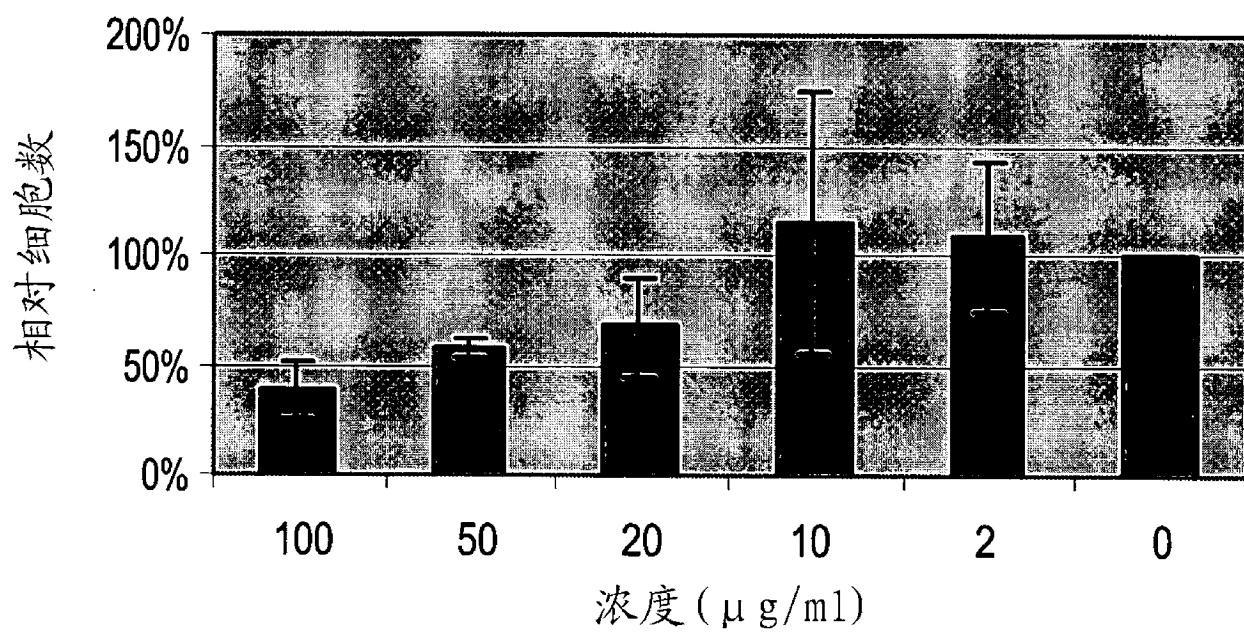


图 22A

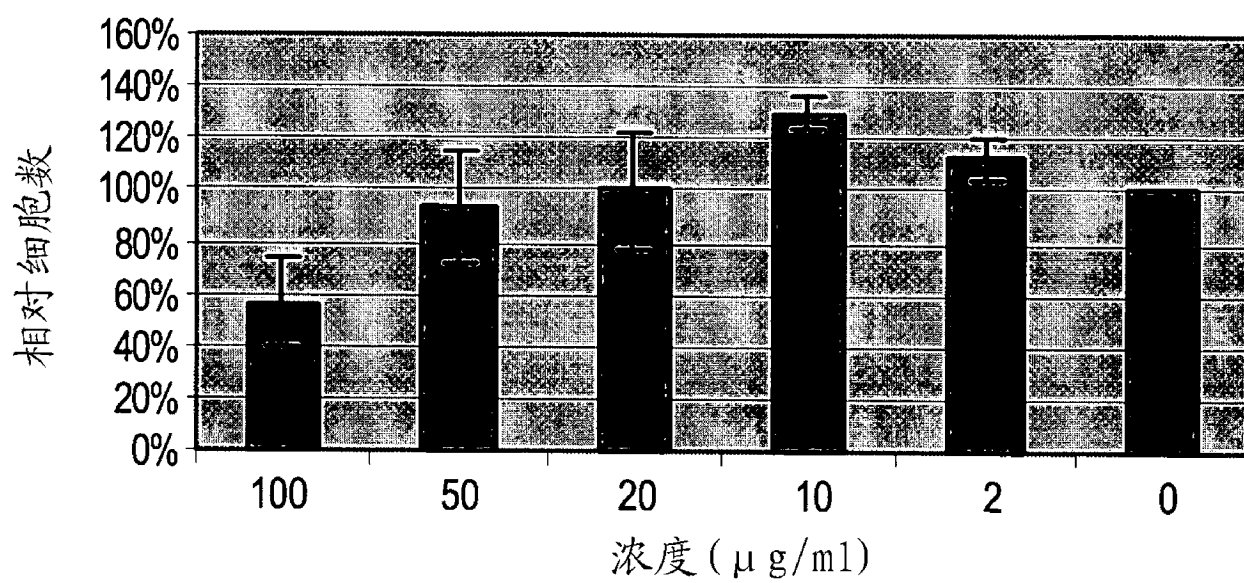


图 22B

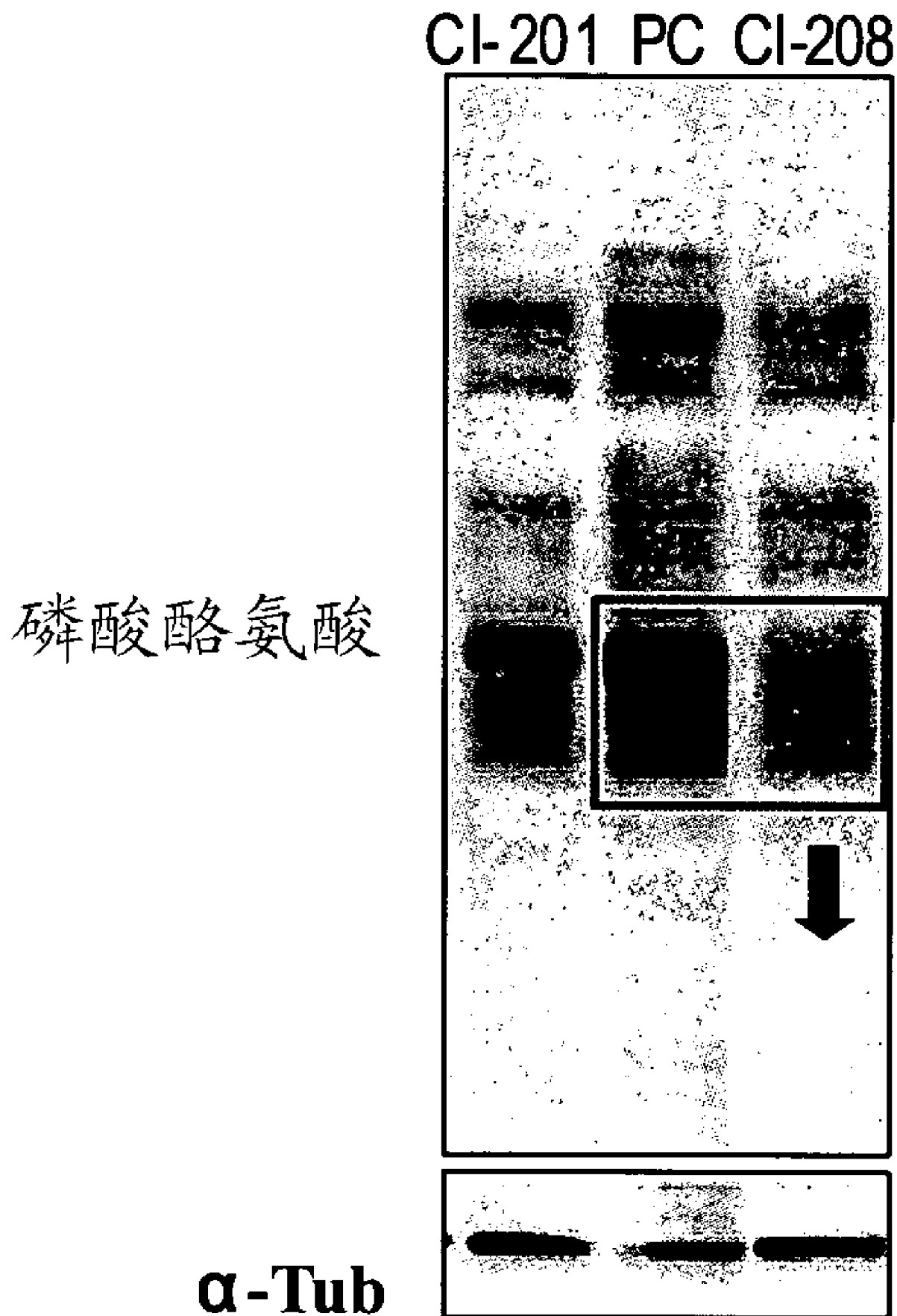


图 23

