



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101622266 B

(45) 授权公告日 2013.09.11

(21) 申请号 200880006090.8

(22) 申请日 2008.01.11

(30) 优先权数据

07290097.0 2007.01.24 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2009.08.25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2008/000053 2008.01.11

(87) PCT申请的公布数据

W02008/090425 EN 2008.07.31

(73) 专利权人 国家科研中心

地址 法国巴黎

(72) 发明人 G·皮佐 J·普朗迪 M·吉勒龙

G·德里贝罗 J·吉亚尔 L·莫里

S·鲍利迪

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 任宗华

(51) Int. Cl.

C07H 13/06 (2006.01)

A61K 31/7024 (2006.01)

A61P 31/06 (2006.01)

(56) 对比文件

侯伟 等. 两种糖脂抗原在结核病血清诊断中的应用.《中国医学科学院学报》.1994, 第16卷(第5期), 第374页第1段至第376页第2段.

Isabelle Vergne, et al. Interaction of Mycobacterial Glycolipids with host cells..《Frontiers in Bioscience》.1998, 第3卷第866页图1, 第868页图2, 图3.

Martine Gilleron, et al. Diacylated Sulfoglycolipids Are Novel Mycobacterial Antigens Stimulating CD1-restricted T Cells during Infection with Mycobacterium tuberculosis ..《The Journal of Experimental Medicine》.2004, 第199卷(第5期), 第649页第1段至657页最后1段, 尤其是第652页图1.

审查员 汪泉

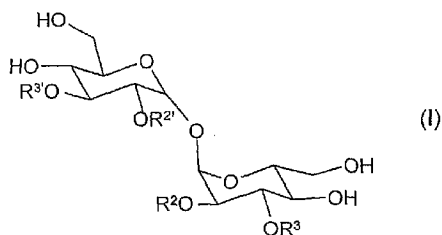
权利要求书5页 说明书30页 附图2页

(54) 发明名称

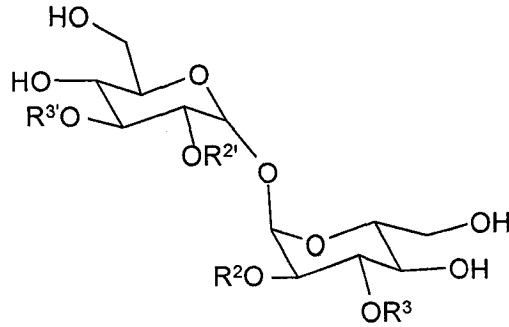
硫酸糖脂抗原、其制备方法及其抗结核病的用途

(57) 摘要

本发明涉及下列式(I)的化合物, 其制备方法及其在治疗或预防结核病中的用途。



1. 式 (I) 的化合物：



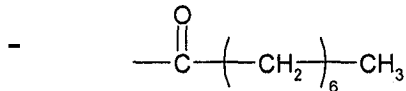
(I)

其中：

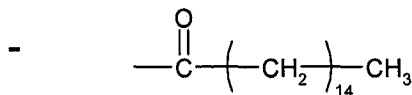
$R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 相同或不同，独立地选自 H、 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ ，条件是 $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 中的至少一个为 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ ；

M^+ 为 Na^+ 或 K^+ ；

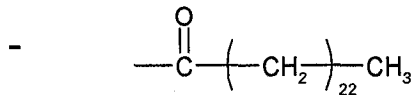
R^2 是选自下述的脂肪酰基：



(辛酰基)

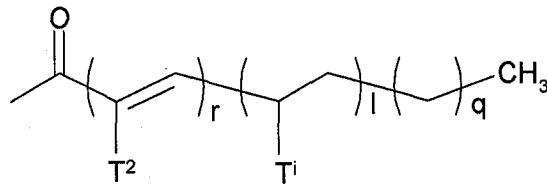


(棕榈酰基)



(二十四烷酰基)

R^3 为式 (b-2)：



(b-2)

