(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118922429 A
(43)申请公布日 2024.11.08

(21)申请号 202280089714.7
(22)申请日 2022.11.29
(30)优先权数据
21306658.2 2021.11.29 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.07.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2022/083709 2022.11.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/094699 FR 2023.06.01
(71)申请人 皮卡第儒勒-凡尔纳大学
地址 法国亚眠
申请人 巴黎第十二大学
国家科学研究中心
(72)发明人 A·瓦多奇 D·帕皮加西亚
G·波西奥 S·尚特皮
(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟
(51)Int.Cl.
C07H 15/12(2006.01)
A61P 25/28(2006.01)

权利要求书4页 说明书43页 附图8页

(54)发明名称

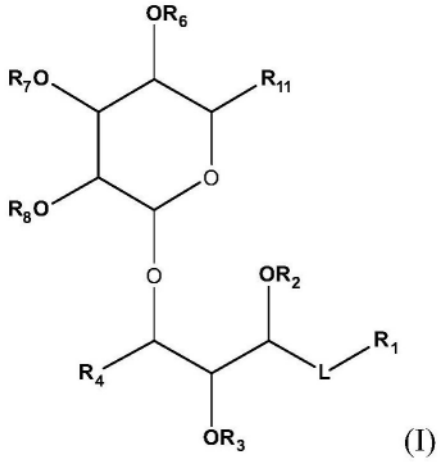
异常磷酸化和TAU蛋白聚集的抑制剂

(57)摘要

本公开涉及脂质阴离子寡糖及其在医学中的用途,尤其是在治疗与Tau蛋白异常过度磷酸化相关的病状(如阿尔兹海默病)中的用途。

CN 118922429 A

1.用于医学用途的下式(I)的化合物：



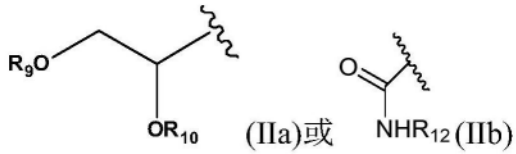
(I)

其中：

L是-C(=O)NH-、-C(=O)O-或-C(=O)S-基团；

R_1是直链或支链、饱和或不饱和的烃链，其包含15、16、17或18个碳原子，任选地在末端位置被选自-OH、-OR、-NH_2、-NHR、-NRR'、-COOH、-COOR、-CONHR、-CONRR'和-SR的基团取代，其中R和R'独立地表示包含一至六个碳原子的烷基；

R_4是式(IIa)或(IIb)的基团：



(IIb)

其中：

R_9和R_{10}彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团；

R_{12}是包含一至六个碳原子的烷基；

R_{11}是-CH_2-OR_5或-$CONHR_{13}$基团，其中：

R_5是氢原子或电离形式的磺酸基团；

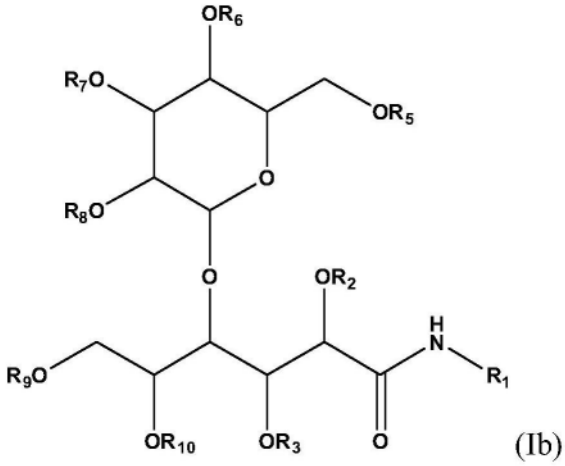
R_{13}是包含一至六个碳原子的烷基；

R_2、R_3、R_6、R_7和R_8彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团；和

其中R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少一个，优选R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少两个是电离形式的磺酸基团。

2.根据权利要求1所述的用于用途的化合物，其中R_{11}是CH_2-OR_5基团，R_5如权利要求1所定义。

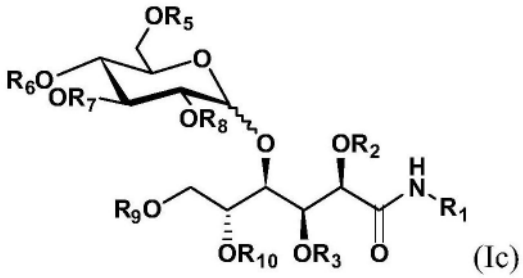
3.根据权利要求1或2所述的用于用途的化合物，其具有下式(Ib)：



(Ib)

其中R_1至R_3和R_5至R_{10}如权利要求1或2所述。

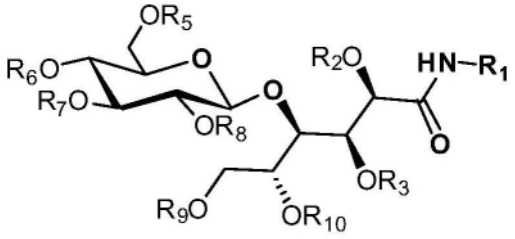
4.根据前述权利要求之一所述的用于用途的化合物,其具有下式(Ic):



(Ic)

其中R_1至R_3和R_5至R_{10}如权利要求1所述。

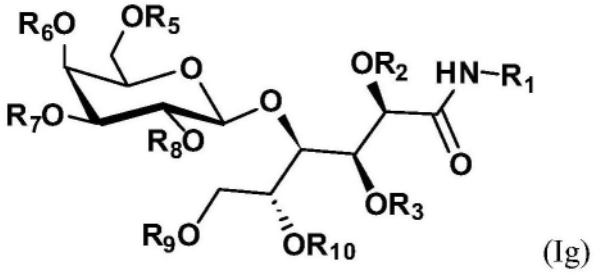
5.根据权利要求1所述的用于用途的化合物,其具有以下结构(Ie):



(Ie)

其中R_1至R_3和R_5至R_{10}如权利要求1所述。

6.根据权利要求1所述的用于用途的化合物,其具有以下结构(Ig):



(Ig)

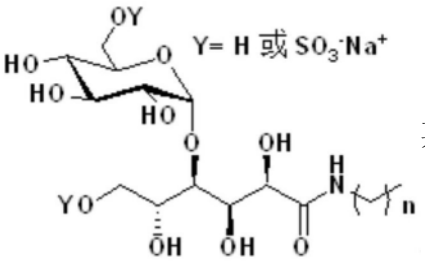
其中R_1至R_3和R_5至R_{10}如权利要求1所述。

7.根据前述权利要求之一所述的用于用途的化合物,其中R_1是饱和直链烃链,其包含15、16、17或18个碳原子,优选16和18个碳原子。

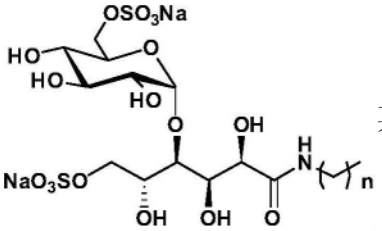
8.根据前述权利要求之一所述的用于用途的化合物,其中R_2、R_3、R_6、R_7、R_8和R_{10}是氢原

子,并且R_5和R_9是电离形式的磺酸基团。

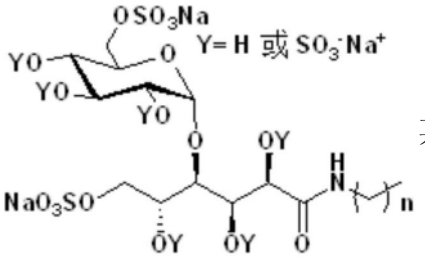
9.根据前述权利要求之一所述的用于用途的化合物,所述化合物选自以下化合物:



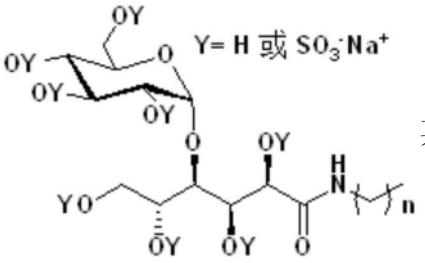
其中n=15或17;



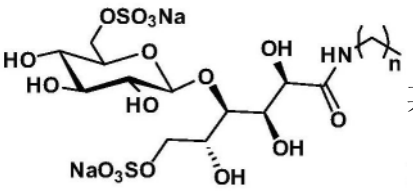
其中n=15或17;



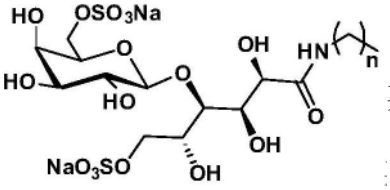
其中n=15或17;



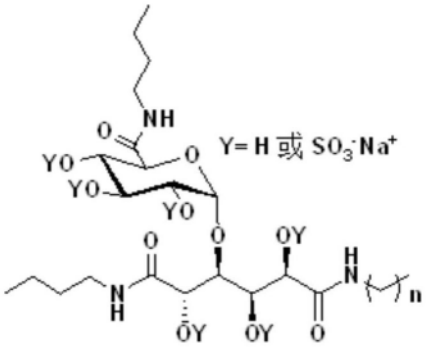
其中n=15;



其中n=15或17;



其中n=15或17;



其中n＝15。

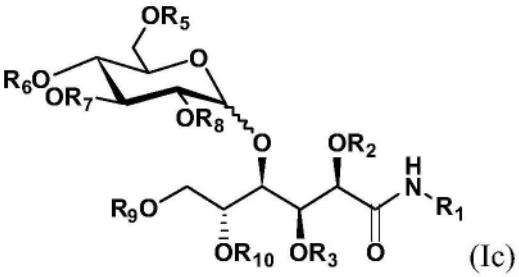
10.用于治疗Tau蛋白病的如权利要求1至9之一所述的化合物。

11.用于治疗阿尔茨海默病的如权利要求1至9之一所述的化合物。

12.一种药物组合物,其包含如权利要求1至9之一所述的式(I)的化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。

13.用于治疗Tau蛋白病的根据权利要求12所述的药物组合物。

14.一种化合物,其具有以下结构(Ic):



(Ic)

R_1是直链或支链、饱和或不饱和的烃链,其包含15、16、17或18个碳原子,任选地在末端位置被选自-OH、-OR、-NH_2、-NHR、-NRR'、-COOH、-COOR、-CONHR、-CONRR'和-SR的基团取代,其中R和R'独立地表示包含一至六个碳原子的烷基;

R_5是氢原子或电离形式的磺酸基团;

R_9和R_{10}彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团;

R_2、R_3、R_6、R_7和R_8彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团;和

其中R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少一个,优选R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少两个是电离形式的磺酸基团。

异常磷酸化和TAU蛋白聚集的抑制剂

技术领域

[0001] 本发明涉及阴离子脂质寡糖及其在医学中的用途,特别是在治疗与Tau蛋白异常过度磷酸化相关的病状(如阿尔茨海默病)中的用途。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(AD)是世界上最常见的与年龄相关的痴呆。根据世界卫生组织(WHO)的数据,它是60-70%的痴呆病例的原因。全世界有超过5000万人受到AD的影响,每年记录1000万新病例。根据WHO预测,患有痴呆的人总数预计将在2030年达到8200万,到2050年将达到1.52亿。

[0003] 这种疾病不仅影响患者及其家人的健康和士气,而且还对社会造成重大经济负担。

[0004] AD的特征是与严重神经元变性相关的认知能力逐渐丧失。在组织病理学上,AD的特征是两种类型的脑病变:一方面是老年斑块(或淀粉样蛋白),其是β-淀粉样肽(Aβ)的细胞外聚集体,另一方面是神经原纤维缠结(NFT),其对应于异常磷酸化Tau蛋白(MAPT,微管相关蛋白Tau)(P-Tau)的细胞内积累。

[0005] 尽管在过去的20年里,学术和工业研究做出了重大努力,但没有一种开发的治疗能够有效且可持续地阻止神经退行性疾病的进展。

[0006] 由于淀粉样斑块和由P-Tau构成的NFT参与神经元的功能改变已被广泛接受,因此开发的大多数治疗都尤其靶向β-淀粉样蛋白的逐渐积累,并且最近靶向Tau蛋白的逐渐积累。然而,靶向淀粉样蛋白J3(AJ3)级联反应不同时期的策略的治疗失败表明,AJ3积累不是该疾病的中心病理过程,而中心病理过程可能是Tau的异常磷酸化和聚集,应当靶向所述Tau的异常磷酸化和聚集以对抗该疾病。

[0007] Tau蛋白是微管相关蛋白(MAP蛋白)家族的成员。在人中,Tau蛋白的主要作用之一是通过与微管蛋白的相互作用来稳定神经元的细胞骨架,从而允许轴突稳定性。在AD中,Tau的异常磷酸化诱导蛋白质从细胞骨架上分离,并且可溶性Tau蛋白聚集以最终形成AD的NFT特征。已经显示在该疾病的临床演变与脑中以神经原纤维缠结(NFT)形式存在的异常磷酸化且聚集的Tau蛋白的积累之间存在直接相关性。

[0008] 数种激酶能够磷酸化Tau(cdK5、NCLK、GSK-3β和MARK),但这以非特异性方式发生,因为数种其他蛋白也是它们的底物。因此,抑制其中一种激酶将不会阻止其他激酶的作用。与此一致,尽管已经对激酶抑制剂以及被视为治疗靶点的磷酸酶(也是非特异性的)进行了大量工作,但迄今为止无论是通过激酶抑制剂、磷酸酶激活剂、还是NFT解离剂,还没有获得通过单独抑制这些酶的活性来阻止或减缓该疾病的积极结果。

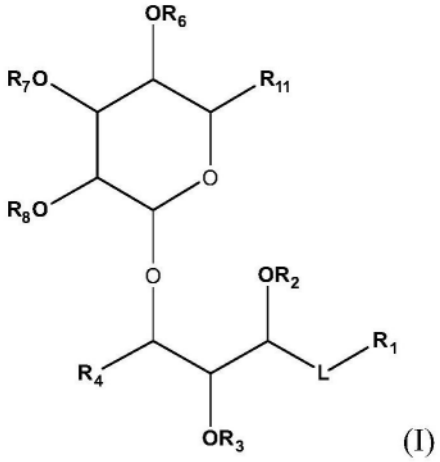
[0009] 迄今为止,正在开发的靶向Tau蛋白的治疗主要基于细胞外水平的免疫疗法。使用的抗体针对Tau片段,旨在减少或多或少聚集的Tau蛋白的细胞外形式。然而,这些细胞外形式是通过Tau蛋白的磷酸化在细胞内产生的;在细胞外分泌后,这些聚集形式的Tau似乎有助于在脑组织中传播该病状。目前,靶向Tau蛋白的免疫疗法仍然是该领域的主要希望,尽

管免疫疗法存在所有固有的困难,尤其是涉及细胞内抗体阻止Tau蛋白的异常磷酸化和聚集的过程的不可及性,这些产物的稳定性,抗抗体(anti-antibody)的产生,以及在医院环境中治疗的需要(Schroeder SK等人,Neuroimmune Pharmacol.2016,11(1):9-25.)。因此,普遍认为最好的策略将是将涉及小而稳定的分子的策略,所述小分子能够阻断Tau的过度磷酸化和聚集,并且可以在非医院环境中通过常规方案施用于患者。

[0010] 因此,仍然需要提供能够阻止或减缓与Tau蛋白过度磷酸化相关的病状(特别是阿尔茨海默病)的进展的化合物。

发明内容

[0011] 本发明涉及用于医学(特别是用于治疗Tau蛋白病)的下式(I)的化合物:

[0012] 

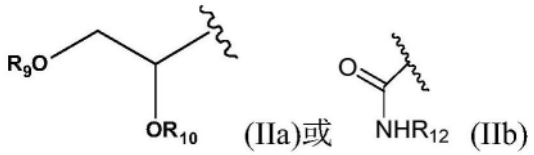
(I)

[0013] 其中:

[0014] L是-C(=O)NH-、-C(=O)O-或-C(=O)S-基团;

[0015] R_1是直链或支链、饱和或不饱和的烃链,其包含15、16、17或18个碳原子,任选地在末端位置被选自-OH、-OR、-NH_2、-NHR、-NRR'、-COOH、-COOR、-CONHR、-CONRR'和-SR的基团取代,其中R和R'独立地表示包含一至六个碳原子的烷基;

[0016] R_4是式(IIa)或(IIb)的基团:

[0017] 

(IIa)或 (IIb)

[0018] 其中:

[0019] R_9和R_{10}彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团;

[0020] R_{12}是包含一至六个碳原子的烷基;

[0021] R_{11}是-CH_2-OR_5或-$CONHR_{13}$基团,其中:

[0022] R_5是氢原子或电离形式的磺酸基团;

[0023] R_{13}是包含一至六个碳原子的烷基;

[0024] R_2、R_3、R_6、R_7和R_8彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团;和

[0025] 其中R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少一个,优选R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少两个是电离形式的磺酸基团。

[0026] 本发明还涉及药物组合物,其包含如本文所述的至少一种式(I)的化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂,以及所述药物组合物在治疗Tau蛋白病中的用途。

[0027] 本发明的其他方面如下文和权利要求书中所述。

附图说明

[0028] 图1:硫酸乙酰肝素(HS)的作用图示。

[0029] 图2:蛋白质印迹显示,在阿尔茨海默病特征性位点由GSK3β介导的Tau磷酸化取决于反应混合物中肝素的存在(Sepulveda-Diaz JE等人,Brain.2015年5月;138(Pt 5):1339-54)。

[0030] 图3:蛋白质印迹显示,体外反应3h后,二硫酸化C16麦芽二糖酰胺(maltobionamide)(Mal16diS)的存在抑制了由阿尔茨海默病特征性抗体(AT270和Ser199/202)揭示的Tau异常磷酸化(P-Tau)。

[0031] 图4:蛋白质印迹显示,反应3h后,二硫酸化C18麦芽二糖酰胺(Mal18diS)的存在抑制了由阿尔茨海默病特征性抗体(AT270、pSer199/202)揭示的Tau异常磷酸化(P-Tau)。

[0032] 图5:蛋白质印迹比较了反应3h后,衍生自二硫酸化麦芽二糖酰胺的化合物的P-Tau诱导能力(由AT270抗体揭示)随着烃链(R_1)(Mal14diS至Mal20diS对应于14至20个碳的链)的长度和肝素("Hep")的变化。

[0033] 图6:反应3h后,根据不同衍生物的二糖(单硫酸化或二硫酸化)和烃链的长度(14至20个碳),蛋白质印迹评估了不同衍生物的Tau异常磷酸化(P-Tau),由阿尔茨海默病特征性抗体(AT270和Ser199/202)揭示。

[0034] 图7:蛋白质印迹比较了与具有16个碳的氧化形式(Mal16diOx)和18个碳的氧化形式(Mal18diOx)相比,二硫酸化麦芽二糖酰胺(Mal16diS、Mal18diS)保护Tau蛋白免于肝素诱导的异常磷酸化的能力,由AT270抗体揭示。

[0035] 图8:蛋白质印迹比较了二糖的硫酸化(monoS和triS)对16或18碳麦芽二糖酰胺的效果,以有效保护Tau免于肝素诱导的异常磷酸化,由AT270抗体揭示,使用了2批化合物(对于Mal16,使用了Mal16monoS、Mal16triS,对于Mal18,使用了Mal18monoS和Mal18triS)。

[0036] 图9:蛋白质印迹将过硫酸化16-碳麦芽二糖酰胺分子(Mal16perS)与其有效的二硫酸化同源物(Mal16diS、Mal18diS)有效保护Tau免于异常的肝素诱导磷酸化的能力进行比较,由AT270抗体揭示。

[0037] 图10:通过整合硫黄素-T(一种整合至聚集体中的荧光化合物)来监测Tau蛋白的聚集,在肝素(Tau:Hep质量比为2:1或4:1)或16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺化合物(Mal16diS)(Tau:寡聚物质量比4:1)存在下进行。n表示重复数。

[0038] 图11:浓度为0.1、1、10或100μg/mL的16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺(Mal16diS)的细胞毒性。

[0039] 图12:浓度为0.1、1、1、10或100μg/mL的18碳二硫酸化麦芽二糖酰胺(Mal18diS)的细胞毒性。

[0040] 图13:浓度为1、10或100μg/mL的16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺化合物(Mal16diS)在细胞中(in cellulo)保护免于Tau磷酸化。t检验:*$p<0.05$,***$p<0.001$;重复数≥5。

[0041] 图14:浓度为1、10或100μg/ml的18碳二硫酸化麦芽二糖酰胺化合物(Mal18diS)在

细胞中保护免于Tau磷酸化。t检验:*p<0.05,***p<0.001;重复数≥5。

[0042] 图15:在诱导Tau蛋白病的SHSY5Y模型中,Cell16diS对细胞中P-Tau的效果。t检验不显著;重复数≥3。

[0043] 图16:在诱导Tau蛋白病的SHSY5Y模型中,Lac16diS对细胞中P-Tau的效果。t检验:*p<0.05;重复数≥3。

[0044] 图17:在rTg4510小鼠模型的皮质细胞中,通过浓度为0.1或1μg/mL的16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺化合物(Mal16diS),显示出中度的Tau磷酸化降低(培养第14天)。t检验:**p<0.01,***p<0.001;重复数=4。

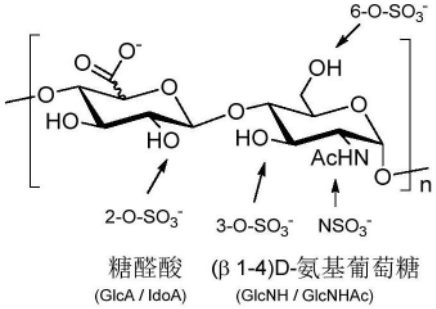
[0045] 图18:在rTg4510小鼠模型的皮质细胞中,通过浓度为0.1或1μg/mL的16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺化合物(Mal16diS),显示出重度的Tau磷酸化降低(培养第18天)。t检验:不显著;重复数=4。

具体实施方式

[0046] 已经发现,如下所述的阴离子脂质寡糖(式(I)的化合物)能够保护Tau蛋白免于异常过度磷酸化,本身不会诱导Tau的异常过度磷酸化,并且能够减少肝素诱导的Tau蛋白聚集,其是阿尔茨海默病中存在的过度硫酸化的硫酸乙酰肝素的原型(Sepulveda-Diaz Je等人,Brain.2015年5月;138(Pt 5):1339-54)。

[0047] 因此,本发明的阴离子脂质寡糖被证明可用于治疗与异常Tau蛋白过度磷酸化相关的病状,并且特别是可用于治疗阿尔茨海默病。可以证明这些化合物能够阻止或减缓该疾病的进展。

[0048] 这些阴离子脂质寡糖模拟硫酸乙酰肝素的某些特征。Gly-CRRET的生物学家团队(Holmes BB等人,Proc Natl Acad Sci USA.2013年8月13日;110(33);Sepulveda-Diaz JE等人,Brain.2015年5月;138(Pt 5):1339-54;Maïza A等人,FEBS Lett.2018年12月;592(23):3806-3818)和世界各地的其他团队(Goedert M等人,Nature.1996年10月10日;383(6600):550-3;Zhao J等人,Biophys J.2017年3月14日;112(5):921-932)表明硫酸乙酰肝素对该疾病的发生和进展至关重要:

[0049] 

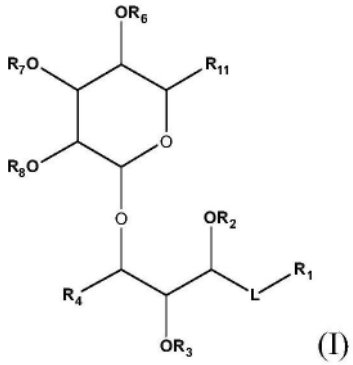
[0050] 硫酸乙酰肝素是糖醛酸(D-葡萄糖醛酸或L-艾杜糖醛酸)和D-氨基葡萄糖的共聚物,其可以被N-乙酰化并含有硫酸化位点。