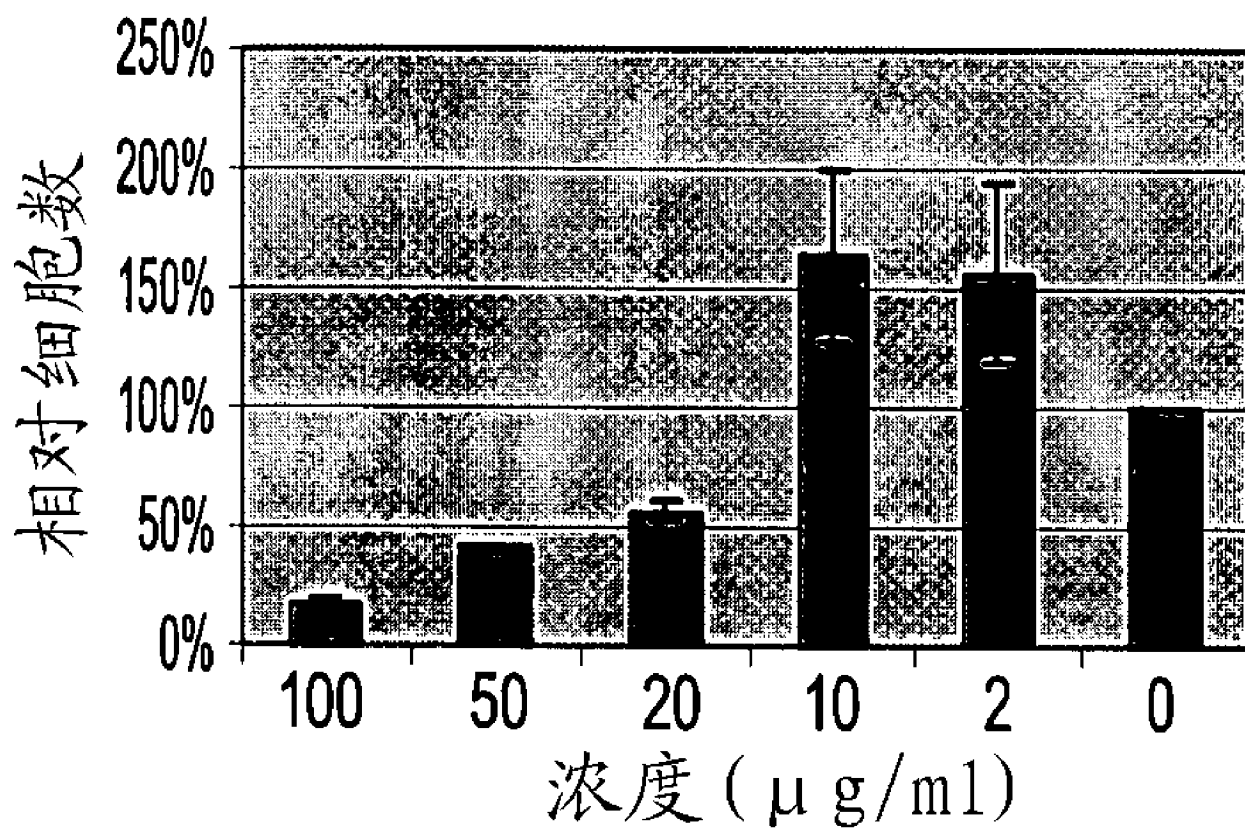


图 24A

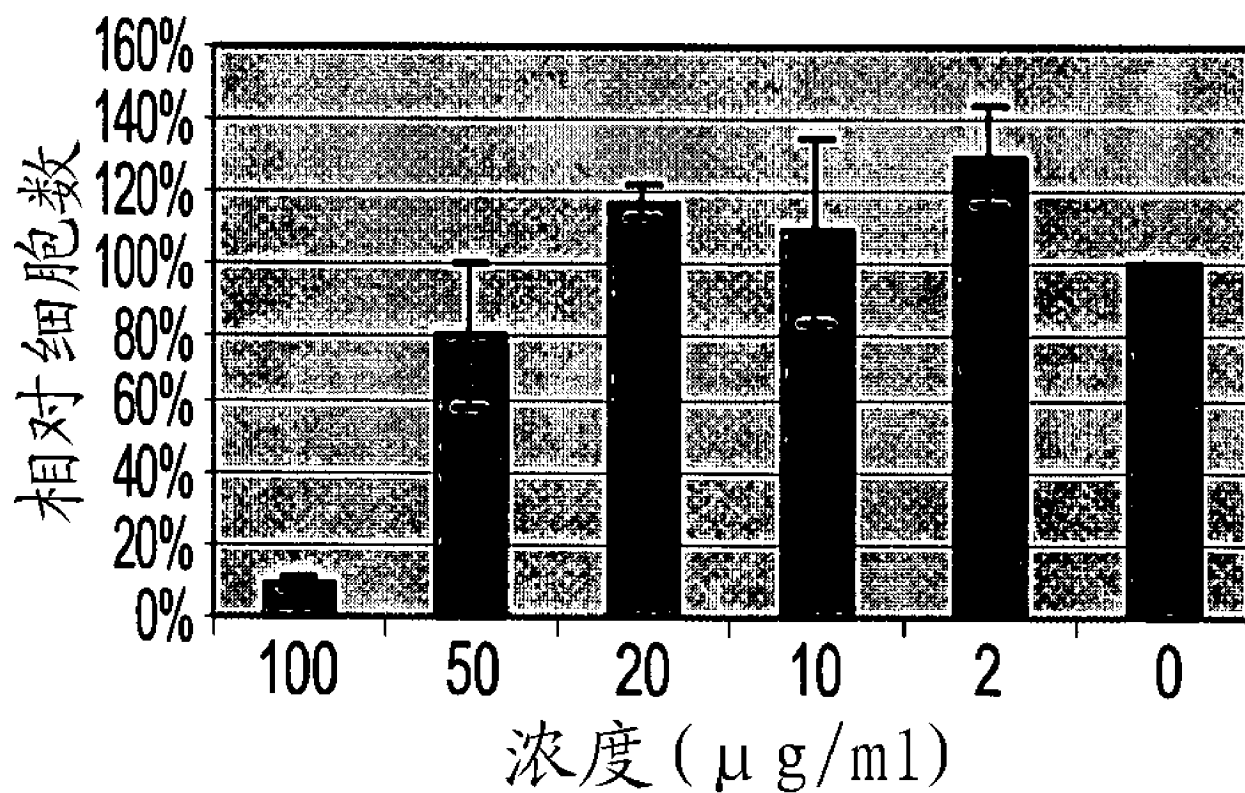


图 24B

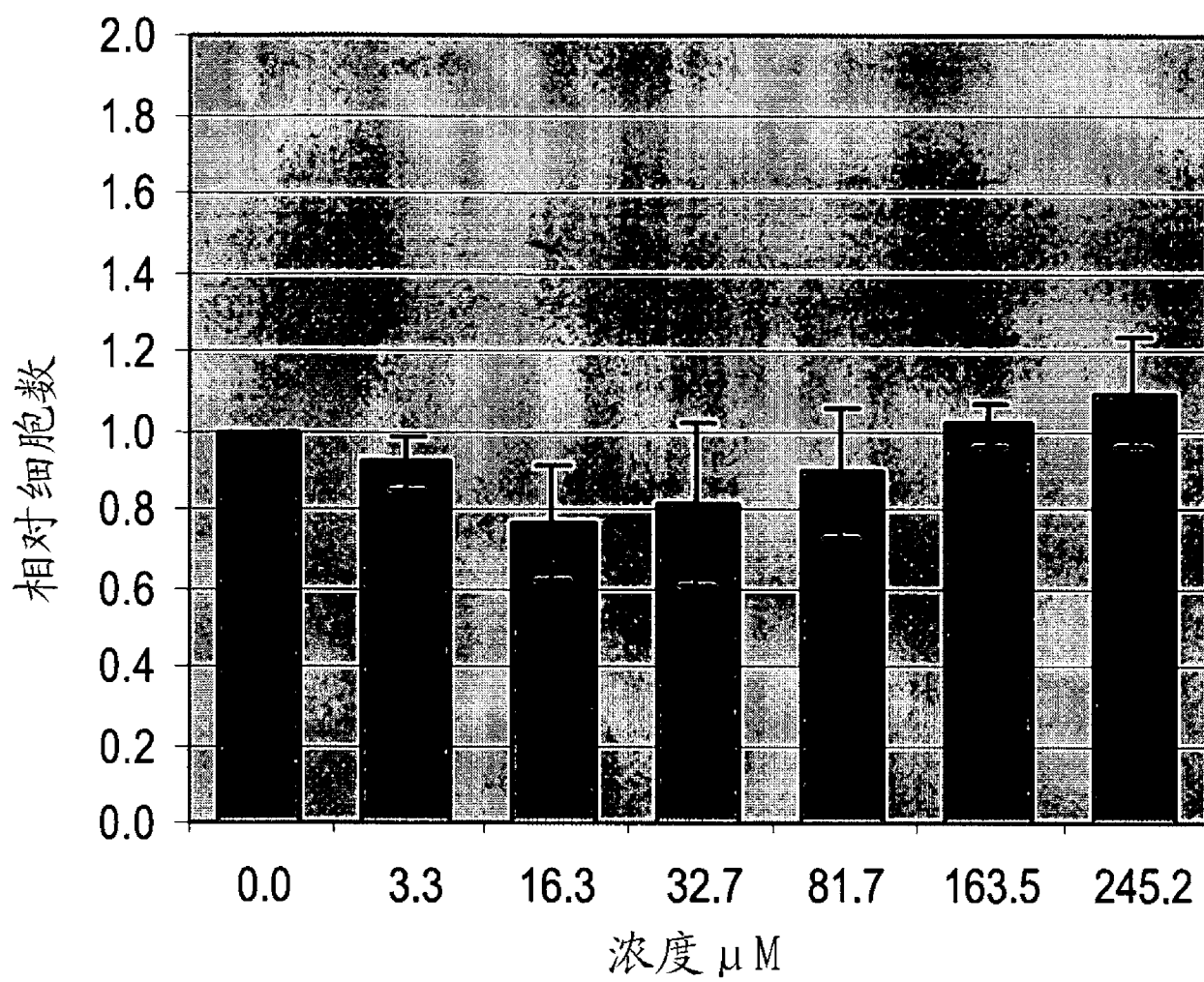


图 25A