其中：

r 是 1 或 2；

l 是 0、1、2 或 3；

q 是选自 0-20 的整数；

条件是 $l+q \geq 1$ ；

T^2 为甲基；

每个 T^1 为甲基；

及其对映异构体、非对映异构体以及式 (I) 的化合物与其对映异构体和非对映异构体混合物。

2. 根据权利要求 1 的化合物, 其中 $R^{2'}$ 为 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ 且 $R^{3'}$ 为 H。

3. 根据权利要求 1 的化合物, 其中:

r 为 1;

l 为 1、2 或 3;

q 为选自 10-20 的整数;

T^2 为甲基;

各个 T^i 为甲基, 并且与 T^i 相连的碳原子显示出 (S) 构型。

4. 根据权利要求 1 的化合物, 其中:

$-l = 2, q = 0$ 且 $r = 1$;

$-l = 3, q = 14$ 且 $r = 1$;

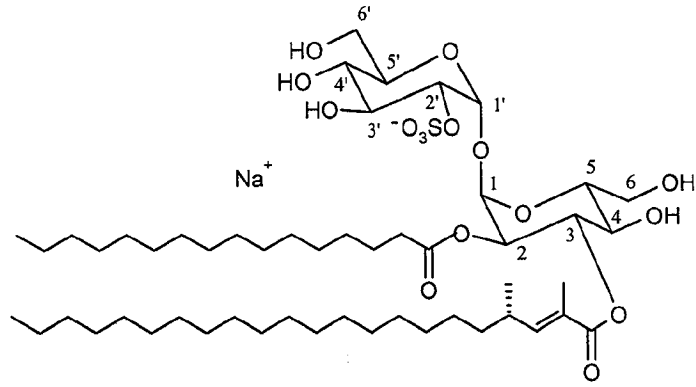
$-l = 1, q = 16$ 且 $r = 1$;

$-l = 2, q = 16$ 且 $r = 1$;

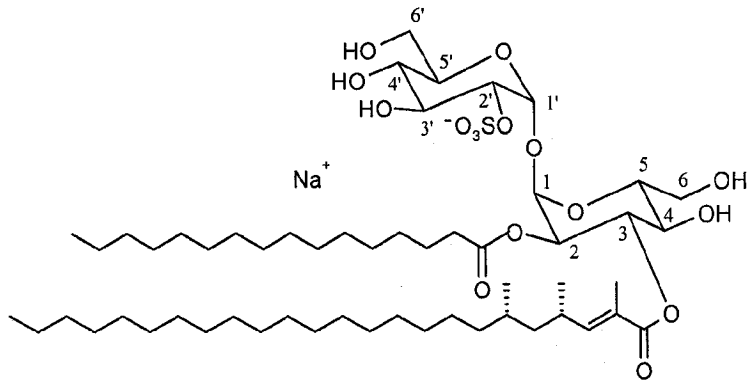
$-l = 1, q = 16$ 且 $r = 2$;

并且其中 T^2 和 T^i 为甲基。

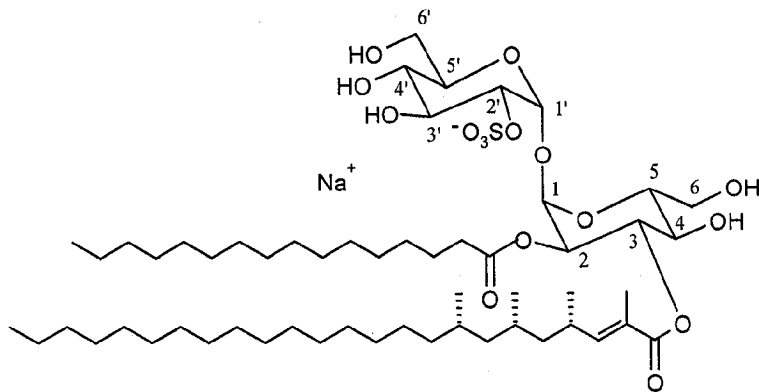
5. 根据权利要求 1 的化合物, 其选自由下列化合物组成的组:



(II.1)



(II.2)



(II.3)