[0051] Gly-CRRET实验室尤其表明,Tau的构象变化允许其异常过度磷酸化及其在神经元中的聚集,这是由于该蛋白与内化于患有该疾病的受试者的神经元中的硫酸乙酰肝素(HS)链相互作用的结果。通过发挥分子伴侣的作用,HS允许Tau蛋白获得有利于激酶攻击的构象,从而导致蛋白质的异常过度磷酸化和聚集(图1)。

[0052] 此外,Gly-CRRET和其他团队进行的研究表明,HS是细胞表面Tau聚集体(蛋白致病种子(proteopathic seed))的受体,它们在中心参与Tau原纤维从患病细胞向健康细胞的转移,这一过程称为扩散(Holmes BB等人,Proc Natl Acad Sci US A.2013年8月13日;110(33))。Tau扩散目前被认为是导致疾病在细胞之间和脑的不同区域之间传播的原因。体内Tau包涵体中HS的存在,以及它们触发异常Tau磷酸化、聚集和扩散的能力,表明这些多糖在神经退行性过程的建立和进展中发挥核心作用。

[0053] 脂质阴离子寡糖

[0054] 本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物是下式(I)的化合物:

[0055] 

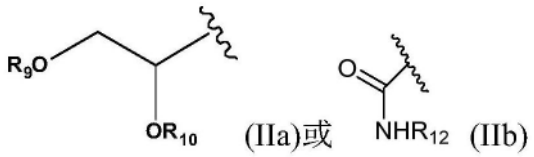
(I)

[0056] 其中:

[0057] L是-C(=O)NH-、-C(=O)O-或-C(=O)S-基团;

[0058] R_1是直链或支链、饱和或不饱和的烃链,其包含15、16、17或18个碳原子,任选地在末端位置被选自-OH、-OR、-NH_2、-NHR、-NRR'、-COOH、-COOR、-CONHR、-CONRR'和-SR的基团取代,其中R和R'独立地表示包含一至六个碳原子的烷基;

[0059] R_4是式(IIa)或(IIb)的基团:

[0060] 

[0061] 其中:

[0062] R_9和R_{10}彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团;

[0063] R_{12}是包含一至六个碳原子的烷基;

[0064] R_{11}是-CH_2-OR_5或-$CONHR_{13}$基团,其中:

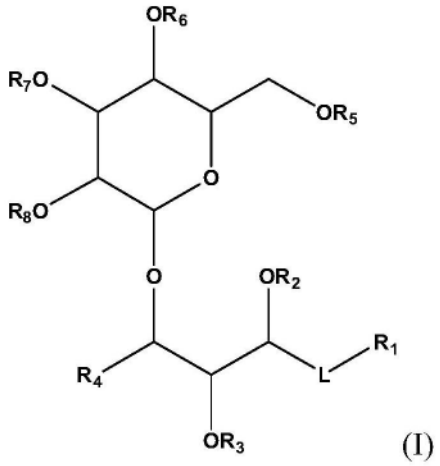
[0065] R_5是氢原子或电离形式的磺酸基团;

[0066] R_{13}是包含一至六个碳原子的烷基;

[0067] R_2、R_3、R_6、R_7和R_8彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团;和

[0068] 其中R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少一个,优选R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少两个是电离形式的磺酸基团。

[0069] 更具体地,本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物是下式(I)的化合物:

[0070] 

(I)

[0071] 其中：

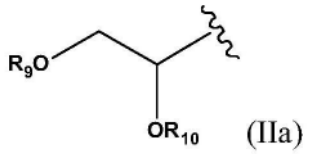
[0072] L是-C(=O)NH-、-C(=O)O-或-C(=O)S-基团；

[0073] R_1是直链或支链、饱和或不饱和的烃链，其包含15、16、17或18个碳原子，任选地在末端位置被选自-OH、-OR、-NH_2、-NHR、-NRR'、-COOH、-COOR、-CONHR、-CONRR'和-SR的基团取代，其中R和R'独立地表示包含一至六个碳原子的烷基；

[0074] R_2是氢原子或电离形式的磺酸基团；

[0075] R_3是氢原子或电离形式的磺酸基团；

[0076] R_4是式(IIa)的基团：

[0077] 

(IIa)

[0078] 其中：

[0079] R_9和R_{10}彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团；

[0080] R_5、R_7和R_8彼此独立地是氢原子或电离形式的磺酸基团；

[0081] R_6是氢原子或电离形式的磺酸基团；和

[0082] 其中R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少一个，优选R_2、R_3、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少两个是电离形式的磺酸基团。

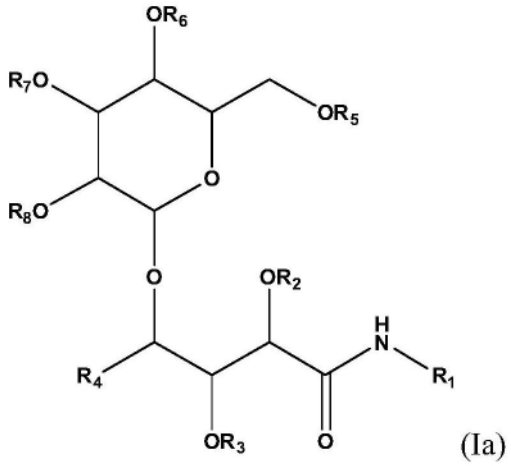
[0083] 表述“电离形式的磺酸基团”表示-SO_3^-基团。

[0084] 式(I)的化合物优选为盐的形式，特别是钠盐的形式。因此，电离形式的磺酸基团优选为磺酸钠基团(-SO_3Na)。

[0085] 在一些实施方案中，式(I)的化合物具有两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个电离形式的磺酸基团。因此，R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的两个、三个、四个、五个、六个、七个或全部是电离形式的磺酸基团。然而，由于高度带电荷的化合物可以引起毒性，因此包含两个或三个电离磺酸基团的化合物可以是优选的。

[0086] 在一些实施方案中，L是-C(=O)NH-基团。

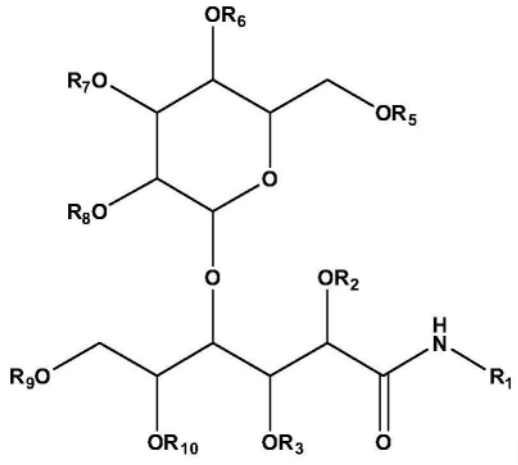
[0087] 在一些实施方案中，本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有下式(Ia)：

[0088] 

(Ia)

[0089] 其中R_1至R_8如上所述,并且其中R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少一个,优选R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少两个是电离形式的磺酸基团。

[0090] 在一些实施方案中,本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有下式(Ib):

[0091] 

(Ib)

[0092] 其中R_1至R_3和R_5至R_{10}如上所述或如下所述,并且其中R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少一个,优选R_2、R_3、R_5、R_6、R_7、R_8、R_9和R_{10}基团中的至少两个是电离形式的磺酸基团。

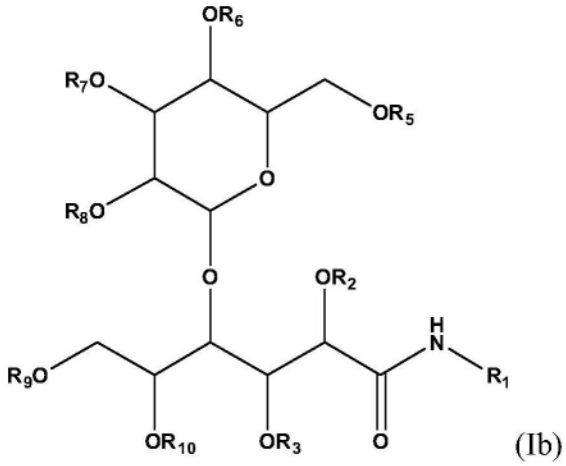
[0093] 在式(I)、(Ia)和(Ib)中,R_1优选为包含15、16、17或18个碳原子,优选16和18个碳原子的饱和直链烃链。

[0094] 在式(I)、(Ia)和(Ib)中,R_2、R_3和R_{10}优选为氢原子。

[0095] 在式(I)、(Ia)和(Ib)中,R_5优选为电离形式的磺酸基团,并且R_6、R_7和R_8是氢原子。

[0096] 在式(I)、(Ia)和(Ib)中,R_9优选为电离形式的磺酸基团。

[0097] 在一些实施方案中,本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有下式(Ib):

[0098] 

(Ib)

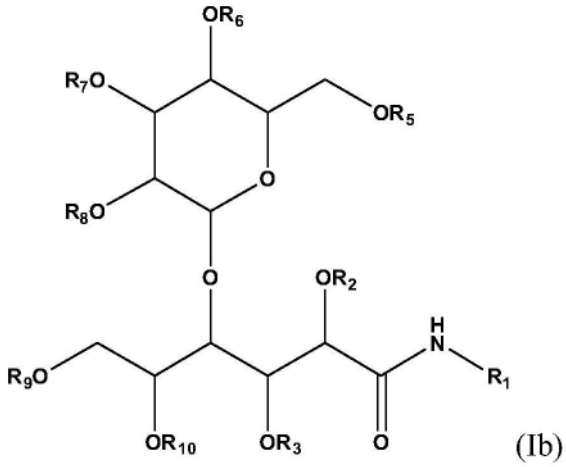
[0099] 其中：

[0100] R_1是包含15、16、17或18个碳原子，优选16或18个碳原子的饱和直链烃链；

[0101] R_2、R_3、R_6、R_7、R_8和R_{10}是氢原子，或者R_2、R_3、R_6、R_7、R_8和R_{10}基团中只有一个是电离形式的磺酸基团而其他基团是氢原子；和

[0102] R_5和R_9是电离形式的磺酸基团。

[0103] 在一些实施方案中，本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有下式(Ib)：

[0104] 

(Ib)

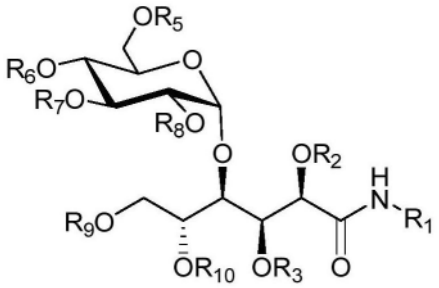
[0105] 其中：

[0106] R_1是包含15、16、17或18个碳原子，优选16或18个碳原子的饱和直链烃链；

[0107] R_2、R_3、R_6、R_7、R_8和R_{10}是氢原子；和

[0108] R_5和R_9是电离形式的磺酸基团。

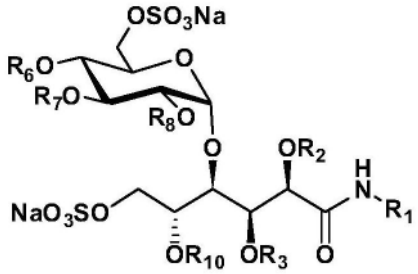
[0109] 在一些实施方案中，本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有以下结构(Ic)：

[0110] 

(Ic)

[0111] 其中R_1至R_3和R_5至R_{10}如上所述。

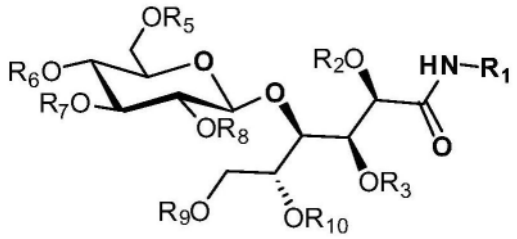
[0112] 在一些实施方案中,本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有以下结构(Id):

[0113] 

(Id)

[0114] 其中R_1、R_2、R_3和R_6至R_8和R_{10}如上所述。

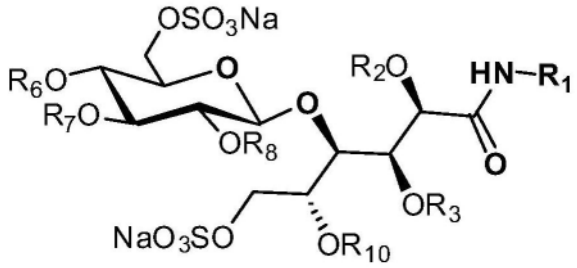
[0115] 在一些实施方案中,本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有以下结构(Ie):

[0116] 

(Ie)

[0117] 其中R_1至R_3和R_5至R_{10}如上所述。

[0118] 在一些实施方案中,本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有以下结构(If):

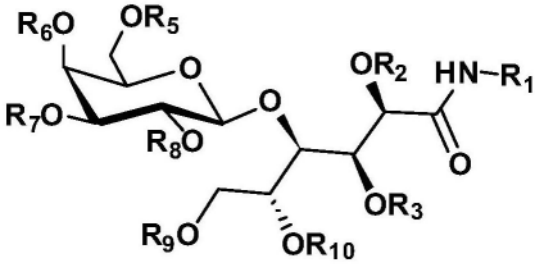
[0119] 

(If)

[0120] 其中R_1、R_2、R_3和R_6至R_8和R_{10}如上所述。

[0121] 在一些实施方案中,本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有以下

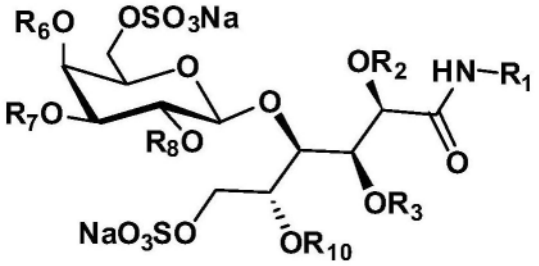
结构(Ig)：

[0122] 

(Ig)

[0123] 其中R_1至R_3和R_5至R_{10}如上所述。

[0124] 在一些实施方案中,本发明的化合物或在本发明的背景下有用的化合物具有以下结构(Ih)：

[0125] 

(Ih)

[0126] 其中R_1、R_2、R_3和R_6至R_8和R_{10}如上所述。

[0127] 在一些实施方案中,本发明的化合物是式(I)的化合物,前提是所述化合物不是十六烷基D-乳二糖酰胺(2,5)硫酸钠,即十六烷基D-乳二糖酰胺二硫酸钠、十六烷基D-乳二糖酰胺三硫酸钠及其混合物。

[0128] 式(I)的化合物的非限制性示例包括“实施例”部分中表1所示的式(I)的化合物。

[0129] 用于制备式(I)的化合物的方法

[0130] 下面描述的示意图和程序说明了式(I)的化合物的合成路线,并且不应被视为限制性的。

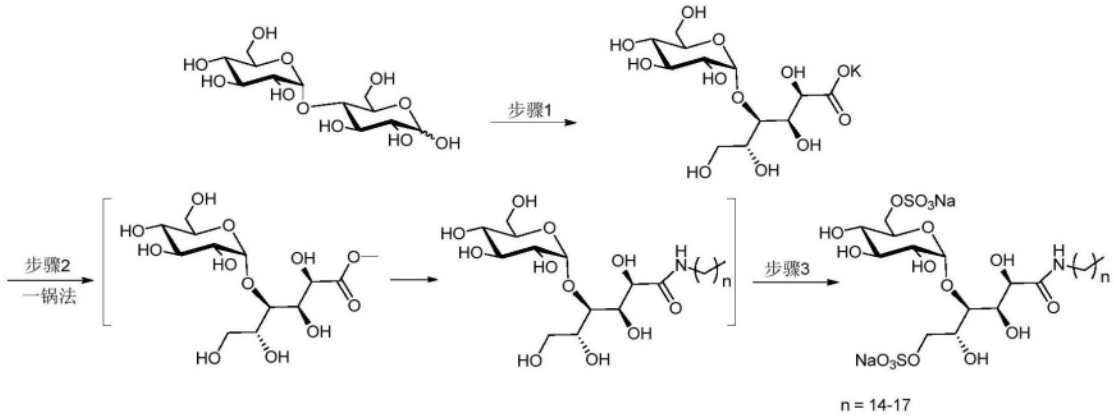
[0131] 可以由二糖(如麦芽糖、纤维二糖或乳糖)分三步制备式(I)的化合物。所述方法包含以下步骤：

[0132] (步骤1)对二糖的异头位置进行氧化；

[0133] (步骤2)通过机械合成在无溶剂条件下合成甲酯并进行氨解以接枝烃链(R_1)；

[0134] (步骤3)对伯羟基进行选择性硫酸化,或进行过硫酸化。

[0135] 下面的反应示意图(示意图1)说明了这样的方法,其中二糖是麦芽糖。应理解,麦芽糖可以被任何适当的二糖替换。

[0136] 

[0137] 示意图1:由麦芽糖合成式(I)的化合物的合成路线

[0138] 步骤1:

[0139] 可以根据众所周知的方法对二糖的异头位置进行氧化,例如通过ACS Sustainable Chemistry&Engineering 2016,4(4),2432-2438中描述的方法A来进行。

[0140] 可替选地,可以通过光催化制备麦芽二糖酸钠(Omri M.等人,ACS Catalysis2018),具有相同的转化率:>99%,选择性:>95%(通过NMR估计)。

[0141] 步骤2:N-烷基D-麦芽二糖酰胺衍生物的一锅法合成

[0142] 它通过无溶剂机械合成方法来生产。在负载酸催化剂(H_2SO_4/SiO_2)和甲醇(使形成的羧酸甲基化所需的精确量)的存在下,在球磨中研磨葡二糖酸钾,然后在第二步中,在葡二糖酸盐完全转化为酯后加入烷基胺。对于两个步骤加在一起,可以获得的步骤2的定量转化率通常大于85%。

[0143] 步骤3:根据文献的方案,在硫酸化剂SO_3-吡啶的存在下,在吡啶介质中进行硫酸化步骤(Tetrahedron.2010年4月17日;66(16):2907-2918)。

[0144] 在下文中,表述"式(I)的化合物"是指如上所述的式(I)的化合物,包括"实施例"部分中描述的化合物。表述"式(I)的化合物"是指单一的式(I)的化合物,或两种或更多种式(I)的化合物的混合物。

[0145] 治疗应用

[0146] 已经表明式(I)的化合物有效保护Tau蛋白免于异常的肝素诱导的过度磷酸化,微弱地诱导Tau蛋白磷酸化,并减少肝素诱导的Tau蛋白聚集。因此,式(I)的化合物被证明在医学上是有用的,特别是在治疗与Tau蛋白异常的过度磷酸化或磷酸化(Tau蛋白病)相关的病状方面,并且特别是在阿尔茨海默病的治疗中有用。式(I)的化合物将在聚集过程和聚集体的增殖之前,通过抑制Tau的异常磷酸化起作用,不是通过抑制激酶,而是通过保护Tau免受其攻击来起作用。

[0147] 因此,本发明涉及用于医学的或以不同的方式配制作为药物的式(I)的化合物。

[0148] 更具体地,本发明涉及用于治疗与Tau蛋白异常的过度磷酸化或磷酸化相关的病状(通常称为"Tau蛋白病")的式(I)的化合物。Tau蛋白病的非限制性示例包括阿尔茨海默病、额颞叶痴呆伴17号染色体帕金森综合征(DFTP17)、皮克氏病、皮质基底节变性和进行性核上性麻痹(PSP)。

[0149] 因此,在具体的实施方案中,本发明涉及用于治疗阿尔茨海默病、额颞叶痴呆伴17号染色体帕金森综合征(DFTP17)、皮克氏病、皮质基底节变性或进行性核上性麻痹的式(I)

的化合物。在具体的实施方案中,本发明涉及用于治疗阿尔茨海默病的式(I)的化合物。

[0150] 本发明还涉及式(I)的化合物在制备药物中的用途,所述药物可用于治疗与Tau蛋白异常的过度磷酸化或磷酸化相关的病状(Tau蛋白病),特别是可用于阿尔茨海默病的治疗。

[0151] 药物组合物

[0152] 本发明还涉及一种药物组合物,特别是一种药物,其包含式(I)的化合物和一种或多种赋形剂,特别是一种或多种药学上可接受的赋形剂,还涉及其在上述治疗应用中的用途。

[0153] 术语"药学上可接受的"是指已知无毒且可以用于医学的事物。药学上可接受的赋形剂在医学文献中是众所周知的。

[0154] 根据所需的药物形式和施用方法来选择赋形剂。此类赋形剂是技术人员众所周知的。

[0155] 根据本发明的药物组合物可以肠胃外施用,如静脉内或皮内,或局部、口服或经鼻施用。

[0156] 可以肠胃外施用的形式包括水性悬浮剂、等渗盐水溶液或无菌注射溶液,其可以含有药理相容的分散剂和/或润湿剂。可以口服施用形式包括片剂(其可以是分散片、口腔分散片、泡腾片或可溶片)、软胶囊或硬胶囊、粉剂、颗粒剂和口服溶液和悬浮剂。可以经鼻施用的形式包括气溶胶。可以局部施用的形式包括贴剂、凝胶、霜剂、软膏、洗剂、喷雾剂和滴眼液。优选地,本发明的化合物或组合物口服或肠胃外(尤其是静脉内)施用。

[0157] 本发明还涉及一种治疗上述病状的方法,其包括向有需要的个体施用有效剂量的式(I)的化合物,或施用包含式(I)的化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0158] 式(I)的化合物的有效剂量是变化的,取决于许多参数,例如所选择的施用途径、体重、年龄、性别、待治疗病状的进展以及待治疗个体的敏感性。

[0159] 以下给出的实施例仅出于说明目的,但绝不应当视为限制本发明。

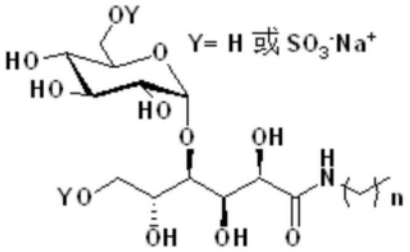
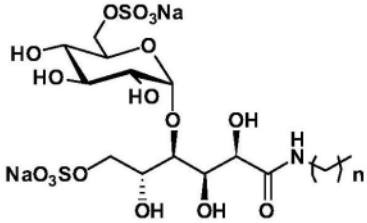
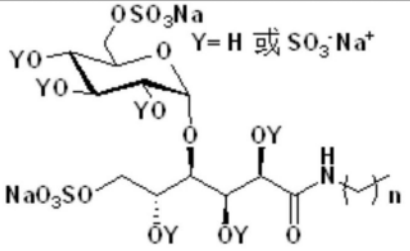
[0160] 实施例

[0161] I.测试的化合物

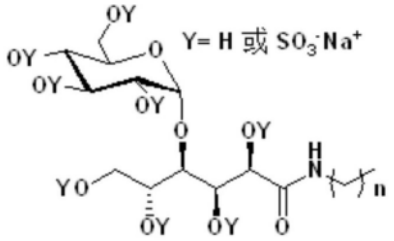
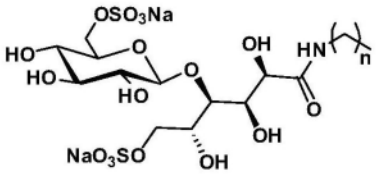
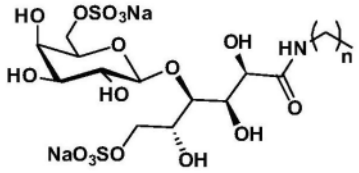
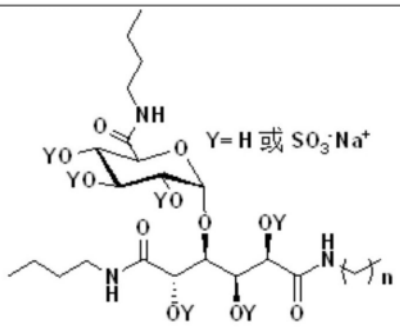
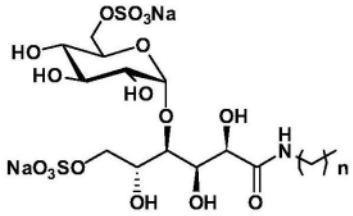
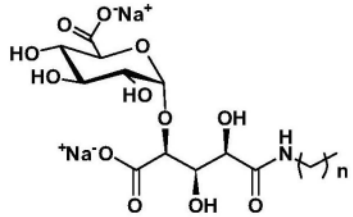
[0162] 测试的化合物示于下表1中。