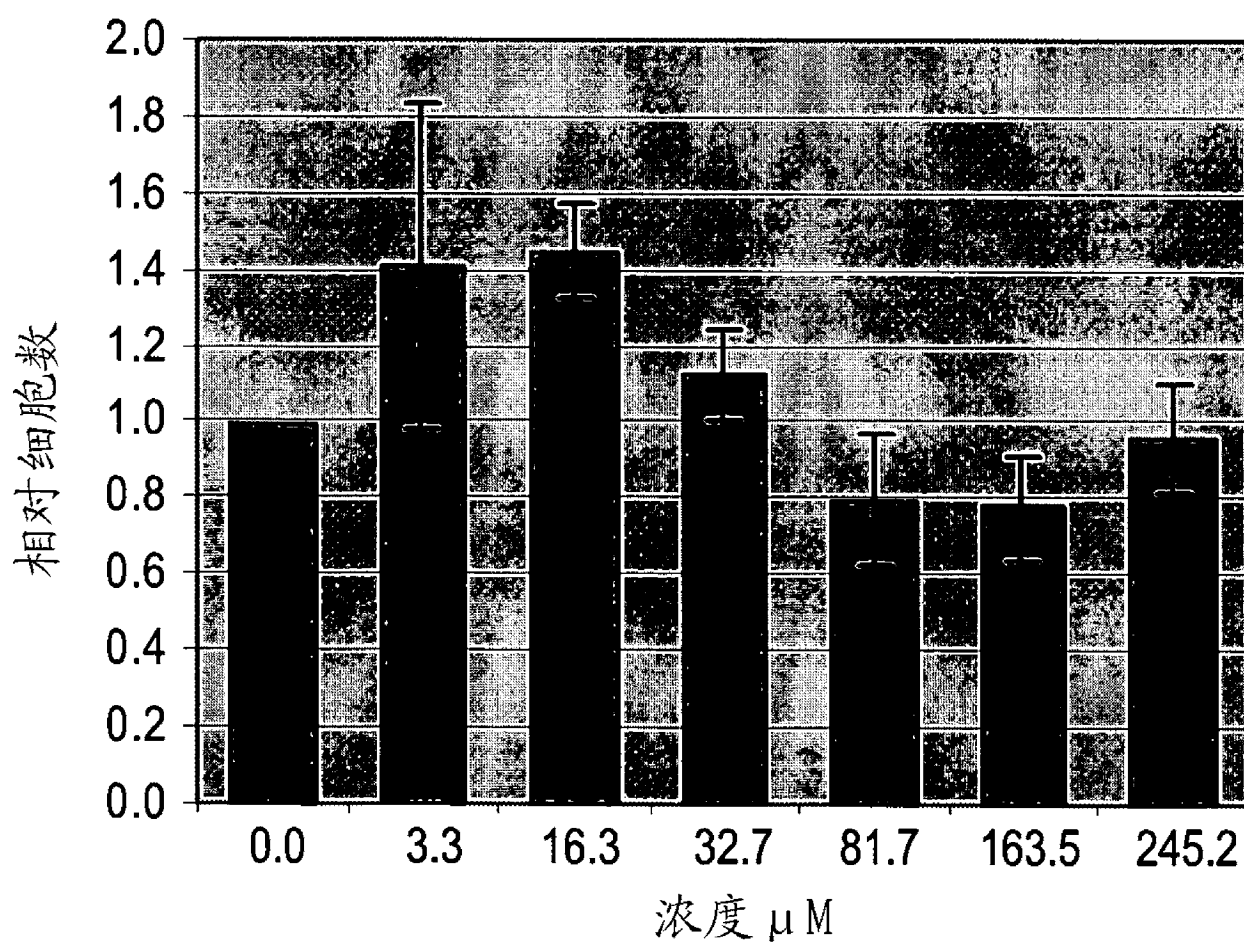


图 25B

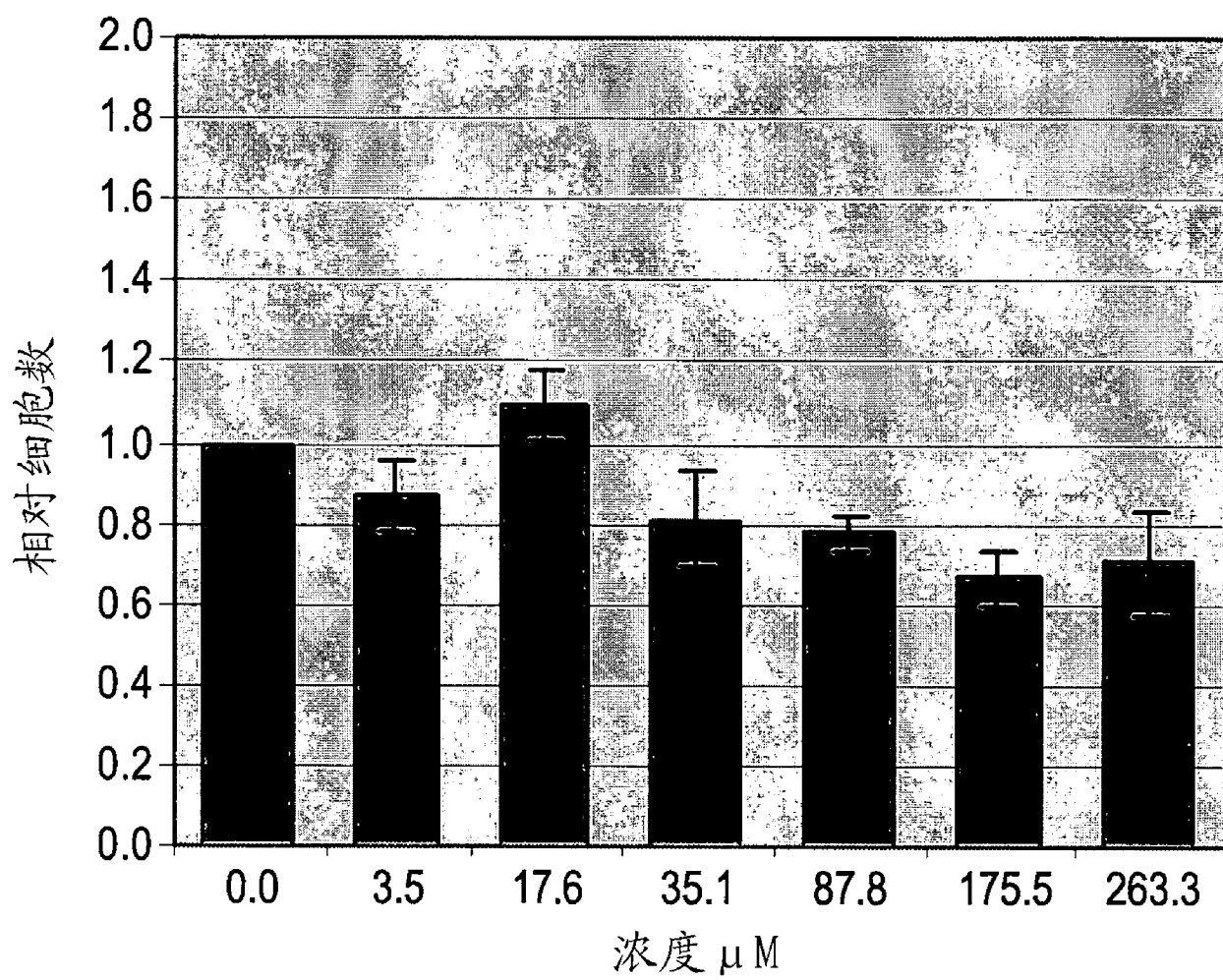


图 26A

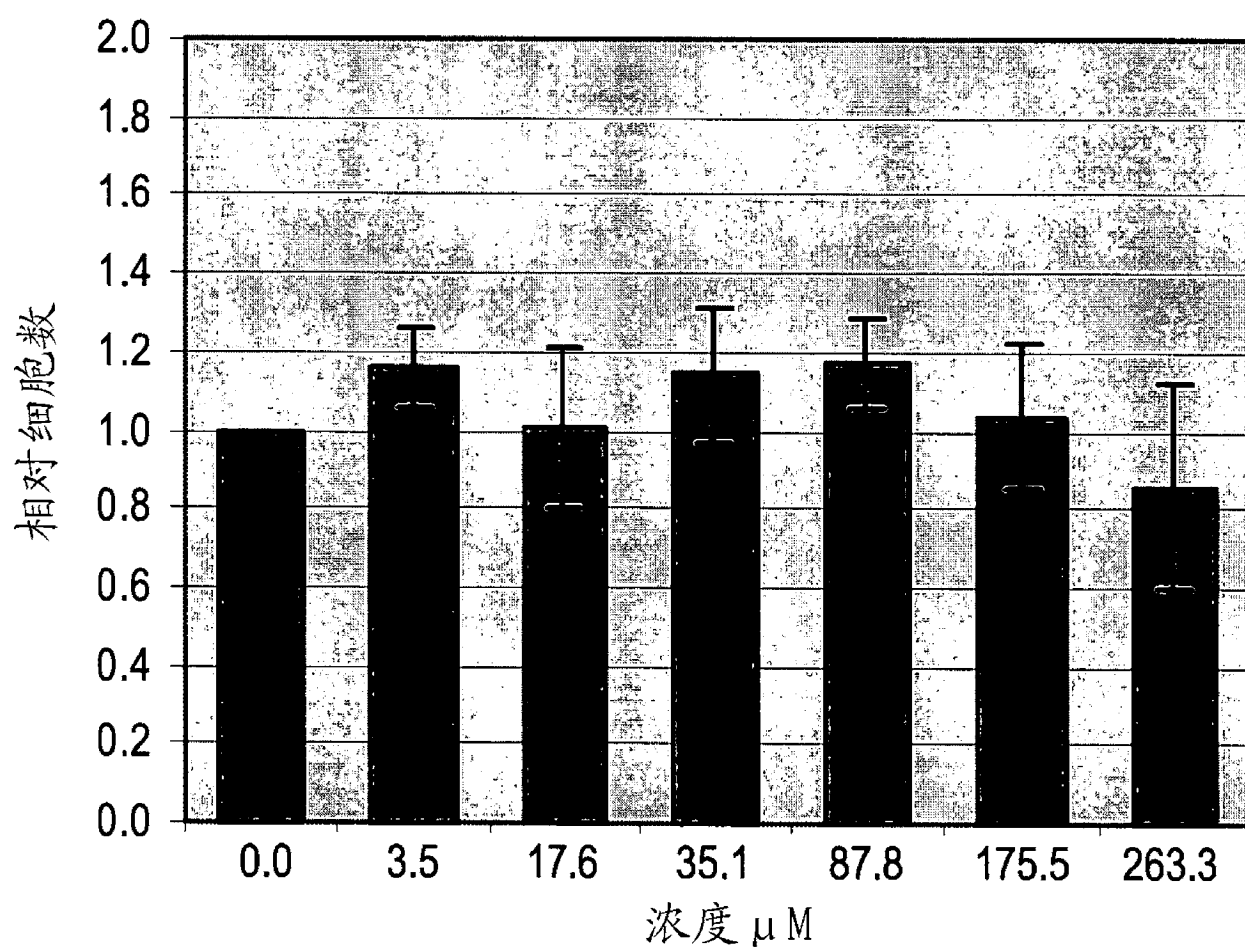


图 26B

