



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112041297 B

(45) 授权公告日 2023.10.20

(21) 申请号 201980027923.7
 (22) 申请日 2019.04.19
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 112041297 A
 (43) 申请公布日 2020.12.04
 (30) 优先权数据
 10-2018-0046890 2018.04.23 KR
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2020.10.23
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2019/004789 2019.04.19
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02019/208980 KO 2019.10.31
 (73) 专利权人 株式会社ENZYCHEM生命科学
 地址 韩国忠清北道堤川市生物谷路59号
 (72) 发明人 孙起荣 金载和 尹善瑛 刘畅炫
 郑珍善
 (74) 专利代理机构 广州三环专利商标代理有限公司 44202
 专利代理师 郝传鑫
 (51) Int. Cl.
 C07C 235/28 (2006.01)
 A61K 31/133 (2006.01)
 A61P 31/12 (2006.01)
 A61P 29/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件

KR 20110088991 A, 2011.08.04
 WO 2017057540 A1, 2017.04.06
 US 4221732 A, 1980.09.09
 GB 2021579 A, 1979.12.05
 Lucie Couturier等.Lipase-catalyzed chemoselective aminolysis of various aminoalcohols with fatty acids.《Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic》.2008,第56卷第32页Fig.3.
 Arantxa Rodriguez,Wesley J.Moran.Palladium-Catalyzed Three-Component Coupling Reactions:1,1-Difunctionalization of Activated Alkenes.《Eur.J.Org.Chem.》.2009,第1313页Scheme 2.
 H. Schick, E.Schrötter, M.Szymanowski.Synthesis of Alkyl (f)-2,3-Di-O-acylglycerates and Attempts Directed to their Conversion into Alkyl (R)-2,3-Di-O-acylglycerates by Enzyme-catalyzed Enantioselective Deacylation Reactions [1].《J.prakt.Chem.》.1993,第335卷第628页Scheme 1,第629页Scheme 2. (续)

审查员 柴伟

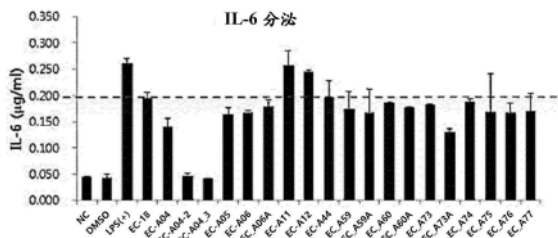
权利要求书1页 说明书30页 附图5页

(54) 发明名称

甘油衍生物、其制备方法以及包含其作为有效成分的免疫调节剂

(57) 摘要

公开了一种甘油衍生物、其制备方法和包含其作为活性成分的免疫调节剂,该甘油衍生物通过下调各种炎性细胞因子诸如IL-4、IL-6等或CXCL8的过表达并减少HL-60细胞系的迁移来用于缓解、预防或治疗炎症相关疾病。包括由说明书中化学式2或3表示的甘油衍生物。



CN 112041297 B

[接上页]

(56) 对比文件

J.P. Ward.Synthesis of hydroxy thiol esters from glycidol esters.《Chemistry and Physics of Lipids》.1988,第47卷第217页 Scheme 1,第218页Scheme 4-5.

Soheila Bahmanjah等.Monoacylglycerols as transmembrane Cl⁻ anion transporters.《Chem.Commun.》.2012,第48卷第4432页.

STN.CAS RN2188187-26-8.《REGISTRY DATABASE》.2018,

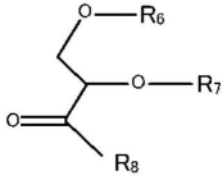
STN.CAS RN1482022-29-6.《REGISTRY DATABASE》.2013,

STN.CAS RN1027540-85-7.《REGISTRY DATABASE》.2008,

STN.CAS RN1026587-59-6.《REGISTRY DATABASE》.2008,

1. 由以下化学式3表示的甘油衍生物，

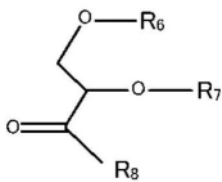
[化学式3]



在化学式3中, R_6 和 R_7 独立地为棕榈酰基或亚油酰基, 并且 R_8 为 $-OR_9$ 或 $-NHR_9$, 在此, R_9 为乙基。

2. 甘油衍生物用于制备免疫调节剂的用途, 由以下化学式3表示的甘油衍生物作为有效成分,

[化学式3]



在化学式3中, R_6 和 R_7 独立地为棕榈酰基或亚油酰基, 并且 R_8 为 $-OR_9$ 或 $-NHR_9$, 在此, R_9 为乙基。

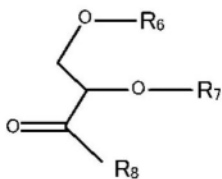
3. 根据权利要求2所述的用途, 其中所述甘油衍生物抑制选自IL-4、IL-6和CXCL8中的一种或多种炎性细胞因子的过表达。

4. 根据权利要求3所述的用途, 其中所述甘油衍生物预防或治疗选自细菌或病毒感染、急性和慢性炎性肺病、肺炎、自身免疫病、变应性疾病和癌症中的免疫性疾病。

5. 根据权利要求4所述的用途, 其中所述甘油衍生物的量0.0001至100.0重量%。

6. 甘油衍生物用于制备调节免疫力的保健功能食品组合物的用途, 由以下化学式3表示的甘油衍生物作为有效成分,

[化学式3]



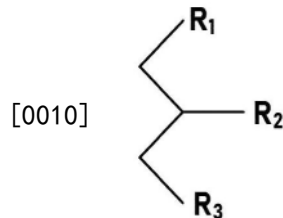
在化学式3中, R_6 和 R_7 独立地为棕榈酰基或亚油酰基, 并且 R_8 为 $-OR_9$ 或 $-NHR_9$, 在此, R_9 为乙基。

有效成分的免疫调节剂。

[0007] 本发明的另一个目的是提供一种通过抑制炎症细胞因子诸如IL-4、IL-6等或涉及炎症细胞迁移的趋化因子CXCL8的过表达来改善、预防或治疗炎症相关疾病的甘油衍生物，其制备方法以及含有其作为活性成分的免疫调节剂。

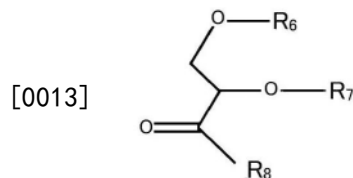
[0008] 在用于实现上述目的的一些实施方案中，本发明提供由以下化学式2或3表示的甘油衍生物。

[0009] [化学式2]



[0011] 在化学式2中， R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-NHR_4$ 或 $-SR_4$ （在此， R_4 是具有2至18个碳原子的链型脂肪酸基团），其余为 $-OC(=O)R_5$ （在此， R_5 是具有1至17个碳原子的链状或支链的脂肪族烃基或具有3至6个碳原子的环状脂肪族烃基）或 $-OH$ 。

[0012] [化学式3]



[0014] 在化学式3中， R_6 和 R_7 独立地为具有2至18个碳原子的脂肪酸基团，并且 R_8 为 $-OR_9$ 或 $-NHR_9$ （在此， R_9 为具有1至3个碳原子的烷基）。

[0015] 此外，本发明提供一种免疫调节剂，其包含由化学式2或3表示的甘油衍生物作为活性成分。

[0016] 此外，本发明提供了一种用于调节免疫力的保健功能食品组合物，其包含由化学式2或3表示的甘油衍生物作为活性成分。

[0017] 根据甘油衍生物、其制备方法以及包含其作为本发明活性成分的免疫调节剂，提供一种通过抑制炎症细胞因子诸如IL-4和IL-6或涉及炎症细胞迁移的趋化因子CXCL8的过表达而用于改善、预防或治疗炎症相关疾病的化合物。

附图说明

[0018] 图1和图2是显示根据本发明实施方案的由LPS诱导的IL-6分泌的程度的图。

[0019] 图3和图4是显示根据本发明另一个实施方案的由IL-6诱导的STAT3活性的程度的图。

[0020] 图5是显示根据本发明另一个实施方案的THP-1细胞的CXCL8 (IL-8) 表达程度的图。

[0021] 图6是显示根据本发明另一个实施方案的使用Transwell (迁移小室) 的HL-60细胞系迁移程度的图。

[0022] 图7和图8是显示根据本发明另一个实施方案的由IL-4诱导的STAT6活性的程度的图。

图。

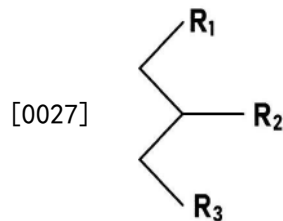
[0023] 图9和图10是显示根据本发明另一个实施方案的由PKC激活剂诱导的IL-4分泌的程度的图。

具体实施方式

[0024] 在下文中,将详细描述本发明。

[0025] 本发明提供由以下化学式2或3表示的新型甘油衍生物。具体地,由以下化学式2表示的新型甘油衍生物和其中羰基被引入到由以下化学式3表示的框架的新型甘油衍生物。

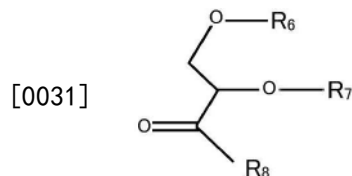
[0026] [化学式2]



[0028] 在化学式2中, R_1 、 R_2 和 R_3 中的至少一个是 $-NHR_4$ 或 $-SR_4$ (在此, R_4 是具有2至18个碳原子的链型脂肪酸基团),其余为 $-OC(=O)R_5$ (在此, R_5 是具有1至17个碳原子的链状或支链的脂肪族烃基或具有3至6个碳原子的环状脂肪族烃基)或 $-OH$ 。

[0029] 具体地, R_4 中的脂肪酸基团是指从链状或支链以及饱和或不饱和脂肪酸中去除了羟基($-OH$)的酰基。例如,它可以是乙酰基、棕榈酰基、亚油酰基、肉豆蔻酰基等。 R_5 中的脂肪族烃基团包括链状、支链或环状以及饱和或不饱和烃,不包括芳族烃。例如,它可以是乙基、丙基、丁基、十五烷基、十七烷基-8,11-二烯、1-甲基丙基、叔丁基、环丙基、环己基等。

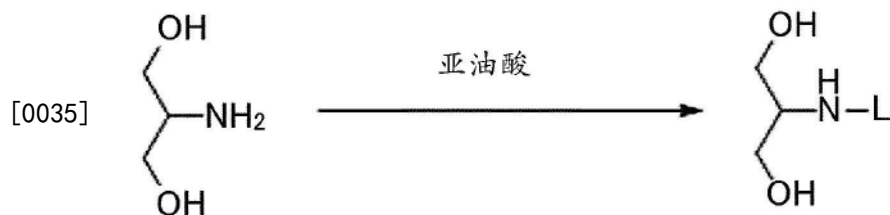
[0030] [化学式3]



[0032] 在化学式3中, R_6 和 R_7 独立地为具有2至18个碳原子的脂肪酸基团,并且 R_8 为 $-OR_9$ 或 $-NHR_9$, R_9 为具有1至3个碳原子的烷基。具体地, R_6 和 R_7 可以各自独立地为棕榈酰基、亚油酰基等, R_9 可以为乙基等。

[0033] 由化学式2或3表示的甘油衍生物可以通过各种方法制备,例如,由化学式2表示的甘油衍生物可以使用丝氨酸(2-氨基-1,3-丙二醇, $C_3H_9NO_2$,分子量:91.11)作为起始原料进行制备。使用丝氨酸作为起始原料的合成方法通常可以根据以下反应1至2进行。

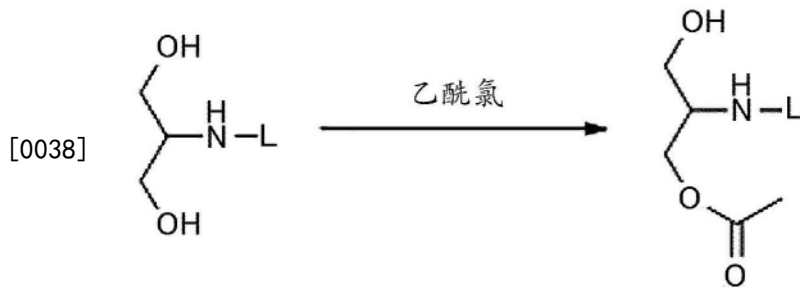
[0034] [反应1]



[0036] 首先,如反应1所示,丝氨酸和亚油酸(脂肪酸)反应,得到由化学式2表示的甘油衍

生物。

[0037] [反应2]



[0039] 通过使乙酰氯于反应2中合成的化合物反应,可以得到由式2表示的甘油衍生物。

[0040] 本发明的甘油衍生物类似于由式1表示的单乙酰基二酰基甘油衍生物 (EC-18, 其作为常规的免疫调节剂和抗癌剂, 在多种急性和慢性炎性疾病中显示出作用), 可以调节巨噬细胞中的最初对人类感染有反应的炎性细胞因子的表达, 并且可以用作免疫调节剂。具体地, 本发明的1,2-二酰基甘油化合物可以抑制炎性细胞因子IL-6的过表达, 并降低IL-6表达调节因子STAT3的活性。因此, 它可用作各种急慢性炎性疾病和免疫疾病相关疾病的改善剂、预防剂和治疗剂。另外, 作为常规的免疫调节和抗癌剂, 类似于由化学式1表示的单乙酰基二酰基甘油衍生物 (EC-18, 其在各种急性和慢性炎性疾病中均表现出作用), 它可以通过调节巨噬细胞中的最初对人类感染有反应的炎性细胞因子的表达而用作免疫调节剂。具体地, 本发明的甘油衍生物调节并减少在T hepler 2型 (Th2) T细胞中的IL-4的表达, 这影响各种变应性和自身免疫疾病以及进一步的癌症的微环境。另外, 由于它具有降低STAT6 (这些细胞因子的表达调节因子) 活性的作用, 因此可以用作Th2相关的慢性疾病和癌症的预防剂和治疗剂。另外, 它具有抑制巨噬细胞系之一RAW 265.7细胞中炎性细胞因子IL-6的表达的作用, 并且具有降低IL-6表达调节剂STAT3的活性的作用。作为改善各种炎性疾病的药物, 它无毒, 可以有效地用作各种阶段的慢性炎性疾病和与免疫疾病有关的疾病的预防剂和治疗剂。

[0041] 与常规甘油衍生物相似, 它有效控制和减少THP-1细胞中CXCL8的表达, 并最终减少嗜中性粒细胞的过度迁移, 从而在动物模型的急性支气管感染模型中抑制感染。因此, 作为调节由于嗜中性粒细胞过度迁移而引起的炎性反应的免疫调节剂, 它是对初始感染有反应并且无毒的治疗剂, 可以有效地用作各种阶段的慢性炎性疾病和与免疫疾病相关的疾病的预防剂和治疗剂。

[0042] 另外, 通过使用Transwell (迁移小室), 未分化的嗜中性粒细胞系HL-60细胞系的迁移减少, 并且通过抑制转移和改变癌症的微环境可有效用作癌症相关疾病的预防剂和治疗剂。

[0043] 可以通过施用本发明的甘油衍生物预防或治疗的免疫相关疾病的实例可以包括各种细菌和病毒感染疾病、急性和慢性炎性肺病、肺炎、自身免疫疾病、变应性疾病、癌症等。如本文所用, 术语“预防 (prevention, preventing)”包括通过施用本发明的衍生物来抑制免疫过表达的任何活动。术语“治疗 (treatment, treating)”包括通过本发明的衍生物改善或有益地改变免疫相关疾病的症状的任何活动。