[0163] 表1:测试的化合物

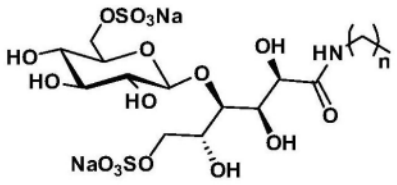
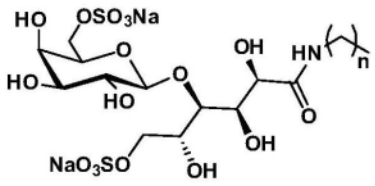
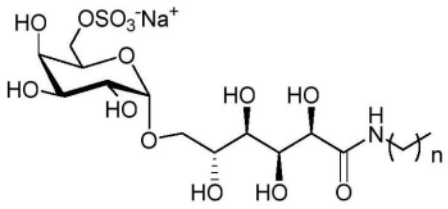
[0164]

		结构		代码
式(I)的化合物	单硫酸化麦芽二糖酰胺		n=15	Mal16monoS
			n=17	Mal18monoS
	二硫酸化麦芽二糖酰胺		n=15	Mal16diS
			n=17	Mal18diS
	三硫酸化麦芽二糖酰胺		n=15	Mal16triS
			n=17	Mal18triS

[0165]

		结构		代码
	过硫酸化麦芽二糖酰胺	 主要为6硫酸盐的混合物	n=15	Mal16perS
	二硫酸化纤维二糖酰胺		n=15	Cell16diS
			n=17	Cell18diS
	二硫酸化乳二糖酰胺		n=15	Lac16diS
			n=17	Lac18diS
	过硫酸化麦芽二糖酰胺二丁基酰胺		n=15	Mal16diBu-perS
不对应于式(I)的化合物	二硫酸化麦芽二糖酰胺		n=13	Mal14diS
			n=18	Mal19diS
			n=19	Mal20diS
	二氧化麦芽二糖酰胺		n=15	Mal16diOx
			n=17	Mal18diOx

[0166]

		结构		代码
	二硫酸化纤维二糖酰胺		n=13	Cell14diS
	二硫酸化乳二糖酰胺		n=13	Lac14diS
	单硫酸化蜜二糖酰胺		n=13	Mel14monoS
			n=15	Mel16monoS
			n=17	Mel18monoS

[0167] II.测试的化合物的合成

[0168] II-1.化学材料和方法

[0169] a)试剂和溶剂

[0170] 使用的试剂来自Merck、Acros或Alfa Aesar,并且未经纯化即使用。溶剂以无水形式购买,或在惰性气氛下蒸馏并用3或4埃分子筛处理。

[0171] b)球磨

[0172] 在Fritsch Pulverisette Premium 7(P7PL)行星磨中进行反应,该行星磨配备两个20mL碗,每个碗包含80个直径为5mm的氧化锆(ZrO_2)球。

[0173] c)色谱法

[0174] 薄层色谱法(TLC)。在二氧化硅板上进行薄层色谱法,对于正相使用ALUGRAM® Xtra SIL G/UV_{254}铝载体,对于反相使用ALUGRAM®RP-18/UV_{254}铝载体。用于在洗脱后揭示产物的技术是:4%的H_2SO_4/EtOH或钼酸铈(IV):$(NH_4)_4Ce(SO_4).2H_2O$,$(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$,H_2SO_4,H_2O(2.1g/5.3g/12mL/188mL)然后加热。

[0175] 自动快速色谱法。使用Grace快速设备(Reveleris®iES Flash System)进行自动快速纯化。使用市售可获得的预填充正相或C18二氧化硅色谱柱(4g、12g、24g、40g、80g)进行分离。可以在正相也可以在反相中进行纯化。粗产品的质量对应于预填充色谱柱中最多10%的二氧化硅。该设备配备了光扩散检测器(DEDL)和具有两个可配置波长的UV检测器。

[0176] d)化合物的表征

[0177] 比旋光度

[0178] 在20℃的温度,使用Perkin-Elmer 343旋光仪测量比旋光度,该旋光仪发出λ=549nm的偏振光(钠D线)。浓度c以每100mL溶剂的克数表示。

[0179] 低分辨率质谱法。

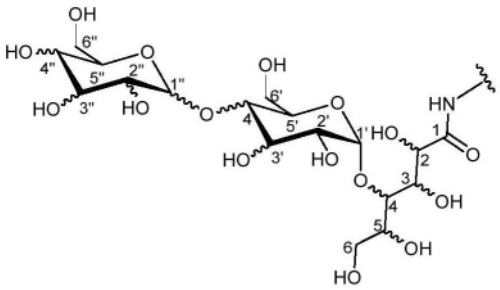
[0180] 在带有电喷雾电离源(Z-spray)的单四极杆装置(Micromass-Waters ZQ)上进行低分辨率质谱分析。该设备允许在正电离或负电离模式中进行分析。毛细管电压为3.5kV,且锥电压从20V至120V不等。源温度和脱溶剂温度分别为80℃和150℃。脱溶剂和雾化气体是氮气。

[0181] 高分辨率质谱法。

[0182] 在配备电喷雾电离源的混合四极杆飞行时间质谱仪(Micromass-Waters Q-TOF Ultima Global)上进行高分辨率质谱(HRMS)分析。源温度和脱溶剂温度分别为80℃和120℃。用于雾化和脱溶剂的气体是氮气,流速分别为20和500L/h。毛细管电压为3.5kV,锥电压从100V至250V不等。在进行任何精确质量测量之前,先用正磷酸进行校准。由于Q-TOF的精确质量测量精度小于5ppm,因此可以获得分子的元素组成。

[0183] NMR光谱法。在Bruker Advance 400或600MHz光谱仪上产生^{1}H NMR和^{13}CNMR光谱。在400MHz或600MHz记录^{1}H NMR光谱,并在101MHz或150MHz记录^{13}C NMR光谱。所有实验均在接近25℃的温度,在氘代溶剂(其也作为参考)中进行。化学位移的单位为ppm,耦合常数的单位为赫兹。使用MestReNova处理NMR光谱。

[0184] 碳编号:

[0185] 

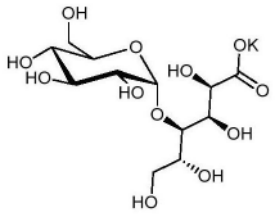
[0186] II-2麦芽二糖酰胺硫酸盐的合成

[0187] 除非另有说明,否则根据说明书中的示意图(1)制备麦芽二糖酰胺硫酸盐(包括式(I)的化合物)。

[0188] II.2a).用于合成葡二糖酸钾的程序

[0189] 将5%二糖的水溶液(250mg二糖在5mL MilliQ水中的溶液)置于10mL CEM微波管中,然后加入2当量的K_2CO_3和2.5mg的Au/Al_2O_3催化剂,该催化剂根据ACS Sustainable Chem.Eng.,2016,4,2432-2438中描述的方案制备,并对混合物进行超声以使其均质化。然后加入1.8当量的H_2O_2的30%水溶液,然后将混合物置于CEM Discover微波仪中并在60℃辐照,使用Dynamic程序持续20分钟。然后使催化剂过滤通过0.25μm PVDF,或通过离心除去。然后将滤液冷冻干燥,并通过^{1}H NMR分析粗反应物,以监测醛糖至醛酸盐的总转化率。可以在35mL管中对1g二糖进行反应,反应时间为50分钟至70分钟,具体取决于二糖。

[0190] D-麦芽二糖酸钾(Mal)

[0191] 

[0192] 定量产率

[0193] 外观:白色固体

[0194] 分子式:$C_{12}H_{21}KO_{12}$

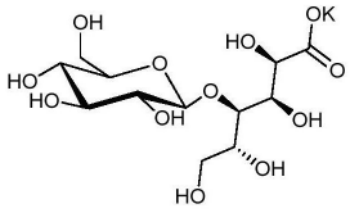
[0195] MM:396.39g.mol^{-1}

[0196] ESI-MS:[M-K]$^-$m/z 357Da

[0197] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ5.20(d,J＝3.9Hz,1H,H-1'),4.17(dd,J＝6.2,2.6Hz,1H,H-3),4.13(d,J＝2.7Hz,1H,H-2),4.03(dt,J＝7.7,3.7Hz,1H,H-5),3.98-3.89(m,2H,H-5',H-4),3.89-3.80(m,3H,1H-6'a,H-6'b,H-6a),3.77(dd,J＝9.2,9.9Hz,1H,H-3'),3.71(dd,1H,J＝11.9,7.8Hz,H-6b),3.59(dd,J＝9.9,3.8Hz,1H,H-2'),3.47(dd,J＝9.1,10.1Hz,1H,H-4')。

[0198] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ178.2(C-1),100.4(C-1'),82.4(C-4),73.0(C-3'),72.6(C-2),72.5(C-3),72.4(C-5),72.3(C-5'),71.8(C-2'),69.3(C-4'),62.1(C-6),60.4(C-6')。

[0199] D-纤维二糖酸钾(Cell)

[0200] 

[0201] 定量产率

[0202] 外观:白色固体

[0203] 分子式:$C_{12}H_{21}KO_{12}$

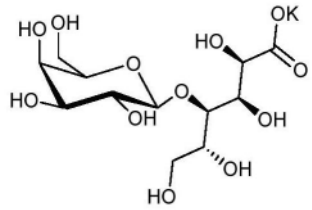
[0204] MM:396.39g.mol^{-1}

[0205] ESI-MS:[M-K]$^-$m/z 357Da

[0206] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ4.63(d,J＝7.9Hz,1H,H-1'),4.16(d,J＝3.0Hz,1H,H-2),4.09(dd,J＝5.4,3.0Hz,1H,H-3),4.05-3.94(m,2H,H-4,H-5),3.91(dd,J＝12.4,2.1Hz,1H,H-6'a),3.85(dd,J＝12.0,3.1Hz,1H,H-6a),3.78-3.71(m,2H,H-6b,H-6'b),3.52(t,J＝9.0Hz,1H,H-3'),3.49-3.44(m,1H,H-5'),3.44-3.38(m,1H,H-4'),3.35(dd,J＝9.4,7.9Hz,1H,H-2')。

[0207] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ178.4(C-1),103.0(C-1'),81.8(C-4),76.0(C-5'),75.6(C-3'),73.4(C-2'),72.4(C-2),71.8(C-5),71.6(C-3),69.5(C-4'),61.9(C-6),60.6(C-6')。

[0208] D-乳二糖酸钾(Lac)

[0209] 

[0210] 定量产率

[0211] 外观:白色固体

[0212] 分子式:$C_{12}H_{21}KO_{12}$

[0213] MM:396.39g.mol^{-1}

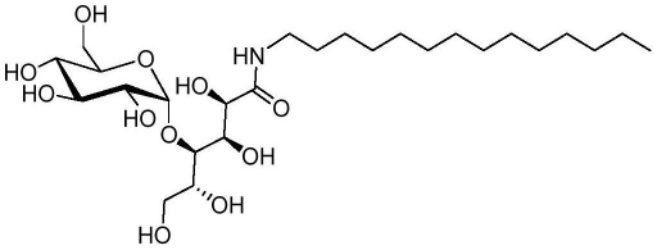
[0214] ESI-MS:[M-K]$^-$m/z 357Da

[0215] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ4.59(d,J＝7.8Hz,1H,H-1'),4.20(d,J＝2.9Hz,1H,H-2),4.13(dd,J＝5.3,2.9Hz,1H,H-3),4.06-3.97(m,2H,H-4,H-5),3.94(d,J＝3.4Hz,1H,H-4'),3.88(dd,J＝12.0,3.1Hz,1H,H-6a),3.84-3.72(m,4H,H-6'a,H-6b,H-6'b,H-5'),3.70(dd,J＝10.0,3.4Hz,1H,H-3'),3.59(dd,J＝10.0,7.8Hz,1H,H-2')。

[0216] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ178.5(C-1),103.5(C-1'),81.7(C-4),75.3(C-5'),72.6(C-3'),72.5(C-2),71.8(C-5),71.6(C-3),71.1(C-2'),68.7(C-4'),61.9(C-6),61.1(C-6')。

[0217] II.2b).通过D-葡二糖酸甲酯合成N-烷基-D-葡二糖酰胺的方案将一克粗反应性葡二糖酸钾和负载于市售22％二氧化硅上的1.1当量(约1g)硫酸(H_2SO_4/SiO_2)置于配备有80个直径为5mm的氧化锆(ZrO_2)球的20mL氧化锆碗中。加入一毫升甲醇,并在P7PL中以500rpm研磨混合物,进行8个周期,每个周期5min。然后通过正相的薄层色谱法(TLC)监测反应(洗脱液:乙酸乙酯/甲醇/水7/2/1)。然后将胺(1.5当量)加入碗中的反应介质中,然后加入2mL甲醇。以500rpm继续研磨12×5min。通过TLC再次监测反应,洗脱液相同。反应完成后,即在室温使反应介质干燥。然后将该重新研磨的粉末与未研磨的二氧化硅混合,并通过快速色谱法进行纯化,使用与监测反应相同的洗脱液。在旋转蒸发器中浓缩含有葡二糖酰胺的级分,然后冷冻干燥。

[0218] N-十四烷基-D-麦芽二糖酰胺(Mal14)

[0219] 

[0220] 产率:93％

[0221] 外观:白色固体

[0222] 分子式:$C_{26}H_{51}NO_{11}$

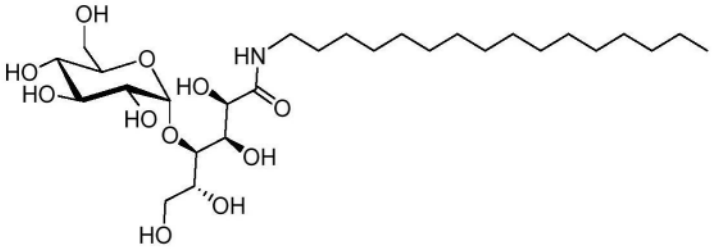
[0223] MM:553.68g.mol^{-1}

[0224] ^{1}H NMR(400MHz,吡啶-d_5):δ8.23(t,1H,J＝6.0Hz,NH),5.76(d,1H,J＝3.9Hz,H-1'),5.25(dd,1H,J＝2.0Hz,J＝5.3Hz,H-3),5.12(d,1H,J＝1.8Hz,H-2),4.76(t,1H,J＝5.0Hz,H-4),4.74-4.67(m,2H,H-5,H-5'),4.60(t,1H,J＝9.2Hz,H-3'),4.54(dd,1H,J＝

1.9Hz,J＝11.5Hz,H-6'a),4.40(dd,1H,J＝4.7Hz,J＝11.3Hz,H-6a),4.37-4.28(m,2H,H-6b,H-6'b),4.19(dd,1H,J＝3.9Hz,J＝9.5Hz,H-2'),4.15(t,1H,J＝9.5Hz,H-4'),3.55-3.40(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.54(p,2H,J＝7.2Hz,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.33-1.12(m,22H,CH_2烷基链),0.88(t,3H,J＝6.6Hz,CH_3)

[0225] ^{13}C NMR(101MHz,吡啶-d_5):δ174.0(C-1),103.4(C-1'),85.5(C-4),75.9(C-3'),75.6(C-5"),74.8(C-5),74.4(C-2'),74.3(C-2),74.1(C-3),72.4(C-4'),64.8(C-6),63.1(C-6'),39.9($C\underline{H}_2$-NH),32.6-23.4(CH_2烷基链),14.8(CH_3)。

[0226] N-十六烷基-D-麦芽二糖酰胺(Mal16)

[0227] 

[0228] 产率:71％％

[0229] 外观:白色固体

[0230] 分子式:$C_{28}H_{55}NO_{11}$

[0231] MM:581.74g.mol^{-1}

[0232] Rf:0.72(EtOAc/MeOH/H_2O:7/2/1)

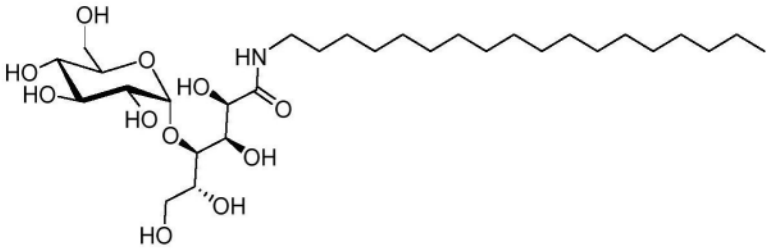
[0233] $[\alpha]_D^{20}$:+71.4°(MeOH,c＝0.5)

[0234] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$604.3663(计算:对于$C_{28}H_{55}NO_{11}Na$为604.3673)

[0235] ^1H NMR(600MHz,吡啶-d_5):δ8.25(t,1H,J＝5.3Hz,NH),5.78(d,1H,J＝3.9Hz,H-1'),5.25(dd,1H,J＝2.0Hz,J＝5.3Hz,H-3),5.13(d,1H,J＝1.8Hz,H-2),4.77(t,1H,J＝5.0Hz,H-4),4.73-4.69(m,2H,H-5,H-5'),4.59(t,1H,J＝9.2Hz,H-3'),4.53(dd,1H,J＝1.9Hz,J＝11.5Hz,H-6'a),4.38(dd,1H,J＝4.7Hz,J＝11.3Hz,H-6a),4.34-4.29(m,2H,H-6b,H-6'b),4.18(dd,1H,J＝3.9Hz,J＝9.5Hz,H-2'),4.14(t,1H,J＝9.5Hz,H-4'),3.52-3.40(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.53(p,2H,J＝7.2Hz,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.29-1.16(m,26H,CH_2烷基链),0.87(t,3H,J＝6.6Hz,CH_3)

[0236] ^{13}C NMR(151MHz,吡啶-d_5):δ173.8(C-1),103.3(C-1'),85.3(C-4),75.8(C-3'),75.5(C-5"),74.7(C-5),74.3(C-2'),74.2(C-2),74.0(C-3),72.3(C-4'),64.6(C-6),63.0(C-6'),39.8($C\underline{H}_2$-NH),32.5-23.3(CH_2烷基链),14.6(CH_3)。

[0237] N-十八烷基-D-麦芽二糖酰胺(Mal18)

[0238] 

[0239] 产率:87％％

[0240] 外观:白色固体

[0241] 分子式:$C_{30}H_{59}NO_{11}$

[0242] MM:609.80g.mol^{-1}

[0243] Rf:0.71(EtOAc/MeOH/H_2O:7/2/1)。

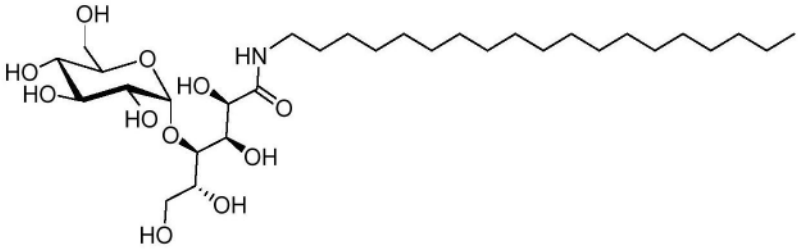
[0244] $[\alpha]_D^{20}$:+70.8(MeOH,c=0.5)

[0245] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$632.3980(计算:对于$C_{30}H_{59}NO_{11}Na$为632.3986)

[0246] ^1H NMR(600MHz,吡啶-d_5):δ8.23(t,1H,J=5.5Hz,NH),5.77(d,1H,J=4.0Hz,H-1'),5.26(dd,1H,J=2.2Hz,J=5.6Hz,H-3),5.13(d,1H,J=2.1Hz,H-2),4.77(t,1H,J=4.9Hz,H-4),4.74-4.69(m,2H,H-5,H-5'),4.60(t,1H,J=9.2Hz,H-3'),4.53(dd,1H,J=2.2Hz,J=11.6Hz,H-6'a),4.39(dd,1H,J=4.8Hz,J=11.3Hz,H-6a),4.35-4.30(m,2H,H-6b,H-6'b),4.18(dd,1H,J=4.0Hz,J=9.5Hz,H-2'),4.15(t,1H,J=9.5Hz,H-4'),3.52-3.41(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.56-1.51(m,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.29-1.17(m,30H,CH_2烷基链),0.87(t,3H,J=6.8Hz,CH_3)

[0247] ^{13}C NMR(151MHz,吡啶-d_5):δ173.8(C-1),103.3(C-1'),85.4(C-4),75.8(C-3'),75.5(C-5'),74.7(C-5),74.3(C-2'),74.2(C-2),74.0(C-3),72.3(C-4'),64.6(C-6),63.0(C-6'),39.8($C\underline{H}_2$-NH),32.5-23.3(CH_2烷基链),14.6(CH_3)。

[0248] N-十九烷基-D-麦芽二糖酰胺(Mal19)

[0249] 

[0250] 产率:69%%

[0251] 外观:白色固体

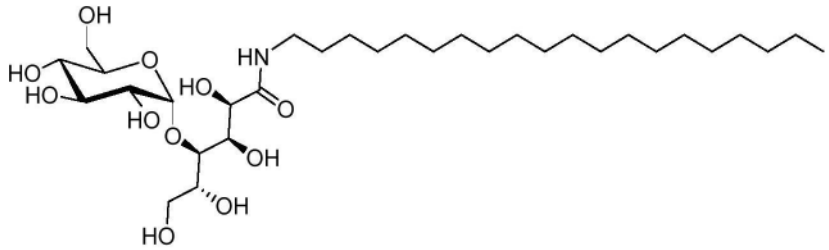
[0252] 分子式:$C_{31}H_{61}NO_{11}$

[0253] MM:623.82g.mol^{-1}

[0254] ^1H NMR(400MHz,吡啶-d_5):δ8.22(t,1H,J=5.5Hz,NH),5.78(d,1H,J=4.0Hz,H-1'),5.25(dd,1H,J=2.2Hz,J=5.6Hz,H-3),5.13(d,1H,J=2.1Hz,H-2),4.77(t,1H,J=4.9Hz,H-4),4.74-4.67(m,2H,H-5,H-5'),4.60(t,1H,J=9.2Hz,H-3'),4.55(dd,1H,J=2.2Hz,J=11.6Hz,H-6'a),4.40(dd,1H,J=4.8Hz,J=11.3Hz,H-6a),4.37-4.28(m,2H,H-6b,H-6'b),4.20(dd,1H,J=4.0Hz,J=9.5Hz,H-2'),4.15(t,1H,J=9.5Hz,H-4'),3.55-3.40(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.58-1.51(m,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.35-1.14(m,30H,CH_2烷基链),0.88(t,3H,J=6.8Hz,CH_3)

[0255] ^{13}C NMR(101MHz,吡啶-d_5):δ173.9(C-1),103.4(C-1'),85.5(C-4),75.9(C-3'),75.6(C-5'),74.8(C-5),74.4(C-2'),74.3(C-2),74.1(C-3),72.4(C-4'),64.7(C-6),63.1(C-6'),39.9($C\underline{H}_2$-NH),32.6-23.1(CH_2烷基链),14.5(CH_3)。

[0256] N-二十烷基-D-麦芽二糖酰胺(Mal20)

[0257] 