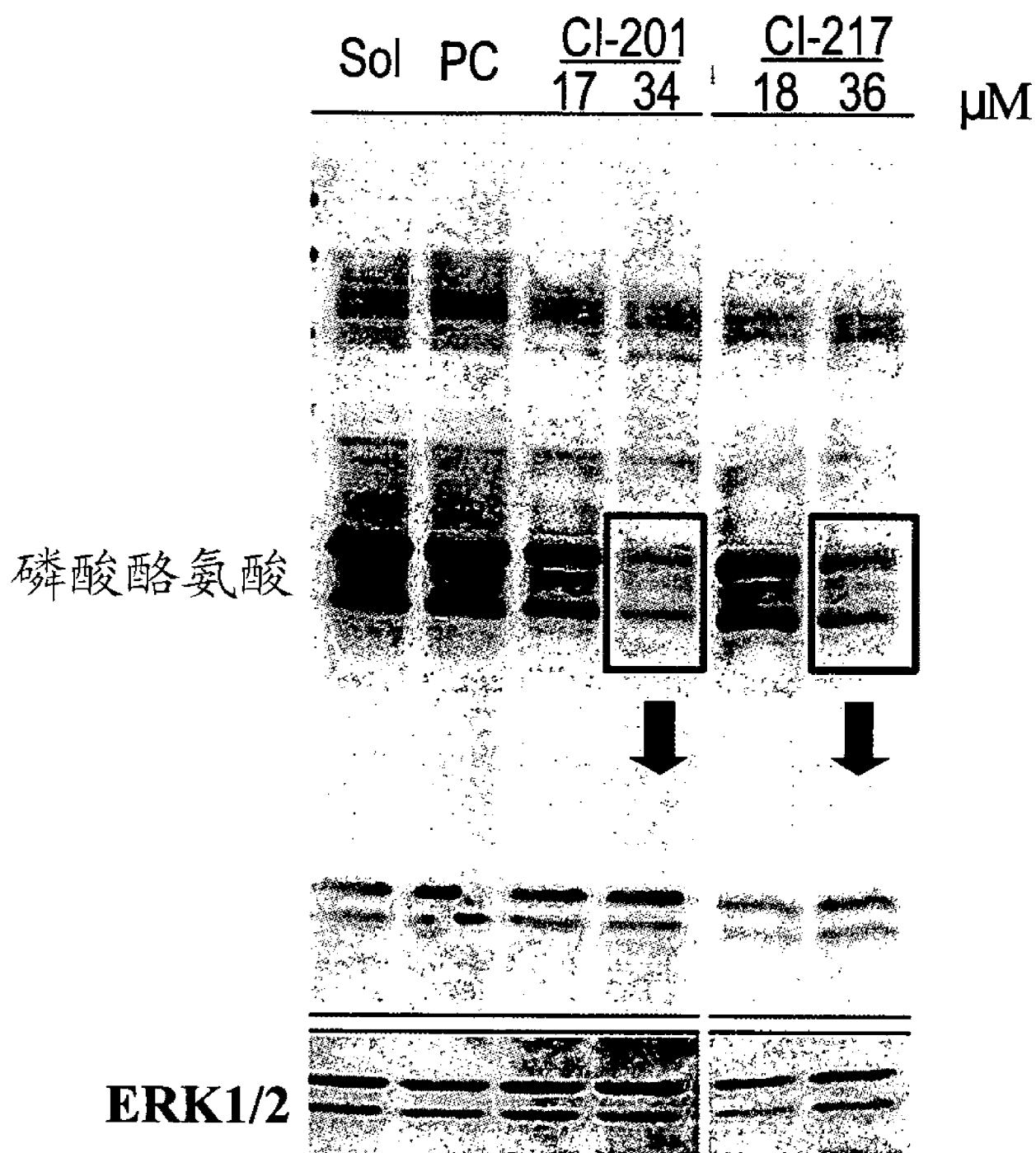


图 27

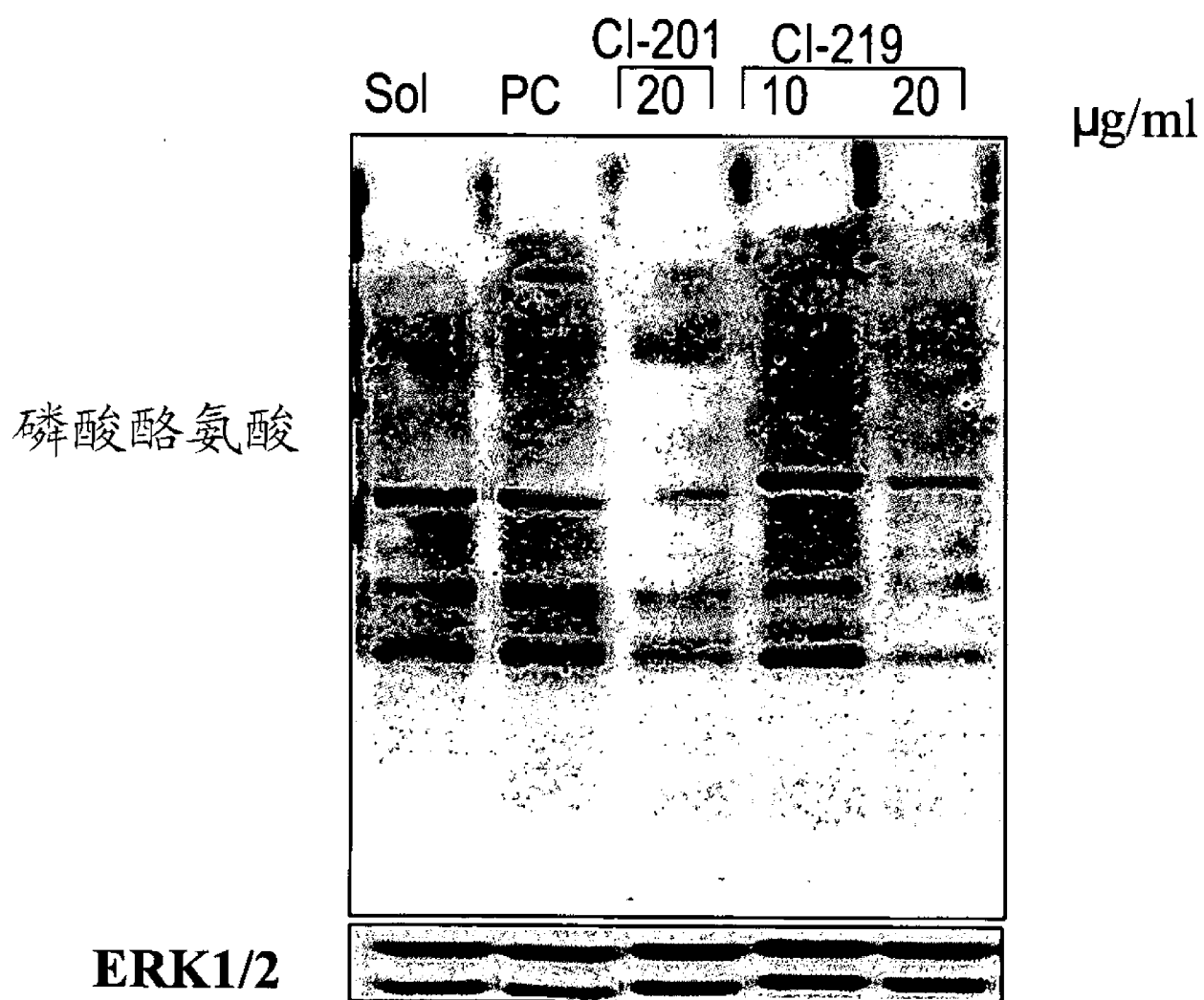


图 28

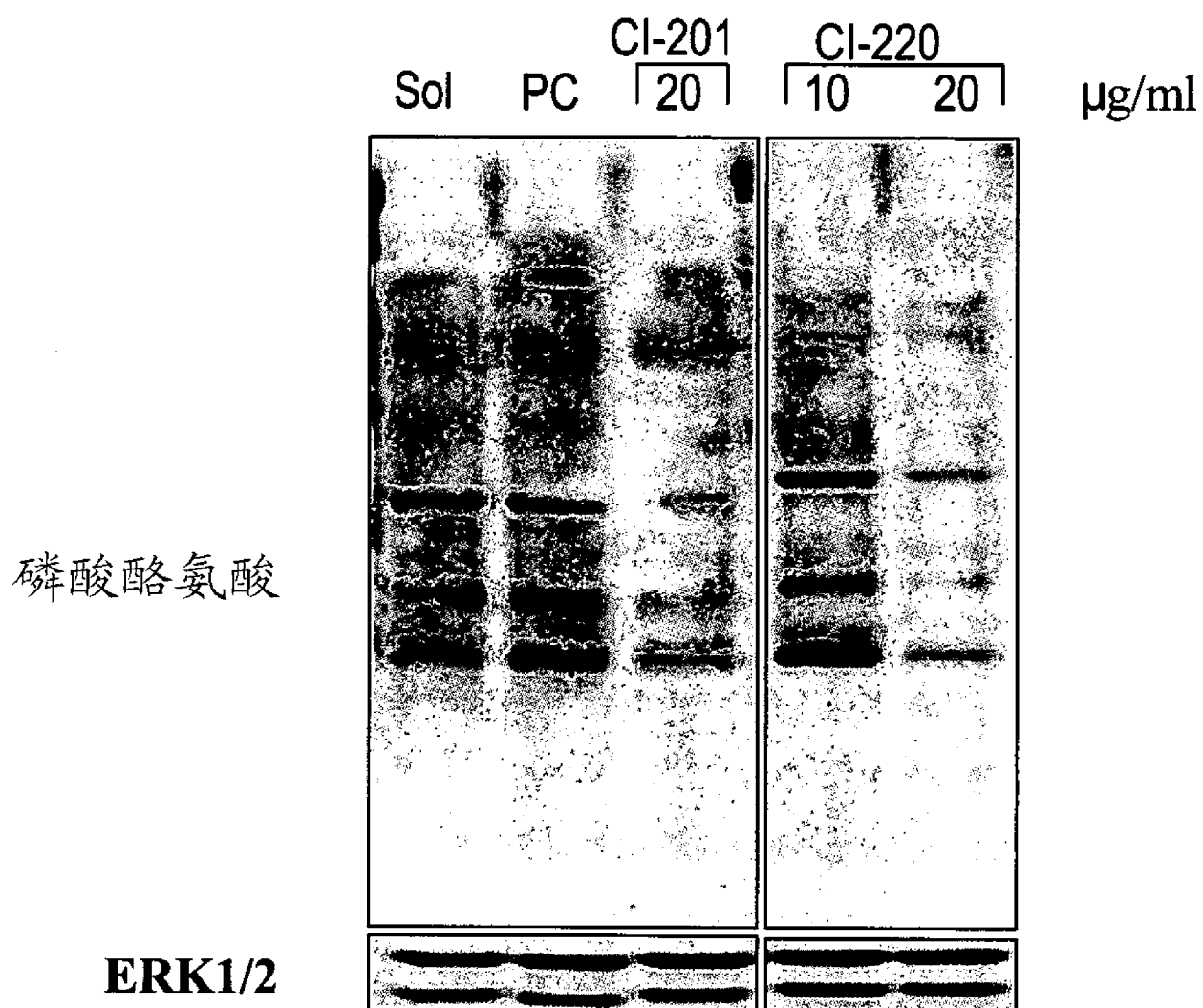


图 29

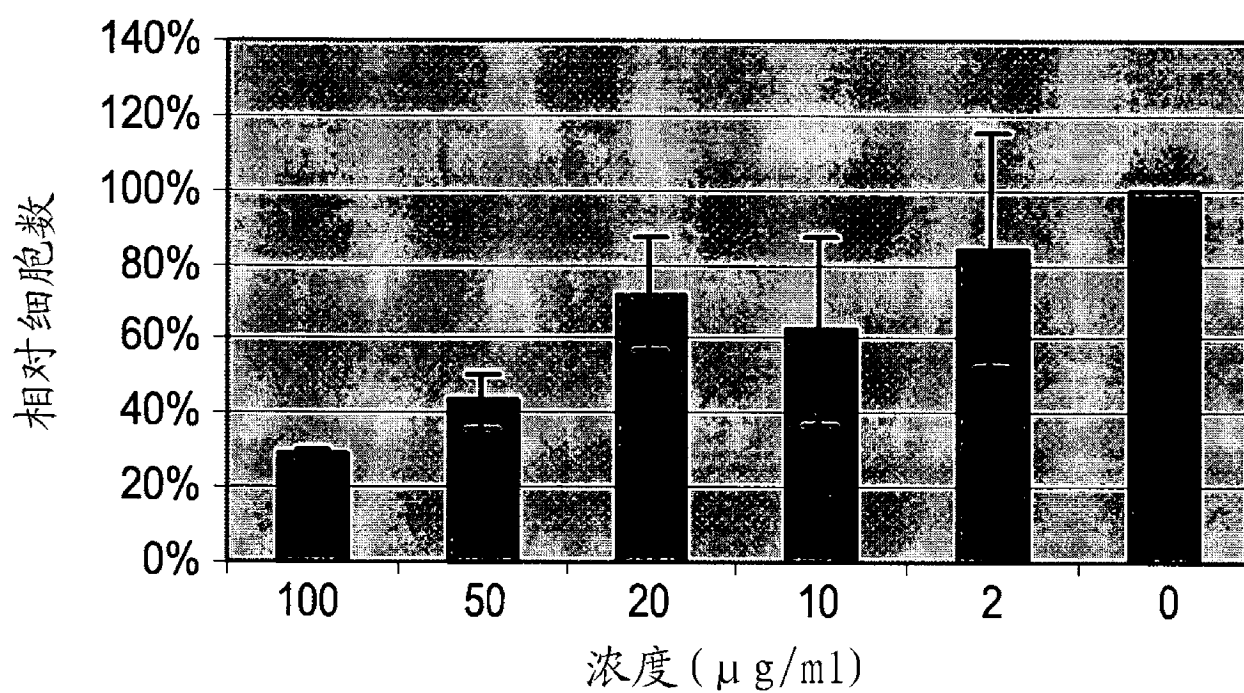