及其相应的 K^+ 盐，

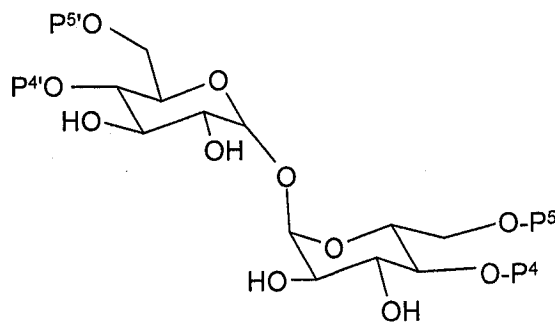
及其对映异构体、非对映异构体以及上述各式与其对映异构体和非对映异构体的混合物。

6. 药物组合物，其包含至少一种如权利要求 1 所定义的化合物，并结合有药学上可接受的载体。

7. 根据权利要求 6 的药物组合物,其为意图经口服或可注射途径给药的形式。
8. 根据权利要求 6 或 7 的药物组合物,特征在于其包含一种或多种可用于治疗或预防结核病的其它产品。
9. 根据权利要求 8 的药物组合物,其中所述其它产品是 BCG 或分枝杆菌蛋白。
10. 用于同时、分别或依次用于治疗或预防结核病的药物组合物,包含:
- 至少一种根据权利要求 1 的化合物,和
 - 至少一种可用于治疗或预防结核病的其它产品。
11. 至少一种根据权利要求 1 的化合物用于制备意图用来治疗或预防结核病的药物的用途。
12. 至少一种根据权利要求 1 的化合物用于制备意图用来治疗或预防结核病的疫苗的用途。
13. 至少一种根据权利要求 1 的化合物用于制备免疫反应活化剂的用途。
14. 至少一种根据权利要求 1 的化合物用于制备 T 淋巴细胞活化剂的用途。
15. 至少一种根据权利要求 1 的化合物用于制备诱导 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 或颗粒溶素产生的活化剂的用途。
16. 用于诊断结核病的试剂盒,包含:
- 如权利要求 1 所定义的式 (I) 化合物;
 - 树突状细胞;和
 - 用于检测 T 淋巴细胞活化的装置。
17. 制备根据权利要求 1 的式 (I) 化合物的方法,包括下列步骤:
- 磺化,和
 - 用相应的式 (IV) 和 (IV') 化合物



其中 R^2 和 R^3 如式 (I) 中的定义,且 X 和 Y 独立地代表卤素原子或 OH 基团,酰化式 (III) 化合物:

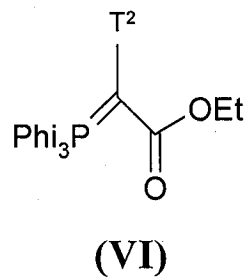
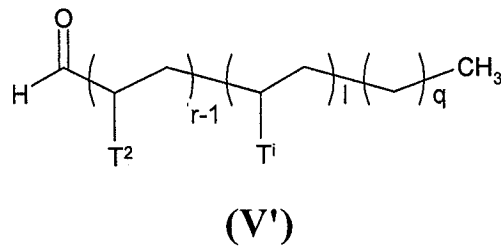
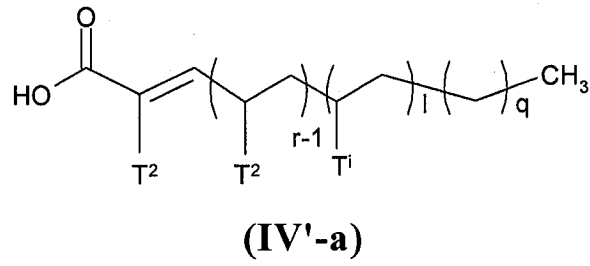


其中 P^4 、 P^5 、 $P^{4'}$ 、 $P^{5'}$ 各自相同或不同,代表 H 或 OH- 保护基团,或者 P^4 和 P^5 和 / 或 $P^{4'}$ 和 $P^{5'}$ 一起形成环状 OH- 保护基;