[0044] 本发明的甘油衍生物可以不与其他物质混合而单独用作免疫调节剂, 也可以以含有甘油衍生物作为有效成分的药物组合物的形式用作免疫调节剂。当本发明的甘油衍生物

用于药物组合物中时,常规的药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂可以包含在其中。药物组合物中的甘油衍生物的量可以没有特别限制地广泛地变化,并且具体地为0.0001至100.0重量%,具体地为0.001至95.0重量%。例如,组合物中甘油衍生物的含量可以为0.01至50重量%,更具体地为1至20重量%。而且,组合物中甘油衍生物的含量可以为50至100重量%,更具体地为50至95重量%。

[0045] 药物组合物可以配制成选自片剂、大丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂、混悬剂、液体溶液剂、乳剂、糖浆剂、无菌水溶液、非水溶液、悬浮剂、乳剂、冻干剂和栓剂等中的任何一种,并且可以配制成各种形式用于口服或非口服施用。在配制组合物时,可以使用常规的赋形剂或稀释剂,诸如填充剂、膨胀剂、粘合剂、润湿剂、崩解剂和表面活性剂。用于口服施用的固体制剂包括片剂、大丸剂、散剂、颗粒剂、胶囊剂等,并且这种固体制剂可以通过将一种或多种组分与至少一种赋形剂诸如淀粉、碳酸钙、蔗糖、乳糖、明胶等混合来制备。除赋形剂外,还可以使用润滑剂,诸如硬脂酸镁和滑石粉。用于口服施用的液体制剂包括混悬剂、液体溶液剂、乳剂、糖浆等,并且可以包括常规稀释剂诸如水和液体石蜡,或者可以包括各种赋形剂诸如湿润剂、甜味剂、调味剂和防腐剂。非口服施用的制剂包括无菌水溶液、非水溶液、悬浮液、乳剂、冻干制剂、栓剂等,以及用于溶液诸如非水溶液、悬浮液的溶剂可以包括丙二醇、聚乙烯乙二醇、植物油(诸如橄榄油)和注射器注射用酯(诸如油酸乙酯)。栓剂的基础材料可以包括witepsol、聚乙二醇、吐温61、可可脂、月桂酸酯和甘油明胶。

[0046] 本发明的组合物可以药物有效量施用。术语“药物有效量”用于指足以以合理的效益/风险比治疗疾病的量,该合理的效益/风险比适用于在医学治疗中实现期望的结果。“药物有效量”可以根据以下来确定:受试者的类别、年龄、性别,疾病的严重程度和类型,药物活性,对药物的敏感性、施用时间,施用途径,排泄率,治疗持续时间,包括同时药物的因素以及医学领域公知的其他因素。本发明的组合物可以单独施用,或者与其他治疗剂依次施用或同时施用。本发明的组合物可以施用一次或多次。考虑到上述所有因素,重要的是施用能够以最小量获得最大效果而没有副作用的量,这可以由本领域技术人员容易地确定。本发明组合物的优选量可以根据患者的状况和体重、疾病的严重程度、药物的制剂类型、施用途径和治疗期而变化。每1天的适当施用总量可由医生确定,通常为约0.001至约1000mg/kg,优选约0.05至200mg/kg,更优选约0.1至约100mg/kg,每天一次,或每天多次分剂量施用。该化合物或组合物可以无特定限制地应用于任何受试者,只要它是用于预防免疫力降低、增强免疫或治疗免疫性疾病目的的个体。例如,本发明的组合物不仅可施用于人,还可施用于非人动物(特别是哺乳动物),诸如猴子、狗、猫、兔、豚鼠、大鼠、小鼠、牛、绵羊、猪、山羊、鸟类和鱼类等。本发明的组合物可以通过常规的各种方法施用,例如通过口服或直肠施用,或通过静脉内(i.v.)、肌内(i.m.)、皮下(s.c.)、子宫内硬脑膜或脑血管注射施用。

[0047] 在一些实施方案中,本发明提供了用于调节免疫力的保健功能性食品组合物,其包含由上式1表示的1,2-二酰基甘油化合物作为活性成分。具体地,本发明的甘油衍生物可以包含在用于预防免疫过表达、增强免疫力、预防或改善免疫相关疾病的保健功能性食品组合物中。术语“改善(improvement,improving)”是指任何改善或改良疑似患有免疫相关疾病或正在发展为免疫相关疾病的个体的症状的活动。

[0048] 该保健功能性食品组合物可以仅由纯的本发明化合物组成或基本上由纯的本发明化合物组成,或者可以包括本发明化合物与其他保健功能性食物的常规成分。保健食品

组合物中的活性成分的量可以根据预期用途适当确定。通常,当本发明的化合物包含在食品或饮料中时,相对于原料的总量,本发明的组合物的量优选小于15重量%,更优选小于10重量%。如果出于健康控制和卫生的目的而长期使用,该量可以小于上述范围。因为在安全性方面没有问题,所以活性成分的量大于上述范围。

[0049] 可加入有本发明化合物的食物没有限制,包括各种食物,例如肉、香肠、面包、巧克力、糖果、点心、比萨饼、面条、树胶、日常产品(如冰淇淋、汤、饮料、茶、饮料、酒精饮料、维生素复合物)和任何保健功能性食物,还包括用作动物饲料的食物。当本发明的保健功能性食品组合物用于饮料产品时,饮料产品可以包括甜味剂、调味剂或天然碳水化合物。天然碳水化合物的实例包括单糖(诸如葡萄糖和果糖)、二糖(诸如麦芽糖和蔗糖)、多糖(诸如糊精和环糊精),以及糖醇(诸如木糖醇、山梨醇和赤藓糖醇)。饮料组合物中碳水化合物的量可以在没有具体限制的情况下广泛变化,并且优选为每100ml饮料0.01至0.04g,更优选0.02至0.03g。甜味剂的实例包括天然甜味剂(诸如索玛甜(thaumatin)和甜叶菊提取物)以及人工甜味剂(诸如糖精和阿斯巴甜)。除了上述之外,本发明的保健功能性食品组合物可以包括各种营养物、维生素、电解质、调味剂、着色剂、果胶酸及其盐、海藻酸及其盐、有机酸、保护性胶体增稠剂、pH控制剂、稳定剂、防腐剂、甘油、酒精、碳酸饮料中使用的碳化剂等。此外,本发明的保健功能性食品组合物可以包括水果,如用于制备天然果汁和果汁饮料以及蔬菜饮料的水果。

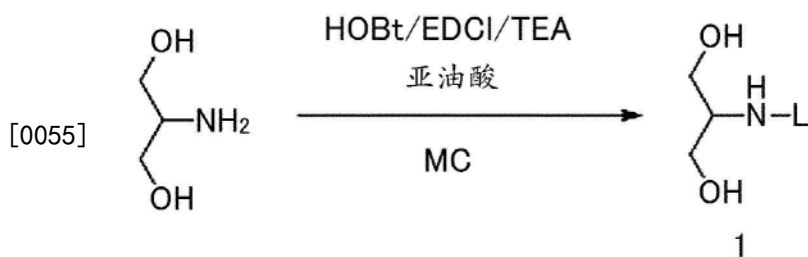
[0050] 在一些实施方案中,本公开提供了用于调节免疫力或者预防或治疗免疫过表达或免疫相关疾病的方法,该方法包括向有此需要的患者施用所述药物组合物。术语“有需要的患者”包括患有免疫相关疾病或可能发展为免疫相关疾病的包括人的任何动物。免疫过表达或免疫相关疾病可通过向有此需要的患者施用有效量的含有本发明化合物或含有本发明化合物及其药学上可接受的盐的药物组合物来治疗或预防。术语“施用”是指通过任何合适的方法将本发明的药物组合物引入到有需要的患者体内。本公开的组合物可以通过常规的各种方法施用,例如,通过口服或非口服施用,直到可以到达目标组织。在一些实施方案中,本公开的方法包括向有此需要的患者施用治疗有效量的包含化学式1的1,2-二酰基甘油化合物的药物组合物。每1天的合适施用总量可以由医生确定,通常为约0.001至约1000mg/kg,优选约0.05至200mg/kg,更优选约0.1至约100mg/kg。每天的施用总量可以每天施用一次,也可以每天分剂量多次施用。然而,施用于特定患者的药物组合物的具体治疗有效量可以根据以下变化:治疗中要实现的反应的类型和程度,具体的组合物(包括组合物中是否包含另一种制剂),患者的年龄、体重、一般健康状况、性别,饮食,施用时间,施用途径,组合物的比例,治疗期,治疗中一起使用的其他药物以及医学领域众所周知的各种因素。

[0051] 实施本发明的实施方案

[0052] 以下,通过实施例更详细地描述本发明。以下实施例仅用于帮助理解本发明,本发明不受以下实施例的限制。

[0053] [实施例1] 合成甘油衍生物(EC-A04_2)

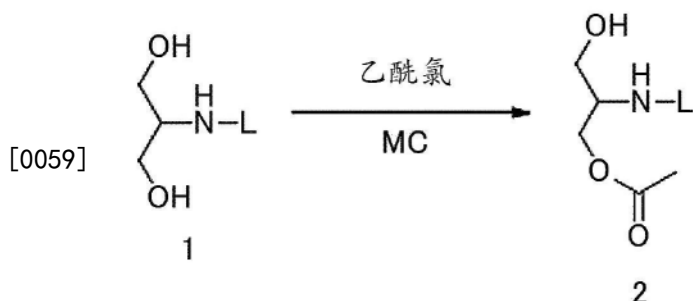
[0054] [反应1a]



[0056] 将作为起始原料的2-氨基丙烷-1,3-二醇(1.5eq.(当量))、三乙胺(TEA,6eq.)、亚油酸(2g,7.13mmol,1eq.)、HOBt(1-羟基苯并三唑,1.2eq.)和EDCI(N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺,1.2eq.)添加到500ml的MC(二氯甲烷)中,并在25℃下搅拌18小时。浓缩溶剂,并通过柱纯化(MC:MeOH=100:1→10:1),得到目标化合物1(L=亚油酰基,MeOH=甲醇,产率90.46%)。

[0057] [实施例2]合成甘油衍生物(EC-A04_3)

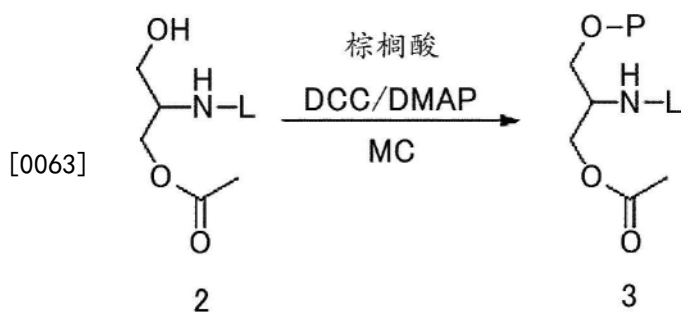
[0058] [反应1b]



[0060] 将实施例1中合成的化合物1(EC-A04_2,1g,2.83mmol,1eq.)加入并溶解于10ml的MC(二氯甲烷)中。在保持0℃的同时缓慢滴加乙酰氯(0.8eq.)。将反应溶液在25℃下搅拌18小时。浓缩溶剂,并通过柱纯化(MC:MeOH=10:1→1:1),得到目标化合物2(产率74.25%)。

[0061] [实施例3]合成甘油衍生物(EC-A04)

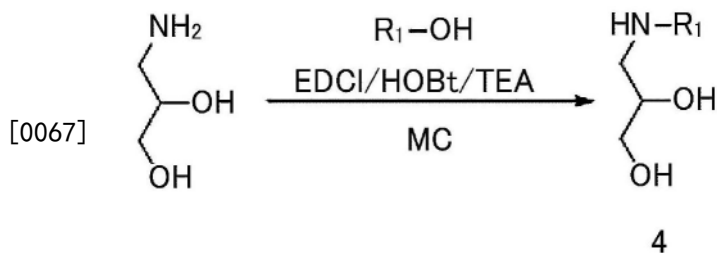
[0062] [反应1c]



[0064] 将在实施例2中合成的化合物2(EC-A04_3,100mg,252.8mmol,1eq.)、DCC(N,N'-二环己基碳二亚胺,1.2eq.)和DMAP(4-(二甲基氨基)吡啶,0.2eq.)加入到100ml的MC(二氯甲烷)中,并在25℃下搅拌18小时。浓缩溶剂,并通过柱纯化(PE(石油醚):EA(乙酸乙酯)=30:1→10:1),得到目标化合物3(P=棕榈酰基,L=亚油酰基,产率60.4%)。

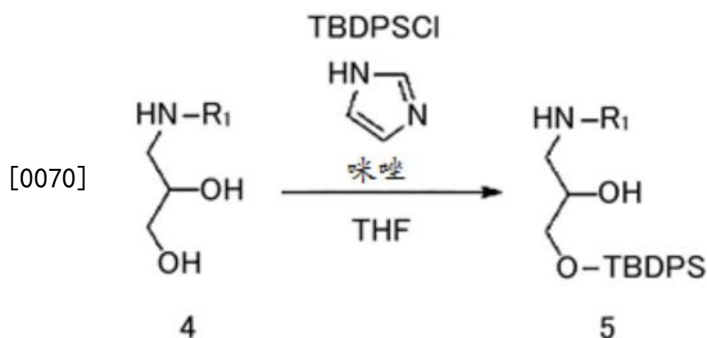
[0065] [实施例4]合成甘油衍生物(EC-A06)

[0066] [反应2a]



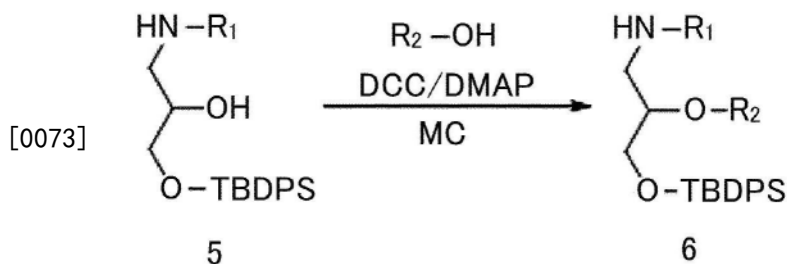
[0068] 将作为起始原料的3-氨基-1,2-丙二醇(1.2eq.)、 R_1 -OH(1g, 3.9mmol, 1eq.)、EDCI(N-(3-二甲基氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺, 1.2eq.)、HOBt(1-羟基苯并三唑, 1.2eq.)和TEA(6eq.)加入到360ml的MC(二氯甲烷)中,并在20℃下搅拌16小时。通过TLC(MC:MeOH=10:1)(TLC=薄层色谱法)确认反应。SM已完全耗尽。浓缩溶剂,并通过柱纯化(MC:MeOH=20:1→10:1),得到目标化合物4(R_1 =棕榈酰基,产率53.22%)。

[0069] [反应2b]



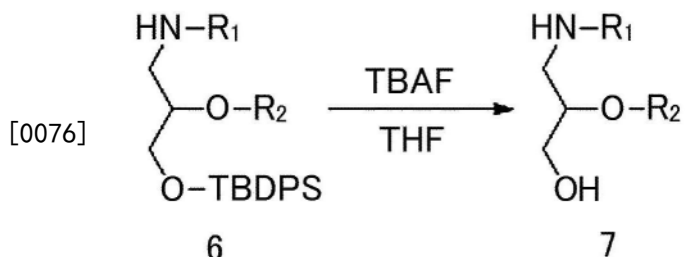
[0071] 将反应2a中合成的化合物4(720mg, 2.18mmol, 1eq.)加入到10ml的THF(四氢呋喃)中,并加入TBDPSCI(叔丁基二苯基氯硅烷, 1.2eq.)和咪唑(2eq.),并在20℃下搅拌16小时。通过TLC(MC:MeOH=10:1, R_f =0.7)确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并通过柱纯化,得到目标化合物5(R_1 =棕榈酰基, TBDPS=叔丁基二苯基甲硅烷基,产率=76.73%)。