图 30A

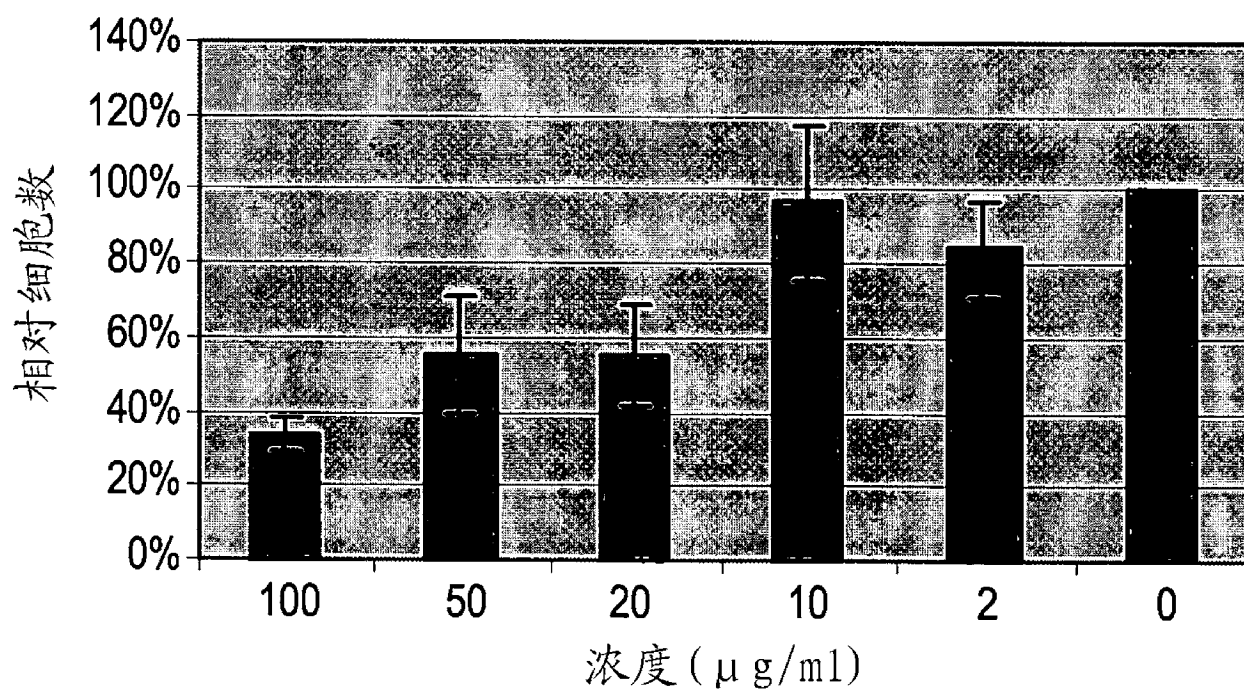


图 30B

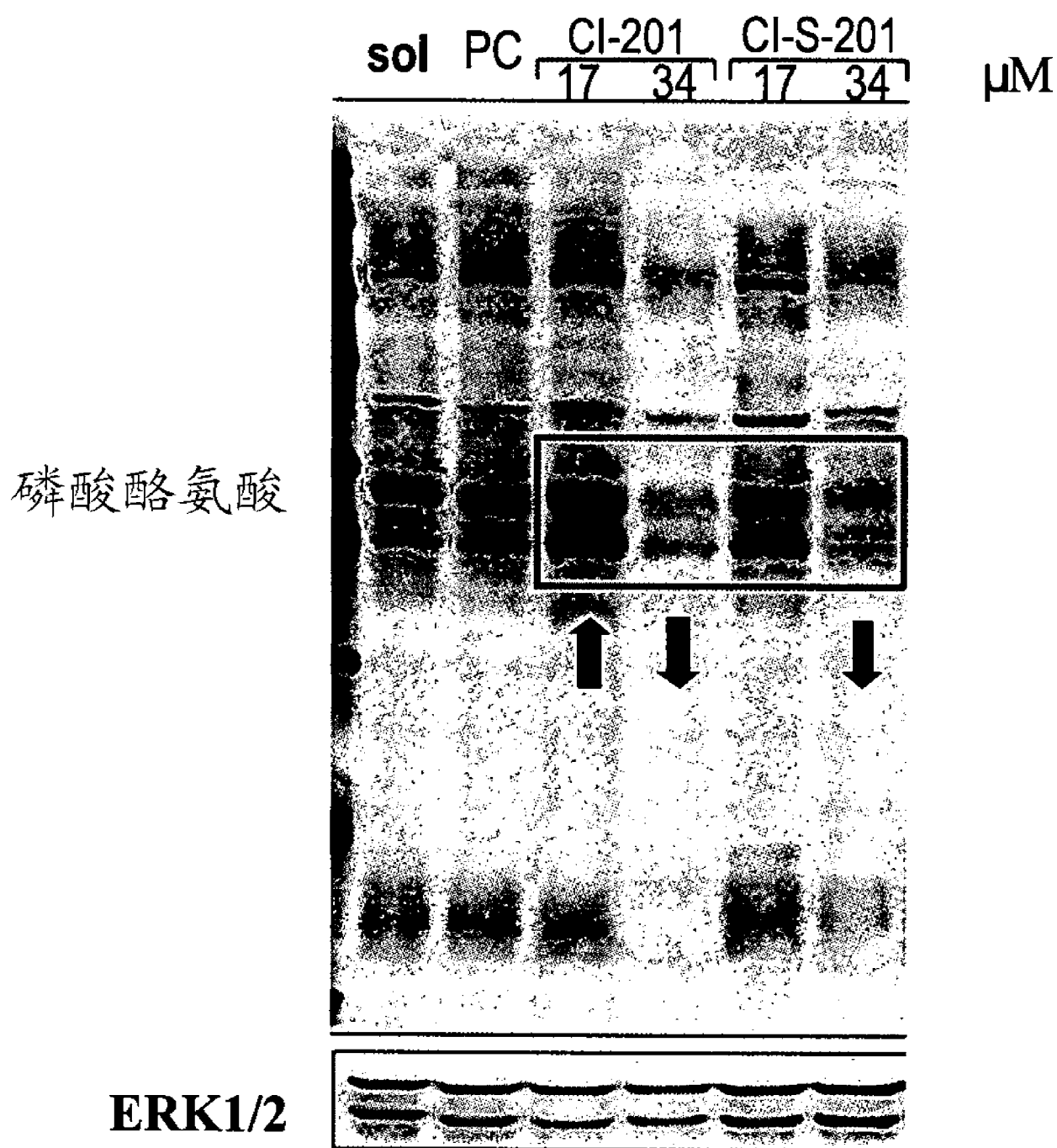


图 31

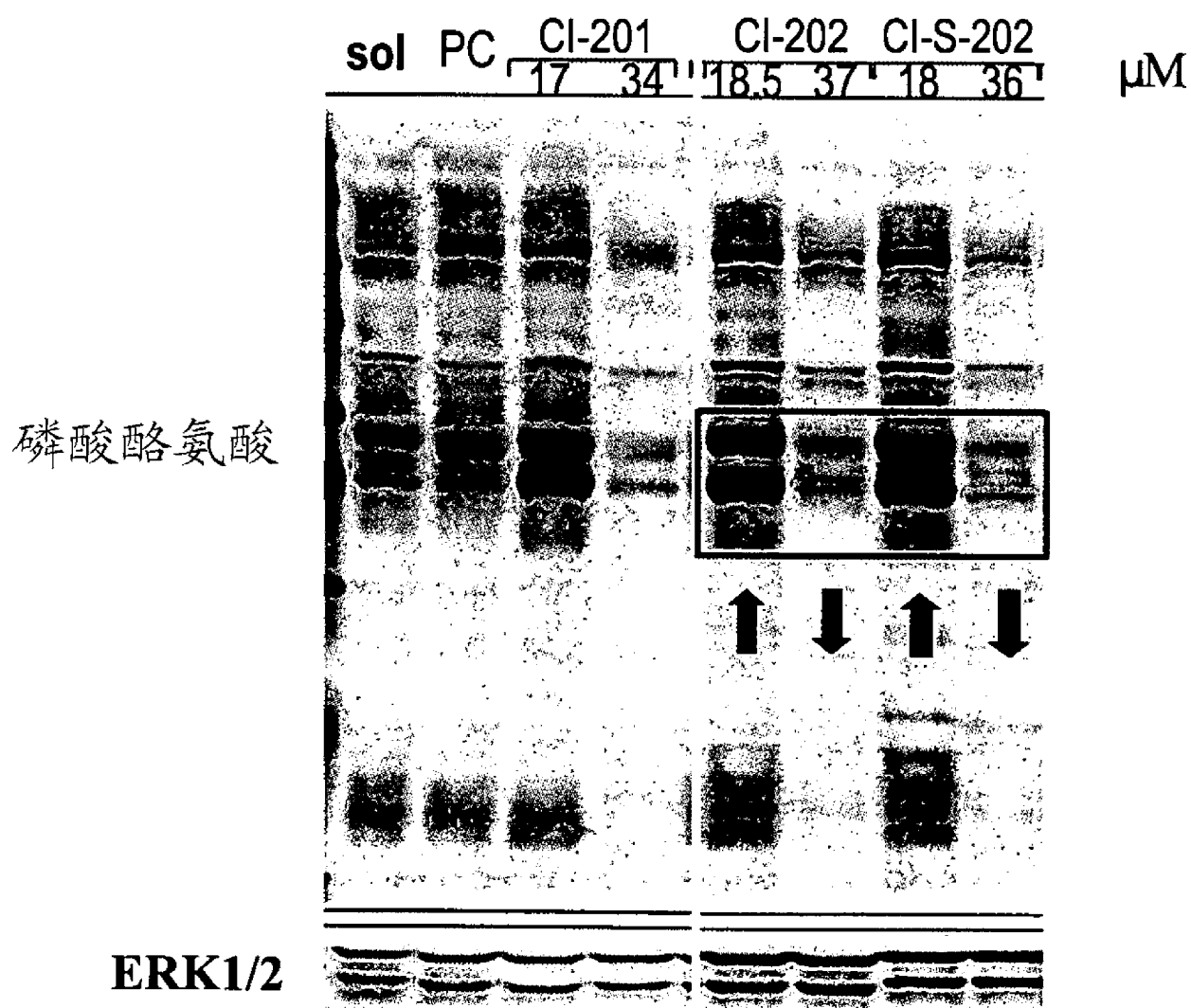