其中,所述磺化和酰化反应以任何顺序连续或交替进行。

18. 根据权利要求 17 的方法,其进一步包括保护和 / 或脱保护步骤。
19. 根据权利要求 17 或 18 的方法,其进一步包括分离所得的化合物的步骤。
20. 根据权利要求 17 的方法,其中所述式 (IV') 化合物是式 (IV' -a) 化合物,并

且使用式 (VI) 化合物通过维悌希反应及随后的皂化反应从相应的式 (V') 化合物获得式 (IV'-a) 化合物：



其中 r 、 l 、 q 、 T^2 、 T^1 如权利要求 1 中所定义。

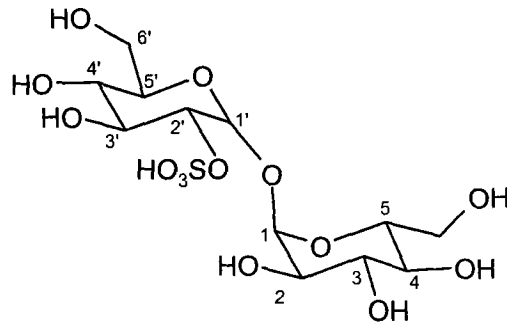
硫酸糖脂抗原、其制备方法及其抗结核病的用途

[0001] 本发明涉及新的硫酸糖脂 (sulfoglycolipid) 抗原,其制备方法及其在治疗或预防结核病中的用途。

[0002] 每年,据估计结核病是导致 3 百万人死亡的原因。导致该疾病的致病试剂是细菌,结核分枝杆菌,全世界每三个人就有一个人被其感染。被感染人群通过打喷嚏或咳嗽使其穿过空气传播。细菌可能以非活性状态潜藏在被感染的人群中,而这种人群永远不会患上该疾病。但是,在某些情况,例如老化或者免疫系统低弱时,细菌可能活化并导致发作结核病。

[0003] 分枝杆菌被膜似乎是分枝杆菌属细菌毒力的重要部分。事实上,分枝杆菌高达 40% 的干重是由脂类构成的。在那些脂类中,其中的一些似乎仅限于结核分枝杆菌,例如硫酸糖脂 (Vergne I. 和 Daffe M. *Frontiers in Bioscience* (1998) 3:865-876)。糖脂族的代表是在海藻糖单元的 2' 位上具有硫酸酯取代基 (即 α -D-吡喃葡萄糖基-(1-1')- α '-D-吡喃葡萄糖苷) (A)。

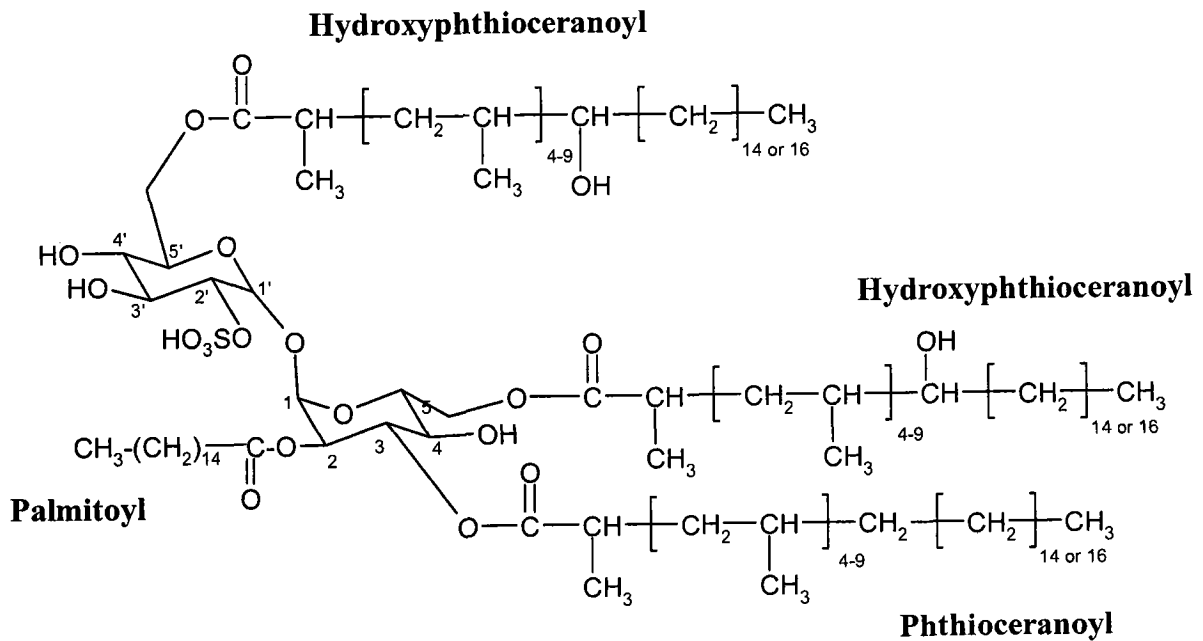
[0004]