[0072] [反应2c]



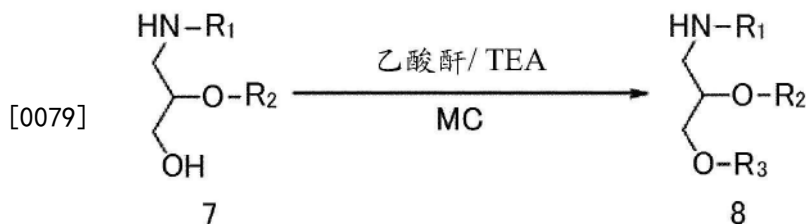
[0074] 将反应2b中合成的化合物5(500mg, 880.41mmol, 1eq.)、 R_2 -OH(1.05eq.)、DCC(1.05eq.)和DMAP(0.1eq.)加入到1ml的MC中,并在20至25℃下搅拌16小时。通过TLC(PE:EA=3:1, R_f =0.35)确认反应。SM已完全耗尽。将反应溶液浓缩并通过柱纯化(PE:EA=3:1→1:1),得到目标化合物6(R_1 =棕榈酰基, R_2 =亚油酰基,产率=64.98%)。

[0075] [反应2d]



[0077] 将在反应2c中合成的化合物6 (500mg, 602.16mmol, 1eq.) 和TBAF (四丁基氟化铵水合物, 1.5eq.) 加入到6ml的THF中, 并在20至25℃下搅拌16小时。通过TLC (PE:EA=3:1, R_f=0.1) 确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液, 并通过柱纯化 (PE:EA=3:1→1:1), 得到目标化合物7 (R₁=棕榈酰基, R₂=亚油酰基, 产率=90.34%)。

[0078] [反应2e]



[0080] 将反应2d中合成的化合物7 (500mg, 602.16mmol, 1eq.)、乙酸酐 (1.2eq.) 和TEA (2eq.) 加入到1ml的MC中, 并在20至25℃下搅拌16小时。通过TLC (PE:EA=3:1, R_f=0.35) 确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液, 并通过柱纯化 (PE:EA=3:1), 得到目标化合物8 (EC_A06, R₁=棕榈酰基, R₂=亚油酰基, R₃=乙酰基, 产率=19.47%)。

[0081] [实施例5至21] 合成甘油衍生物

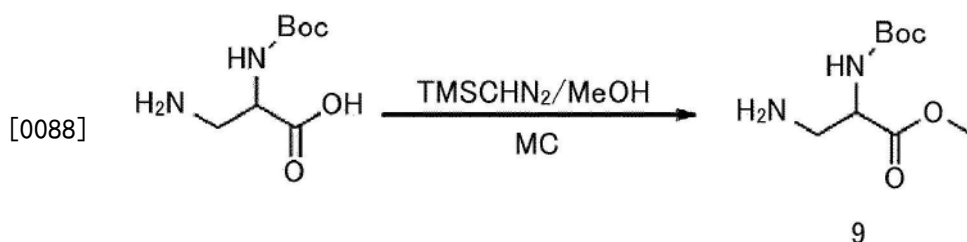
[0082] 以实质上与实施例4中的方法相同, 合成下表1所示的甘油衍生物。它和最终合成步骤的产率在下表1中示出。

[0083] [表1]

| 实施例 | 化合物 | R ₁ 基团 | R ₂ 基团 | R ₃ 基团 | 产率(%) |
|-----|---------|-------------------|-------------------|-------------------|-------|
| 5 | EC-A06A | 棕榈酰基 | 乙酰基 | 亚油酰基 | 22.17 |
| 6 | EC-A11 | 乙酰基 | 亚油酰基 | 棕榈酰基 | 46.33 |
| 7 | EC-A73 | 棕榈酰基 | 亚油酰基 | 2-甲基丁酰基 | 37.3 |
| 8 | EC-A73A | 棕榈酰基 | 2-甲基丁酰基 | 亚油酰基 | 29.8 |
| 9 | EC-A74 | 肉豆蔻酰基 | 亚油酰基 | 乙酰基 | 42.7 |
| 10 | EC-A75 | 棕榈酰基 | 亚油酰基 | 丙酰基 | 53.0 |
| 11 | EC-A76 | 棕榈酰基 | 亚油酰基 | 丁酰基 | 63.9 |
| 12 | EC-A77 | 棕榈酰基 | 亚油酰基 | 环丙甲酰基 | 44.9 |
| 13 | EC-A81 | 棕榈酰基 | 亚油酰基 | 环己甲酰基 | 38.7 |
| 14 | EC-A104 | 肉豆蔻酰基 | 乙酰基 | 亚油酰基 | 50.1 |
| 15 | EC-A105 | 肉豆蔻酰基 | 环丙甲酰基 | 亚油酰基 | 37.7 |
| 16 | EC-A106 | 肉豆蔻酰基 | 2-甲基丁酰基 | 亚油酰基 | 48.9 |
| 17 | EC-A107 | 肉豆蔻酰基 | 新戊酰基 | 亚油酰基 | 50.7 |
| 18 | EC-A111 | 棕榈酰基 | 丙酰基 | 亚油酰基 | 59.7 |
| 19 | EC-A112 | 棕榈酰基 | 丁酰基 | 亚油酰基 | 60.3 |
| 20 | EC-A113 | 棕榈酰基 | 环丙甲酰基 | 亚油酰基 | 27.1 |
| 21 | EC-A114 | 棕榈酰基 | 环己甲酰基 | 亚油酰基 | 31.7 |

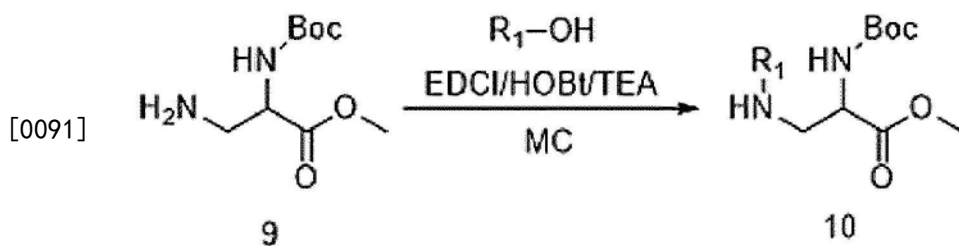
[0086] [实施例22]合成甘油衍生物(EC-A44)

[0087] [反应3a]



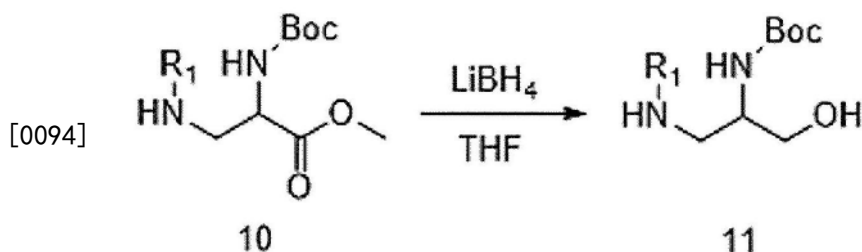
[0089] 将作为起始原料的2-[(叔丁氧基羰基)氨基]-3-氨基丙酸(Boc-Dap-OH, 10g, 48.97mol, 1eq.)和MeOH(16ml)加入到160ml的MC中,缓慢滴加(三甲基甲硅烷基)重氮甲烷(TMSCHN₂, (三甲基甲硅烷基)重氮甲烷溶液,在己烷或乙醚中2.0M, 1.07eq.),并在20至25℃下搅拌16小时。通过TLC(MC:MeOH=10:1, R_f=0.5)确认反应。SM已完全耗尽。过滤反应溶液以获得目标化合物9。

[0090] [反应3b]



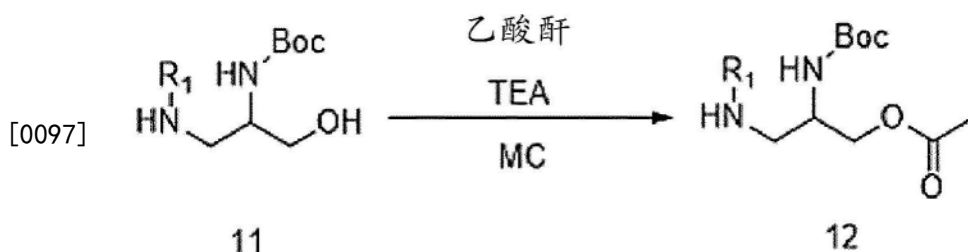
[0092] 在N₂吹扫中将反应3a中合成的化合物9 (1.2eq.)、R₁-OH (9.5g, 37.05mmol, 1eq.)、EDCI (1.2eq.)、HOBt (1.2eq.) 和TEA (6eq.) 加入到100ml的MC中,并在20至25℃下搅拌16小时。通过TLC (PE:EA=2:1, R_f=0.5) 确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并通过柱纯化 (PE:EA=5:1→3:1), 得到目标化合物10 (R₁=棕榈酰基, 产率=32%)。

[0093] [反应3c]



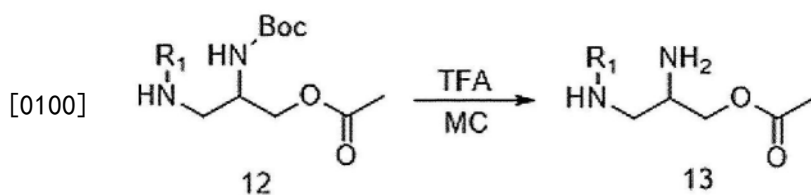
[0095] 将在反应3c中合成的化合物10 (2.1g, 4.6mmol, 1eq.) 加入到20ml的THF中,在0℃下加入LiBH₄ (4eq.),并在0至20℃下搅拌1小时。通过TLC (PE:EA=2:1, R_f=0.15) 确认反应。SM已完全耗尽。将净化水和乙酸乙酯 (EA) 添加到反应溶液,并萃取三次。有机层用盐水溶液 (盐水) 洗涤,用硫酸钠 (Na₂SO₄) 脱水,过滤并浓缩,得到目标化合物11 (R₁=棕榈酰基, 产率=91.54%)。

[0096] [反应3d]



[0098] 将在反应3c中合成的化合物11 (200mg, 466.58mmol, 1eq.) 添加到2ml的MC中。然后在0℃下加入乙酸酐 (1.2eq.) 和TEA (2eq.) 后,将混合物在0至20℃下搅拌16小时。通过TLC (PE:EA=2:1, R_f=0.4) 确认反应。SM已完全耗尽。向反应溶液中加入净化水和MC,并萃取三次。有机层用盐水溶液 (盐水) 洗涤,用硫酸钠 (Na₂SO₄) 脱水,过滤并浓缩,得到目标化合物12 (R₁=棕榈酰基, 产率=86.06%)。

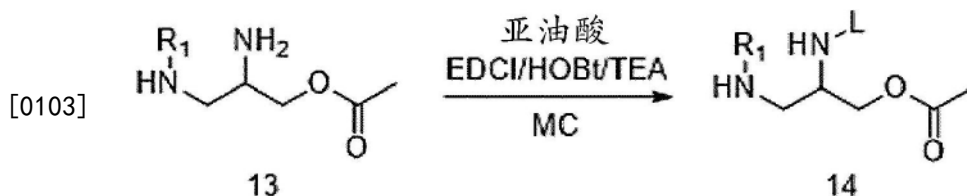
[0099] [反应3e]



[0101] 将反应3d中合成的化合物12 (230mg, 488.65mmol, 1eq.) 加入到2ml的MC和400ml的

TFA的混合溶剂中。然后在20℃下搅拌15小时。通过TLC (MC:MeOH=10:1, R_f=0.3) 确认反应。SM已完全耗尽。在反应溶液中用碳酸氢钠(NaHCO₃溶液)将pH调节至7至8后,加入净化水和MC。萃取三遍。将有机层用盐水溶液(盐水)洗涤,用硫酸钠(Na₂SO₄)脱水,过滤并浓缩,得到目标化合物13。

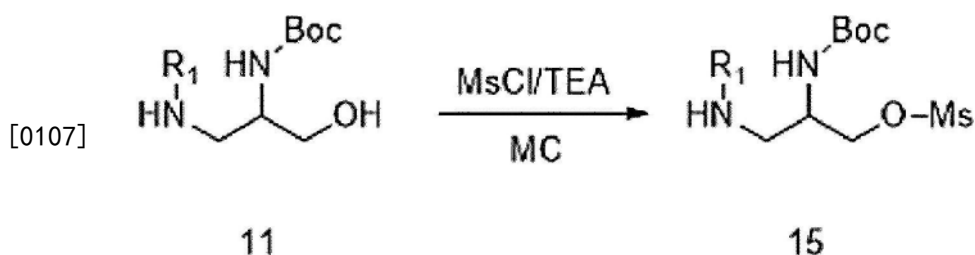
[0102] [反应3f]



[0104] 在N₂吹扫中将反应3e中合成的化合物13 (181mg, 488.44mmol, 1eq.)、亚油酸 (1.2eq.)、EDCI (1.2eq.)、HOBt (1.2eq.) 和TEA (4eq.) 加入到100ml的MC中。然后在20至25℃下搅拌16小时。通过TLC (MC:MeOH=10:1, R_f=0.7) 确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并通过柱纯化 (PE:EA=1:1→3:1), 得到目标化合物14 (EC-A44, R₁=棕榈酰基, 产率=9.27%)。

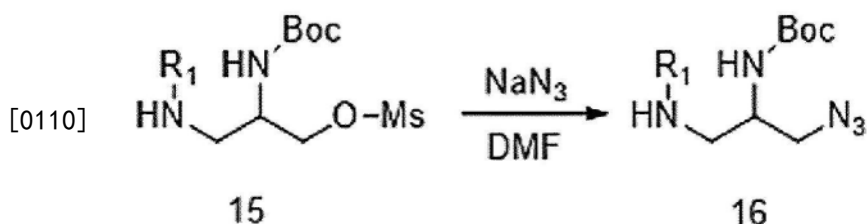
[0105] [实施例23] 合成甘油衍生物 (EC-A45)

[0106] [反应4a]



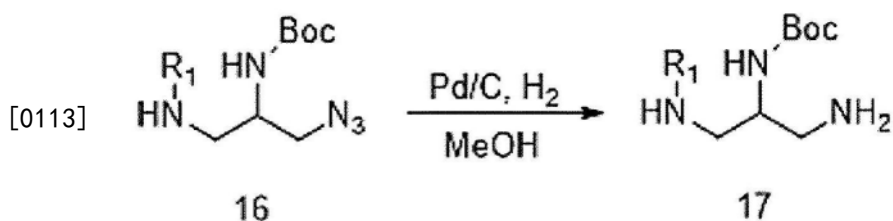
[0108] 将在反应3c中合成的化合物11 (500mg, 1.17mmol, 1eq.) 和TEA (1.1eq.) 加入到10ml的MC中并冷却至0℃。然后,缓慢滴加甲磺酰氯 (1.1eq.), 并在20℃下搅拌24小时。通过TLC (PE:EA=2:1, R_f=0.35) 确认反应。向反应溶液中加入净化水和MC, 并萃取三次。有机层用盐水溶液(盐水)洗涤,用硫酸钠(Na₂SO₄)脱水并过滤。然后通过柱纯化 (PE:EA=1:1) 并浓缩以获得目标化合物15 (R₁=棕榈酰基, 产率=32.05%)。

[0109] [反应4b]