图 32

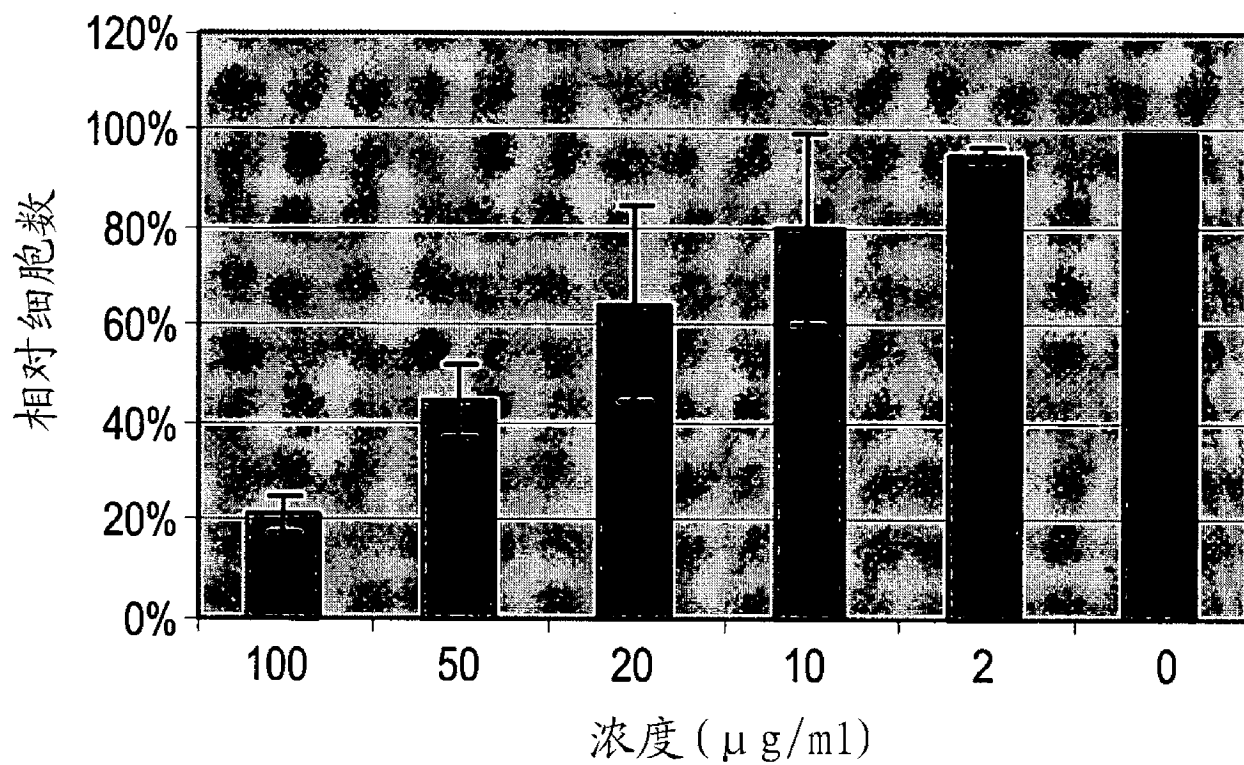


图 33A

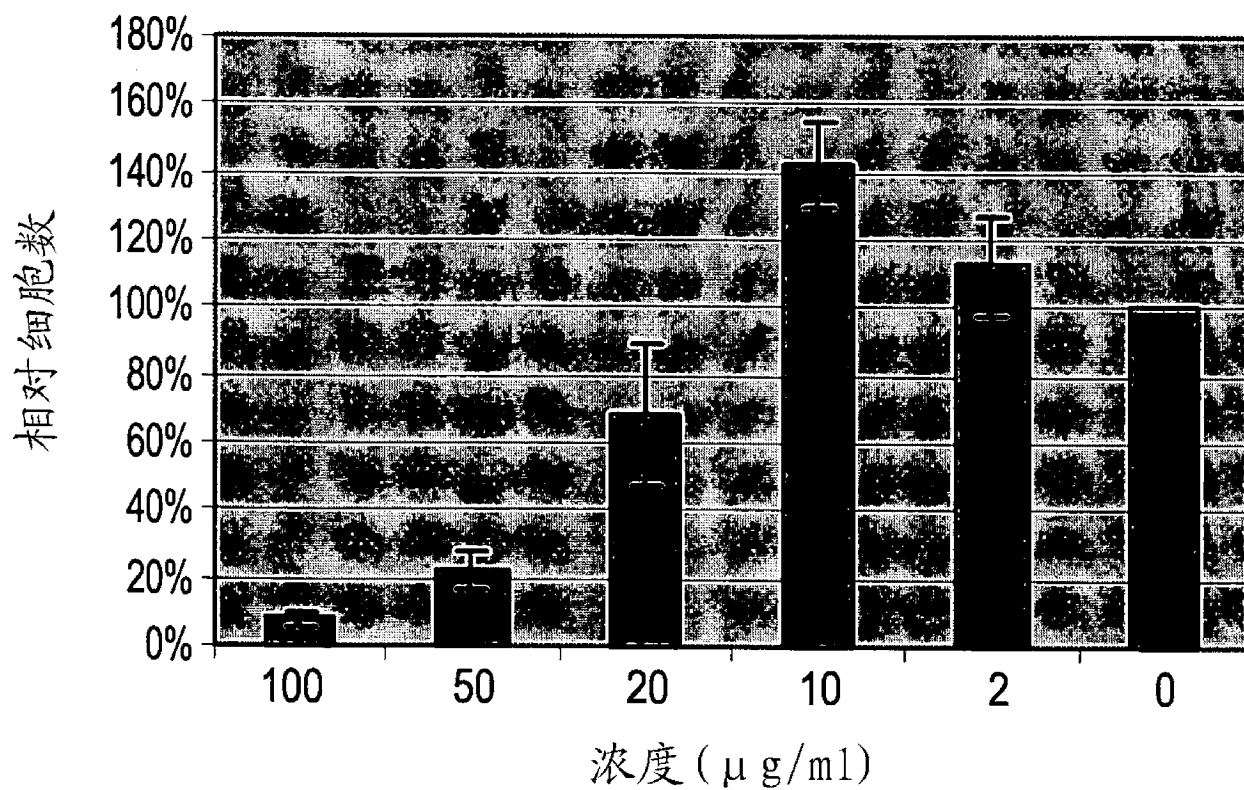


图 33B

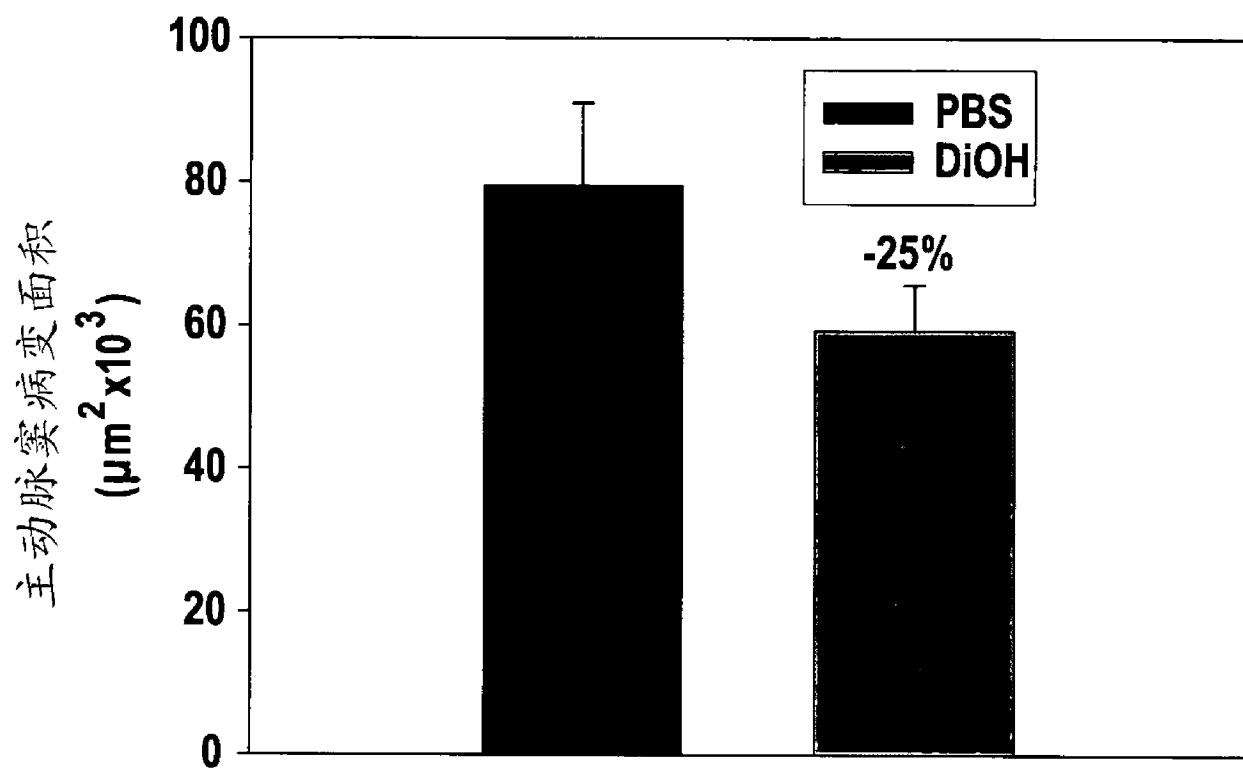