A

[0005] 该族成员彼此的区别在于在海藻糖单元上取代的脂肪酸的数量、位置和类型不同。特别地,脂肪酸取代基包括棕榈酸、硬脂酸、结核菌酸 (phthioceranoic acid) 和羟基结核菌酸 (hydroxyphthioceranoic acid)。后两种脂肪酸代表了硫酸糖脂的特征。最广泛的硫酸糖脂是 SL-I (Goren 等, *Biochemistry* (1976) 15:2728-2735) (B)。

[0006]



B

[0007] 已证实 SL-I 能够抑制巨噬细胞的抗菌活性和阻断若干炎性试剂, 例如 LPS、IFN- γ 或 TNF- α 对巨噬细胞的作用 (Vergne I. 和 Daffe M. *Frontiers in Bioscience* (1998) 3 :865-876)。

[0008] 目前, 有两种抗击结核病的方式: 抗生素疗法和接种疫苗。

[0009] 用于预防结核病的疫苗由牛分枝杆菌属的减活细菌构成。20 世纪初, 两名科学家首先设计出了疫苗, 之后其被命名为 BCG, 卡介苗。除了其作为活疫苗而阻碍其被用在免疫抑制病人中的缺点之外, 其对抗结核病的保护作用也是有争议的。因此, 根据不同的研究, BCG 在成人中的保护效果为 0% -80%, 此外, 其不能对抗成人中最普遍的肺结核病。

[0010] 而且在超过 35 个国家中都发现了结核分枝杆菌的耐抗生素菌株。

[0011] 因此, 本发明的目的是提供一种更有效的治疗和 / 或预防结核病的方式。

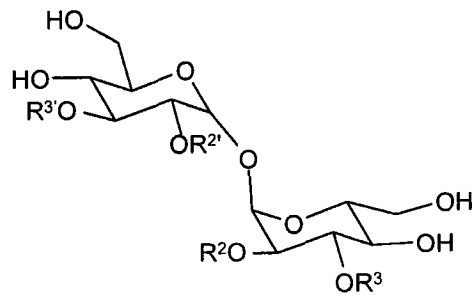
[0012] WO 2004/092192 中公开了从结核分枝杆菌中提取的其它致免疫的糖脂。但是, 这些天然产品只能获得有限的量; 此外, 其得自病原菌株, 其制备过程可能有毒并且需要特定的安全设置。

[0013] 因此, 非常希望提供在工业规模和可实行的条件下获得致免疫糖脂的其它新的合成方法。

[0014] 值得注意地, 本发明提供新的合成的硫酸糖脂抗原, 其显示出在体外能够刺激 CD1- 限制性 T 淋巴细胞。

[0015] 本发明涉及下列式 (I) 的化合物:

[0016]



(I)

[0017] 其中

[0018] $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 相同或不同,独立地选自 H、 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ ,条件是 $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 中的至少一个为 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ ;

[0019] 优选地, $R^{2'}$ 为 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ ,且 $R^{3'}$ 为 H。

[0020] $-\text{M}^+$ 为金属的阳离子,例如 Na^+ 、 K^+ 。

[0021] R^2 、 R^3 相同或不同,独立地选自:

[0022] a) 脂肪酰基

[0023] b) $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{X} \end{array}$,其中 X 为任选被一个或多个取代基取代的不饱和直链或支链烃链;