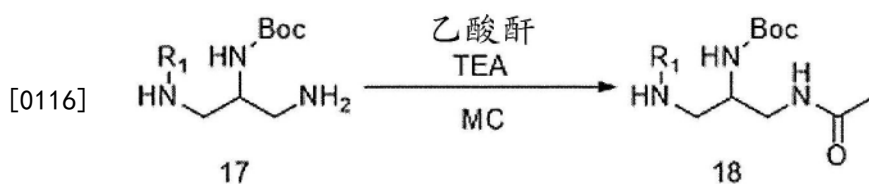
[0111] 将反应4a中合成的化合物15 (300mg, 592.02mmol, 1eq.) 和叠氮化钠 (2.4eq.) 添加到6ml的DMF (二甲基甲酰胺) 中, 并在50℃下搅拌24小时。通过TLC (PE:EA=2:1, R_f=0.35) 确认反应。SM已完全耗尽。在反应溶液中用净化水和碳酸氢钠(NaHCO₃溶液)将pH调节至9或更高后,加入EA萃取三次。有机层用盐水溶液(盐水)反洗,用硫酸钠(Na₂SO₄)脱水并过滤。然后通过柱纯化 (PE:EA=1:1) 并浓缩,得到目标化合物16 (R₁=棕榈酰基)。

[0112] [反应4c]



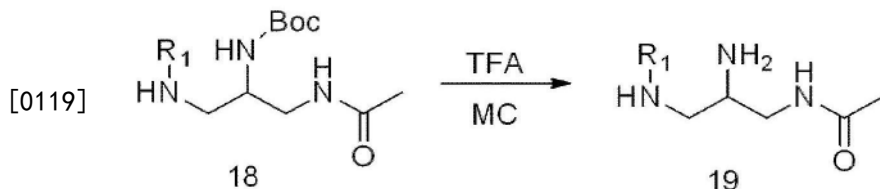
[0114] 在 N_2 吹扫中将反应4b中合成的化合物16 (300mg, 661.29mmol, 1eq.) 和Pd/C (300mg) 添加到10ml的MeOH中。然后, 将其用 H_2 脱气几次, 在 20°C 下保持20psi H_2 的同时搅拌16小时。通过TLC (MC:MeOH=10:1, $R_f=0.25$) 确认反应。SM已完全耗尽。通过LC-MS (EW2692-141-P1A) 确认反应。当反应完成时, 将其通过过滤除去并浓缩以获得目标化合物17 (R_1 = 棕榈酰基)。

[0115] [反应4d]



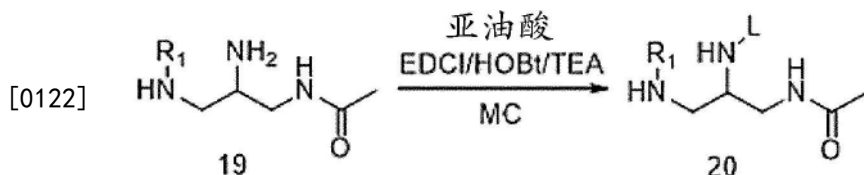
[0117] 将反应4c中合成的化合物11 (3000mg, 701.49mmol, 1eq.) 加入到3ml的MC中。然后在 0°C 下加入乙酸酐 (1.2eq.) 和TEA (2eq.) 后, 将混合物在 20°C 下搅拌16小时。通过TLC (MC:MeOH=20:1, $R_f=0.3$) 确认反应。SM已完全耗尽。向反应溶液中加入净化水和MC, 并萃取三次。有机层用盐水溶液 (盐水) 洗涤, 用硫酸钠 (Na_2SO_4) 脱水并过滤。然后将其通过柱纯化 (MC:MeOH=20:1) 并浓缩以获得目标化合物18 (R_1 = 棕榈酰基)。

[0118] [反应4e]



[0120] 将反应4d中合成的化合物18 (50mg, 106.45mmol, 1eq.) 加入到2ml的MC和200ml三氟乙酸 (TFA) 的混合溶剂中, 并在 20°C 下搅拌10小时。通过TLC (MC:MeOH=10:1, $R_f=0.3$) 确认反应。SM已完全耗尽。用碳酸氢钠 (NaHCO_3 溶液) 将pH调节至7至8, 向反应溶液中加入净化水和MC, 萃取三次。将有机层用盐水溶液 (盐水) 洗涤, 用硫酸钠 (Na_2SO_4) 脱水, 过滤, 并浓缩以获得目标化合物。

[0121] [反应4f]

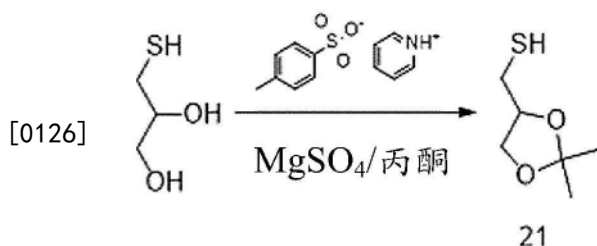


[0123] 在 N_2 吹扫中将反应4e中合成的化合物19 (40mg, 108.23mmol, 1eq.)、亚油酸 (1.2eq.)、EDCI (1.2eq.)、HOBt (1.2eq.) 和TEA (4eq.) 加入到1ml的MC中, 并在20至 25°C 下搅拌16小时。通过TLC (MC:MeOH=10:1, $R_f=0.5$) 确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液, 并通过柱纯化 (MC:MeOH=15:1), 得到目标化合物20 (EC-A45, R_1 = 棕榈酰基, 产率 =

14.16%)。

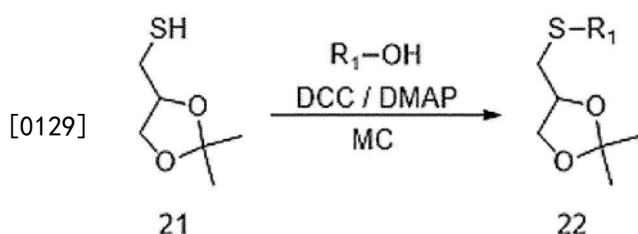
[0124] [实施例24]合成甘油衍生物(EC-A07)

[0125] [反应5a]



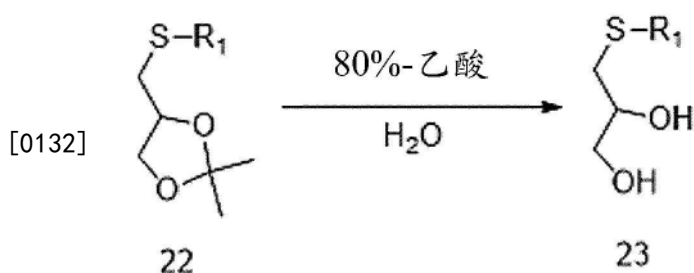
[0127] 在 N_2 吹扫中将作为起始原料的1-硫代甘油(2g, 18.49mmol, 1eq.)、对甲苯磺酸吡啶鎓(0.1eq.)和硫酸镁($MgSO_4$, 1.5eq.)加入到40ml的丙酮中。通过TLC(PE:EA=5:1)确认反应。SM已完全耗尽。将反应溶液过滤,浓缩并通过柱纯化(PE:EA=100:1→50:1),得到目标化合物21(收率=14.16%)。

[0128] [反应5b]



[0130] 将反应5a中合成的化合物21(963.39mg, 6.5mmol, 1eq.)、 R_1 -OH(1.2eq.)、DCC(1.4eq.)和DMAP(0.2eq.)加入到1ml的MC中,并且在20至25℃下搅拌18小时。通过TLC(MC:MeOH=20:1)确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液并通过柱纯化(PE:EA=100:1→20:1),得到目标化合物22(R_1 =棕榈酰基,产率=75.6%)。

[0131] [反应5c]

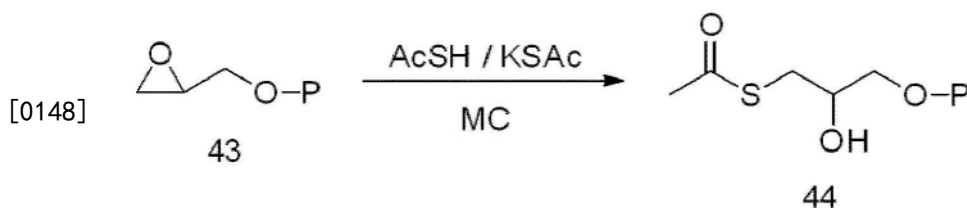


[0133] 将反应5b中合成的化合物22(963.39mg, 6.5mmol, 1eq.)和乙酸(400ml)加入到100ml净化水中,并在100℃下搅拌10分钟。通过TLC(MC:MeOH=20:1)确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并从10ml石油醚中重结晶,得到目标化合物23(R_1 =棕榈酰基,产率=90.13%)。

[0134] [反应5d]

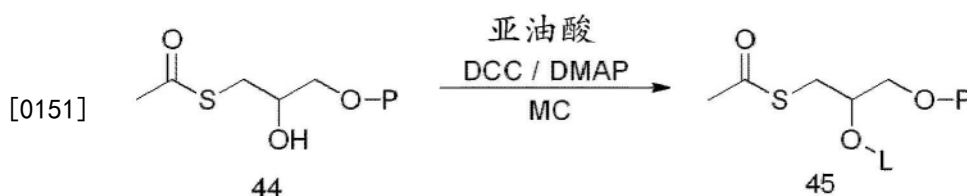
加到1.5ml石油醚(PE)中。然后将温度升至50℃并搅拌5小时。反应溶液用30ml的PE稀释,然后过滤。有机层用硫酸钠(Na_2SO_4)脱水,过滤并浓缩。然后通过快速柱纯化(PE:EA(乙酸乙酯)=50:1),得到目标化合物43(P=棕榈酰基,产率=63.65%)。

[0147] [反应6b]



[0149] 将反应6a中合成的化合物43(200mg,640.02mmol,1eq.)和硫代乙酸钾(KSAc,0.25eq.)溶解在2ml的MC中。将硫代乙酸(AcSH,2.5eq.)加入到溶解的溶液中,并在15℃下强烈搅拌65小时。通过TLC(PE:EA=5:1)确认反应。反应完成后,将反应溶液浓缩并通过柱纯化(PE:EA=3:1),得到目标化合物44(P=棕榈酰基,产率=44.23%)。

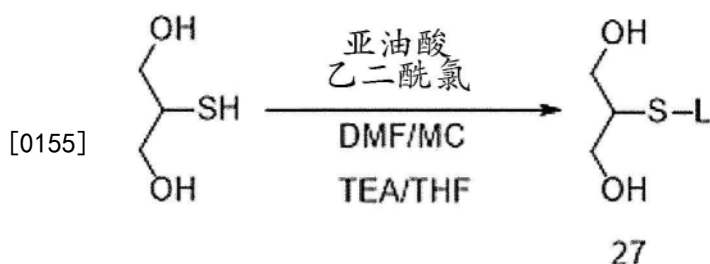
[0150] [反应6c]



[0152] 将在反应6b中合成的化合物44(40mg,102.93mmol,1eq.)、亚油酸(1.5eq.)、DCC(1.05eq.)和DMAP(0.1eq.)添加到600ml的MC中,并在15℃下搅拌14小时。通过TLC(PE:EA=10:1)确认反应。反应完成后,将其过滤并用MC和净化水萃取。然后,用硫酸钠(Na_2SO_4)去除水,并浓缩有机层。用柱纯化(PE:EA=3:1),得到目标化合物45(EC-A12,P=棕榈酰基,L=亚油酰基,产率=20.82%)。

[0153] [实施例26]合成甘油衍生物(EC-A05)

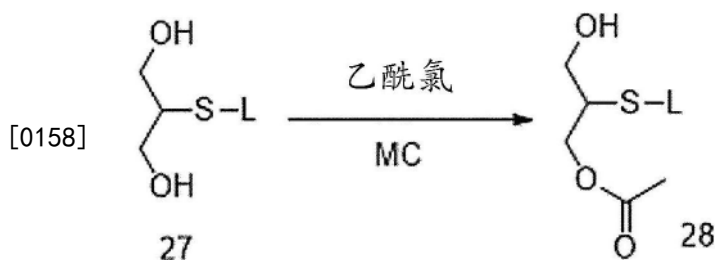
[0154] [反应7a]



[0156] 将亚油酸(588.9mg,2.1mmol,1eq.)加入到10ml无水MC中。将乙二酰氯(C1-CO-CO-C1,2eq.)溶解在1.1ml的MC中,并加入到反应混合物中,搅拌。将20ml的MC和DMF(0.1eq.)的溶液加入到反应混合物中,并在20℃下搅拌1小时。通过TLC(PE:EA=5:1, $R_f=0.3$)确认反应。反应完成后,将627.67mg亚油酰氯(通过浓缩反应产物而获得的粗产物)直接用于下一步。在0至10℃下将上述合成的亚油酰氯加入到5ml的THF中并搅拌。在保持0至10℃的同时,将起始材料、2-巯基-1,3-丙二醇(454.27mg,4.2mmol,2eq.)和TEA(2eq.)的溶液加入到15ml的THF中,并将其加入到上述混合物。然后在相同温度下搅拌1小时。通过TLC(MC:MeOH=20:1, $R_f=0.2$)确认反应。反应完成后,将反应溶液用20ml的Hex(己烷)稀释,过滤并浓

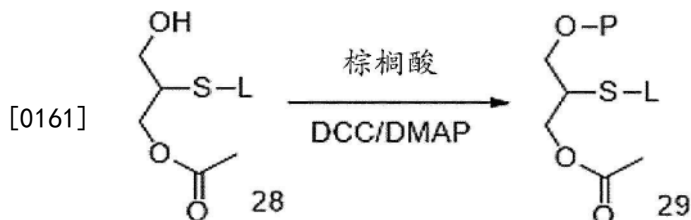
缩。在溶解于10ml氯仿中后,用净化水洗涤。然后,有机层用硫酸钠(Na_2SO_4)脱水,过滤并浓缩。通过柱纯化(PE:EA=1:1)得到目标化合物27(L=亚油酰基,产率=59.05%)。

[0157] [反应7b]



[0159] 将在反应7a中合成的化合物27(300mg, 809.52mmol, 1eq.)和TEA(1eq.)添加到9ml的MC中,并在-10至0℃下缓慢滴加乙酰氯(0.8eq.)。将反应溶液在-10至0℃下搅拌15分钟。通过TLC(PE:EA=3:1, $R_f=0.5$)确认反应。当剩余约50%的SM时,反应终止。在0℃下加入净化水和MC,并萃取三次。有机层用盐水溶液(盐水)反洗,用硫酸钠(Na_2SO_4)脱水,过滤并浓缩。通过柱纯化(PE:EA=3:1),得到目标化合物28(产率=18.86%)。

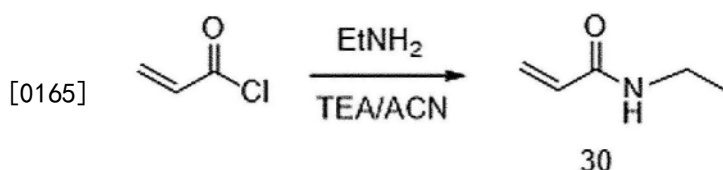
[0160] [反应7c]



[0162] 将反应7b中合成的化合物28(60mg, 145.41mmol, 1eq.)、棕榈酸(1.05eq.)、DCC(1.05eq.)和DMAP(0.1eq.)添加到600ml的MC中,并在20至25℃下搅拌16小时。通过TLC(PE:EA=10:1, $R_f=0.5$)确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液并通过柱纯化(PE:EA=10:1),得到目标化合物29(EC_A05, P=棕榈酰基, L=亚油酰基,产率=24.1%)。