图 34

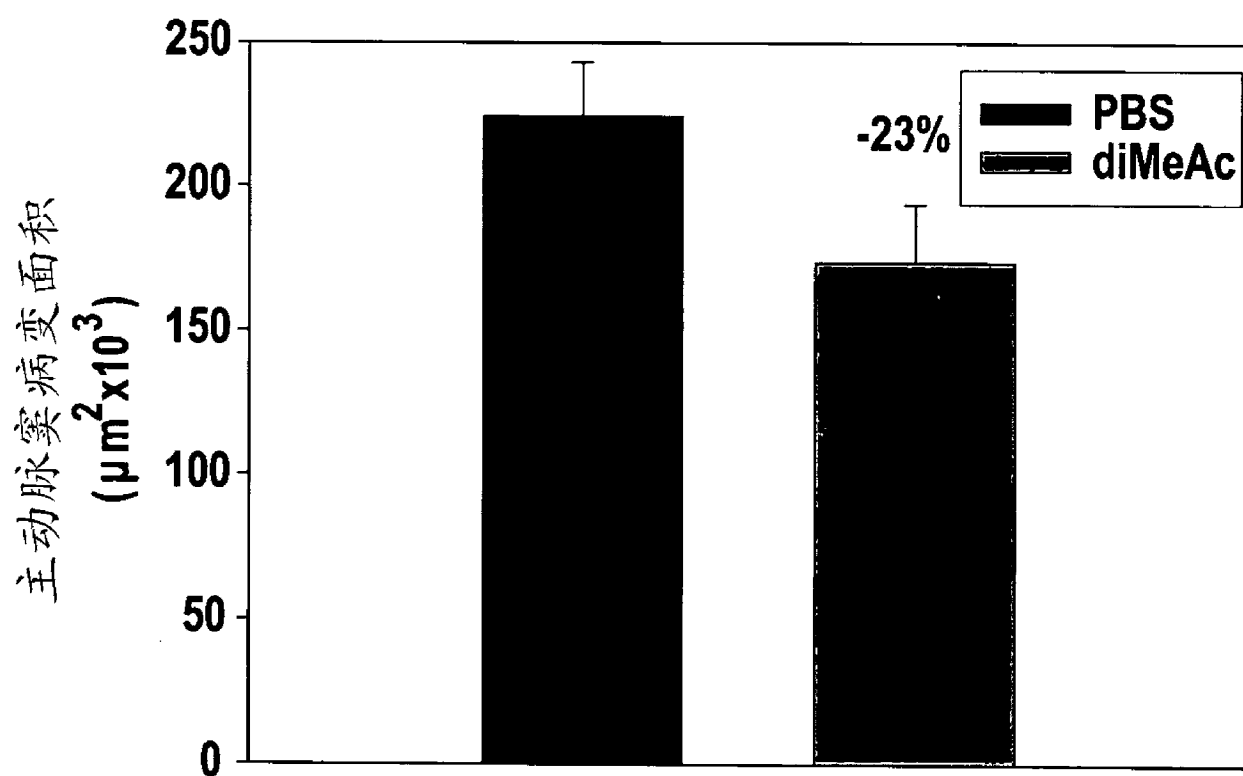


图 35

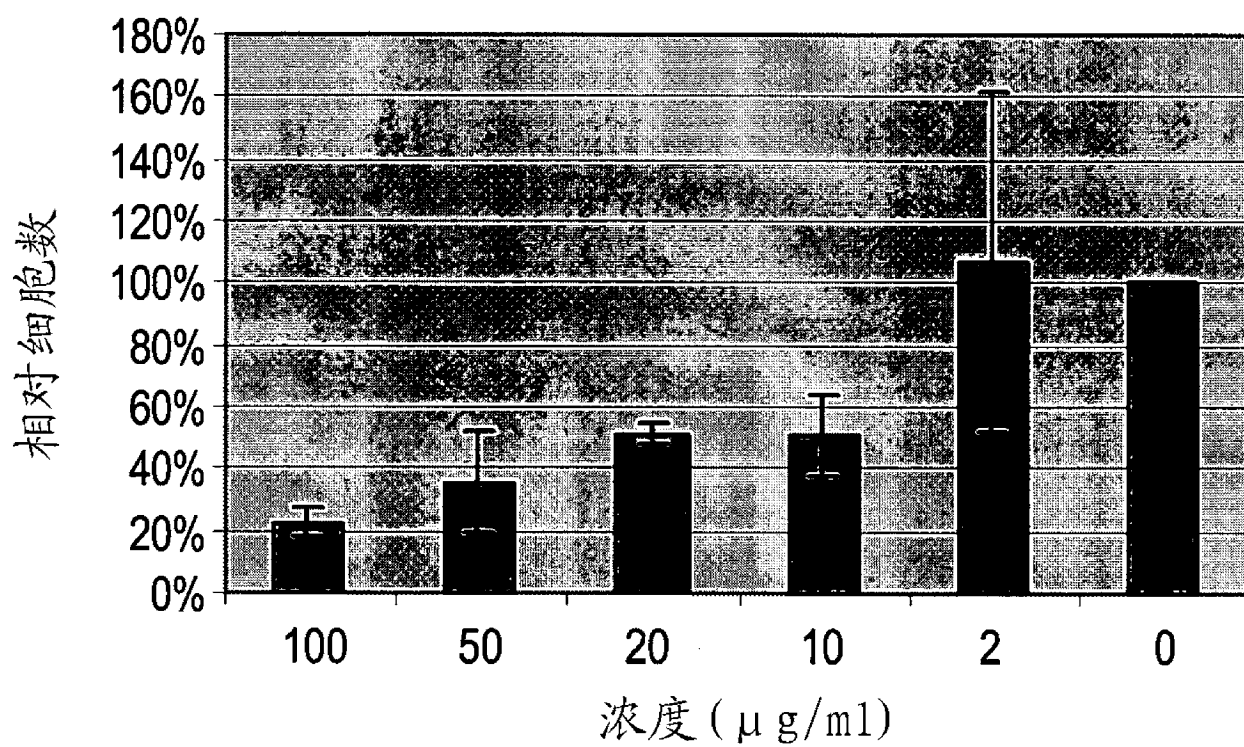


图 36A

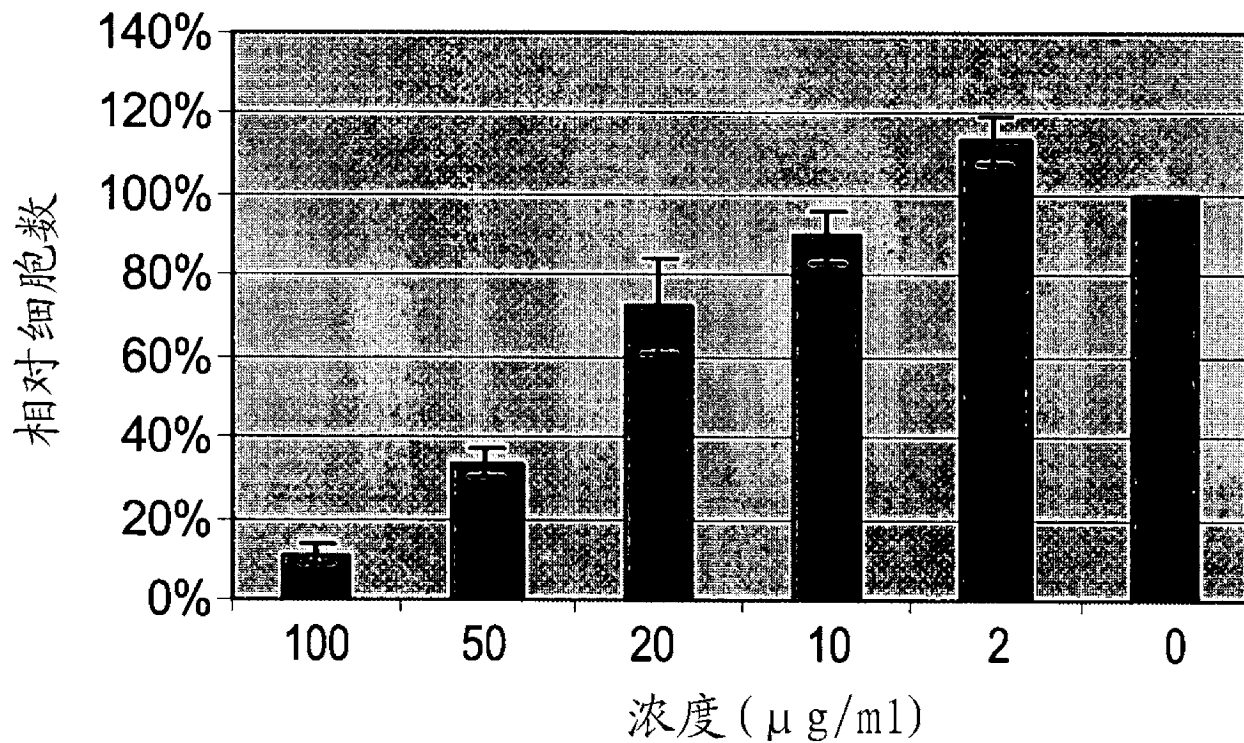