[0258] 产率:38％％

[0259] 外观:白色固体

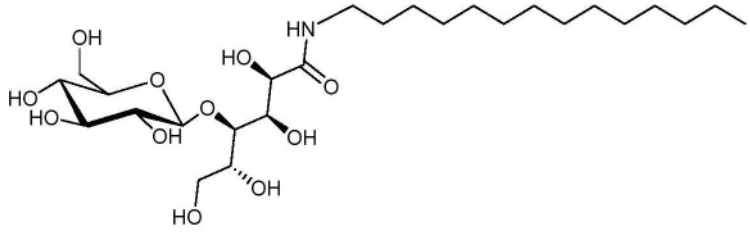
[0260] 分子式:$C_{32}H_{63}NO_{11}$

[0261] MM:637.84g.mol^{-1}

[0262] ^{1}H NMR(400MHz,吡啶-d_5):δ8.25(t,1H,J＝5.5Hz,NH),5.78(d,1H,J＝4.0Hz,H-1'),5.25(dd,1H,J＝2.2Hz,J＝5.6Hz,H-3),5.13(d,1H,J＝2.1Hz,H-2),4.79(t,1H,J＝4.9Hz,H-4),4.76-4.68(m,2H,H-5,H-5'),4.61(t,1H,J＝9.2Hz,H-3'),4.56(dd,1H,J＝2.2Hz,J＝11.6Hz,H-6'a),4.38(dd,1H,J＝4.8Hz,J＝11.3Hz,H-6a),4.44-4.27(m,2H,H-6b,H-6'b),4.19(dd,1H,J＝4.0Hz,J＝9.5Hz,H-2'),4.15(t,1H,J＝9.5Hz,H-4'),3.55-3.40(m,2H,CH_2-NH),1.59-1.50(m,2H,CH_2-CH_2-NH),1.37-1.11(m,30H,CH_2烷基链),0.88(t,3H,J＝6.8Hz,CH_3)

[0263] ^{13}C NMR(101MHz,吡啶-d_5):δ173.9(C-1),103.4(C-1'),85.4(C-4),75.9(C-3'),75.6(C-5'),74.8(C-5),74.4(C-2'),74.3(C-2),74.1(C-3),72.4(C-4'),64.7(C-6),63.1(C-6'),39.9(CH_2-NH),32.4-23.4(CH_2烷基链),14.7(CH_3)。

[0264] N-十四烷基-D-纤维二糖酰胺(Cel114)

[0265] 

[0266] 产率:74％

[0267] 外观:白色固体

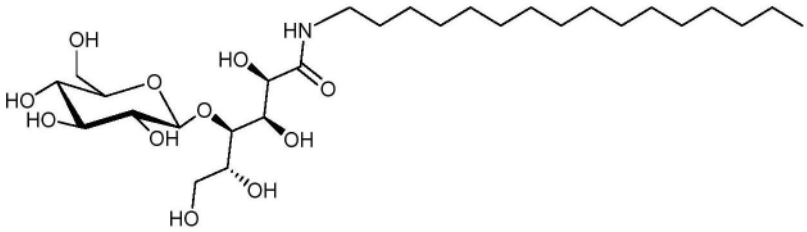
[0268] 分子式:$C_{26}H_{51}NO_{11}$

[0269] MM:553.68g.mol^{-1}

[0270] ^{1}H NMR(400MHz,吡啶-d_5):δ8.31(t,1H,J＝5.9Hz,NH),5.35(t,1H,J＝3.2Hz,H-3),5.29(d,1H,J＝2.9Hz,H-2),5.27(d,1H,J＝7.9Hz,H-1'),4.83-4.79(m,2H,H-4,H-5),4.53-4.47(m,3H,H-6a,H-6b,H-6a'),4.23(dd,1H,J＝6.7Hz,J＝11.8Hz,H-6b'),4.19(t,1H,J＝8.9Hz,H-3'),4.06(t,J＝8.7Hz,2H,H-2',H-4'),4.01-3.96(m,1H,H-5'),3.53-3.37(m,2H,CH_2-NH),1.56-1.50(m,2H,CH_2-CH_2-NH),1.28-1.09(m,22H,CH_2烷基链),0.88(t,3H,J＝6.8Hz,CH_3)

[0271] ^{13}C NMR(101MHz,吡啶-d_5):δ174.8(C-1),106.5(C-1'),84.3(C-4),79.2(C-5'),78.9(C-3'),76.0(C-2'),73.9(C-5),73.4(C-2),73.3(C-3),72.2(C-4'),65.2(C-6),63.4(C-6'),40.0(CH_2-NH),32.6-23.4(CH_2烷基链),14.6(CH_3)。、

[0272] N-十六烷基-D-纤维二糖酰胺(Cell16)

[0273] 

[0274] 产率:92%

[0275] 外观:白色固体

[0276] 分子式:$C_{28}H_{55}NO_{11}$

[0277] MM:581.74g.mol^{-1}

[0278] Rf:0.72(EtOAc/MeOH/H_2O:7/2/1)

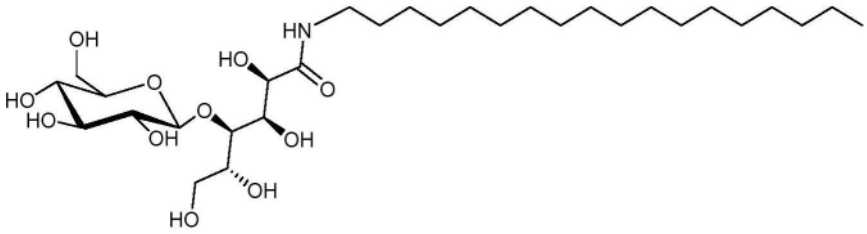
[0279] $[\alpha]_D^{20}$:+13.8°(MeOH,c=0.5)

[0280] ESI-HRMS:$[M+H]^+$582.3861(计算:对于$C_{28}H_{55}NO_{11}$为582.3853)

[0281] ^1H NMR(600MHz,吡啶-d_5):δ8.30(t,1H,J=5.9Hz,NH),5.34(t,1H,J=3.2Hz,H-3),5.27(d,1H,J=2.9Hz,H-2),5.26(d,1H,J=7.9Hz,H-1'),4.83-4.79(m,2H,H-4,H-5),4.53-4.47(m,3H,H-6a,H-6b,H-6a'),4.22(dd,1H,J=6.7Hz,J=11.8Hz,H-6b'),4.19(t,1H,J=8.9Hz,H-3'),4.04(t,J=8.7Hz,2H,H-2',H-4'),3.99-3.94(m,1H,H-5'),3.49-3.38(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.55-1.48(m,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.27-1.15(m,26H,CH_2烷基链),0.87(t,3H,J=6.8Hz,CH_3)

[0282] ^{13}C NMR(151MHz,吡啶-d_5):δ174.7(C-1),106.4(C-1'),84.2(C-4),79.1(C-5'),78.8(C-3'),75.9(C-2'),73.8(C-5),73.3(C-2),73.2(C-3),72.1(C-4'),65.1(C-6),63.3(C-6'),39.9($C\underline{H}_2$-NH),32.5-23.3(CH_2烷基链),14.6(CH_3)。

[0283] N-十八烷基-D-纤维二糖酰胺(Cell18)

[0284] 

[0285] 产率:97%

[0286] 外观:白色固体

[0287] 分子式:$C_{30}H_{59}NO_{11}$

[0288] MM:609.41g.mol^{-1}

[0289] Rf:0.75(EtOAc/MeOH/H_2O:7/2/1)

[0290] $[\alpha]_D^{20}$:+14.8°(MeOH,c=0.5)

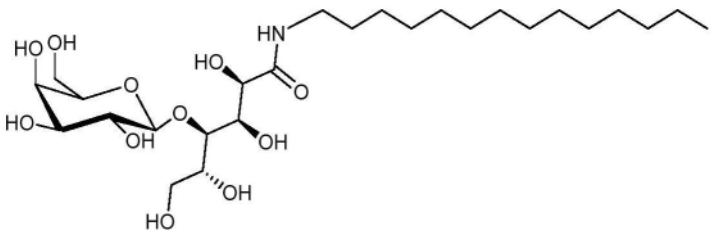
[0291] ESI-HRMS:$[M+H]^+$610.4175(计算:对于$C_{30}H_{60}NO_{11}$为610.4166)

[0292] ^1H NMR(400MHz,吡啶-d_5):δ8.31(t,J=5.7Hz,1H,NH),5.34(br s,1H,H-3),5.30-5.23(m,2H,H-2,H-1'),4.84-4.78(m,2H,H-4,H-5),4.57-4.45(m,3H,H-6a,H-6b,H-6a'),4.23(dd,1H,J=6.4Hz,J=11.8Hz,H-6b'),4.19(t,1H,J=8.8Hz,H-3'),4.04(t,J=8.3Hz,2H,H-2',H-4'),3.99-3.95(m,1H,H-5'),3.52-3.37(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.53(p,J=

6.9Hz,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.38-1.11(m,30H烷基链),0.88(t,J=6.8Hz,3H,CH_3)。

[0293] ^{13}C NMR(101MHz,吡啶-d_5):δ174.6(C-1),106.3(C-1'),84.1(C-4),79.1(C-5'),78.8(C-3'),75.9(C-2'),73.8(C-5),73.3(C-2),73.2(C-3),72.1(C-4'),65.0(C-6),63.3(C-6'),39.8($C\underline{H}_2$-NH),32.5-23.3(CH_2烷基链),14.6(CH_3)。

[0294] N-十四烷基-D-乳二糖酰胺(Lac14)

[0295] 

[0296] 产率:76%%

[0297] 外观:白色固体

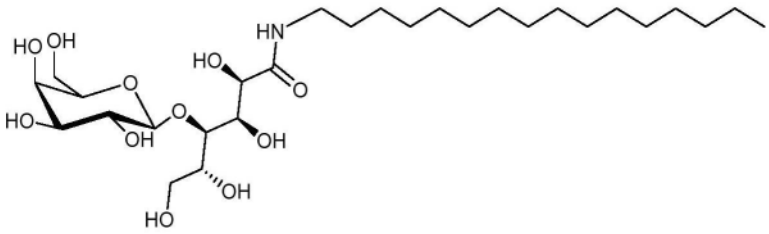
[0298] 分子式:$C_{26}H_{51}NO_{11}$

[0299] MM:553.68g.mol^{-1}

[0300] ^{1}H NMR(600MHz,吡啶-d_5):δ8.18(t,1H,J=5.8Hz,NH),5.34(t,1H,J=3.0Hz,H-3),5.26(d,1H,J=2.4Hz,H-2),5.22(d,1H,J=7.7Hz,H-1'),4.81(dd,1H,J=4.1Hz,J=6.9Hz,H-4),4.78-4.72(m,1H,H-5),4.56-4.45(m,4H,H-2',H-6'a,H-6a,H-6b),4.43(d,1H,J=2.9Hz,H-4'),4.29(dd,1H,J=4.6Hz,J=11.3Hz,H-6'b),4.14(dd,1H,J=3.2Hz,J=9.4Hz,H-3'),4.08(dd,1H,J=5.4Hz,J=6.4Hz,H-5'),3.52-3.38(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.58-1.47(m,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.32-1.14(m,22H,CH_2烷基链),0.88(t,3H,J=6.8Hz,CH_3)

[0301] ^{13}C NMR(151MHz,吡啶-d_5):δ174.3(C-1),107.0(C-1'),84.8(C-4),77.9(C-5'),75.7(C-3'),74.2(C-2),73.8(C-5),73.5(C-2'),73.0(C-3),70.7(C-4'),64.9(C-6),63.0(C-6'),39.9($C\underline{H}_2$-NH),32.6-23.4(CH_2烷基链),14.7(CH_3)。

[0302] N-十六烷基-D-乳二糖酰胺(Lac16)

[0303] 

[0304] 产率:69%%

[0305] 外观:白色固体

[0306] 分子式:$C_{28}H_{55}NO_{11}$

[0307] MM:581.74g.mol^{-1}

[0308] Rf:0.69(EtOAc/MeOH/H_2O:7/2/1)

[0309] $[\alpha]_D^{20}$:+22.0°(MeOH,c=0.05)

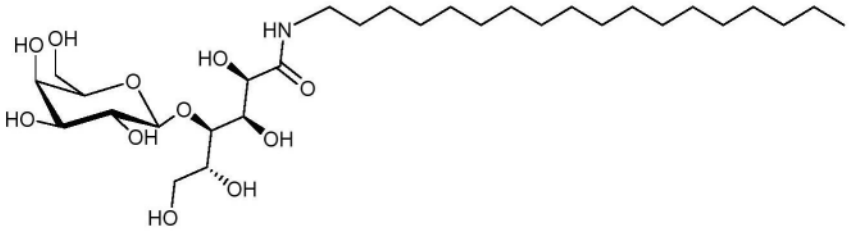
[0310] ESI-HRMS:$[M+H]^+$582.3852(计算:对于$C_{28}H_{55}NO_{11}$为582.3853)

[0311] ^{1}H NMR(600MHz,吡啶-d_5):δ8.19(t,1H,J=5.8Hz,NH),5.32(t,1H,J=3.0Hz,H-3),5.24(d,1H,J=2.4Hz,H-2),5.21(d,1H,J=7.7Hz,H-1'),4.80(dd,1H,J=4.1Hz,J=6.9Hz,H-4),4.74-4.71(m,1H,H-5),4.51-4.45(m,4H,H-2',H-6'a,H-6a,H-6b),4.42(d,

1H,J＝2.9Hz,H-4'),4.27(dd,1H,J＝4.6Hz,J＝11.3Hz,H-6'b),4.12(dd,1H,J＝3.2Hz,J＝9.4Hz,H-3'),4.06(dd,1H,J＝5.4Hz,J＝6.4Hz,H-5'),3.48-3.38(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.55-1.48(m,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.27-1.16(m,26H,CH_2烷基链),0.87(t,3H,J＝6.8Hz,CH_3)

[0312] ^{13}C NMR(151MHz,吡啶-d_5):δ174.2(C-1),106.9(C-1'),84.6(C-4),77.8(C-5'),75.6(C-3'),74.1(C-2),73.7(C-5),73.4(C-2'),72.9(C-3),70.6(C-4'),64.8(C-6),62.9(C-6'),39.8($C\underline{H}_2$-NH),32.5-23.3(CH_2烷基链),14.6(CH_3)。

[0313] N-十八烷基-D-乳二糖酰胺(Lac18)

[0314] 

[0315] 产率:86%

[0316] 外观:白色固体

[0317] 分子式:$C_{30}H_{59}NO_{11}$

[0318] MM:609.80g.mol^{-1}

[0319] Rf:0.71(EtOAc/MeOH/H_2O:7/2/1)

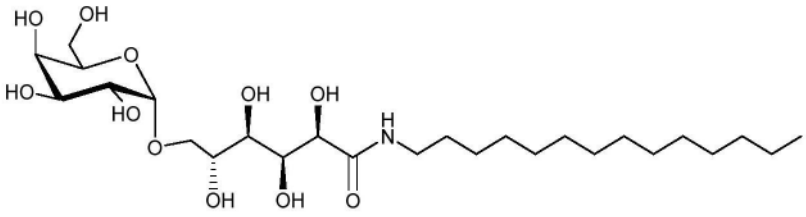
[0320] $[\alpha]_D^{20}$:+136.0°(MeOH,c＝0.025)

[0321] ESI-HRMS:$[M+H]^+$610.4166(计算:对于$C_{30}H_{60}NO_{11}$为610.4166)

[0322] ^{1}H NMR(600MHz,吡啶-d_5):δ8.19(t,1H,J＝5.9Hz,NH),5.32(br s,1H,H-3),5.24(d,1H,J＝2.5Hz,H-2),5.21(d,1H,J＝7.8Hz,H-1'),4.80(dd,1H,J＝4.0Hz,J＝7.0Hz,H-4),4.74-4.72(m,1H,H-5),4.52-4.45(m,4H,H-2',H-6'a,H-6a,H-6b),4.42(d,1H,J＝3.1Hz,H-4'),4.27(dd,1H,J＝4.4Hz,J＝11.2Hz,H-6'b),4.12(dd,1H,J＝3.3Hz,J＝9.5Hz,H-3'),4.06(dd,1H,J＝5.0Hz,J＝7.0Hz,H-5'),3.48-3.38(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.55-1.48(m,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.29-1.16(m,30H,CH_2烷基链),0.87(t,3H,J＝6.9Hz,CH_3)

[0323] ^{13}C NMR(151MHz,吡啶-d_5):δ174.2(C-1),106.9(C-1'),84.7(C-4),77.9(C-5'),75.6(C-3'),74.1(C-2),73.7(C-5),73.4(C-2'),72.9(C-3),70.6(C-4'),64.8(C-6),62.9(C-6'),39.8($C\underline{H}_2$-NH),32.5(CH_2烷基链),30.6-23.3(CH_2烷基链),14.6(CH_3)

[0324] N-十四烷基-蜜二糖酰胺(Mel14)

[0325] 

[0326] 产率:60%

[0327] 外观:白色固体

[0328] 分子式:$C_{26}H_{51}NO_{11}$

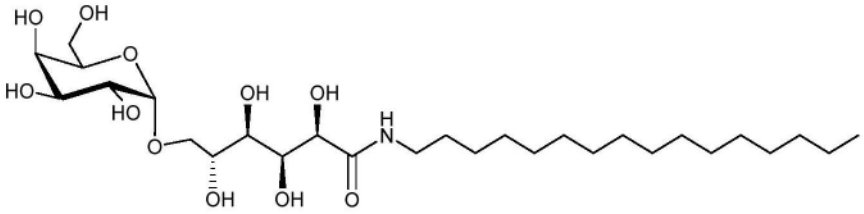
[0329] MM:553.35g.mol^{-1}

[0330] ^{1}H NMR(400MHz,吡啶-d_5):δ8.39(t,J＝5.9Hz,N-H),5.46(d,J＝3.7Hz,1H,H-1'),

5.21(t,J＝3.2Hz,1H,H-3),5.04(d,J＝3.3Hz,1H,H-2),4.78-4.70(m,2H,H-4',H-4),4.68(dd,J＝9.9,3.8Hz,1H,H-2'),4.63-4.56(m,3H,H-6a,b,H-5'),4.51(dd,J＝9.9,3.1Hz,1H,H-3'),4.42(d,J＝5.9Hz,2H,H-6'a,b),4.38-4.32(m,1H,H-5),3.56-3.37(m,2H,CH_2-N),1.63-1.49(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.33-1.12(m,22H,CH_2烷基链),0.88(t,J＝6.7Hz,3H,CH_3)。

[0331] ^{13}C NMR(101MHz,吡啶-d_5):δ174.5(C-1),101.60(C-1'),75.3(C-2),75.1(C-4),73.2(C-5'),72.7(C-3),72.1(C-3'),71.4(C-5,C-6),71.4(C-4'),71.1(C-2'),63.0(C-6'),40.0(CH_2-N),33.0-23.4(CH_2烷基链),14.7(CH_3)。

[0332] N-十六烷基-蜜二糖酰胺(Me116)

[0333] 

[0334] 产率:44%

[0335] 外观:白色固体

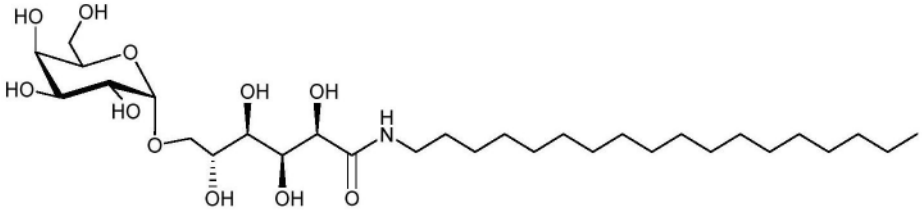
[0336] 分子式:$C_{28}H_{55}NO_{11}$

[0337] MM:581.38g.mol^{-1}

[0338] ^{1}H NMR(400MHz,吡啶-d_5):δ8.39(t,J＝5.9Hz,N-H),5.45(d,J＝3.7Hz,1H,H-1'),5.21(t,J＝3.2Hz,1H,H-3),5.04(d,J＝3.3Hz,1H,H-2),4.78-4.70(m,2H,H-4',H-4),4.67(dd,J＝9.9,3.8Hz,1H,H-2'),4.62-4.55(m,3H,H-6a,b,H-5'),4.51(dd,J＝9.9,3.1Hz,1H,H-3'),4.41(d,J＝5.9Hz,2H,H-6'a,b),4.38-4.30(m,1H,H-5),3.54-3.40(m,2H,CH_2-N),1.62-1.51(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.34-1.12(m,26H,CH_2烷基链),0.88(t,J＝6.7Hz,3H,CH_3)。

[0339] ^{13}C NMR(101MHz,吡啶-d_5):δ174.5(C-1),101.6(C-1'),75.3(C-2),75.1(C-4),73.2(C-5'),72.7(C-3),72.1(C-3'),71.4(C-5,C-6),71.4(C-4'),71.1(C-2'),63.0(C-6'),40.0(CH_2-N),33.0-23.4(CH_2烷基链),14.8(CH_3)。

[0340] N-十八烷基-蜜二糖酰胺(Me118)

[0341] 

[0342] 产率:38%

[0343] 外观:白色固体

[0344] 分子式:$C_{30}H_{59}NO_{11}$

[0345] MM:609.41g.mol^{-1}

[0346] ^{1}H NMR(400MHz,吡啶-d_5):δ8.39(t,J＝5.9Hz,N-H),5.46(d,J＝3.7Hz,1H,H-1'),5.21(t,J＝3.2Hz,1H,H-3),5.04(d,J＝3.3Hz,1H,H-2),4.78-4.70(m,2H,H-4',H-4),4.68

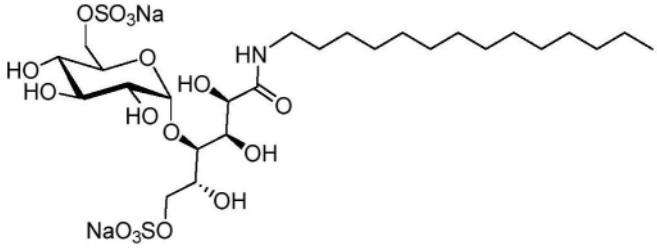
(dd,J＝9.9,3.8Hz,1H,H-2')，4.62-4.56(m,3H,H-6a,b,H-5')，4.51(dd,J＝9.9,3.1Hz,1H,H-3')，4.42(d,J＝5.9Hz,2H,H-6'a,b)，4.38-4.31(m,1H,H-5)，3.54-3.40(m,2H,CH_2-N)，1.62-1.51(m,2H,CH_2-CH_2-N)，1.34-1.12(m,30H,CH_2烷基链)，0.88(t,J＝6.7Hz,3H,CH_3)。

[0347] ^{13}C NMR(101MHz,吡啶-d_5):δ174.5(C-1)，101.6(C-1')，75.3(C-2)，75.1(C-4)，73.2(C-5')，72.7(C-3)，72.1(C-3')，71.4(C-5,C-6)，71.4(C-4')，71.1(C-2')，63.0(C-6')，40.0(CH_2-N)，33.0-23.4(CH_2烷基链)，14.8(CH_3)。

[0348] II-2.c).N-烷基-葡糖酰胺硫酸化的一般程序

[0349] 向1g放置在双颈烧瓶中的50mL无水吡啶中的N-烷基-葡糖酰胺中加入2×1.1当量对葡二糖酰胺有活性的50％SO_3/吡啶复合物和3×1.1当量对麦芽三糖酰胺有活性的50％SO_3/吡啶复合物。通过反相薄层色谱法(C18固定相,洗脱液甲醇/水6/4)监测反应过程。反应约一小时后,加入1.5当量另外的50％SO_3/活性吡啶以完成反应。将反应置于搅拌下过夜,然后用pH约9的饱和碳酸氢钠溶液处理,然后蒸发至干燥。二硫酸化化合物(N-烷基-葡糖酰胺)或三硫酸化N-烷基麦芽三糖酰胺是在反应介质中获得的大多数产物,少数形成的化合物在一级位置未完全硫酸化或含有额外的硫酸根。然后通过反相快速色谱法用C18 80g Reveleris色谱柱纯化粗反应物。流动相为水/甲醇混合物,流速为40mL/min,梯度从40％甲醇开始并在10min中上升至80％甲醇。然后蒸发纯化的单硫酸化、二硫酸化(非常主要)和三硫酸化N-烷基葡二糖酰胺或三硫酸化N-烷基麦芽三糖酰胺的级分以除去甲醇,然后冷冻干燥。

[0350] N-十四烷基-6,6'-二-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺二钠(Mal14diS)

[0351] 