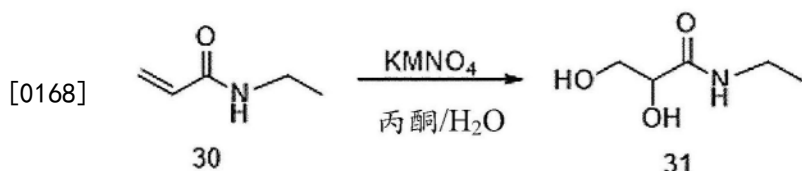
[0163] [实施例27] 合成甘油衍生物(EC-A60)

[0164] [反应8a]



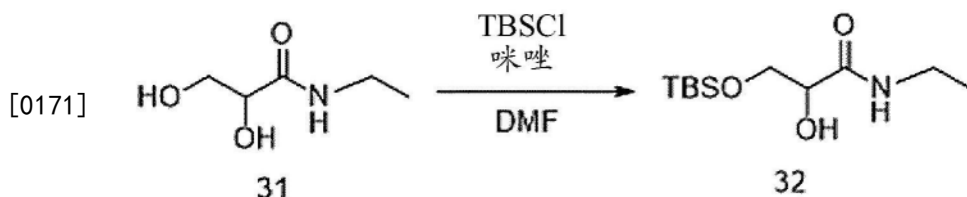
[0166] 将乙胺(1.99g, 44.2mmol, 1eq.)和TEA(5eq.)加入到140ml乙腈(ACN)中,并在0℃下缓慢滴加作为起始原料的丙烯酰氯(2.5eq.)。并在20℃下搅拌16小时。通过TLC确认反应(PE:EA=1:1)。SM已完全耗尽。反应溶液用EA稀释,依次用1N-HCl和 NaHCO_3 洗涤,然后再用盐水溶液(盐水)洗涤。然后用硫酸钠(Na_2SO_4)脱水,过滤并浓缩。通过柱纯化(PE:EA=20:1→3:1),得到目标化合物30(产率=58.43%)。

[0167] [反应8b]



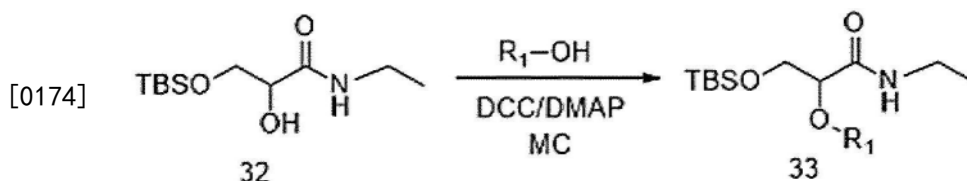
[0169] 将高锰酸钾(KMNO_4 , 1.1eq.)溶解于54ml的丙酮和36ml的净化水中,并冷却至 -50°C 。然后将在反应8a中合成的化合物30(2.5g, 25.22mmol, 1eq.)缓慢滴加到其中。将其在相同温度下搅拌10分钟,并在30分钟内将温度逐渐升高至 20°C 。通过TLC(MC:MeOH=10:1)确认反应。SM已完全耗尽。将反应溶液过滤并浓缩以获得目标化合物31。

[0170] [反应8c]



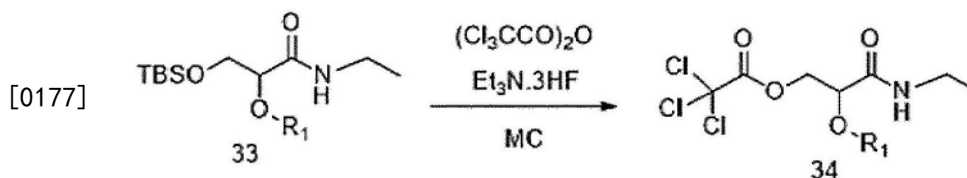
[0172] 将反应8b中合成的化合物31(2.2g, 16.52mmol, 1eq.)、叔丁基二甲基甲硅烷基氯(TBSCl, 1.2eq.)和咪唑(2eq.)添加到12ml的N,N-二甲基甲酰胺(DMF)中,并在 20°C 下搅拌3小时。通过TLC(MC:MeOH=10:1, $R_f=0.65$)确认反应。SM已完全耗尽。向反应溶液中加入净化水和EA,并萃取三次。有机层再用盐水溶液(盐水)洗涤,用硫酸钠(Na_2SO_4)脱水,过滤并浓缩。通过柱纯化(PE:EA=20:1 \rightarrow 2:1),得到目标化合物32(产率=28.14%)。

[0173] [反应8d]



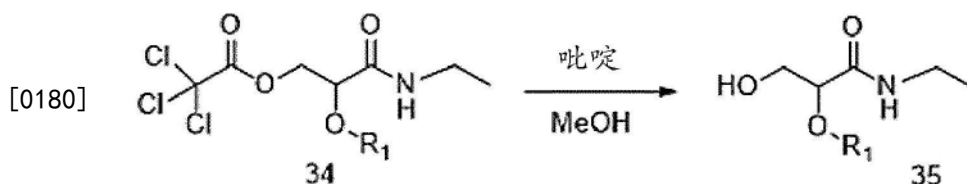
[0175] 将反应8c中合成的化合物32(750mg, 3.03mmol, 1.05eq.)、 $\text{R}_1\text{-OH}$ (R_1 =具有2至18个碳原子的羰基, 1eq.)、DCC(1eq.)和DMAP(0.1eq.)加入到8ml的MC中,并在 20°C 下搅拌16小时。通过TLC(PE:EA=3:1, $R_f=0.75$)确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并通过柱纯化(PE:EA=50:1 \rightarrow 5:1),得到目标化合物33(R_1 =亚油酰基,产率=58.45%)。

[0176] [反应8e]



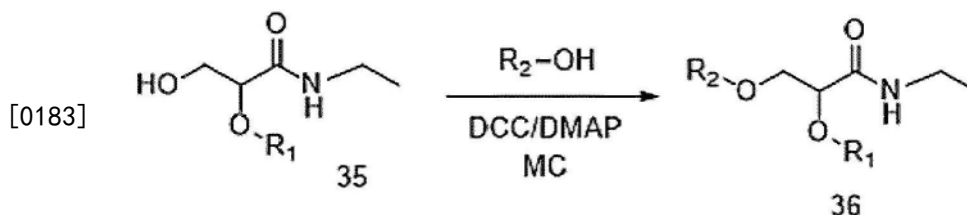
[0178] 在 N_2 吹扫中在25至 30°C 下将在反应8d中合成的化合物33(850mg, 1.67mmol, 1eq.)、三乙胺三氢氟酸盐(2eq.)和三氯乙酸酐(9eq.)加入到2ml的MC中。将反应溶液在 80°C 下搅拌2.5小时。通过TLC(PE:EA=10:1, $R_f=0.43$)确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并通过柱纯化(PE:EA=50:1 \rightarrow 5:1),得到目标化合物34(R_1 =亚油酰基,产率=81.4%)。

[0179] [反应8f]



[0181] 将1ml吡啶和反应8e中合成的化合物34(800mg, 1.48mmol, 1eq.) 加入到10ml的MeOH中,并在25℃下搅拌1小时。通过TLC(PE:EA=50:1, R_f=0.22) 确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并通过柱纯化(PE:EA=50:1→2:1),得到目标化合物35(R₁=亚油酰基,产率=56.37%)。

[0182] [反应8g]



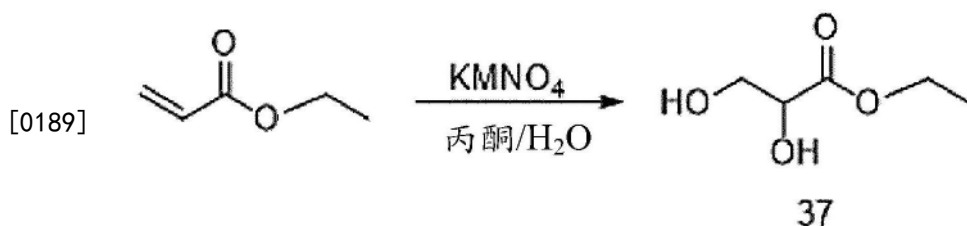
[0184] 将反应8f中合成的化合物35(320mg, 808.96mmol, 1.2eq.)、R₂-OH(R₂=具有2至18个碳原子的羧基, 1eq.)、DCC(1.2eq.)和DMAP(0.2eq.) 加入到4ml的MC中,并在20℃下搅拌16小时。通过TLC确认反应(PE:EA=5:1, R_f=0.58)。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并通过柱纯化(PE:EA=50:1→5:1),得到目标化合物36(EC-A60, R₁=亚油酰基, R₂=棕榈酰基,产率=77.89%)。

[0185] [实施例28]合成甘油衍生物(EC-60A)

[0186] 以与实施例27基本相同的方式,合成甘油衍生物。目标化合物(EC-60A)的结构为化合物36中的结构, R₁为棕榈酰基, R₂为亚油酰基,最终合成步骤的产率为62.14%。

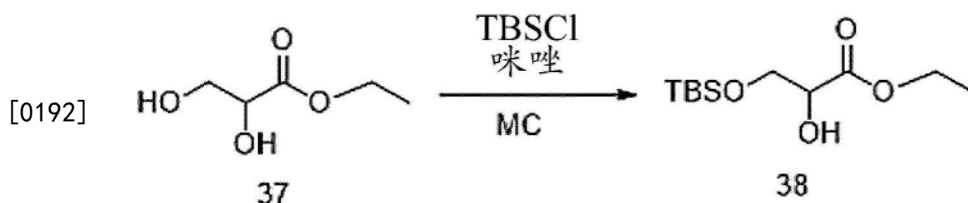
[0187] [实施例29]合成甘油衍生物(EC-A59)

[0188] [反应9a]



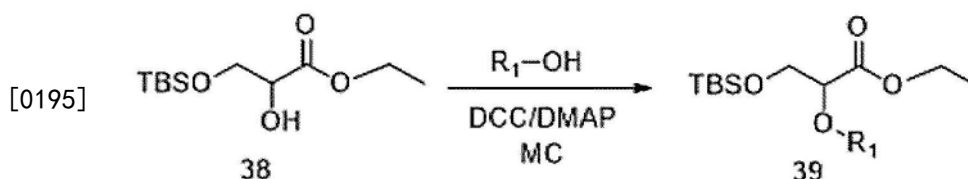
[0190] 将高锰酸钾(KMNO₄, 1.1eq.) 加入到45ml的丙酮和30ml的净化水中,并冷却至-50℃。然后向其中缓慢滴加作为起始原料的丙烯酸乙酯(2g, 19.976mmol, 1eq.)。将其在相同温度下搅拌10分钟,并在30分钟内将温度逐渐升高至20℃。通过TLC(MC:MeOH=10:1) 确认反应。SM已完全耗尽。过滤反应产物后,将其用净化水,盐水溶液(盐水)和EA萃取三次。然后用硫酸镁(MgSO₄) 进行脱水,过滤并浓缩,得到目标化合物37(产率=39%)。

[0191] [反应9b]



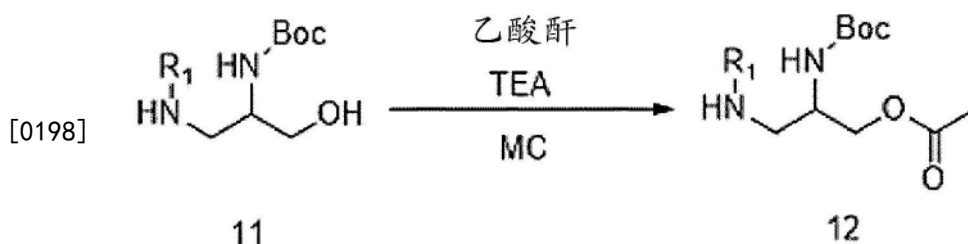
[0193] 将反应9a中合成的化合物37 (1.05g, 7.83mmol, 1eq.)、叔丁基二甲基甲硅烷基氯 (TBSCl, 1.2eq.) 和咪唑 (2eq.) 加入到20ml的MC中,并在20℃下搅拌3个小时。通过TLC确认反应 (己烷:EA=1:1或9:1, R_f=0.4)。SM已完全耗尽。向反应溶液中加入净化水和MC,萃取三次,再用盐水溶液 (盐水) 洗涤。然后用硫酸钠 (Na₂SO₄) 脱水,过滤并浓缩。用柱纯化 (Hex:EA=13:1),得到目标化合物38 (产率=72%)。

[0194] [反应9c]



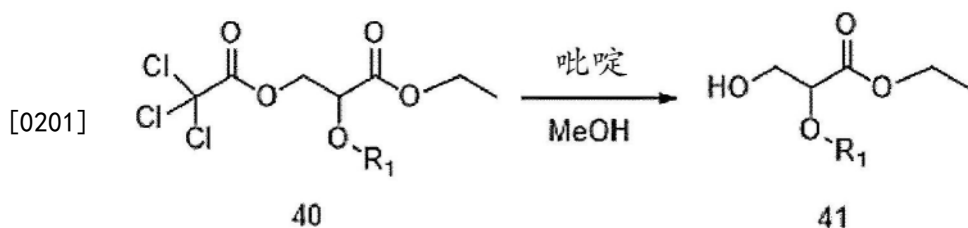
[0196] 将反应9b中合成的化合物38 (640mg, 2.58mmol, 1.05eq.)、R₁-OH (R₁=具有2至18个碳原子的羧基, 1eq.)、DCC (1.05eq.) 和DMAP (0.1eq.) 加入到6.5ml的MC中,并在20℃下搅拌16小时。通过TLC证实该反应 (Hex:EA=13:1)。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,并通过柱纯化 (PE:EA=200:1→100:1),得到目标化合物39 (R₁=亚油酰基,产率68.52%)。

[0197] [反应9d]



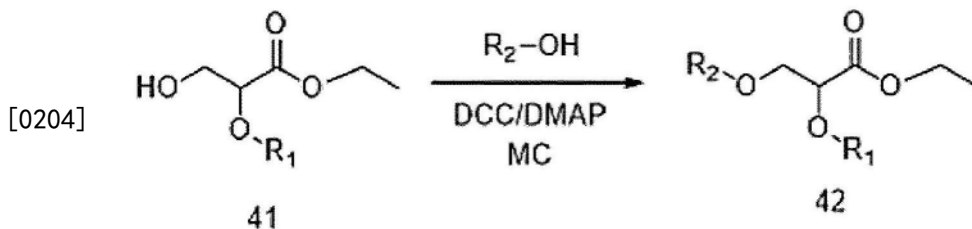
[0199] 在N₂吹扫中在25至30℃下将在反应9c中合成的化合物39 (800mg, 1.57mmol, 1eq.)、三乙胺三氢氟酸盐 (2eq.) 和三氯乙酸酐 (9eq.) 加入到5ml的MC中。将反应溶液在80℃下搅拌2.5小时。通过TLC (PE:EA=20:1, R_f=0.43) 确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液,得到目标化合物40 (R₁=亚油酰基, 620mg, 粗品)。

[0200] [反应9e]



[0202] 将2ml吡啶和反应9d中合成的化合物40 (2g, 3.69mmol, 粗品) 加入到20ml的MeOH中,并在25℃下搅拌1小时。通过TLC (PE:EA=10:1, R_f=0.42) 确认反应。SM已完全耗尽。将反应溶液浓缩。添加EA和净化水并萃取三次。然后将其用硫酸钠 (Na₂SO₄) 脱水并浓缩。通过柱纯化 (PE:EA=100:1→20:1),得到目标化合物41 (R₁=亚油酰基,产率=38.27%)。

[0203] [反应9f]