图 36B

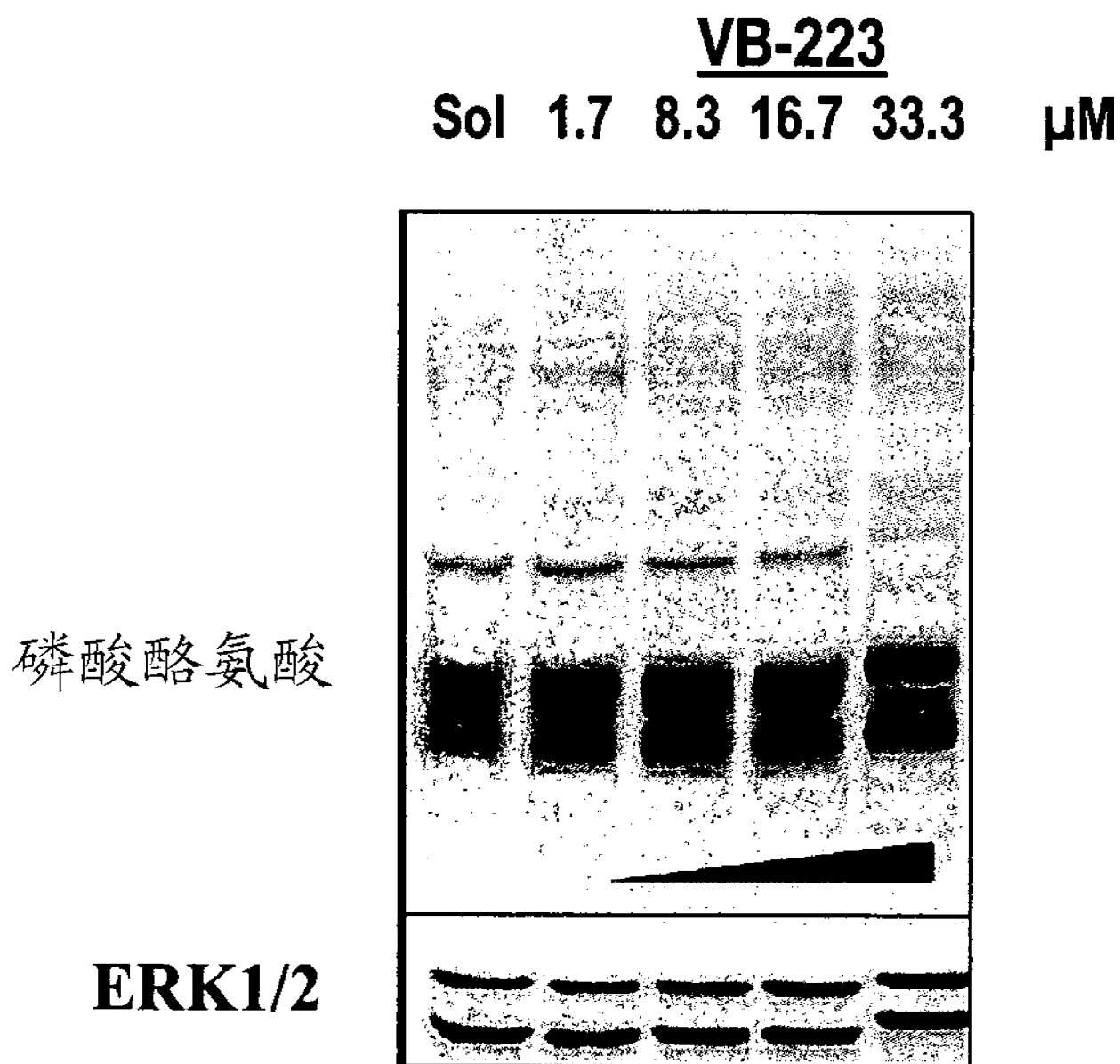


图 37

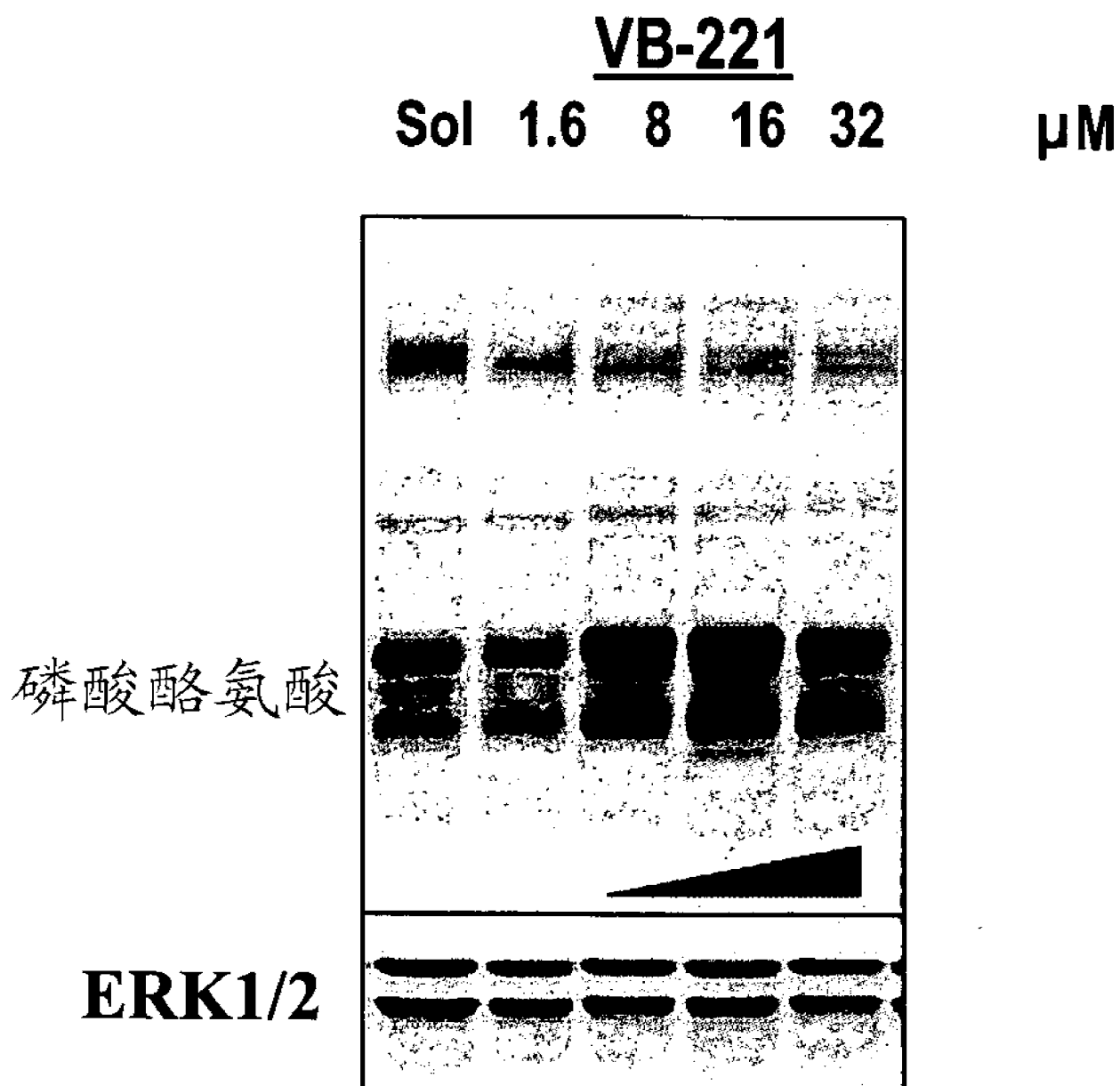


图 38

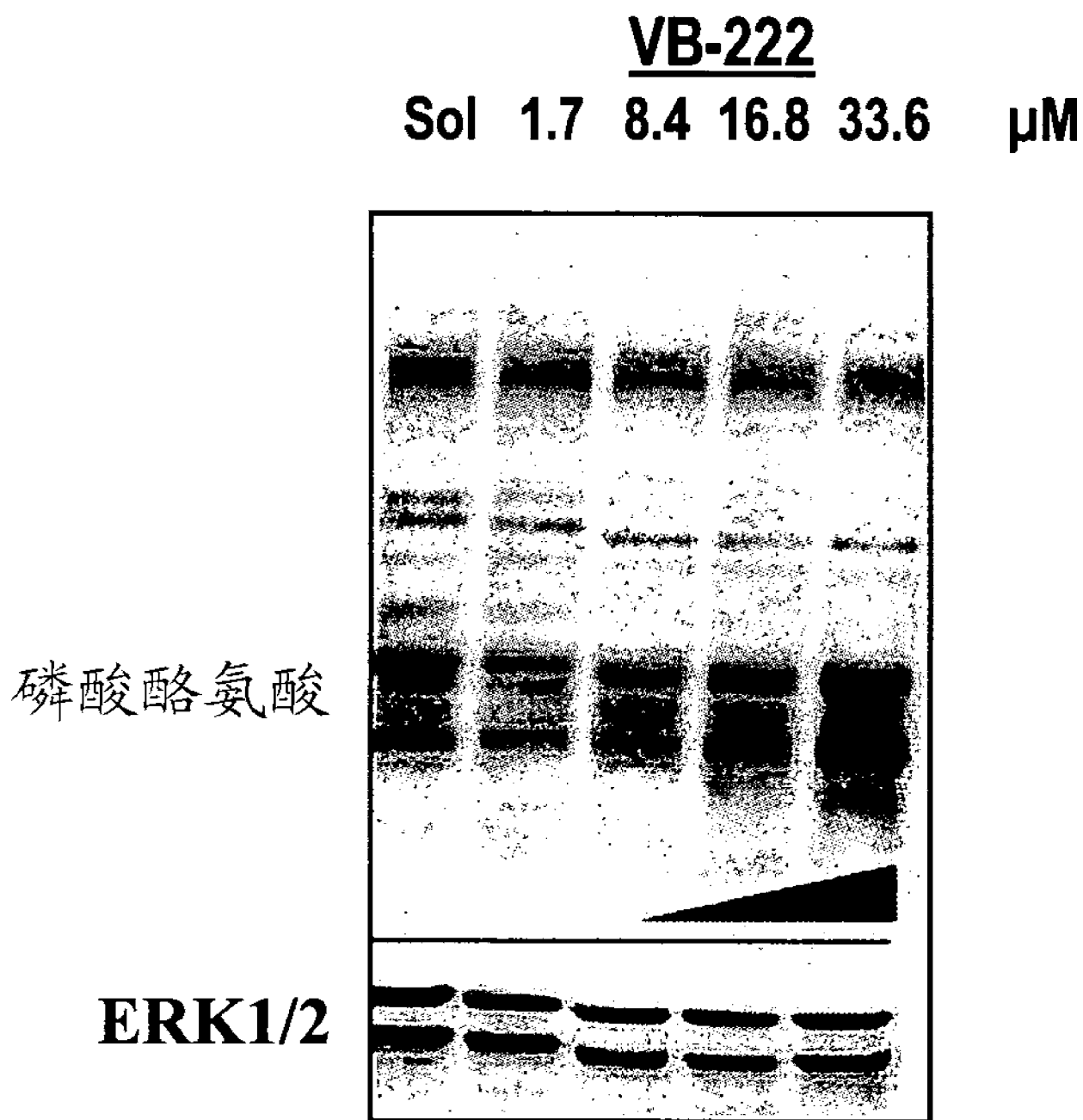


图 39