[0352] 产率:61％

[0353] 外观:白色固体

[0354] 分子式:$C_{26}H_{49}NNa_2O_{17}S_2$

[0355] MM:757.22g.mol^{-1}

[0356] Rf:0.47(CH_3CN/H_2O:3/7)TLC-C18

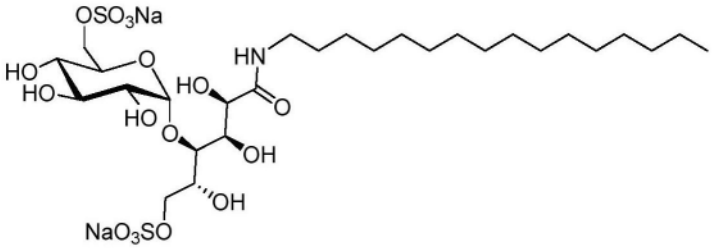
[0357] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$780.2133(计算:对于$C_{26}H_{49}NNa_3O_{17}S_2$为780.2135)

[0358] ^{1}H NMR(600MHz,D_2O):δ5.22(d,J＝3.9Hz,1H,H-1')，4.41-4.10(m,8H,H-6'a,H-6'b,H-2,H-5,H-6a,H-6b,H-3,H-5')，4.00(dd,J＝5.7,3.8Hz,1H,H-4)，3.81(t,J＝9.5Hz,1H,H-3')，3.65(dd,J＝9.9,3.8Hz,1H,H-2')，3.57(t,J＝9.6Hz,1H,H-4')，3.34-3.18(m,2H,CH_2-N)，1.57(br s,2H,CH_2-CH_2-N)，1.33(br s,22H,CH_2烷基链)，0.92(t,J＝6.5Hz,3H,CH_3)

[0359] ^{13}C NMR(151MHz,D_2O):δ173.4(C-1)，100.5(C-1')，82.0(C-4)，72.7(C-3')，71.8(C-2)，71.7(C-3)，71.5(C-2')，70.5(C-5')，69.8(C-5)，68.9(C-6)，68.8(C-4')，66.7(C-

6'),39.4(CH_2-N),32.0-22.6(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0360] N-十六烷基-6,6'-二-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺二钠(Mal16diS)

[0361] 

[0362] 产率:55%

[0363] 外观:白色固体

[0364] 分子式:$C_{28}H_{53}NNa_2O_{17}S_2$

[0365] MM:785.82g.mol^{-1}

[0366] Rf:0.52(CH_3CN/H_2O:6/4)TLC-C18

[0367] $[\alpha]_D^{20}$:+53.6°(H_2O,c=0.5)

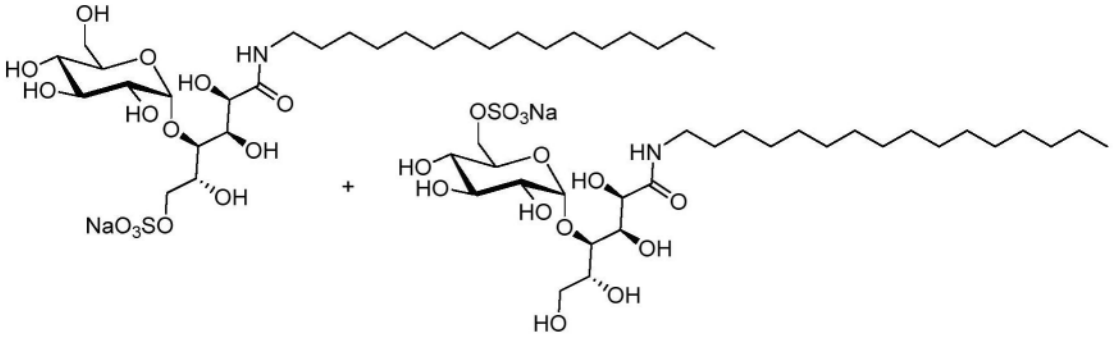
[0368] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$808.2463(计算:对于$C_{28}H_{53}NNa_3O_{17}S_2$为808.2448)

[0369] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ5.21(d,J=3.9Hz,1H,H-1'),4.40-4.09(m,8H,H-6'a,H-6'b,H-2,H-5,H-6a,H-6b,H-3,H-5'),3.99(dd,J=5.7,3.8Hz,1H,H-4),3.81(t,J=9.5Hz,1H,H-3'),3.64(dd,J=9.9,3.8Hz,1H,H-2'),3.56(t,J=9.6Hz,1H,H-4'),3.33-3.17(m,2H,CH_2-N),1.56(br s,2H,CH_2-CH_2-N),1.33(br s,26H,CH_2烷基链),0.92(t,J=6.5Hz,3H,CH_3)

[0370] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ173.4(C-1),100.5(C-1'),82.0(C-4),72.8(C-3'),71.8(C-2),71.7(C-3),71.5(C-2'),70.5(C-5'),69.8(C-5),68.9(C-6),68.8(C-4'),66.7(C-6'),39.4(CH_2-N),32.0-22.6(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0371] N-十六烷基-6或6'-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺钠(Mal16monoS)

[0372] 由在快速色谱柱上纯化的粗Mal16diS中获得Mal16的单硫酸化级分。这是在6位硫酸化的N-十六烷基麦芽二糖酰胺及其在6'位硫酸化的同系物的混合物。

[0373] 

[0374] 产率:40%

[0375] 外观:白色固体

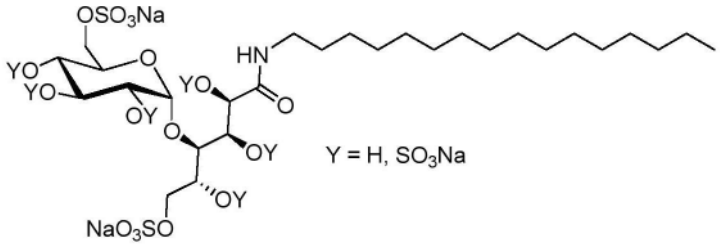
[0376] 分子式:$C_{28}H_{54}NNaO_{14}S$

[0377] MM:683.78g.mol^{-1}

[0378] N-十六烷基-三-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺三钠(Mal16triS)

[0379] 由在快速色谱柱上纯化的粗Mal16diS中获得Mal16的三硫酸化级分。它是在6和6'

位二硫酸化并在次要位置之一包含第三硫酸根的数种N-十六烷基麦芽二糖酰胺化合物的混合物。

[0380] 

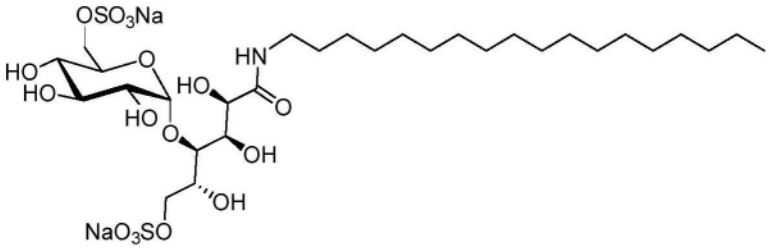
[0381] 产率:6%

[0382] 外观:白色固体

[0383] 分子式:$C_{28}H_{52}NNa_3O_{20}S_3$

[0384] MM:887.86g.mol^{-1}

[0385] N-十八烷基-6,6'-二-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺二钠(Mal18diS)

[0386] 

[0387] 产率:49%

[0388] 外观:白色固体

[0389] 分子式:$C_{30}H_{57}NNa_2O_{17}S_2$

[0390] MM:813.88g.mol^{-1}

[0391] Rf:0.44(CH_3CN/H_2O:6/4)TLC-C18

[0392] $[\alpha]_D^{20}$:+39.2°(H_2O,c=0.125)

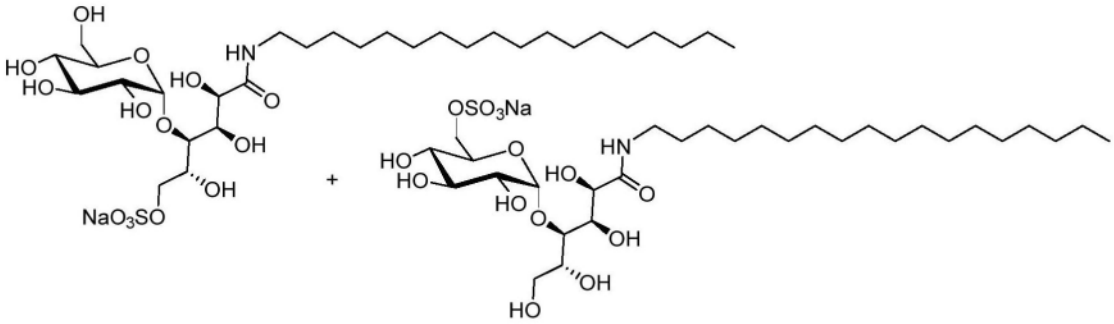
[0393] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$836.2776(计算:对于$C_{30}H_{57}NNa_3O_{17}S_2$为836.2761)

[0394] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ5.23(d,J=3.8Hz,1H,H-1'),4.45-4.08(m,8H,H-6'a,H-6'b,H-2,H-5,H-6a,H-6b,H-3,H-5'),4.01(t,J=4.8Hz,1H,H-4),3.83(t,J=9.5Hz,1H,H-3'),3.67(dd,J=9.9,3.5Hz,1H,H-2'),3.58(t,J=9.5Hz,1H,H-4'),3.41-3.10(m,2H,CH_2-N),1.58(br s,2H,CH_2-CH_2-N),1.33(br s,30H,CH_2烷基链),0.93(t,J=6.5Hz,3H,CH_3)。

[0395] ^{13}C NMR(D_2O,101MHz):δ173.4(C-1),100.5(C-1'),82.0(C-4),72.8(C-3'),71.8(C-2),71.6(C-3),71.5(C-2'),70.5(C-5'),69.8(C-5),68.9(C-6),68.9(C-4'),66.7(C-6'),39.5(CH_2-N),32.1-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0396] N-十八烷基-6或6'-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺钠(Mal18monoS)

[0397] 由在快速色谱柱上纯化的粗Mal18diS中获得Mal18的单硫酸化级分。这是在6位硫酸化的N-十八烷基麦芽二糖酰胺及其在6'位硫酸化的同系物的混合物。

[0398] 

[0399] 产率:37%

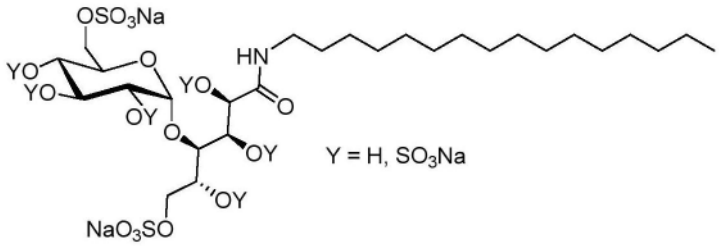
[0400] 外观:白色固体

[0401] 分子式:$C_{30}H_{58}NNaO_{14}S$

[0402] MM:711.84g.mol^{-1}

[0403] N-十八烷基-三-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺三钠(Mal18triS)

[0404] 由在快速色谱柱上纯化的粗Mal18diS中获得Mal18的三硫酸化级分。它是在6和6’位二硫酸化并在二级位置之一包含第三硫酸根的数种N-十八烷基麦芽二糖酰胺化合物的混合物。

[0405] 

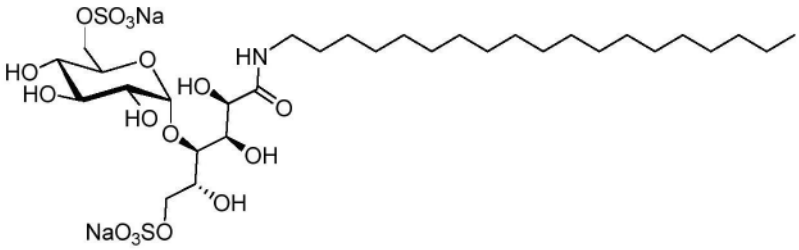
[0406] 产率:5%

[0407] 外观:白色固体

[0408] 分子式:$C_{30}H_{56}NNa_3O_{20}S_3$

[0409] MM:915.91g.mol^{-1}

[0410] N-十九烷基-6,6’-二-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺二钠(Mal19diS)

[0411] 

[0412] 产率:47%

[0413] 外观:白色固体

[0414] 分子式:$C_{31}H_{59}NNa_2O_{17}S_2$

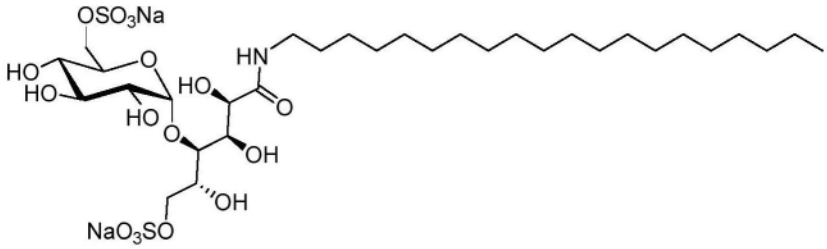
[0415] MM:827.90g.mol^{-1}

[0416] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ5.22(d,J=3.8Hz,1H,H-1’),4.42-4.09(m,8H,H-6’a,H-6’b,H-2,H-5,H-6a,H-6b,H-3,H-5’),4.00(t,J=4.8Hz,1H,H-4),3.82(t,J=9.5Hz,1H,H-3’),3.65(dd,J=9.9,3.5Hz,1H,H-2’),3.57(t,J=9.5Hz,1H,H-4’),3.35-3.15(m,2H,CH_2-N),1.57(br s,2H,CH_2-CH_2-N),1.33(br s,32H,CH_2烷基链),0.91(t,J=6.5Hz,3H,

CH_3)。

[0417] ^{13}C NMR(D_2O,101MHz):δ173.4(C-1),100.5(C-1'),82.0(C-4),72.7(C-3'),71.9(C-2),71.5(C-3),71.5(C-2'),70.5(C-5'),69.8(C-5),68.9(C-6),68.9(C-4'),66.7(C-6'),39.5(CH_2-N),32.1-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0418] N-二十烷基-6,6'-二-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺二钠(Mal20diS)

[0419] 

[0420] 产率:32%

[0421] 外观:白色固体

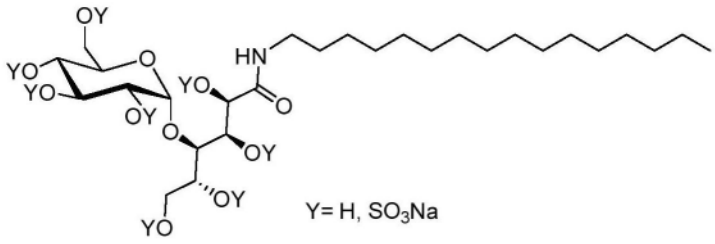
[0422] 分子式:$C_{32}H_{61}NNa_2O_{17}S_2$

[0423] MM:841.32g.mol^{-1}

[0424] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ5.23(d,J=3.8Hz,1H,H-1'),4.42-4.08(m,8H,H-6'a,H-6'b,H-2,H-5,H-6a,H-6b,H-3,H-5'),4.01(t,J=4.8Hz,1H,H-4),3.82(t,J=9.5Hz,1H,H-3'),3.66(dd,J=9.9,3.5Hz,1H,H-2'),3.57(t,J=9.5Hz,1H,H-4'),3.36-3.14(m,2H,CH_2-N),1.57(br s,2H,CH_2-CH_2-N),1.33(br s,34H,CH_2烷基链),0.91(t,J=6.5Hz,3H,CH_3)。

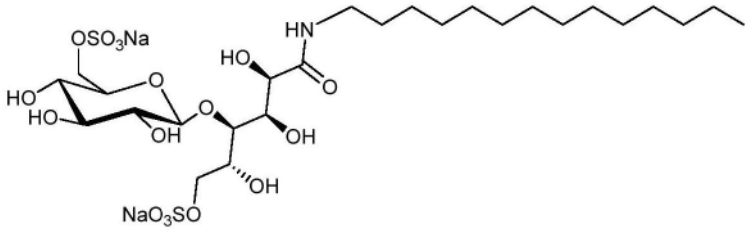
[0425] ^{13}C NMR(D_2O,101MHz):δ173.4(C-1),100.5(C-1'),82.0(C-4),72.8(C-3'),71.8(C-2),71.6(C-3),71.5(C-2'),70.5(C-5'),69.8(C-5),68.9(C-6),68.9(C-4'),66.7(C-6'),39.5(CH_2-N),32.1-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0426] N-十六烷基-过-O-磺基-D-麦芽二糖酰胺二钠盐(Mal16perS)

[0427] 

[0428] 将N-十六烷基-D-麦芽二糖酰胺(Mal16)化合物(200mg,0.34mmol)和20当量的97%SO_3/活性吡啶引入20mL氧化锆碗中,该碗含有80个直径为5mm的氧化锆球,然后引入P7PL Fritsch行星研磨机中。以400rpm研磨混合物,进行48个周期,每个周期5min。然后将30当量$NaHCO_3$(578mg,6.88mmol)引入碗中,并再次研磨混合物,进行6个周期,每个周期5分钟。然后将粗反应溶解在milliQ水中,并使用1000kD截止膜(3x 500mL)进行透析。冷冻干燥后,获得白色固体,并通过高分辨率质谱进行分析。Mal16perS由三、四、五、六、七和八硫酸化N-十六烷基-D-麦芽二糖酰胺的混合物(524mg)组成。

[0429] N-十四烷基-6,6'-二-O-磺基-D-纤维二糖酰胺二钠(Cell14diS)

[0430] 

[0431] 产率:69%

[0432] 外观:白色固体

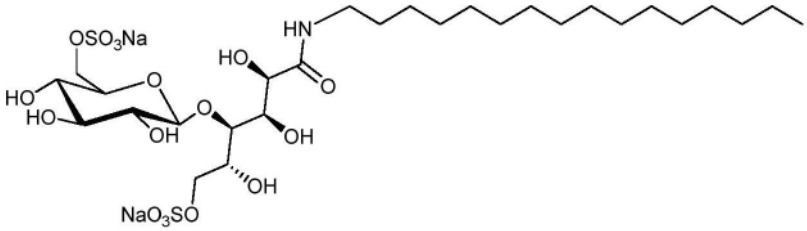
[0433] 分子式:$C_{26}H_{49}NNa_2O_{17}S_2$

[0434] MM:757.22g.mol^{-1}

[0435] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ4.69(d,J=7.9Hz,1H,H-1'),4.44(bs,1H,H-2),4.40-4.33(m,4H,H-6'a,H-6a,H-6b,H-3),4.33-4.10(m,2H,H-6'b,H-5),4.06(dd,J=7.7,3.2Hz,1H,H-4'),3.79-3.71(m,1H,H-5),3.60-3.48(m,2H,H-3',H-4'),3.40(t,J=8.4Hz,1H,H-2'),3.32-3.20(m,2H,CH_2-N),1.61-1.51(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.33(s,22H,CH_2烷基链),0.91(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0436] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ173.5(C-1),102.6(C-1'),80.5(C-4),75.3(C-3'),73.7(C-5'),73.2(C-2'),72.9(C-2),69.5(C-3),69.3(C-4'),68.9(C-5,C-6),66.8(C-6'),39.3(CH_2-N),31.7-22.4(CH_2烷基链),13.8(CH_3)。

[0437] N-十六烷基-6,6'-二-O-磺基-D-纤维二糖酰胺二钠(Cell16diS)

[0438] 

[0439] 产率:59%

[0440] 外观:白色固体

[0441] 分子式:$C_{28}H_{53}NNa_2O_{17}S_2$

[0442] MM:785.82g.mol^{-1}

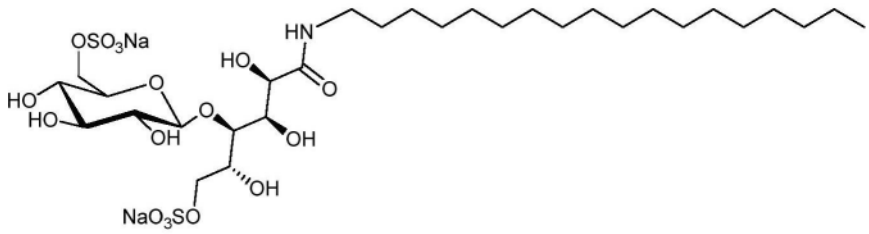
[0443] Rf:0.6(H_2O/CH_3CN:65/35)TLC-C18

[0444] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$808.2472(计算:对于$C_{28}H_{53}NNa_3O_{17}S_2$为808.2448)

[0445] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ4.69(d,J=7.9Hz,1H,H-1'),4.45(bs,1H,H-2),4.40-4.27(m,4H,H-6'a,H-6a,H-6b,H-3),4.24-4.13(m,2H,H-6'b,H-5),4.07(dd,J=7.7,3.2Hz,1H,H-4'),3.77-3.73(m,1H,H-5),3.58-3.48(m,2H,H-3',H-4'),3.44(t,J=8.4Hz,1H,H-2'),3.32-3.18(m,2H,CH_2-N),1.58-1.54(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.33(s,26H,CH_2烷基链),0.93(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0446] ^{13}C NMR(D_2O,101MHz):δ173.5(C-1),102.6(C-1'),80.5(C-4),75.3(C-3'),73.9(C-5'),73.2(C-2'),72.9(C-2),69.7(C-3),69.5(C-4'),68.9(C-5,C-6),67.0(C-6'),39.4(CH_2-N),32.0-22.7(CH_2烷基链),14.0(CH_3)。

[0447] N-十八烷基-6,6'-二-O-磺基-D-纤维二糖酰胺二钠(Cell18diS)

[0448] 

[0449] 产率:66%

[0450] 外观:白色固体

[0451] 分子式:$C_{30}H_{57}NNa_2O_{17}S_2$

[0452] MM:813.88g.mol^{-1}

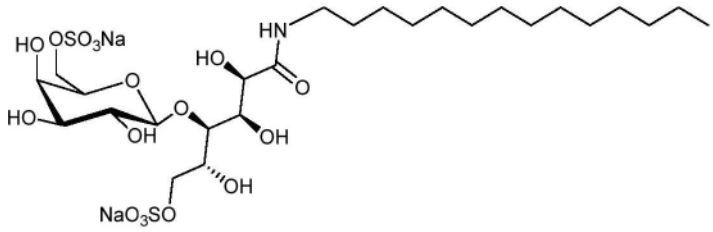
[0453] Rf:0.22(CH_3CN/H_2O:2/8)TLC-C18

[0454] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$836.2803(计算:对于$C_{30}H_{57}NNa_3O_{17}S_2$为836.2761)

[0455] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ4.69(d,J=7.9Hz,1H,H-1'),4.45(bs,1H,H-2'),4.41-4.26(m,4H,H-6'a,H-6a,H-6b,H-3),4.24-4.13(m,2H,H-6'b,H-5),4.07(dd,J=7.7,3.2Hz,1H,H-4'),3.78-3.72(m,1H,H-5),3.60-3.48(m,2H,H-3',H-4'),3.41(t,J=8.4Hz,1H,H-2'),3.32-3.18(m,2H,CH_2-N),1.63-1.52(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.34(s,30H,CH_2烷基链),0.93(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0456] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ173.4(C-1),102.6(C-1'),80.5(C-4),75.3(C-3'),73.9(C-5'),73.2(C-2'),72.8(C-2),69.7(C-3),69.5(C-4'),68.9(C-5,C-6),67.0(C-6'),39.4(CH_2-N),32.0-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0457] N-十四烷基-6,6'-二-O-磺基-乳二糖酰胺二钠(Lac14diS)

[0458] 

[0459] 产率:72%

[0460] 外观:白色固体

[0461] 分子式:$C_{26}H_{49}NNa_2O_{17}S_2$

[0462] MM:757.22g.mol^{-1}

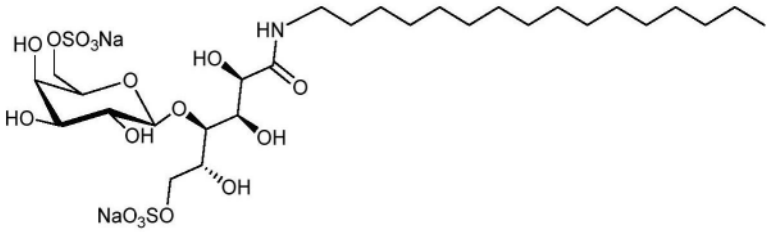
[0463] Rf:0.23(H_2O/CH_3CN:7/3)TLC-C18

[0464] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$780.2146(计算:对于$C_{26}H_{49}NNa_3O_{17}S_2$为780.2135)