[0205] 将反应9e中合成的化合物41 (200mg, 504.34mmol, 1.2eq.)、 R_2 -OH (R_2 =具有2至18个碳原子的羰基, 1eq.)、DCC (1.21eq.) 和DMAP (0.2eq.) 加入到2ml的MC中, 并在20°C下搅拌16小时。通过TLC (PE:EA=10:1, R_f =0.68) 确认反应。SM已完全耗尽。浓缩反应溶液, 并通过柱纯化 (PE:EA=200:1→20:1), 得到目标化合物42 (EC-A59, R_1 =亚油酰基, R_2 =棕榈酰基, 产率=86.19%)。

[0206] [实施例30] 合成甘油衍生物 (EC-59A)

[0207] 以与实施例29基本相同的方式, 合成甘油衍生物化合物。目标化合物 (EC-59A) 的结构为化合物42中的结构, R_1 为棕榈酰基, R_2 为亚油酰基, 最终合成步骤的产率为80.94%。

[0208] [实验例1] LPS诱导的IL-6分泌减少

[0209] 在添加了10%胎牛血清的DMEM (Hyclone, Thermo Scientific) 培养基中, 以 1×10^5 个细胞/ml的浓度加入小鼠巨噬细胞家族的RAW264.7细胞, 并将细胞保持在37°C下5% CO_2 加湿培养箱中, 培养。将培养的RAW264.7细胞以 5×10^4 个细胞/ml接种到48孔板中, 并稳定15小时。然后, 用下表2和表3中所示类型的甘油衍生物化合物来处理培养液1小时, 然后用 $1 \mu\text{g/ml}$ 的细胞刺激剂脂多糖 (LPS) 处理, 随后进一步孵育24小时。此后, 每个孔收集0.5ml培养上清液, 并离心 (3000rpm, 5分钟) 以回收上清液。根据小鼠IL-6ELISA装置 (BD Biosciences) 提供的手册, 测量回收的上清液中的IL-6水平。在进行ELISA的前一天, 将IL-6捕获抗体稀释在磷酸盐缓冲盐水中, 涂在微孔上, 然后在4°C下储存过夜。每个孔用缓冲溶液洗涤三次, 然后在室温下用2%牛血清蛋白 (BSA) 封闭1小时。在用缓冲溶液洗涤三次后, 将 $100 \mu\text{l}$ 样品分配到每个孔中, 并在室温下放置2小时。将用洗涤缓冲溶液洗涤3次并稀释的检测抗体分配到每个孔中, 并使得在室温下反应1小时, 然后在室温下放置1小时。此后, 使二级HRP结合抗体在室温下反应30分钟, 用缓冲溶液洗涤三次, 并每孔用 $50 \mu\text{l}$ 终止溶液处理, 然后用ELISA微孔板前导 (ELISA microplate leader) 在450nm处测量光密度。IL-6表达降低率的结果示于下表2和表3中。

[0210] [表2]

[0211]

| | 样品 | 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) | IL-6浓度 ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 平均值 \pm 偏差) |
|----|----------|----------------------------|---|
| 1 | 阴性对照组 | 0 | 0.045 ± 0.001 |
| 2 | DMSO | 1 % | 0.045 ± 0.004 |
| 3 | LPS | 1 | 0.262 ± 0.008 |
| 4 | EC-18 | 100 | 0.194 ± 0.011 |
| 5 | EC_A04 | 100 | 0.141 ± 0.016 |
| 6 | EC_A04_2 | 100 | 0.048 ± 0.003 |
| 7 | EC_A04_3 | 100 | 0.043 ± 0.000 |
| 8 | EC_A05 | 100 | 0.164 ± 0.012 |
| 9 | EC_A06 | 100 | 0.168 ± 0.004 |
| 10 | EC_A06A | 100 | 0.180 ± 0.011 |
| 11 | EC_A11 | 100 | 0.257 ± 0.029 |
| 12 | EC_A12 | 100 | 0.245 ± 0.003 |
| 13 | EC_A44 | 100 | 0.197 ± 0.031 |
| 14 | EC_A59 | 100 | 0.174 ± 0.033 |
| 15 | EC_A59A | 100 | 0.168 ± 0.044 |
| 16 | EC_A60 | 100 | 0.187 ± 0.000 |
| 17 | EC_A60A | 100 | 0.178 ± 0.001 |
| 18 | EC_A73 | 100 | 0.183 ± 0.000 |
| 19 | EC_A73A | 100 | 0.130 ± 0.006 |
| 20 | EC_A74 | 100 | 0.187 ± 0.006 |
| 21 | EC_A75 | 100 | 0.170 ± 0.071 |
| 22 | EC_A76 | 100 | 0.167 ± 0.019 |
| 23 | EC_A77 | 100 | 0.171 ± 0.032 |

[0212] [表3]

| | 样品 | 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) | IL-6浓度 ($\text{pg}/\mu\text{l}$, 平均值 \pm 偏差) |
|--------|---------|----------------------------|---|
| | DMSO | 1 % | 0.588 ± 0.003 |
| | LPS | 1 | 1.526 ± 0.077 |
| | EC-18 | 100 | 1.159 ± 0.036 |
| | EC_A104 | 100 | 1.293 ± 0.000 |
| [0213] | EC_A105 | 100 | 1.163 ± 0.074 |
| | EC_A106 | 100 | 1.139 ± 0.010 |
| | EC_A107 | 100 | 1.462 ± 0.180 |
| | EC_A111 | 100 | 1.562 ± 0.127 |
| | EC_A112 | 100 | 1.312 ± 0.170 |
| | EC_A113 | 100 | 1.417 ± 0.159 |
| | EC_A114 | 100 | 1.394 ± 0.072 |

[0214] 图1和图2是显示上表2和表3中的值的图,其显示了由LPS诱导的IL-6分泌的程度。如表2、表3、图1和图2所示,证实了当用炎性诱导因子LPS处理RAW264.7细胞时,与阴性对照组相比,炎性细胞因子IL-6的分泌增加了约六至十倍。当添加抑制炎性细胞因子表达的物质EC-18(1-棕榈酰基-2-亚油酰基-3-乙酰甘油,PLAG)化合物时,与LPS处理组相比,IL-6表达降低了约30%,并且在本发明的甘油衍生物化合物的情况下,A04、A04-2、A04-3、A05、A06、A06A、A44、A59、A59A、A60、A60A、A73、A73A、A74、A75、A76、A77、A105、A106是与EC-18(PLAG)类似或更多抑制IL-6表达的衍生物,并且证实IL-6细胞因子的分泌在RAW264.7细胞中减少了至少30%,并且高达50%。特别地,化合物A04-2和A04-3在未经LPS处理的阴性对照组中显示IL-6表达水平,并完全抑制了LPS的活性。

[0215] [实验例2] IL-6诱导的STAT3活性降低

[0216] 进行两个实验作为确认STAT3活性的方法。首先,HEK-Blue™ IL-6细胞用于借助STAT3诱导的SEAP(分泌性胚胎碱性磷酸酶)表达来确认STAT3活性。其次,这是一种通过将含有与STAT3结合的sis诱导型元素的pGL4.47[luc2P/SIE/Hygro]载体注入RAW264.7细胞来检查STAT3活性的方法。下表4证实了使用第一种方法的本发明衍生物化合物的STAT3活性抑制能力。

[0217] 在添加了10%胎牛血清的DMEM(Hyclone, Thermo Scientific)培养基中,将HEK-Blue™ IL-6细胞以 1×10^5 个细胞/ml的浓度培养,并将细胞保持在37°C下5%CO₂加湿培养箱中,培养。将培养的HEK-Blue™ IL-6细胞以 1×10^5 个细胞/ml接种,并在培养液中加入下表3所示类型的甘油衍生物化合物处理1小时,然后将IL-6(5ng/ml)进一步温育24小时以获得STAT3活性。此后,每个孔收集培养上清液并离心(3000rpm,5分钟)以回收上清液。将回收的上清液中的SEAP表达水平以1:10的比例与Quanti Blue试剂(Quanti blue reagent)和上清液混合,并在37°C下放置约30分钟。然后,使用分光光度计在650nm波长下确认SEAP浓度,其结果示于下表4中。

[0218] [表4]

| | 样品 | 浓度($\mu\text{g/ml}$) | STAT3活性SEAP表达(%) (平均值 \pm 偏差) |
|--------|----------|------------------------|------------------------------------|
| | 阴性对照组 | 0 | 100 |
| | IL-6 | 5 ng/ml | 228.8 \pm 17.0 |
| | EC_18 | 100 | 173.0 \pm 7.9 |
| | EC_A04 | 100 | 177.2 \pm 18.4 |
| [0219] | EC_A04_2 | 100 | 85.4 \pm 9.4 |
| | EC_A04_3 | 100 | 85.9 \pm 6.4 |
| | EC_A05 | 100 | 201.6 \pm 34.6 |
| | EC_A06 | 100 | 164.8 \pm 16.3 |
| | EC_A11 | 100 | 167.4 \pm 9.8 |
| | EC_A12 | 100 | 174.9 \pm 12.1 |
| | EC_A44 | 100 | 236.5 \pm 55.9 |

[0220] 图3是显示上表4中的值的图,其显示了由IL-6诱导的STAT3活性的程度。如表4和图3所示,证实了当在HEK-Blue™ IL-6细胞中用IL-6细胞因子处理时,与阴性对照组相比,STAT3活性增加了约2.3倍。与LPS处理组相比,EC-18 (PLAG) 处理组使STAT3活性降低了约25%。在本发明的甘油衍生物化合物的情况下,将STAT3活性降低至与EC-18相似的程度的衍生物(PLAG)包括A04、A06和A11、A12,并且证实了它们中的大多数降低STAT3活性约25%。在A04-2和A04-3的情况下,证实LPS对STAT3活性的抑制作用与未经IL-6处理的阴性对照相当。

[0221] [实验例3] IL-6诱导的STAT3活性降低

[0222] 在添加有10%胎牛血清的DMEM (Hyclone, Thermo Scientific) 培养基中,将RAW264.7细胞以 1×10^5 个细胞/ml的浓度培养,并将该细胞保持在37°C下5%CO₂加湿培养箱中,培养。将培养的RAW264.7细胞以 1×10^5 个细胞/ml接种到48孔板中,并稳定18小时。此后,将含有sis-诱导型元素的pGL 4.47[luc2P/SIE/Hygro]载体与Attractene(引诱子)混合,以在室温下诱导复合物形成15分钟。该复合物用于处理该细胞,然后进一步孵育18小时。此后,用下表5所示类型的甘油衍生物化合物处理培养液1小时,然后用LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)处理并进一步培养18小时以获得STAT3活性。此后,移除每个孔的培养上清液,用细胞裂解缓冲液裂解剩余的细胞,然后回收细胞裂解物。将90 μl 荧光素酶试剂与10 μl 回收的细胞裂解物混合,用光度计确认荧光度。结果如下面的表5所示。

[0223] [表5]

| | 样品 | 浓度($\mu\text{g/ml}$) | STAT3 活性_荧光霉素活性 (平均值 \pm 偏差) |
|--------|---------|------------------------|-----------------------------------|
| | 阴性对照组 | 0 | 100.00 \pm 0.00 |
| | DMSO | 1 % | 73.26 \pm 4.54 |
| | LPS | 1 | 857.47 \pm 12.13 |
| | EC-18 | 100 | 393.64 \pm 46.12 |
| | EC_A59 | 100 | 392.97 \pm 40.30 |
| | EC_A59A | 100 | 410.32 \pm 5.35 |
| | EC_A60 | 100 | 572.19 \pm 40.59 |
| | EC_A60A | 100 | 717.94 \pm 25.68 |
| | EC_A73 | 100 | 451.22 \pm 166.71 |
| [0224] | EC_A73A | 100 | 649.59 \pm 274.69 |
| | EC_A74 | 100 | 484.95 \pm 29.86 |
| | EC_A75 | 100 | 727.51 \pm 117.37 |
| | EC_A76 | 100 | 786.72 \pm 202.75 |
| | EC_A77 | 100 | 500.37 \pm 63.45 |
| | EC_A104 | 100 | 402.47 \pm 55.50 |
| | EC_A105 | 100 | 458.80 \pm 20.98 |
| | EC_A106 | 100 | 485.49 \pm 6.45 |
| | EC_A107 | 100 | 541.13 \pm 98.80 |
| | EC_A111 | 100 | 339.58 \pm 20.40 |
| | EC_A112 | 100 | 470.22 \pm 13.74 |
| | EC_A113 | 100 | 421.60 \pm 29.72 |
| | EC_A114 | 100 | 382.48 \pm 54.41 |

[0225] 图4是显示上表5中的值的图,其显示了由IL-6诱导的STAT3活性的程度。如表5和图4所示,证实了当在RAW264.7细胞中用LPS处理时,与阴性对照组相比,STAT3活性增加了约8.5倍,并且EC-18(PLAG)处理组使STAT3活性降低了约50%。在本发明的甘油衍生物化合物的情况下,已证实存在将STAT3活性降低至类似于EC-18(PLAG)的程度的A59、A59A、A104、A111、A113和A114衍生物。

[0226] [实验例4] THP-1细胞中CXCL8(IL-8)表达减少

[0227] 在添加有10%胎牛血清的RPMI (Hyclone, Thermo Scientific) 培养基中,将人巨噬细胞家族的THP-1细胞以 1×10^5 个细胞/ml的浓度悬浮,将细胞保持在37°C下5%CO₂加湿培养箱中,培养。将培养的THP-1细胞以 1×10^6 个细胞/ml接种到12孔板中,并稳定30分钟。然后,用下表6所示类型的甘油衍生物化合物处理培养液1小时,然后用细胞刺激剂吉西他滨(Gemcitabine) (2 $\mu\text{g/ml}$)处理,随后进一步孵育24小时。此后,每孔收集1.5ml培养上清液,并离心(3000rpm,5分钟)以回收上清液。根据人类IL-8ELISA装置(BD Biosciences)提供的手册,测量回收的上清液中的CXCL8(IL-8)水平。在进行ELISA前一天,将IL-8捕获抗体稀释在磷酸盐缓冲盐水中,涂在微孔上,然后在4°C下储存过夜。每个孔用缓冲溶液洗涤三次,然后在室温下用2%牛血清蛋白(BSA)封闭1小时。在用洗涤缓冲溶液洗涤三次后,将100

μl 样品分配到每个孔中,并在室温下放置2小时。用洗涤缓冲液洗涤3次并稀释的检测抗体被分配到每个孔中,并在室温下反应1小时,然后在室温下放置1小时。此后,使二级HRP结合抗体在室温下反应30分钟,用洗涤缓冲液洗涤三次,并每孔用 $50\mu\text{l}$ 终止溶液处理,然后用ELISA微孔板前导在450nm处测量光密度。表达增加率的结果显示在下表6中。