[0024] 其中 R^2 、 R^3 中的至少一个为 b);

[0025] 及其对映异构体,非对映异构体,其混合物和药学上可接受的盐或酯。

[0026] 优选地, X 为式 (b-1):

[0027] $-\text{CR}^i = \text{CR}^j-\text{Y}$

[0028] (b-1)

[0029] 其中:

[0030] $-\text{Y}$ 为任选被一个或多个取代基取代的饱和或不饱和、优选饱和的直链或支链烃链。

[0031] 优选地, Y 为任选被 1-10 个,更优选 1-4 个烷基,优选甲基取代的饱和直链烷基链。

[0032] 更优选地,所述甲基位于 Y 链的 C-1、C-3、C-7 或 C-9 位上。

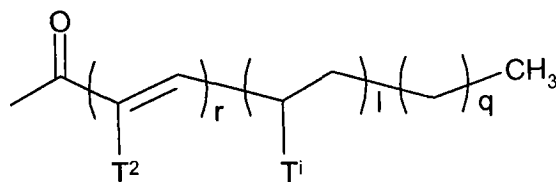
[0033] 更优选地,被取代的碳原子显示 (S) 构型。

[0034] $-\text{R}^i$ 、 R^j 相同或不同,独立地选自 H、烷基;优选地, R^i 为甲基,且 R^j 为 H。

[0035] R^i 和 R^j 使所述构型可为 (E) 或 (Z)。

[0036] 根据优选的方面, b) 链为式 (b-2):

[0037]

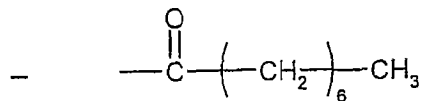


(b-2)

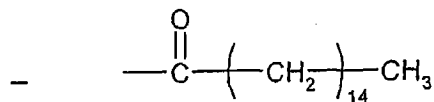
[0038] 其中:

[0039] r 为选自 1、2 或 3 的整数;优选 1;

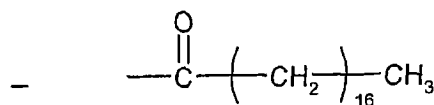
- [0040] 1 为选自 0-10 的整数 ; 优选 1、2 或 3 ;
- [0041] q 为 0-50 的整数 ; 优选 5-50 ; 更优选 10-20 ;
- [0042] 条件是 $1+q \geq 1$;
- [0043] 每个 T^1 相同或不同, 独立地选自烷基 ; 优选地, 每个 T^1 为甲基。
- [0044] T^1 所连接的碳原子为不对称的。优选地, 所述碳原子显示 (S) 构型。
- [0045] T^2 为烷基 ; 优选甲基。
- [0046] 根据另一个优选方面, R^2 为如上定义的 a) 脂肪酰基, 且 R^3 为如上定义的 b) $-C = O-X$ 。
- [0047] 脂肪酰基衍生自脂肪酸基团, 其将 2' - 或 3' - 硫酸化海藻糖单元的 2 位或 3 位上的羟基酯化。
- [0048] 脂肪酸基团为脂肪族羧酸, 其可以为直链或支链的、饱和或不饱和的、未取代的或被诸如羟基或酮取代。
- [0049] 优选地, 它们含有 5-50, 优选 15-50 个碳原子, 并且更尤其可以选自 :
- [0050]



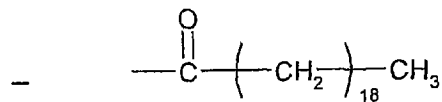
(辛酰基)



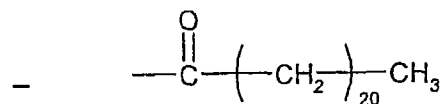
(棕榈酰基)



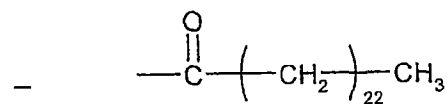
(硬脂酰基)