[0465] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ4.63(d,J=7.7Hz,1H,H-1'),4.45(bs,1H,H-2),4.42-4.26(m,3H,H-6a,H-6b,H-3),4.24(d,J=5.9Hz,2H,H-6'a,H-6'b),4.20-4.13(m,1H,H-5),4.08(dd,J=8.0,2.9Hz,1H,H-4),4.09-3.94(m,2H,H-4',H-5),3.72(dd,J=10.0,3.3Hz,1H,H-3'),3.62(dd,J=9.9,7.6Hz,1H,H-2'),3.36-3.16(m,2H,CH_2-N),1.63-1.50(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.32(s,22H,CH_2烷基链),0.92(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0466] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ173.5(C-1),103.1(C-1'),80.4(C-4),72.9(C-2),72.8(C-4'),72.4(C-3'),70.9(C-2'),69.7(C-3),69.1(C-5,C-6),68.3(C-5'),66.7(C-6'),39.4(CH_2-N),32.0-22.6(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0467] N-十六烷基-6,6'-二-O-磺基-乳二糖酰胺二钠(Lac16diS)

[0468] 

[0469] 产率:72%

[0470] 外观:白色固体

[0471] 分子式:$C_{28}H_{53}NNa_2O_{17}S_2$

[0472] MM:785.82g.mol^{-1}

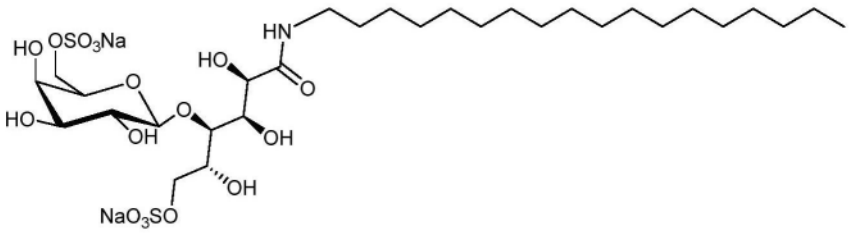
[0473] Rf:0.23(H_2O/CH_3CN:7/3)TLC-C18

[0474] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$808.2473(计算:对于$C_{28}H_{53}NNa_3O_{17}S_2$为808.2448)

[0475] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ4.64(d,J=7.7Hz,1H,H-1'),4.46(bs,1H,H-2),4.43-4.28(m,3H,H-6a,H-6b,H-3),4.24(d,J=5.9Hz,2H,H-6'a,H-6'b),4.20-4.13(m,1H,H-5),4.08(dd,J=8.0,2.9Hz,1H,H-4),4.05-3.99(m,2H,H-4',H-5),3.72(dd,J=10.0,3.3Hz,1H,H-3'),3.63(dd,J=9.9,7.6Hz,1H,H-2'),3.36-3.16(m,2H,CH_2-N),1.64-1.52(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.33(s,26H,CH_2烷基链),0.92(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0476] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ173.5(C-1),103.1(C-1'),80.4(C-4),72.9(C-2),72.8(C-4'),72.4(C-3'),70.9(C-2'),69.7(C-3),69.0(C-5,C-6),68.3(C-5'),66.7(C-6'),39.4(CH_2-N),32.0-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0477] N-十八烷基-6,6'-二-O-磺基-乳二糖酰胺二钠(Lac18diS)

[0478] 

[0479] 产率:64%

[0480] 外观:白色固体

[0481] 分子式:$C_{30}H_{57}NNa_2O_{17}S_2$

[0482] MM:813.88g.mol^{-1}

[0483] Rf:0.36(H_2O/CH_3CN:7/3)TLC-C18

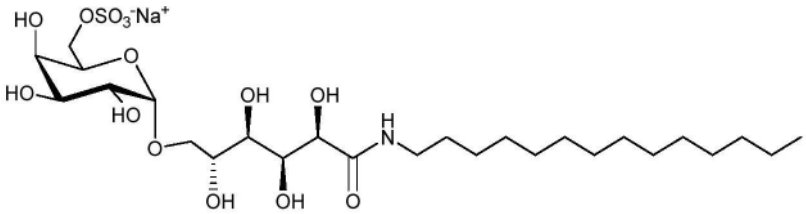
[0484] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$836.2798(计算:对于$C_{30}H_{57}NNa_3O_{17}S_2$为836.2761)

[0485] ^1H NMR(D_2O,400MHz):δ4.65(d,J=7.6Hz,1H,H-1'),4.47(bs,1H,H-2),4.43-4.28(m,3H H-6a,H-6b,H-3),4.24(d,J=5.7Hz,2H,H-6'a,H-6'b),4.18(d,J=7.1Hz,1H,H-5),4.15-4.06(m,1H,H-4),4.07-4.00(m,2H,H-4',H-5),3.73(dd,J=10.1,3.0Hz,1H,H-3'),3.65(dd,J=9.8,7.6Hz,1H,H-2'),3.36-3.16(m,2H,CH_2-N),1.65-1.49(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.34(s,30H,CH_2烷基链),0.93(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0486] ^{13}C NMR(D_2O,101MHz):δ173.5(C-1),103.1(C-1'),80.3(C-4),72.9(C-2),72.8(C-4'),72.4(C-3'),70.9(C-2'),69.7(C-3),68.9(C-5,C-6),68.3(C-5'),66.7(C-6'),

39.5(CH_2-N),32.0-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0487] N-十四烷基-6'-O-磺基-蜜二糖酰胺钠(Me114monoS)

[0488] 

[0489] 产率:48%

[0490] 外观:白色固体

[0491] 分子式:$C_{26}H_{50}NNaO_{14}S$

[0492] MM:655.28g.mol^{-1}

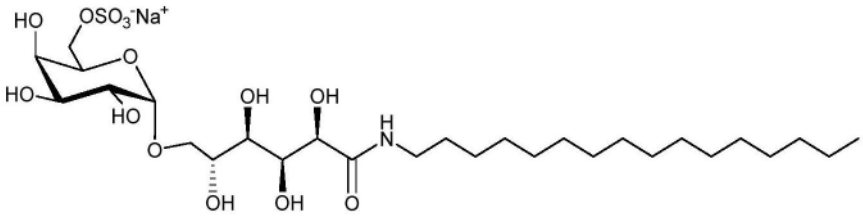
[0493] Rf:0.32(H_2O/CH_3CN:7/3)TLC-C18

[0494] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$678.2750(计算:对于$C_{26}H_{50}NNa_3O_{14}S$为678.2747)

[0495] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ5.03(d,J=3.7Hz,1H,H-1'),4.35(bs,1H,H-2),4.30-4.14(m,4H,H-6'a,H-6'b,H-5',H-3),4.08(d,J=3.2Hz,1H,H-4'),4.01-3.90(m,4H,H-3',H-5,H-4,H-2'),3.75(dd,J=22,7.2Hz,1H,H-6a,H-6b),3.38-3.12(m,2H,CH_2-N),1.66-1.50(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.47-1.21(s,22H,CH_2烷基链),0.92(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0496] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ173.7(C-1),98.4(C-1'),73.6(C-2),72.3(C-4),70.1(C-3),69.6(C-5),69.3(C-3'),69.2(C-4'),68.6(C-6,C-5'),68.4(C-2'),67.4(C-6'),39.4(CH_2-N),32.1-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0497] N-十六烷基-6'-O-磺基-蜜二糖酰胺钠(Me116monoS)

[0498] 

[0499] 产率:53%

[0500] 外观:白色固体

[0501] 分子式:$C_{28}H_{54}NNaO_{14}S$

[0502] MM:683.32g.mol^{-1}

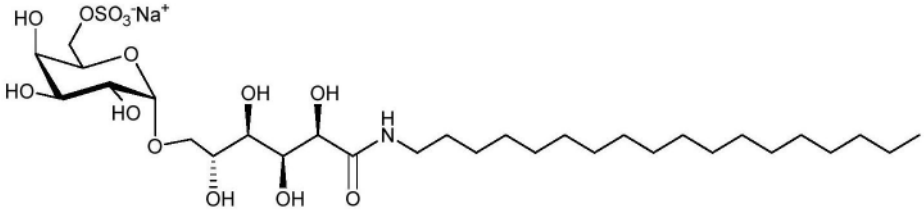
[0503] Rf:0.22(H_2O/CH_3CN:7/3)TLC-C18

[0504] ESI-HRMS:$[M+Na]^+$706.3082(计算:对于$C_{28}H_{54}NNa_3O_{14}S$为706.3060)

[0505] ^1H NMR(400MHz,D_2O):δ5.03(d,J=3.7Hz,1H,H-1'),4.35(bs,1H,H-2),4.29-4.13(m,4H,H-6'a,H-6'b,H-5',H-3),4.08(d,J=3.2Hz,1H,H-4'),4.01-3.90(m,4H,H-3',H-5,H-4,H-2'),3.75(dd,J=22,7.2Hz,1H,H-6a,H-6b),3.37-3.14(m,2H,CH_2-N),1.63-1.52(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.46-1.18(s,26H,CH_2烷基链),0.91(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0506] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ173.7(C-1),98.4(C-1'),73.6(C-2),72.3(C-4),70.1(C-3),69.6(C-5),69.3(C-3'),69.1(C-4'),68.7(C-6),68.6(C-5'),68.4(C-2'),67.4(C-6'),39.4(CH_2-N),32.1-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0507] N-十八烷基-6'-O-磺基-蜜二糖酰胺钠(Me118monoS)

[0508] 

[0509] 产率:38%

[0510] 外观:白色固体

[0511] 分子式:$C_{30}H_{58}NNaO_{14}S$

[0512] MM:711.35g.mol^{-1}

[0513] Rf:0.16(H_2O/CH_3CN:7/3)TLC-C18

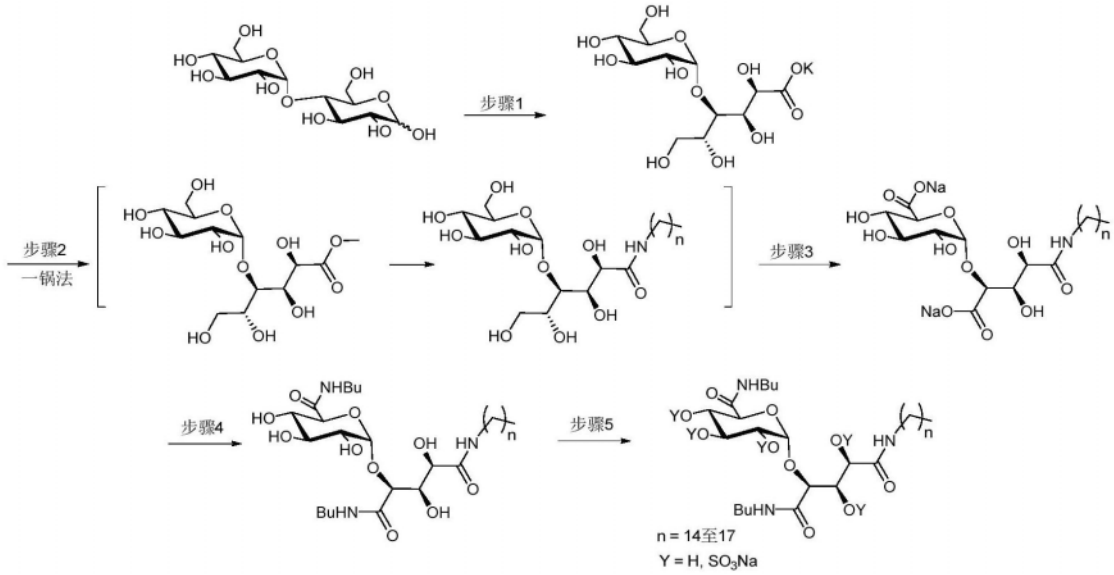
[0514] ESI-HRMS:[M]$^-$688.3569(计算:对于$C_{30}H_{58}NO_{14}S$为688.3578)

[0515] ^{1}H NMR(400MHz,D_2O):δ5.03(d,J=3.7Hz,1H,H-1'),4.35(bs,1H,H-2),4.28-4.14(m,4H,H-6'a,H-6'b,H-5',H-3),4.08(d,J=3.2Hz,1H,H-4'),4.01-3.81(m,4H,H-3',H-5,H-4,H-2'),3.75(dd,J=22,7.2Hz,1H,H-6a,H-6b),3.37-3.14(m,2H,CH_2-N),1.63-1.52(m,2H,CH_2-CH_2-N),1.46-1.18(s,30H,CH_2烷基链),0.91(t,J=6.4Hz,3H,CH_3)。

[0516] ^{13}C NMR(101MHz,D_2O):δ173.7(C-1),98.5(C-1'),73.7(C-2),72.3(C-4),70.1(C-3),69.6(C-5),69.3(C-3'),69.1(C-4'),68.7(C-6),68.6(C-5'),68.4(C-2'),67.4(C-6'),39.4(CH_2-N),32.1-22.7(CH_2烷基链),13.9(CH_3)。

[0517] II-3.氧化葡二糖酰胺的合成

[0518] 根据下面的反应示意图(示意图2)进行氧化葡二糖酰胺的合成。

[0519] 

[0520] 示意图2:氧化葡二糖酰胺的合成途径

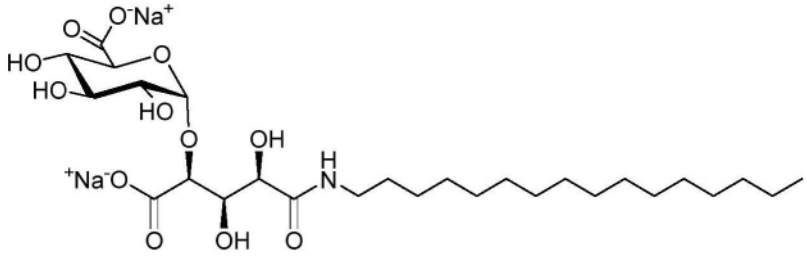
[0521] 氧化葡二糖酰胺的合成涉及三个步骤,其中前两个步骤与硫酸化衍生物的合成相同:异头位置的氧化和一锅酯化-氨解以通过酰胺键接枝脂质链。

[0522] 步骤3:在CH_3CN/H_2O混合物中通过TEMPO/BAIB和$NaHCO_3$体系氧化二糖的伯羟基(48h)(Lu,H.等人,Molecules 2016,21(10),1301/1-1301/15)。NMR和HRMS分析表明,已经发生碳-C6的丧失(通过脱羧),与文献中描述的类似,具有丙酮酸基序(Coggins,A.J.等人,

Nature Chemistry 2017,9(4),310-317;Lee Y等人,Chem Commun 2014,50)。

[0523] 对于Mal16diBu-perS化合物,还需要两个额外的步骤:酯化-氨解(步骤4),然后是过硫酸化(步骤5)(示意图2中Bu=丁基)。

[0524] N-十六烷基-D-葡萄糖醛酸基-(α-1,4)-D-木酮糖酰胺(Mal16diOx)

[0525] 

[0526] 将N-十六烷基-麦芽二糖酰胺衍生物(0.60mmol,350mg)溶解在乙腈(4mL)和mQ H_2O(4mL)的混合物中。在0℃搅拌混合物并加入TEMPO(1.20mmol,187mg),然后加入BAIB(6.02mmol,1.94g)和$NaHCO_3$(3.01mmol,253mg)。然后,在室温搅拌混合物72h。加入乙醇(10mL)并用EtOAc(100mL)和mQ H_2O(100mL)稀释反应介质。分离水相并用EtOAc(2×100mL)萃取,然后冷冻干燥。然后通过反相色谱法纯化粗反应物。洗脱梯度为H_2O/MeCN:20min中100/0至0/100。蒸发并冷冻干燥后,获得白色粉末形式的Mal16diOx化合物,产率为8%(31mg)。

[0527] $M:623.65g.mol^{-1}$

[0528] 式:$C_{27}H_{47}NNa_2O_{12}$

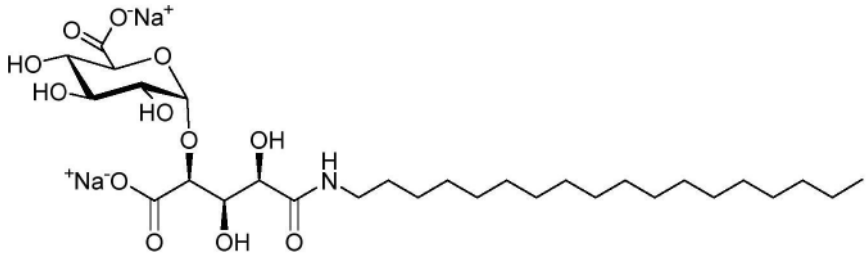
[0529] Rf:0.51(H_2O/MeCN:5/5)

[0530] HRMS:602.3150(对于$C_{27}H_{49}NO_{12}Na$发现为602.3152)

[0531] ^1H NMR(D_2O,400MHz):5.14(m,1H,$H_{Glc1'}$),4.20(m,3H,H_{Glc2},H_{Glc3}和$H_{Glc5'}$),4.10(d,1H,J=6.0Hz,H_{Glc4}),3.93(t,1H,J=9.4Hz,$H_{Glc3'}$),3.65(d,1H,J=9,6Hz,$H_{Glc2'}$),3.50(t,1H,J=9.5Hz,$H_{Glc4'}$),3.22(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.55(m,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.32(m,26H,CH_2烷基链),0.90(t,3H,J=6.2Hz,CH_3烷基链)

[0532] ^{13}C NMR(D_2O,100MHz):177.22(C_{Glc5}),176.93($C_{Glc6'}$),173.68(C_{Glc1}),100.66($C_{Glc1'}$),83.33(C_{Glc4}),72.84(C_{Glc2}或C_{Glc3}),72.55(C_{Glc2}或C_{Glc3}),72.44($C_{Glc3'}$),72.07($C_{Glc4'}$),71.59($C_{Glc5'}$),71.29($C_{Glc2'}$),39.38($C\underline{H}_2$-NH),32.09(CH_2烷基链),30.16-29.11(CH_2烷基链),27.14(CH_2烷基链),22.71(CH_2烷基链),13.86(CH_3烷基链)。

[0533] N-十八烷基-D-葡萄糖醛酸基-(α-1,4)-D-木酮糖酰胺(Mal18diOx)

[0534] 

[0535] 将N-十六烷基-麦芽二糖酰胺衍生物(0.82mmol,500mg)溶解在乙腈(5mL)和mQ H_2O(5mL)的混合物中。在0℃搅拌混合物并加入TEMPO(1.64mmol,256mg),然后加入BAIB(8.20mmol,2.64g)和$NaHCO_3$(4.10mmol,344mg)。然后,在室温搅拌混合物48h。加入乙醇(5mL)并用EtOAc(200mL)和mQ H_2O(200mL)稀释反应介质。分离水相并用EtOAc(2×200mL)

萃取,然后冷冻干燥。然后通过反相色谱法纯化粗反应物。洗脱梯度为H_2O/MeCN:20min中100/0至0/100。蒸发并冷冻干燥后,获得白色粉末形式的Mal18diOx化合物,产率为17%(90mg)。

[0536] M:651.70g.mol^{-1}

[0537] 式:$C_{29}H_{51}NNa_2O_{12}$

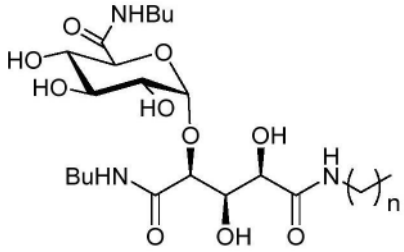
[0538] Rf:0.48(H_2O/MeCN:5/5)

[0539] HRMS:630.3466(对于$C_{29}H_{53}NO_{12}Na$发现为630.3465)

[0540] ^{1}H NMR(D_2O,400MHz):5.14(m,1H,$H_{Glc1'}$),4.20(m,3H,H_{Glc2},H_{Glc3}和$H_{Glc5'}$),4.10(d,1H,J=6.0Hz,H_{Glc4}),3.94(t,1H,J=8.7Hz,$H_{Glc3'}$),3.66(d,1H,J=9,6Hz,$H_{Glc2'}$),3.50(t,1H,J=9.5Hz,$H_{Glc4'}$),3.21(m,2H,$C\underline{H}_2$-NH),1.54(m,2H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.32(m,30H,CH_2烷基链),0.88(t,3H,J=6.2Hz,CH_3烷基链)

[0541] ^{13}C NMR(D_2O,100MHz):177.31(C_{Glc5}),176.94($C_{Glc6'}$),173.68(C_{Glc1}),100.71($C_{Glc1'}$),82.38(C_{Glc4}),72.80(C_{Glc2}或C_{Glc3}),72.55(C_{Glc2}或C_{Glc3}或$C_{Glc3'}$),72.04($C_{Glc4'}$),71.74($C_{Glc5'}$),71.23($C_{Glc2'}$),39.43($C\underline{H}_2$-NH),32.24(CH_2烷基链),30.68-29.19(CH_2烷基链),27.35(CH_2烷基链),22.82(CH_2烷基链),13.84(CH_3烷基链)。

[0542] N-十六烷基-(D-葡萄糖醛酸基-(α-1,4)-D-木酮糖酰胺)二丁酰胺(Mal16diBu)

[0543] 

[0544] 将N-十六烷基-D-葡萄糖醛酸基-(α-1,4)-D-木酮糖酰胺(0.127mmol,79mg)和H_2SO_4/SiO_2 22重量%(0.305mmol,136mg)加入氧化锆碗中,该碗含有80个直径为5mL的氧化锆球。加入MeOH(0.15mL)。在行星球磨机(P7PL)中以500rpm研磨介质,进行8个周期,每个周期5min并有反向模式的2min间隙。获得的甲酯在相同的研磨条件下直接参与后续反应。将99.5%丁胺(0.381mmol,38μL)加入碗中,然后加入MeOH(0.15mL)。在行星球磨机(P7PL)中以500rpm研磨介质,进行8个周期,每个周期5min并有反向模式的2min间隙。将粗反应物溶解在MeOH中,进行过滤以除去H_2SO_4/SiO_2并蒸发。通过自动快速色谱法在15g SiO_2色谱柱上纯化残留物。洗脱梯度为:EtOAc/MeOH:30min中100/0至80/20。蒸发并冷冻干燥后,获得白色粉末形式的Mal16diBu化合物,产率为40%(35mg)。

[0545] M:689.93g.mol^{-1}

[0546] 式:$C_{35}H_{67}N_3O_{10}$

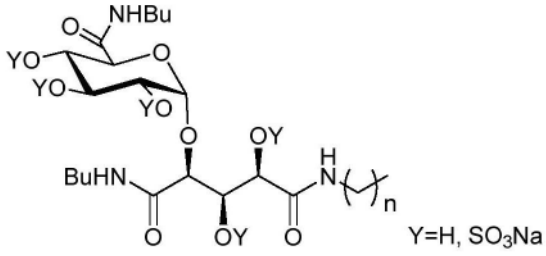
[0547] Rf:0.57(EtOAc/MeOH:9/1)

[0548] ^{1}H NMR(600MHz,吡啶-d_5,):8.34(m,3H,NH),5.70(d,1H,J=3.2Hz,$H_{Glc1'}$),5.22(d,1H,J=5.1Hz,H_{Glc2}),5.03(m,8H,H_{Glc3},H_{Glc4},Hglc5',$_{Glc5'}$和OH),4.59(t,1H,J=9.1Hz,$H_{Glc3'}$),4.27(t,1H,J=9.4Hz,$H_{Glc4'}$),4.13(dd,1H,J=9,5Hz,J=3.4Hz,$H_{Glc2'}$),3.45(m,5H,$C\underline{H}_2$-NH),3.27(s^x,1H,J=6.5Hz,$C\underline{H}_2$-NH),1.53(m,6H,$C\underline{H}_2$-CH_2-NH),1.24(m,30H,CH_2十六烷基胺和丁胺链),0.86(t,3H,J=6.1Hz,CH_3十六烷基胺和丁胺链),0.79(m,6H,CH_3十六烷基

胺和丁胺链)