[0228] [表6]

| | 样品 | 浓度($\mu\text{g/ml}$) | CXCL8 [IL-8]浓度 ($\text{pg}/\mu\text{l}$, 平均值 \pm 偏差) |
|-----------|----------|------------------------|---|
| 1 | 阴性对照组 | 0 | 7.9 ± 0.0 |
| 2 | 吉西他滨 | 2 | 104.6 ± 1.5 |
| 3 | EC_18 | 100 | 79.6 ± 6.0 |
| 4 | EC_A04 | 100 | 124.2 ± 0.5 |
| 5 | EC_A04_2 | 100 | 141.6 ± 0.0 |
| 6 | EC_A04_3 | 100 | 68.5 ± 0.2 |
| 7 | EC_A05 | 100 | 84.6 ± 0.0 |
| 8 | EC_A06 | 100 | 96.8 ± 8.3 |
| 9 | EC_A06A | 100 | 228.7 ± 1.0 |
| 10 | EC_A44 | 100 | 96.8 ± 8.3 |
| 11 | EC_A45 | 100 | 82.0 ± 2.0 |
| [0229] 12 | EC_A59 | 100 | 79.6 ± 2.3 |
| 13 | EC_A59A | 100 | 116.6 ± 2.8 |
| 14 | EC_A73A | 100 | 100.9 ± 3.6 |
| 15 | EC_A74 | 100 | 114.4 ± 3.9 |
| 16 | EC_A75 | 100 | 110.9 ± 8.9 |
| 17 | EC_A76 | 100 | 225.9 ± 7.0 |
| 18 | EC_A104 | 100 | 113.6 ± 5.4 |
| 19 | EC_A105 | 100 | 112.3 ± 1.8 |
| 20 | EC_A106 | 100 | 115.7 ± 4.3 |
| 21 | EC_A107 | 100 | 107.6 ± 3.4 |
| 22 | EC_A111 | 100 | 92.0 ± 7.2 |
| 23 | EC_A112 | 100 | 106.5 ± 8.2 |
| 24 | EC_A113 | 100 | 113.1 ± 11.1 |
| 25 | EC_A114 | 100 | 120.2 ± 4.3 |

[0230] 图5是显示上表6中的值的图,其显示了CXCL8 (IL-8)的表达程度。如表6和图5所示,证实了当在THP-1细胞中用抗癌药物吉西他滨处理时,与阴性对照组相比,嗜中性粒细胞募集因子CXCL8 (IL-8)趋化因子的分泌增加了约13倍。当用EC-18 (PLAG)处理时,CXCL8的表达减少了约20%。当添加本发明的甘油衍生物化合物的处理时,将CXCL8 (IL-8)趋化因子的分泌减少到与EC-18 (PLAG)相似的程度的衍生物包括A04-3、A05、A44和A45。在A04-3的情况下,已确认其降低至约35%。

[0231] [实验例5]使用Transwell减少HL-60细胞系的迁移

[0232] 在添加有10%胎牛血清的RPMI (Hyclone, Thermo Scientific) 培养基中, 将人巨噬细胞家族THP-1细胞以 1×10^5 个细胞/ml的浓度传代培养, 并将细胞保持在37°C下5%CO₂加湿培养箱中, 培养。为了制备在迁移测定 (Transmigration assay) 期间在较下部的孔中使用的THP-1细胞培养液, 首先, 将培养的THP-1细胞以 1×10^6 个细胞/ml接种到12孔板中, 并稳定30分钟。然后, 用下表7所示类型的甘油衍生物化合物处理培养液1小时, 然后用细胞刺激剂吉西他滨 (2 μ g/ml) 处理, 随后进一步孵育24小时。此后, 每个孔收集1.5ml培养上清液, 并离心 (3000rpm, 5分钟) 以回收上清液。根据Cultrex 96孔层粘连蛋白细胞侵袭测定 (Cultrex 96well Laminin Cell Invasion) 提供的手册, 测量回收的上清液中的CXCL8 (IL-8) 水平。在进行细胞迁移测定的前一天, 在上部浸润小室 (Invasion Chamber) 中处理 $1 \times$ 核纤层蛋白I溶液并涂覆。此后, 在添加有10%胎牛血清的RPMI (Hyclone, Thermo Scientific) 培养基中, 将培养的HL-60细胞分配为 5×10^4 个细胞/小室, 并且将预先制备的150 μ l THP-1培养上清液添加到下小室。此后, 移去上小室, 用离心机将细胞附着在下小室的底部, 然后移除上清液。加入细胞解离/钙黄绿素-AM溶液, 反应1小时。然后, 借助转换细胞数量来计算使用荧光光谱法获得的值。HL-60细胞迁移减少的结果示于下表7中。

[0233] [表7]

| | 样品 | 浓度(μ g/ml) | 通过 Transwell 迁移的 HL-60 细胞的数量(细胞数量) |
|--------|----------|-----------------|---------------------------------------|
| | 阴性对照组 | 0 | 2582.6 |
| | 吉西他滨 | 2 | 5022.9 |
| | EC_18 | 100 | 2697.2 |
| | EC_A04 | 100 | 11116.7 |
| | EC_A04_2 | 100 | 4346.3 |
| | EC_A04_3 | 100 | 11646.2 |
| | EC_A05 | 100 | 17283.8 |
| [0234] | EC_A06A | 100 | 11719.5 |
| | EC_A44 | 100 | 9320.6 |
| | EC_A45 | 100 | 16343.3 |
| | EC_A59 | 100 | 15130.2 |
| | EC_A59A | 100 | 4714.8 |
| | EC_A73A | 100 | 2527.7 |
| | EC_A75 | 100 | 3140.9 |
| | EC_A76 | 100 | 5338.4 |
| | EC_A104 | 100 | 6901.7 |
| | EC_A111 | 100 | 4899.9 |

[0235] 图6是显示上表7中的值的图, 其显示了使用Transwell的HL-60细胞系的迁移程度。如表7和图6所示, 证实了当在THP-1细胞中用抗癌药物吉西他滨处理时, 与阴性对照组相比, 嗜中性粒细胞的迁移增加了约两倍。当用EC-18 (PLAG) 处理时, HL-60细胞的迁移减少到与阴性对照组相似的程度。当添加本发明的甘油衍生物化合物的处理时, 证实存在类似于EC-18 (PLAG) 的减少细胞迁移的A73和A75衍生物。

[0236] [实验例6] IL-4诱导的STAT6活性降低

[0237] 在添加了10%胎牛血清的DMEM培养基(Dulbecco改良的Eagle培养基, Hyclone, Thermo Scientific)中, 将A549细胞以 1×10^5 个细胞/ml的浓度传代培养, 并将该细胞保持在37°C下5%CO₂加湿培养箱中, 培养。将培养的A549细胞以 1×10^5 个细胞/ml接种到48孔板中, 并稳定18小时。此后, 将含有STAT6结合启动子部分的pGL4-STAT6报告载体与Attractene混合, 以在室温下诱导复合物形成15分钟。该复合物用于处理该细胞, 然后进一步孵育24小时。此后, 在培养液中用下表8和表9所示类型的甘油衍生物化合物处理培养液1小时, 然后将IL-4(2ng/ml或10ng/ml)进一步温育20小时以获得STAT6活性。此后, 移除每个孔的培养上清液, 用细胞裂解缓冲液裂解剩余的细胞, 然后回收细胞裂解物。将90 μ l荧光素酶试剂与10 μ l回收的细胞裂解物混合, 用光度计确认荧光度。结果示于下表8和表9中。

[0238] [表8]

| | 样品 | 浓度(μ g/ml) | STAT6 活性_荧光霉素活性 (平均值 \pm 偏差) |
|--------|----------|-----------------|-----------------------------------|
| | 阴性对照组 | 0 | 8.5 \pm 1.2 |
| | IL-4 | 2 | 982.0 \pm 38.7 |
| | EC_18 | 100 | 462.5 \pm 161.7 |
| | EC-A04 | 100 | 1026 \pm 275.9 |
| [0239] | EC-A04-2 | 100 | 175.5 \pm 28.2 |
| | EC-A04_3 | 100 | 123.2 \pm 11.5 |
| | EC-A05 | 100 | 739.5 \pm 197.6 |
| | EC-A06 | 100 | 570.7 \pm 52.9 |
| | EC-A11 | 100 | 953 \pm 98.9 |
| | EC-A12 | 100 | 549.5 \pm 96.5 |
| | EC-A44 | 100 | 974.2 \pm 37.4 |

[0240] [表9]

| | 样品 | 浓度($\mu\text{g}/\text{m}\ell$) | STAT6 活性_荧光霉素活性 (平均值 \pm 偏差) |
|--------|---------|----------------------------------|-----------------------------------|
| | 阴性对照组 | 0 | 12.5 \pm 0.7 |
| | IL-4 | 10 | 2134.5 \pm 17.6 |
| | EC_18 | 100 | 1281.5 \pm 26.1 |
| | EC_A59 | 100 | 1129 \pm 5.6 |
| | EC_A59A | 100 | 2127.5 \pm 4.9 |
| [0241] | EC_A60 | 100 | 2534.5 \pm 40.3 |
| | EC_60A | 100 | 1034.5 \pm 12.0 |
| | EC_A73 | 100 | 1176 \pm 1.4 |
| | EC_A73A | 100 | 625.5 \pm 7.7 |
| | EC_A74 | 100 | 2450 \pm 16.9 |
| | EC_A75 | 100 | 2308 \pm 4.2 |
| | EC_A76 | 100 | 1438 \pm 7.0 |
| | EC_A77 | 100 | 1819 \pm 2.8 |
| | EC_06A | 100 | 1552.5 \pm 9.1 |

[0242] 图7和图8是显示以上表8和表9中的值的图,其显示了由IL-4诱导的STAT6活性的程度。如表8、表9、图7和图8所示,证实了当在A549细胞中用IL-4处理时,与阴性对照组相比,根据处理的IL-4的量,STAT6活性增加了约120至2000倍。当用EC-18处理时,STAT6活性降低了约50%。在本发明的甘油衍生物化合物的情况下,A04-2、A04-3、A06、A12、A59、A60A、A73、A73A和A76是显著降低STAT6活性到与EC-18 (PLAG) 相似程度的衍生物,并证实STAT6活性降低到与大多数EC-18处理组的结果相似的程度。其中,已证实与EC-18处理组相比,A04-2、A04-3和A73A显著降低STAT6活性高达约80%。

[0243] [实验例7]PKC激活剂诱导的IL-4分泌减少

[0244] 在添加了10%胎牛血清的DMEM培养基(Dulbecco改良的Eagle培养基,Hyclone, Thermo Scientific)中,将小鼠淋巴瘤家族EL-4细胞以 1×10^5 个细胞/ml的浓度传代培养,并将细胞保持在37°C下5%CO₂加湿培养箱中,培养。将培养的EL-4细胞以 5×10^4 个细胞/ml接种到48孔板中,并稳定30小时。然后,用下表10和表11所示类型的甘油衍生物化合物处理培养液2小时。此后,用0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的细胞刺激剂PKC激活剂(p10,某种PMA)处理,随后进一步孵育18小时。此后,每个孔收集0.5ml培养上清液,并离心(3000rpm,5分钟)以回收上清液。根据小鼠IL-4ELISA装置(BD Biosciences)提供的手册,测量回收的上清液中的IL-4水平。在进行ELISA的前一天,将IL-4捕获抗体稀释在磷酸盐缓冲盐水中,涂在微孔上,然后在4°C下储存过夜。每个孔用缓冲溶液洗涤三次,然后在室温下用2%牛血清蛋白(BSA)封闭1小时。用缓冲溶液洗涤三次后,将100 μl 样品分配到每个孔中,并在室温下放置2小时。将用洗涤缓冲溶液洗涤3次并稀释的检测抗体分配到每个孔中,并在室温下反应1小时,然后在室温下放置1小时。此后,使二级HRP结合抗体在室温下反应30分钟,用缓冲溶液洗涤三次,并且每个孔用50 μl 终止溶液处理,然后用ELISA微孔板前导在450nm处测量光密度。表达减少率的结果示于下表10和表11中。

[0245] [表10]

| | 样品 | 浓度($\mu\text{g/ml}$) | IL-4浓度 ($\text{pg}/\mu\text{l}$, 平均值 \pm 偏差) |
|--------|---------|------------------------|---|
| | 阴性对照组 | 0 | 1.5 ± 1.2 |
| | PKC激活剂 | 1 | 910.6 ± 25.7 |
| | EC-18 | 100 | 662.4 ± 42.4 |
| | EC_A59 | 100 | 1027.4 ± 22.4 |
| | EC_A59A | 100 | 955.1 ± 26.9 |
| [0246] | EC_A60 | 100 | 899.2 ± 61.0 |
| | EC_60A | 100 | 774.7 ± 187.0 |
| | EC_A73 | 100 | 1424.7 ± 210.2 |
| | EC_A73A | 100 | 792 ± 220.4 |
| | EC_A74 | 100 | 627 ± 3.8 |
| | EC_A75 | 100 | 728.8 ± 23.1 |
| | EC_A76 | 100 | 933.3 ± 140.1 |
| | EC_A77 | 100 | 721.0 ± 89.3 |
| | EC_A06A | 100 | 778.8 ± 86.1 |
| | EC_A06 | 100 | 912.9 ± 10.9 |

[0247] [表11]

| | 样品 | 浓度($\mu\text{g/ml}$) | IL-4浓度 ($\text{pg}/\mu\text{l}$, 平均值 \pm 偏差) |
|--------|---------|------------------------|---|
| | 阴性对照组 | 0 | 0.6 ± 0.0 |
| | PKC激活剂 | 1 | 462.5 ± 57.1 |
| | EC-18 | 100 | 189.8 ± 38.5 |
| [0248] | EC_A104 | 100 | 183.2 ± 56.4 |
| | EC_A105 | 100 | 154.7 ± 6.6 |
| | EC_A106 | 100 | 166.9 ± 15.7 |
| | EC_A107 | 100 | 175.0 ± 17.3 |
| | EC_A111 | 100 | 165.6 ± 20.1 |
| | EC_A112 | 100 | 171.6 ± 18.1 |
| | EC_A113 | 100 | 198.5 ± 26.0 |
| | EC_A114 | 100 | 277.8 ± 61.2 |

[0249] 图9和图10是显示以上表8和表9中的值的图,其显示了由PKC激活剂诱导的IL-4分泌的程度。如表10、表11、图9和图10所示,证实了当在小鼠EL-4细胞中用PKC激活剂处理时,与阴性对照组相比,IL-4细胞因子的分泌迅速增加。当用EC-18化合物处理时,IL-4表达降低约20%至60%。当添加本发明的甘油衍生物化合物的处理时,将IL-4趋化因子的分泌减少到与EC-18 (PLAG) 相似的程度的衍生物包括A74、A75、A77、A104、A105、A106、A107、A111、A112和A113。证实减少量从大约20%减少到60%。