[0549] ^{13}C NMR(150MHz,吡啶-d_5,):173.53(C_{Glc1}),171.75(C_{Glc5}或$C_{Glc6'}$),171.71(C_{Glc5}或$C_{Glc6'}$),103.19($C_{Glc1'}$),84.74(C_{Glc4}),74.61($C_{Glc3'}$),74.16($C_{Glc4'}$),74.10(C_{Glc2}),73.91(C_{Glc3}或$C_{Glc5'}$),73.22($C_{Glc2'}$),39.85($\underline{C}H_2$-NH丁基链),39.68($\underline{C}H_2$-NH丁基链),39.47($\underline{C}H_2$-NH十六烷基链),32.09(CH_2十六烷基链),32.38(CH_2丁基链),32.36(CH_2丁基链),30.58-29.98(CH_2十六烷基链),27.66(CH_2十六烷基链),23.31(CH_2十六烷基链),20.79(CH_2丁基链),20.69(CH_2丁基链),14.65(CH_3十六烷基链),14.26(CH_3丁基链),14.24(CH_3丁基链)

[0550] N-十六烷基-(D-葡萄糖醛酸基-(α-1,4)-D-木酮糖酰胺)二丁酰胺过硫酸盐(Mal16diBu-perS)

[0551] 

[0552] 按照与获得Mal16perS所述相同的程序获得Mal16diBu-perS衍生物。将Mal16diBu化合物(35mg,0.051mmol)和16当量的97%SO_3/活性吡啶引入20mL氧化锆碗中,该碗含有80个直径为5mm的氧化锆球,然后引入P7PL Fritsch行星研磨机中。以400rpm研磨混合物,进行48个周期,每个周期5min。然后将16当量$NaHCO_3$(69mg,0.81mmol)引入碗中,并再次研磨混合物,进行6个周期,每个周期5分钟。然后将粗反应物溶解在milliQ水中,并使用1000kD截止膜(3x 500mL)进行透析。获得Mal16diBu-perS(52mg),其为N-十六烷基-(D-葡萄糖醛酸基-(α-1,4)-D-木酮糖酰胺)二丁酰胺三、四和五硫酸盐的混合物的形式。

[0553] III.生物数据

[0554] 1)Tau蛋白异常磷酸化的体外测试

[0555] Tau蛋白磷酸化是调节Tau活性和功能的最常见的翻译后修饰。使用最长的Tau亚型(4R2N,441个氨基酸),其含有85个潜在的磷酸化位点。Tau蛋白的体外磷酸化一方面是通过诱导完成的(图5),另一方面是根据LG2A分子和肝素之间的竞争过程完成的,该过程通常用于在体外诱导异常Tau磷酸化(图3、图4、图6、图7、图8、图9和图10)。

[0556] 对于异常Tau磷酸化测试,使用了GSK3β,一种在阿尔茨海默病(AD)患者脑中在中心参与该过程的激酶。通过蛋白质印迹技术,使用在AD受试者脑或脑脊液中识别异常磷酸化位点的特异性抗体(如识别苏氨酸181(Thr181)的AT270抗体,识别丝氨酸396和404(Ser396/Ser404)的PHF1抗体,和识别Ser199/Ser202/Thr205位点的AT8抗体),可以分析在AD特征性位点通过GSK3b发生的Tau磷酸化。

[0557] 实验方案

[0558] 反应介质的组成如下:

[0559] 通过诱导:在48μM的ATP(Sigma-Aldrich)和蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich,1/100)的存在下,在缓冲液(40mM Tris[pH 7.5],20mM $MgCl_2$,0.1mg/mL BSA和0.1mM DTT)中,Tau蛋白(40μg/mL)(Millipore)被4ng/mL的GSK3β酶(Promega)磷酸化。加入12μg/mL的LG2A分子,并将其效果与通过加入相同浓度的肝素观察到的那些效果进行比较。

[0560] 通过竞争:在48μM的ATP(Sigma-Aldrich)和蛋白酶抑制剂(Sigma-Aldrich,1/100)的存在下,在上述缓冲液中,Tau蛋白(40μg/mL)被4ng/mL的GSK3β酶(Promega)磷酸化。评估了LG2A分子(60μg/mL)与肝素(12μg/mL;Sigma-Aldrich)竞争的能力。因此,如果在该分子存在下的信号小于单独用肝素获得的信号,则将该分子定义为异常Tau磷酸化的"保护者"。

[0561] 在两种体系(诱导或竞争)中,在37℃在上述不同要素的存在下搅拌孵育Tau蛋白。通过在孵育1.5h、3h和6h时取8μL样品来监测反应动力学。将上样缓冲液(Euromedex)和β-巯基乙醇(Sigma-Aldrich)加入每个样品中。然后将样品储存在-20℃,直至通过蛋白质印迹进行分析。

[0562] 在95℃加热5分钟使样品变性后,将样品与分子量标记物(Precision Plus Protein™ Dual Color Standard;BIO-RAD)同时沉积在10%丙烯酰胺凝胶上,该凝胶放置在含有迁移缓冲液(0.25M Tris;1.6M甘氨酸;20%SDS;pH 8.6)的电泳槽中。

[0563] 用于该磷酸化实验和随后的蛋白质印迹的对照是:

[0564] -"天然Tau"蛋白,即非磷酸化Tau蛋白。

[0565] -在没有肝素的情况下单独被GSK3b磷酸化的Tau蛋白。

[0566] -在肝素的存在下被磷酸化的Tau蛋白,表示为"Tau+肝素"。

[0567] -对应于在肝素的存在下被磷酸化3h的Tau蛋白的"外部标准"。该标准是在LG2A化合物的存在下,在独立于磷酸化实验的实验中进行的。它确保蛋白质印迹正确进行。

[0568] 在恒定的80V进行迁移,直至蛋白到达分离凝胶中,其通过上样缓冲液中含有的溴酚蓝的迁移前沿可视化,然后在恒定的120V进行迁移,直至迁移前沿到达凝胶的另一端。

[0569] 在迁移结束时,使用"Trans-blot Turbo RTA Transfer Kit,PVDF"(Bio-Rad)在聚偏氟乙烯(PVDF)膜上进行半干式转移。事先在甲醇(VWR)中激活PVDF膜,然后置于试剂盒中提供的转移缓冲液中。

[0570] 在25V进行转移10分钟。

[0571] 蛋白转移到PVDF膜上完成后,即在室温搅拌下,在含有3%脱脂奶粉(Merck Millipore)和0.1%吐温20(VWR)的PBS中进行饱和步骤1h。

[0572] 然后在+4℃搅拌下,在含有对Tau磷酸化位点具有特异性的一抗(AT270,ThermoScientific或S199-202,Millipore)的PBS,0.1%吐温和1%牛奶的溶液中,孵育膜过夜。

[0573] 在所选择的一抗中孵育PVDF膜后,在PBS和0.1%吐温中,在搅拌下连续洗涤膜3次,每次5分钟,并在室温搅拌下,在含有稀释二抗(Jackson Immuno-Research)的1X PBS,0.1%吐温和1%牛奶的溶液中孵育膜1h。

[0574] 用PBS和0.1%吐温洗涤3次,每次5分钟,然后用PBS洗涤一次后,使用"Immobilon Forte Western HRP Substrate"试剂盒(Merck Millipore)揭示膜,并通过LI-COR设备(Odyssey)记录信号。

[0575] 结果

[0576] 在没有肝素(高度硫酸化HS)的情况下,在AD特征性位点没有观察到Tau磷酸化(Sepulveda-Diaz等人,2015)(图2)。然而,在肝素(高度硫酸化HS)的存在下,所有Tau位点发生磷酸化(p-Tau),再现了Tau蛋白病建立之前在细胞中发生的异常过度磷酸化过程。

[0577] 使用体外测试,已经表明从1.5h开始并直至反应6h,合成的二硫酸化C16麦芽二糖酰胺(Mal16diS)进入与肝素(Hep)的完全竞争,阻止肝素在分析的阿尔茨海默病特征性的两个异常Tau磷酸化位点(AT270和Ser 199/202)诱导Tau磷酸化。因此,体外反应3h后,二硫酸化C16麦芽二糖酰胺(Mal16diS)的存在抑制了由阿尔茨海默病特征性抗体(AT270和Ser199/202)揭示的Tau异常磷酸化(P-Tau)。结果示于图3中。

[0578] 同样,在反应1.5、3和6h后,合成的二硫酸化C18麦芽二糖酰胺(Mal18diS)进入与肝素(Hep)在Tau AD位点(AT270)上的完全竞争。因此,反应3h后,二硫酸化C18麦芽二糖酰胺(Mal18diS)的存在抑制了由阿尔茨海默病特征性抗体(AT270和pSer199/202)揭示的Tau异常磷酸化(P-Tau)(图4)。

[0579] 然而,当研究麦芽二酰胺化合物(其烃链(R_1)包含14至20个碳(Mal14diS至Mal20diS))自身诱导Tau异常磷酸化(即在没有肝素的情况下)的能力时,表明了化合物的烃链越长,则其诱导p-Tau越多(图5)。

[0580] 因此,对于保护Tau免于异常磷酸化的相同能力,优选选择脂质链长度最短的化合物。

[0581] 二糖的影响

[0582] 为了研究二糖性质的影响,合成了烃链包含14至18个碳的类似二硫化纤维二糖酰胺和乳二糖酰胺衍生物。

[0583] 在通过GSK3b发生Tau磷酸化1.5至6h时,在进入与肝素的全面竞争的能力方面,如图6对于反应3h所示,只有包含16碳和18碳烃链的纤维二糖酰胺和乳二糖酰胺化合物(分别为“Cell16diS”、“Cell18diS”、“Lac16diS”和“Lac18diS”)显示出与包含16碳烃链(“Mal16diS”)和18碳烃链(“Mal18diS”)的二硫化麦芽二糖酰胺相似的结果。

[0584] 包含14、16或18碳烃链的蜜二糖酰胺衍生物(分别为“Mel14monoS”、“Mel16monoS”和“Mel18monoS”)不与肝素竞争发生异常Tau磷酸化(图6)。因此,通过这些后者衍生物,似乎单个阴离子电荷或二糖的构象不利于与肝素竞争并防止Tau异常磷酸化。

[0585] 硫酸化的影响

[0586] 合成了包含16或18碳烃链的类似于麦芽二糖酰胺的氧化化合物,以估计化合物的糖部分硫酸化对于其抗p-Tau活性的必要性。据观察,包含16碳烃链的氧化化合物(“Mal16diOx”)在防止Tau磷酸化方面不如具有相同链长的二硫酸化麦芽二糖酰胺化合物(Mal16diS)有效(图7)。与包含18碳烃链的二硫化类似物(“Mal18diS”)不同,包含18碳烃链的氧化化合物(“Mal18diOx”)不与肝素竞争。

[0587] 因此,二糖的硫酸化对于与肝素(阿尔茨海默病中存在的高硫酸化HS的原型)竞争和防止Tau异常磷酸化至关重要。

[0588] 为了阐明二糖硫酸化的重要性,合成了烃链含有16或18个单硫酸化碳(分别为“mal16monoS”和“mal18monoS”)或三硫酸化碳(分别为“mal16triS”和“mal18triS”)的麦芽二糖酰胺衍生物。

[0589] 化合物“Mal16monoS”、“Mal16triS”、“mal18monoS”和“mal18triS”显示(i)当麦芽二糖酰胺失去硫酸根时(“Mal16monoS”和“Mal18 monoS”),使Tau免于肝素诱导的磷酸化的保护能力略有丧失,以及(ii)当化合物获得硫酸根时(“Mal16triS”和“Mal18triS”),这种保护Tau的能力保持不变(图8)。

[0590] 此外,当16碳麦芽二糖酰胺化合物被过硫酸化时(Mal16perS),它保留了保护Tau免于肝素诱导的异常磷酸化的能力,正如其相同脂质链长度的二硫酸化同系物(图9)。

[0591] 2)诱导Tau蛋白聚集

[0592] 评估了16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺化合物"Mal16diS"诱导Tau蛋白聚集(神经原纤维缠结发生的另一个步骤)的能力。

[0593] 因此,在测试中评估了该分子在体外诱导或抑制Tau聚集的能力(图10),该测试描述于Sui等人,2015的文章中,其中通过掺入硫黄素T(ThT)监测Tau聚集。

[0594] 实验方案

[0595] 用供应商Tebu-bio定制合成的Tau蛋白(4R2N亚型,441个氨基酸)(19年4月17日制造;初始浓度:2.47mg/mL)在黑色96孔板中进行聚集测试,最终体积为100μL,并在不同条件下进行:

[0596] • 单独的Tau蛋白(0.71mg/mL)在缓冲液(40mM Tris[pH 7.45],200mM NaCl,2mM EDTA和1mM DTT)中的溶液。

[0597] • 在0.35mg/mL(质量比为2/1)或0.175mg/mL(质量比为4/1)肝素的存在下,Tau蛋白(0.71mg/mL)在上述缓冲液中的溶液。

[0598] • 在0.175mg/mL(质量比为4/1)Mal16diS的存在下,Tau蛋白(0.71mg/mL)在上述缓冲液中的溶液。

[0599] 立即将50μM的100μL ThT(Sigma-Aldrich)加入每个孔中,然后在37℃搅拌孵育板。通过监测硫黄素的掺入导致其荧光发射,可以监测Tau蛋白聚集体的形成,并通过Infinite M1000荧光光谱仪(Tecan)在0、24、40、48和71h在λExc450nm/λEm 510nm处读取来进行。

[0600] 结果

[0601] 直至反应72h,与肝素相比,测试的Mal16diS化合物更弱地诱导Tau蛋白聚集(图10)。

[0602] 3)Tau异常磷酸化的细胞内测试

[0603] 在细胞内测试Tau磷酸化之前,对神经母细胞瘤细胞系SH-SY5Y进行了细胞毒性研究。

[0604] a)细胞毒性研究

[0605] 对在体外Tau磷酸化测试中显示出最佳潜力的分子:具有16个碳和18个碳的二硫酸化麦芽二糖酰胺进行了细胞毒性测试。为了根据这些分子在细胞环境中的浓度评估其毒性水平,在细胞内磷酸化测试的上游进行MTT测试(3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴化物)(图11和图12)。

[0606] 实验方案

[0607] SH-SY5Y(ATCC-CRL-2266)在37℃和5%CO_2的培养箱中,在含有10%胎牛血清(FBS)和1%青霉素/链霉素的Dulbecco改良Eagle完全培养基(DMEM-GlutaMAX™,Life Technologies)中发育。

[0608] 为此,以200000个细胞/孔的细胞密度在6孔板中培养SH-SY5Y细胞,并使用视黄酸(10μM,Sigma Aldrich)分化5天。在第6天,细胞与不同浓度(0.1、1、10或100μg/mL)的LG2A分子接触,最终体积为2mL。24小时后,将MTT(5μg/mL;Sigma-Aldrich)加入细胞培养基中,

在37℃保持2小时。然后除去培养基,并将200μL纯二甲基亚砜(DMSO,Sigma-Aldrich)加入每个孔中。将每个孔的全部内容物转移至96孔板中,并使用Infinite M1000荧光光谱仪(Tecan)在562nm处测量吸光度。

[0609] 结果

[0610] 从最低剂量0.1μg/mL至最高剂量100μg/mL,16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺(Mal16diS)对SH-SY5Y没有细胞毒性(图11)。

[0611] 类似地,已经表明从最低剂量0.1μg/mL至最高剂量100μg/mL,18碳二硫酸化麦芽二糖酰胺(Mal18diS)对SH-SY5Y没有细胞毒性(图12)。

[0612] 此外,与仅接受LPS的相同细胞(数据未显示)相比,当以0.1、1或10μg/mL的剂量加入化合物时,通过白细胞介素6测定,在用脂多糖(LPS)(50ng/mL)刺激后,未发现测试的化合物诱导HMC3细胞的额外炎症状态。

[0613] b)SH-SY5Y系中的细胞内测试

[0614] 在此使用了Gly-CRRET实验室文章中描述的SH-SY5Y细胞系上的Tau磷酸化诱导模型(Sepulveda-Diaz等人,2015)。

[0615] 实验方案

[0616] 简而言之,将SH-SY5Y细胞接种在6孔板中,并使用视黄酸(10μM,Sigma Aldrich)分化5天。在第6天,与未接收分子的孔同时,将细胞置于不同浓度(1、10或100μg/mL)的Mal16diS和Mal18diS分子的存在下,最终体积为2mL。24小时后,除去分子,并将应激诱导剂(H_2O_2,Sigma Aldrich)加入细胞培养基中30分钟。然后用1X PBS冲洗细胞,然后在RIPA缓冲液(Thermo Fisher)中裂解并回收。然后根据上述相同程序,通过蛋白质印迹分析来自细胞的蛋白提取物(10μg)。

[0617] 在此研究的Tau磷酸化位点是S262位点(Thermo Fisher),归一化为GAPDH蛋白(Sigma Aldrich)的表达。使用LI-COR设备的Odyssey软件对条带进行定量,以允许计算每种条件下的p-Tau/GAPDH比率。然后将对于每个浓度的分子获得的比率表示为对于对照细胞(即未被分子处理)获得的比率的百分比。因此,小于100%的值对应于分子在该Tau磷酸化诱导细胞模型中提供的保护。

[0618] 对于“Mal16diS”和“Mal18diS”分子的每个分子剂量,重复实验至少4次,而对于“Cell16diS”和“Lac16diS”分子,重复实验至少两次。重复的平均值和标准差示于图13至图16中;通过t检验的方式将对于每个剂量获得的每个值与未加入分子的对照值进行比较。p值<0.05和<0.001的统计差异分别用“*”和“***”表示。

[0619] 结果

[0620] 与未处理细胞相比,测试的两个最低剂量的16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺(“mal16diS”)(1和10μg/mL)允许SH-SY5Y细胞中Tau磷酸化显著减少(p<0.01)30和40%(图13)。

[0621] 在18碳二硫酸化麦芽二糖酰胺(“mal18diS”)中,随着化合物浓度的增加,观察到Tau磷酸化降低幅度更大。使用100μg/mL的最高剂量,与未处理细胞相比,观察到Tau磷酸化减少高达60%(p<0.001);最低剂量提供的免于氧化应激诱导的Tau磷酸化的保护接近30%(图14)。

[0622] 对于1μg/mL的最低剂量,与未处理细胞相比,16碳二硫酸化纤维二糖酰胺

(“cell16diS”)提供了SH-SY5Y细胞中Tau磷酸化降低大约34％;然而,该差异在统计学上没有差异。对于10和100μg/mL的该化合物的剂量,情况相同,其中对Tau的保护分别为17和20％(图15)。

[0623] 最后,对于16碳二硫酸化乳二糖酰胺(“lac16diS”),1μg/mL的最低剂量提供了SH-SY5Y细胞中Tau磷酸化几乎显著(p＝0.069)降低25％。该化合物的10μg/mL剂量未被测试。与未处理对照细胞相比,该分子100μg/mL的最高剂量提供的免于Tau蛋白磷酸化的保护为54％(p<0.01)(图16)。

[0624] c)rTg4510小鼠皮质细胞中的细胞内测试

[0625] 与先前的细胞模型不同,针对人Tau蛋白(P301L)突变的来自rTg4510小鼠的皮质细胞被用作没有效应子的诱导而表达Tau蛋白病的原代细胞模型(Santa Cruz等人,Science,2005)。

[0626] 实验方案

[0627] 从E16阶段的表达P301L突变的小鼠胚胎中提取皮质细胞,并在6孔板中培养。在第14天(中度Tau磷酸化)或第18天(重度Tau磷酸化),与来自同一胚胎的细胞不接收分子的孔同时,将从同一胚胎中提取的细胞置于不同浓度(0.1或1μg/mL)的Mal16diS分子的存在下,最终体积为2mL,持续24h。

[0628] 用分子处理24h后,用1X PBS冲洗细胞,然后在RIPA缓冲液(Thermo Fischer)中裂解并回收。然后根据上述相同程序,通过蛋白质印迹分析来自细胞的蛋白提取物(10μg)。

[0629] 在此研究的Tau磷酸化位点是S262位点(Thermo Fisher),归一化为总Tau蛋白(K9JA,Dako)的表达。使用LI-COR设备的Odyssey软件对条带进行定量,以允许计算每种条件下的p-Tau/Tau比率。然后将对于每个浓度的分子获得的比率表示为对于未被分子处理的细胞获得的比率的百分比。因此,小于100％的值对应于分子在该Tau磷酸化表达细胞模型中提供的保护。

[0630] 对于每个剂量的“Mal16diS”分子,重复实验至少三次。重复的平均值和标准差示于图17和图18中;用t检验将对于每个剂量获得的每个值与未加入分子的细胞的值进行比较。p值<0.01和<0.001的统计差异分别用“**”和“***”表示。

[0631] 结果

[0632] 与未处理细胞相比,当rTg4510小鼠皮质细胞中的Tau磷酸化为中度(J14)时,测试的两个剂量的16碳二硫酸化麦芽二糖酰胺(“mal16diS”)(0.1和1μg/mL)均允许该Tau磷酸化显著减少48％(p<0.01)和64％(p<0.001)(图17,n＝4)。

[0633] 当细胞在处理前表现出更重度磷酸化(J18)时,皮质细胞原代培养物中磷酸化的这种减少得以保持,尤其是对于0.1和1μg/mL剂量的“mal16diS”分别减少39％和53％(图18,n＝4)。