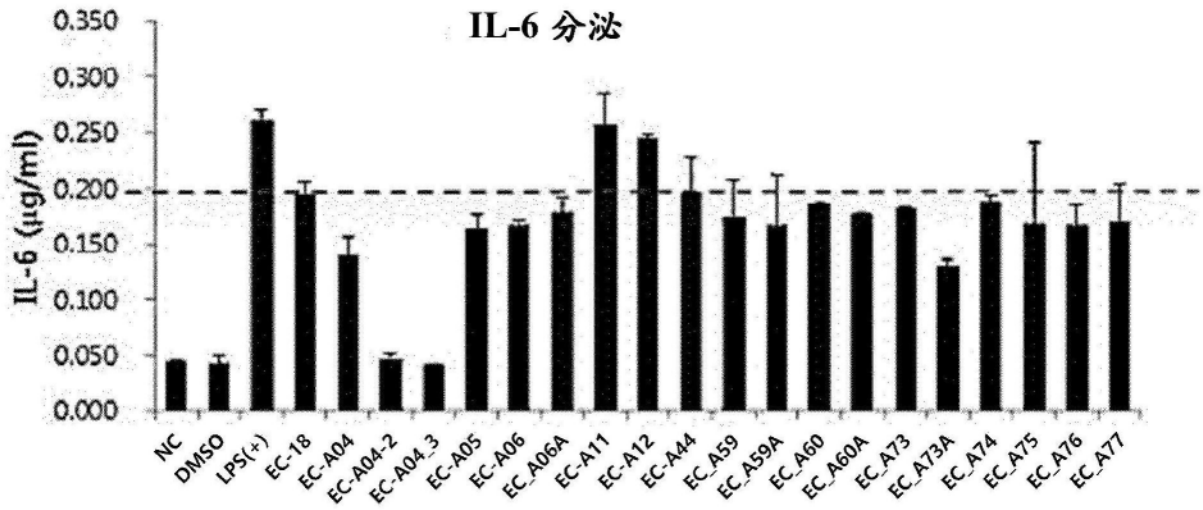


图1

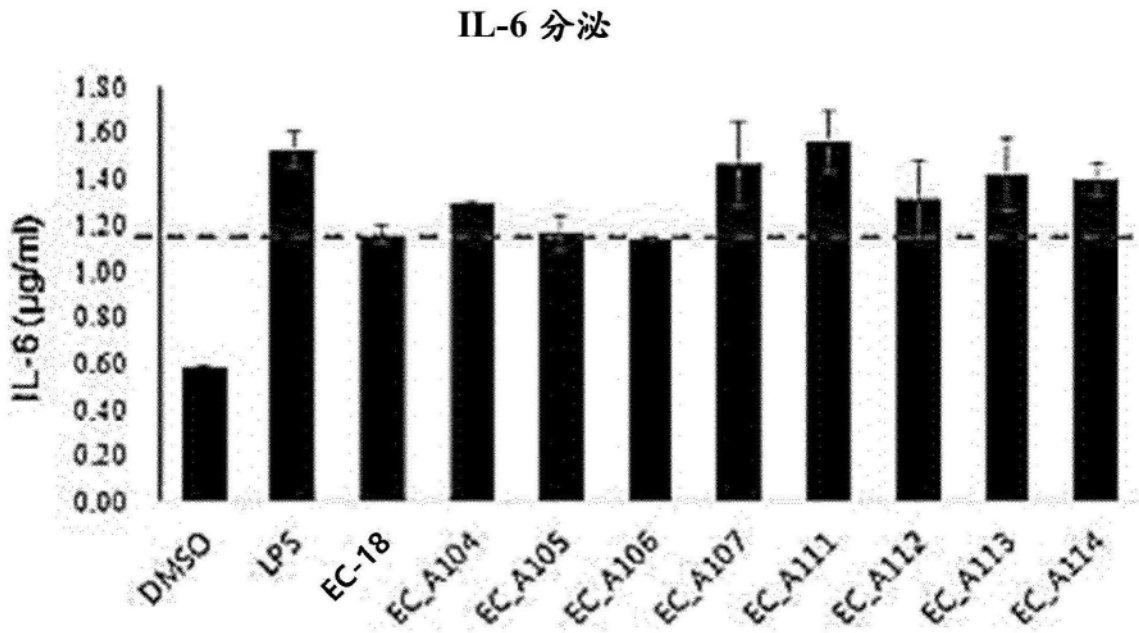


图2

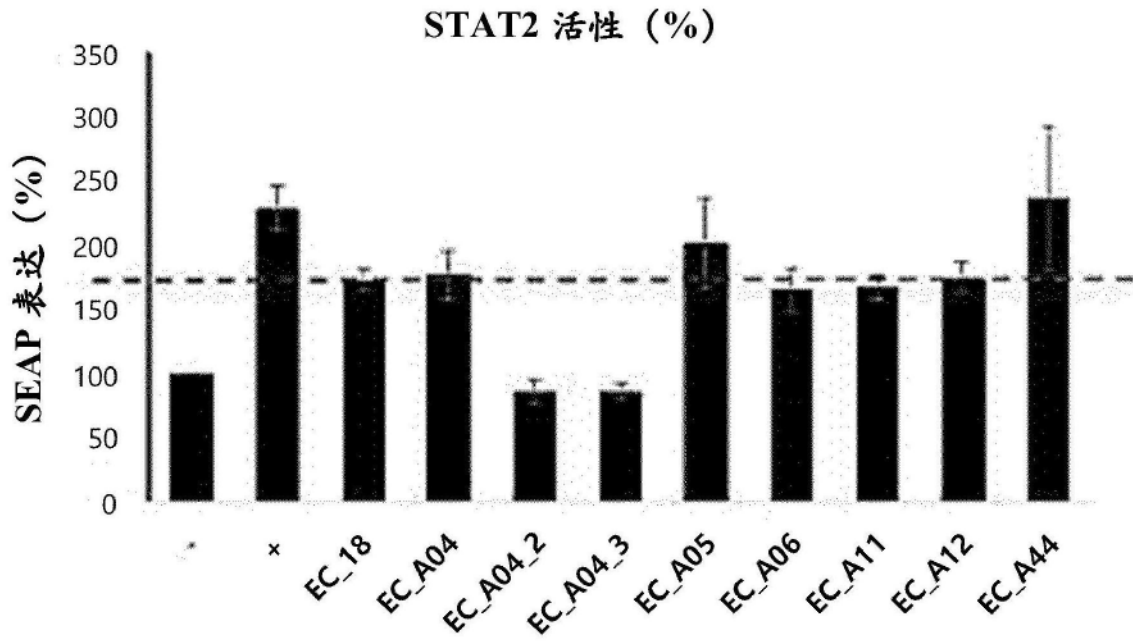


图3

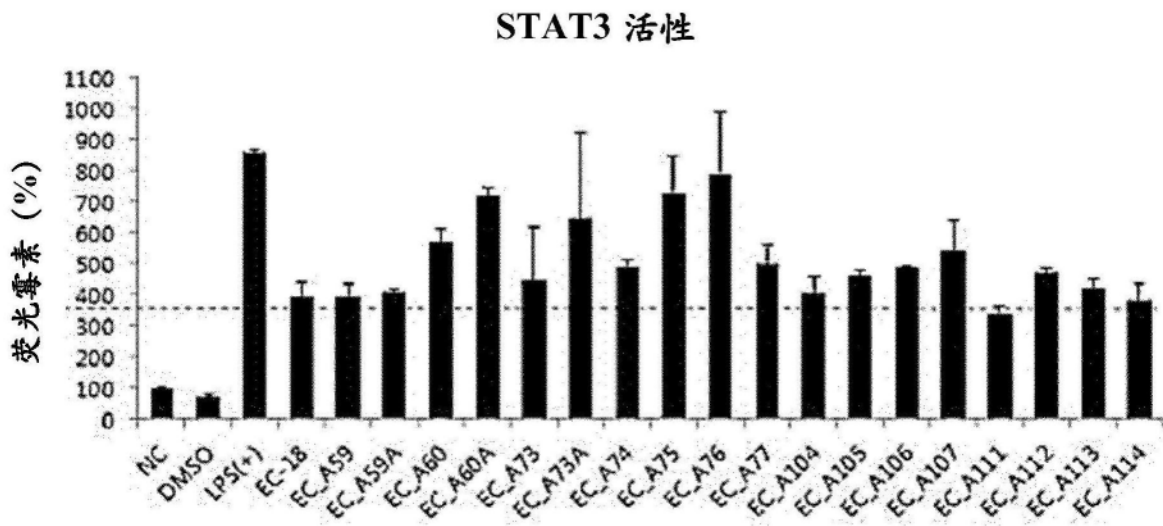


图4

EC-18 衍生物对吉西他滨诱导的 CXCL8 分泌的作用

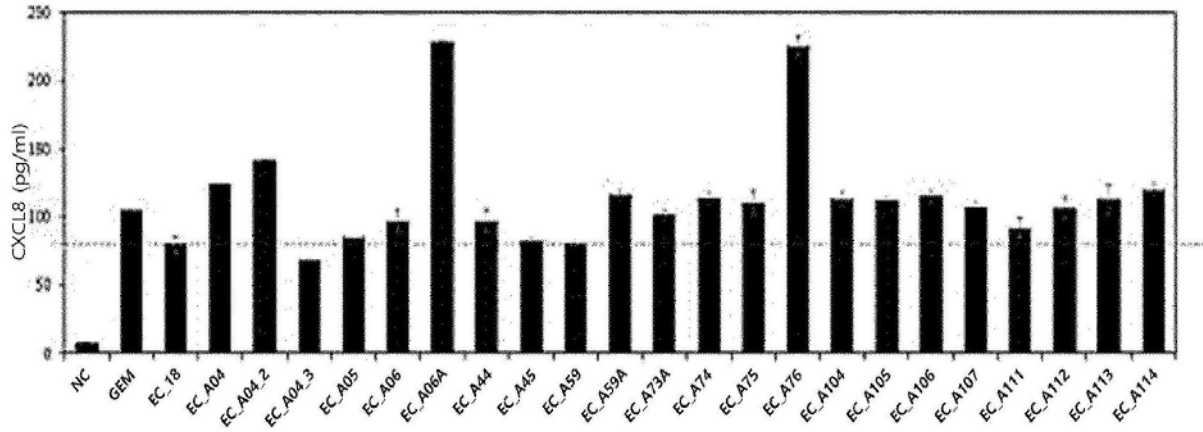


图5

HL-60 迁移

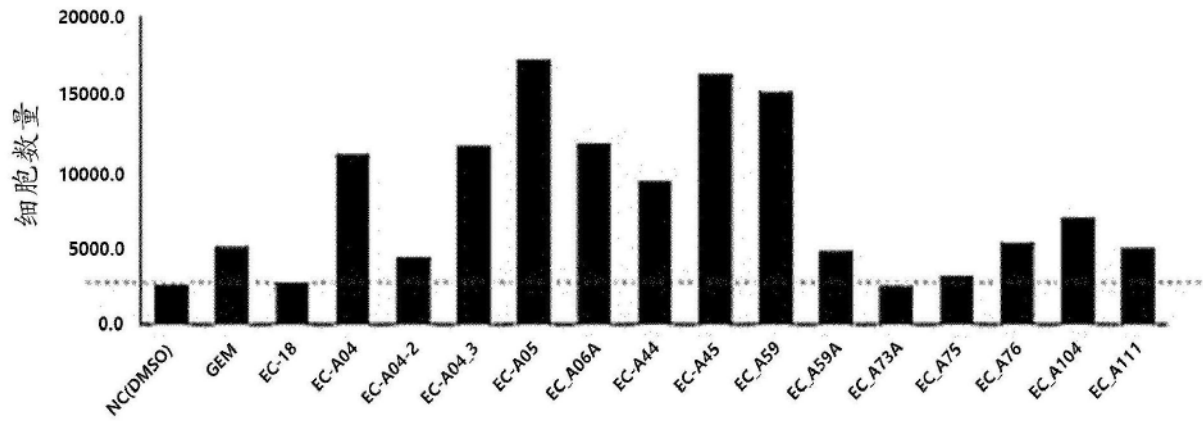


图6

STAT6 活性

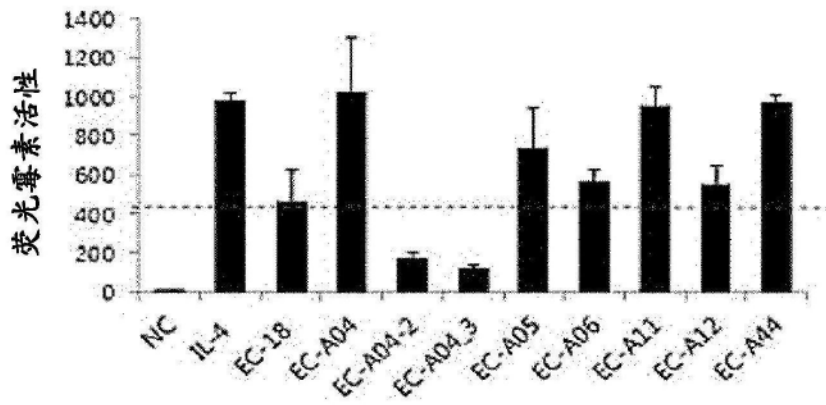


图7

STAT6 活性

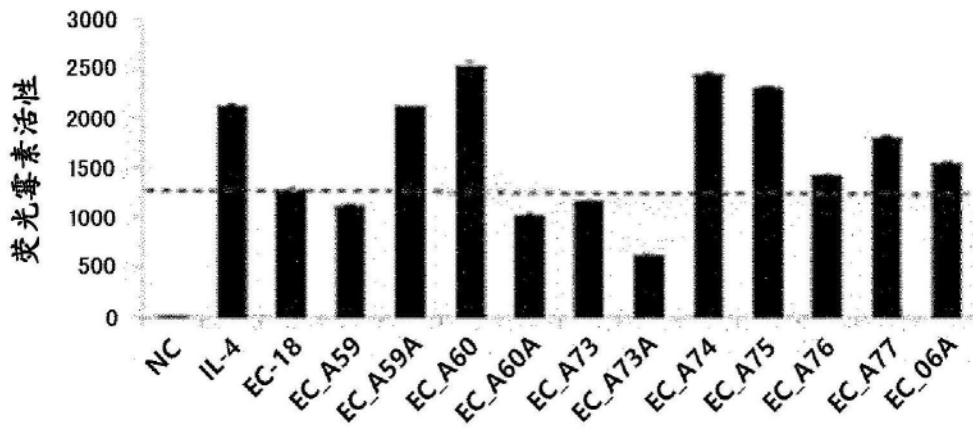


图8

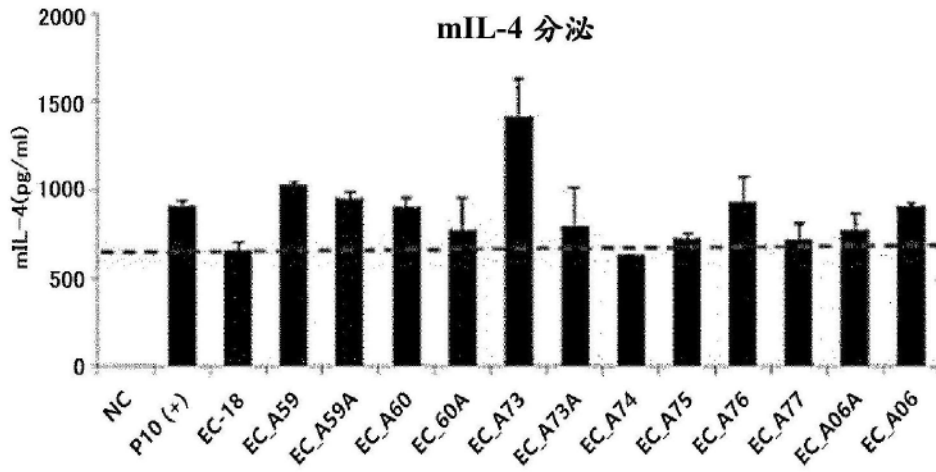


图9

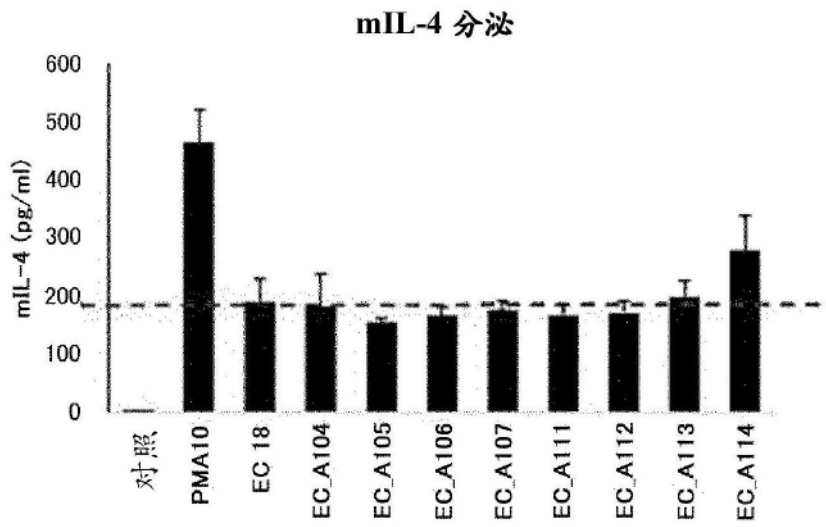


图10