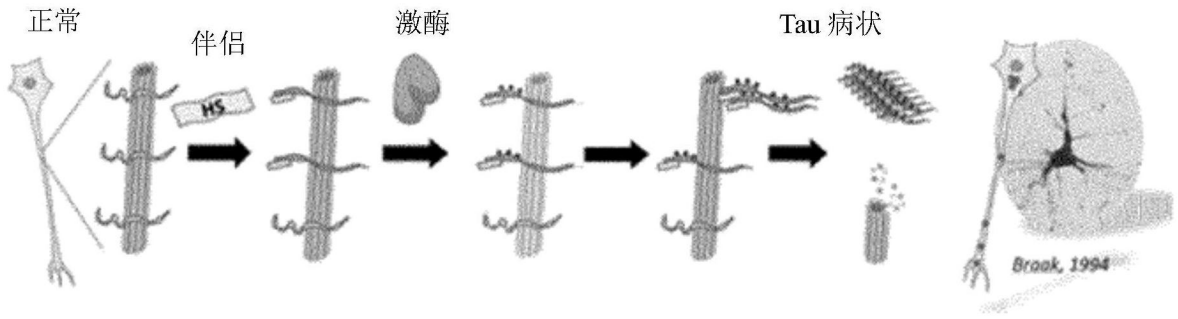

正常
伴侣
HS
激酶
Tau 病状
Braak, 1994

图1

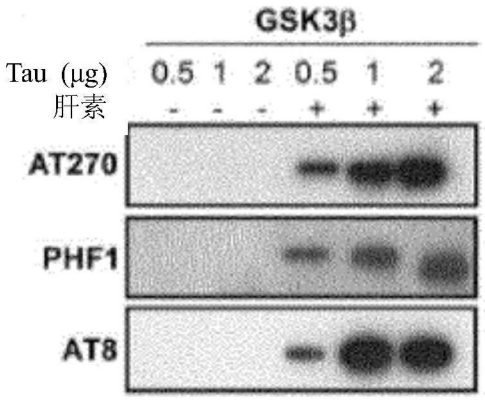

GSK3β
Tau (μg) 0.5 1 2 0.5 1 2
肝素 - - - + + +
AT270
PHF1
AT8

图2

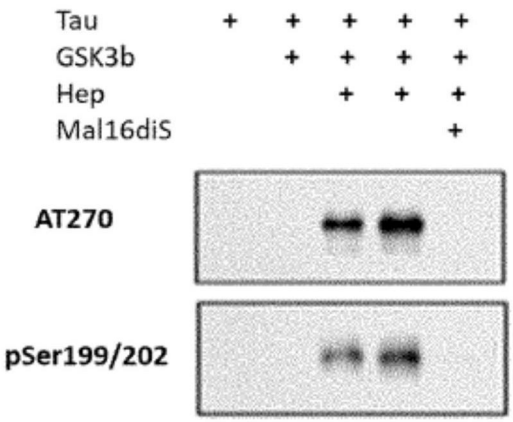

Tau + + + + +
GSK3b + + + +
Hep + + +
Mal16diS +
AT270
pSer199/202

图3

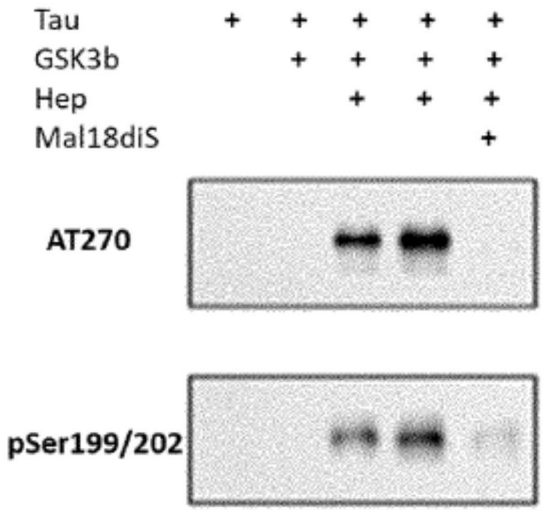

Tau + + + + +
GSK3b + + + +
Hep + + +
Mal18diS +
AT270
pSer199/202

图4

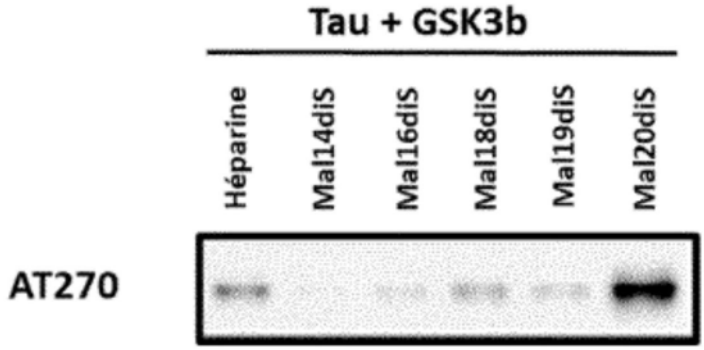

Tau + GSK3b
Héparine
Mal14diS
Mal16diS
Mal18diS
Mal19diS
Mal20diS
AT270

图5

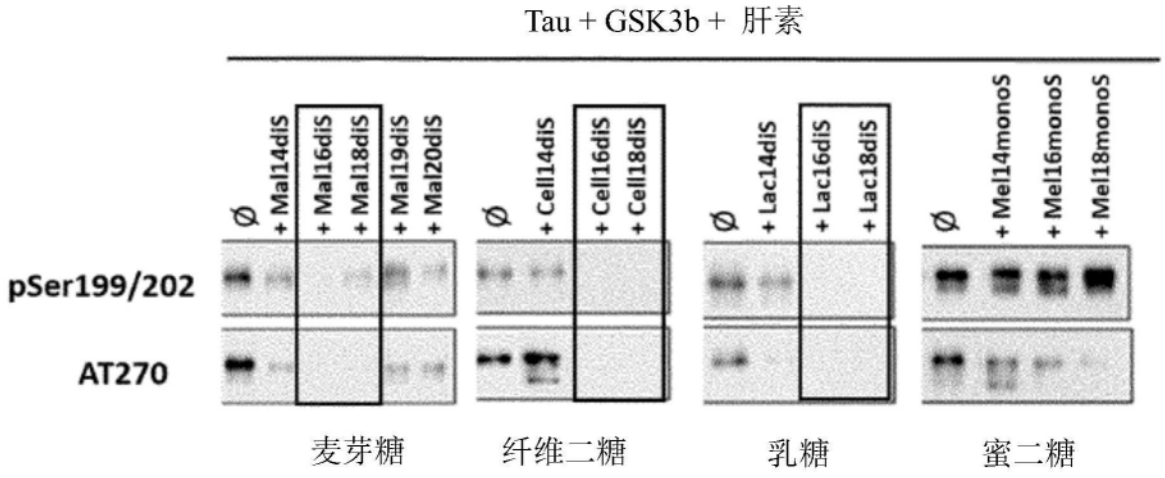

Tau + GSK3b + 肝素
∅
+ Mal14diS
+ Mal16diS
+ Mal18diS
+ Mal19diS
+ Mal20diS
∅
+ Cell14diS
+ Cell16diS
+ Cell18diS
∅
+ Lac14diS
+ Lac16diS
+ Lac18diS
∅
+ Mel14monoS
+ Mel16monoS
+ Mel18monoS
pSer199/202
AT270
麦芽糖
纤维二糖
乳糖
蜜二糖

图6

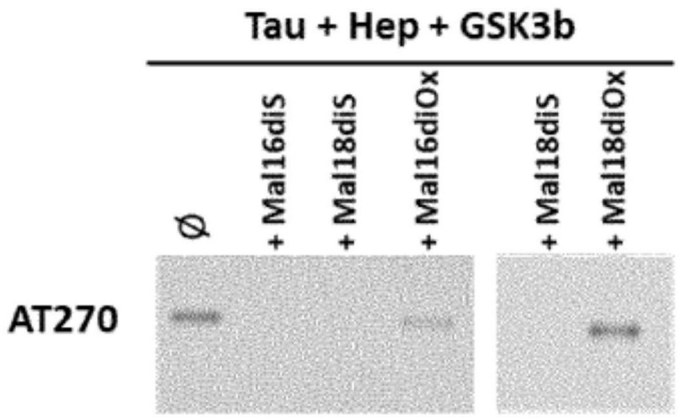

Tau + Hep + GSK3b
Ø
+ Mal16diS
+ Mal18diS
+ Mal16diOx
+ Mal18diS
+ Mal18diOx
AT270

图7

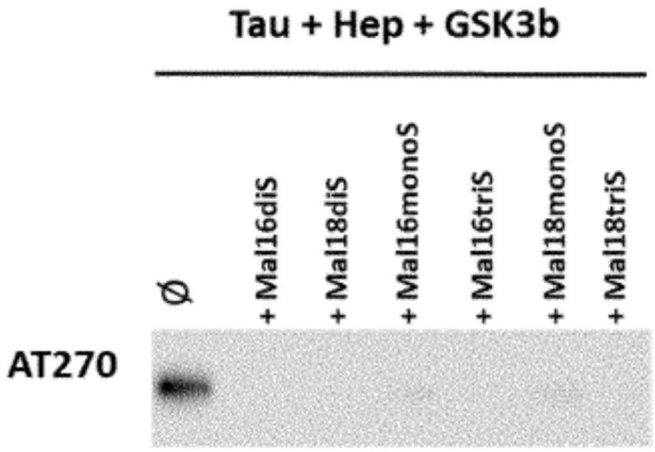

Tau + Hep + GSK3b
Ø
+ Mal16diS
+ Mal18diS
+ Mal16monoS
+ Mal16triS
+ Mal18monoS
+ Mal18triS
AT270

图8

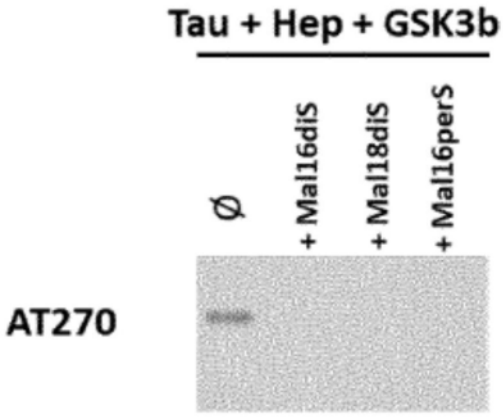

Tau + Hep + GSK3b
Ø
+ Mal16diS
+ Mal18diS
+ Mal16perS
AT270

图9

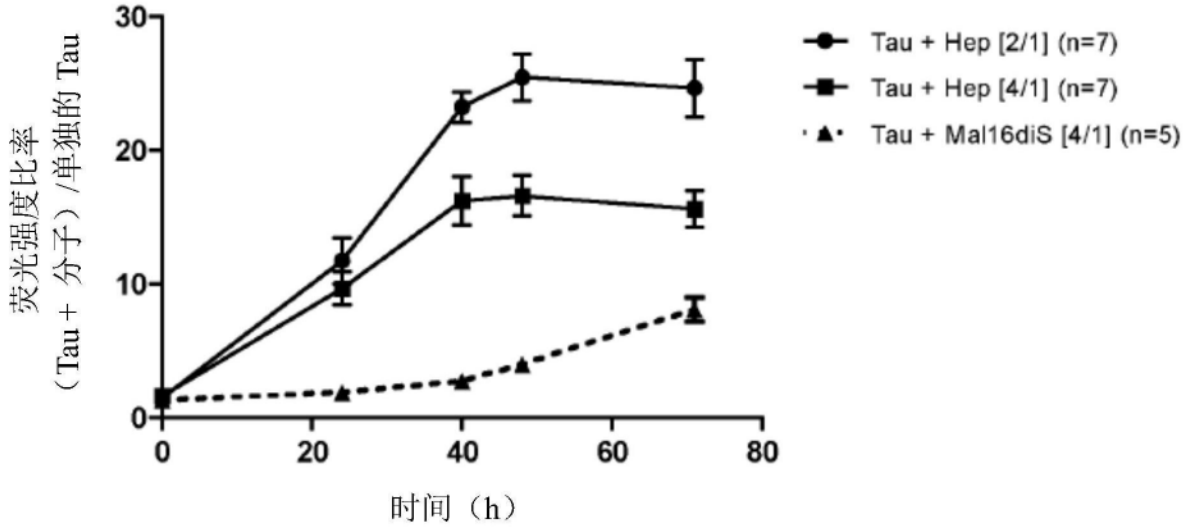

荧光强度比率
（Tau + 分子）/单独的 Tau
30
20
10
0
0
20
40
60
80
时间（h）
Tau + Hep [2/1] (n=7)
Tau + Hep [4/1] (n=7)
Tau + Mal16diS [4/1] (n=5)

图10

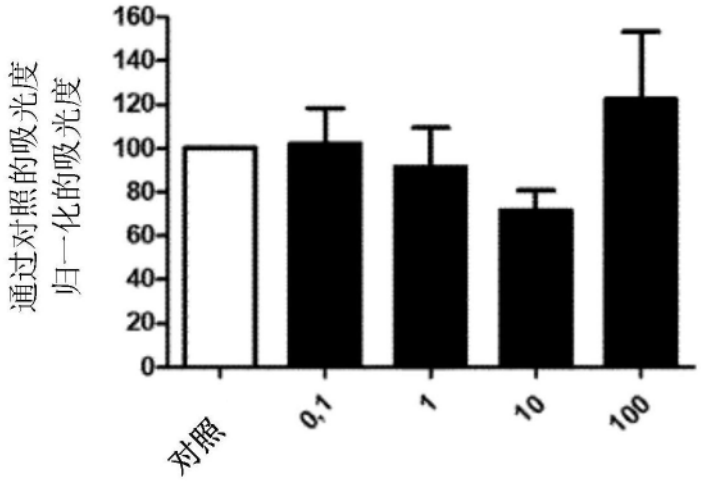

通过对照的吸光度
归一化的吸光度
160
140
120
100
80
60
40
20
0
对照
0.1
1
10
100

图11

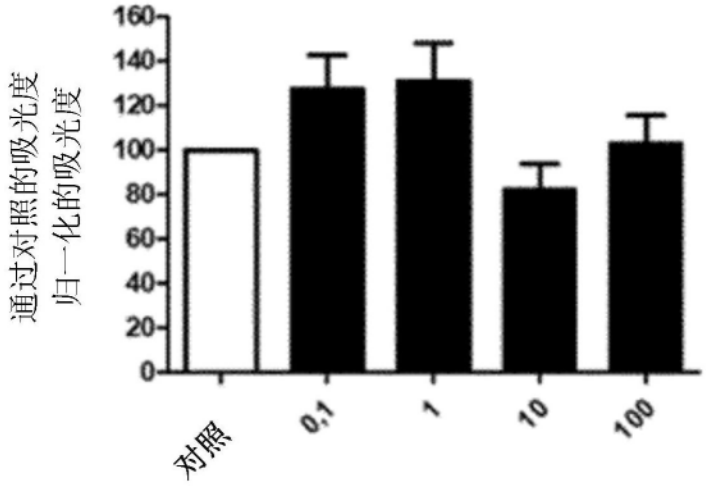

通过对照的吸光度
归一化的吸光度
160
140
120
100
80
60
40
20
0
对照
0.1
1
10
100

图12

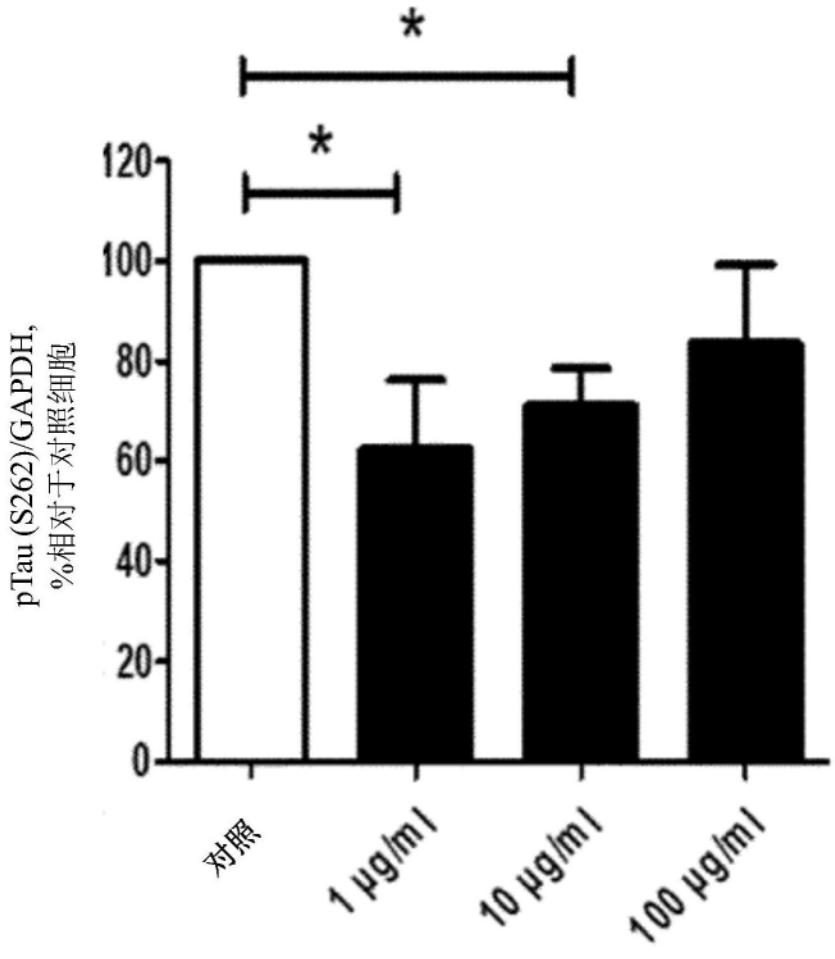

*
*
pTau (S262)/GAPDH,
%相对于对照细胞
120
100
80
60
40
20
0
对照
1 μg/ml
10 μg/ml
100 μg/ml

图13

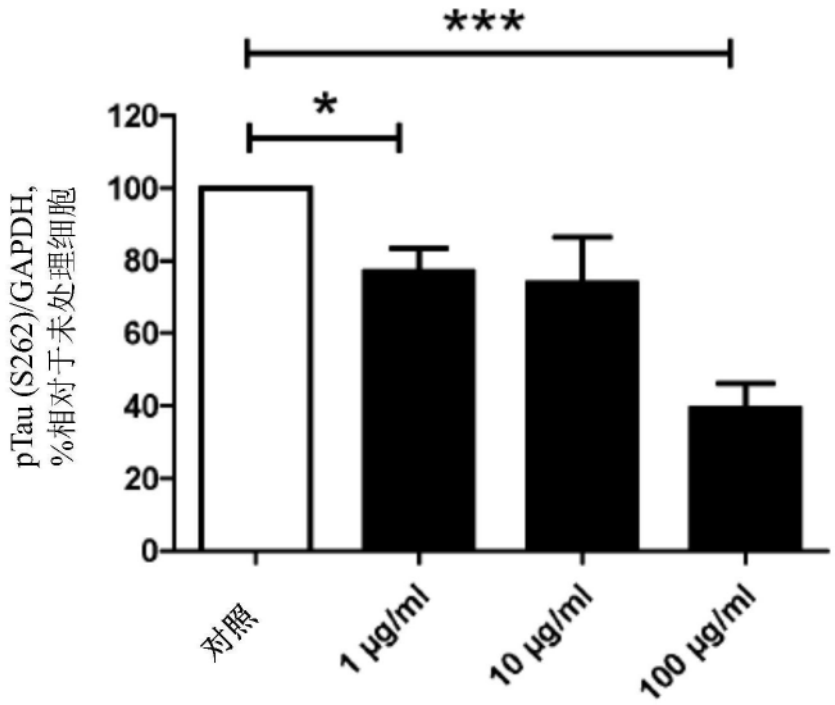

***
*
120
100
80
60
40
20
0
pTau (S262)/GAPDH,
%相对于未处理细胞
对照
1 μg/ml
10 μg/ml
100 μg/ml

图14

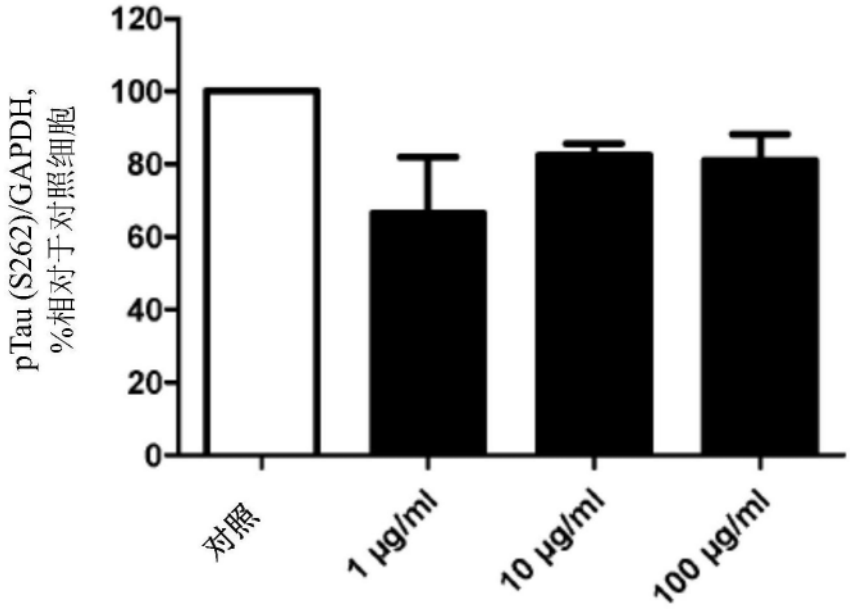

120
100
80
60
40
20
0
pTau (S262)/GAPDH,
%相对于对照细胞
对照
1 μg/ml
10 μg/ml
100 μg/ml

图15

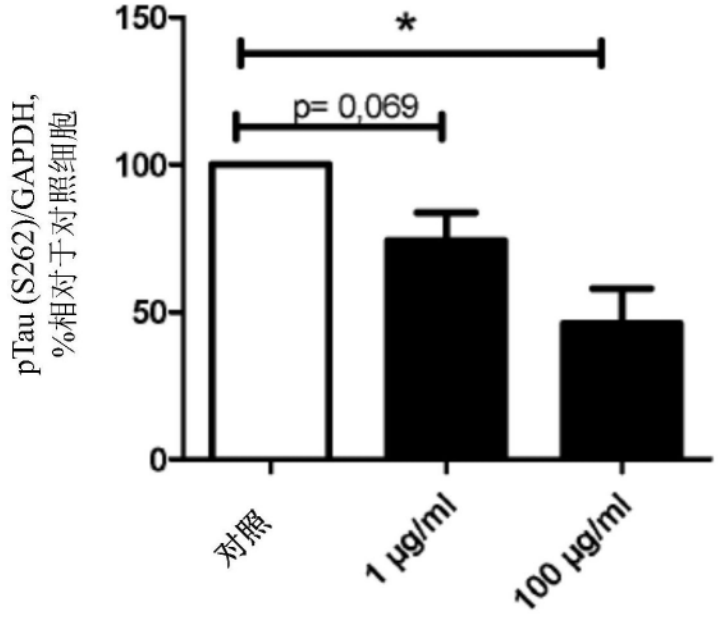

150
100
50
0
*
p= 0,069
pTau (S262)/GAPDH,
%相对于对照细胞
对照
1 µg/ml
100 µg/ml

图16

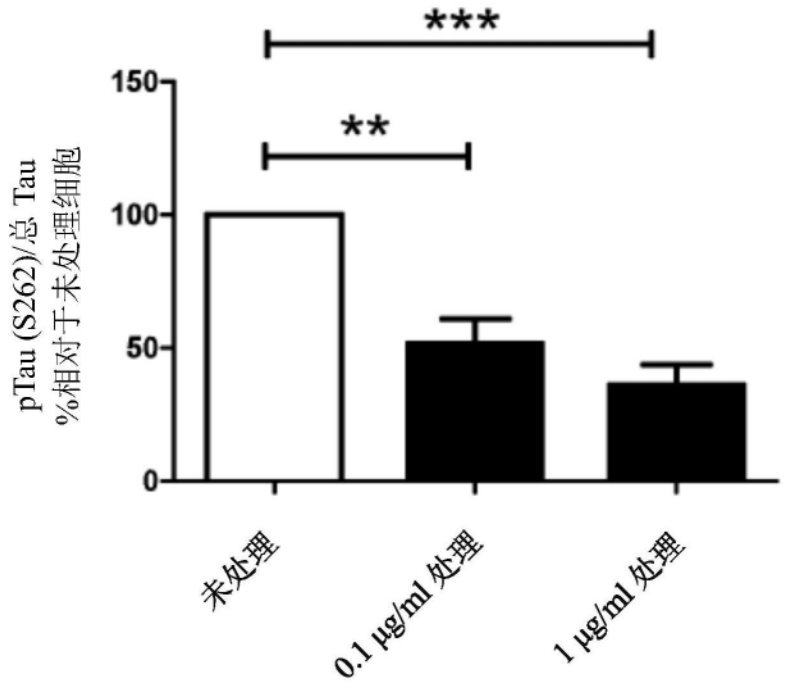

***
**
150
100
50
0
pTau (S262)/总 Tau
%相对于未处理细胞
未处理
0.1 µg/ml 处理
1 µg/ml 处理

图17

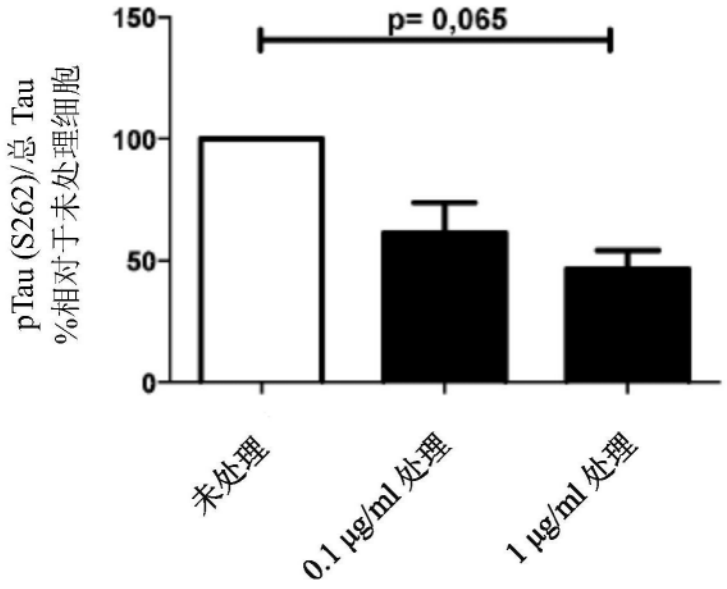

p= 0,065
150
100
50
0
pTau (S262)/总 Tau
%相对于未处理细胞
未处理
0.1 µg/ml 处理
1 µg/ml 处理

图18