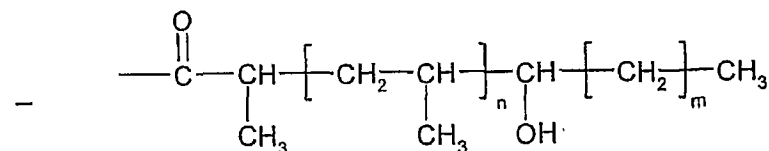
(二十烷酰基)



(二十二烷酰基)



(二十四烷酰基)

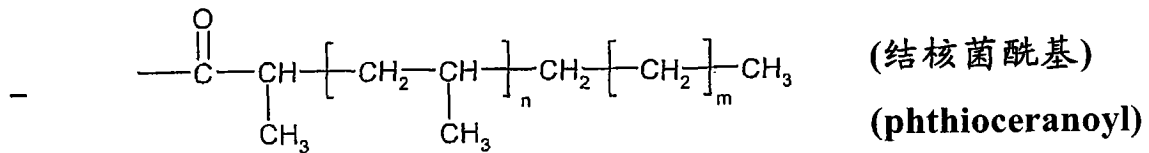


(羟基结核菌酰基)

(hydroxyphthioceranoyl)

[0051] 其中 m 为 14 或 16 且 n 为 2-10 的整数,

[0052]



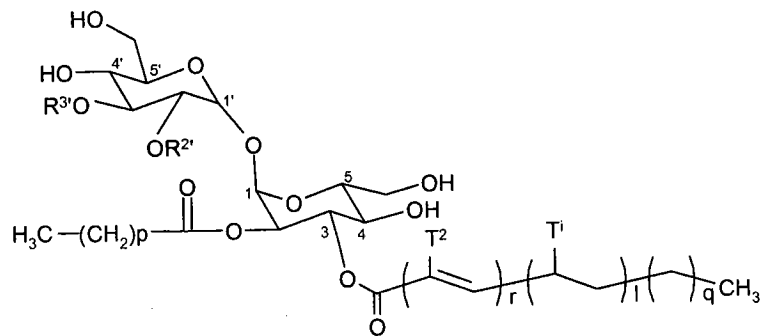
[0053] 其中 m 为 14 或 16 且 n 为 2-10 的整数，

[0054] 特别地，所述脂肪酰基包含直链和饱和的脂肪酰基，例如根据式 $-\text{C}=\text{O}-(\text{CH}_2)_k-\text{CH}_3$ (其中 k 为 14-50 的整数) 的基团。

[0055] 再更优选地，脂肪酰基选自棕榈酰基和硬脂酰基。

[0056] 本发明更尤其涉及式 I 的化合物，其中 R^2 代表脂肪酰基，优选棕榈酰基或硬脂酰基，且 R^3 代表 (b-2) 链，即下式 (II) 的化合物：

[0057]



II

[0058] 其中 $\text{R}^{2'}$ 、 $\text{R}^{3'}$ 、r、p、l、q、 T^2 、 T^1 如上述定义，或其相应的盐，

[0059] 及其对映异构体，非对映异构体，其混合物和药学上可接受的盐或酯。

[0060] 本发明尤其涉及式 II 的化合物，其中：

[0061] $-l = 1, q = 14$ 且 $r = 1$ ；

[0062] $-l = 2, q = 14$ 且 $r = 1$ ；

[0063] $-l = 3, q = 14$ 且 $r = 1$ ；

[0064] $-l = 4, q = 14$ 且 $r = 1$ ；

[0065] $-l = 1, q = 14$ 且 $r = 2$ ；

[0066] $-l = 2, q = 14$ 且 $r = 2$ ；

[0067] $-l = 3, q = 14$ 且 $r = 2$ ；

[0068] $-l = 4, q = 14$ 且 $r = 2$ ；

[0069] $-l = 1, q = 12$ 且 $r = 1$ ；

[0070] $-l = 2, q = 12$ 且 $r = 1$ ；

[0071] $-l = 3, q = 12$ 且 $r = 1$ ；

[0072] $-l = 4, q = 12$ 且 $r = 1$ ；

[0073] $-l = 1, q = 12$ 且 $r = 2$ ；

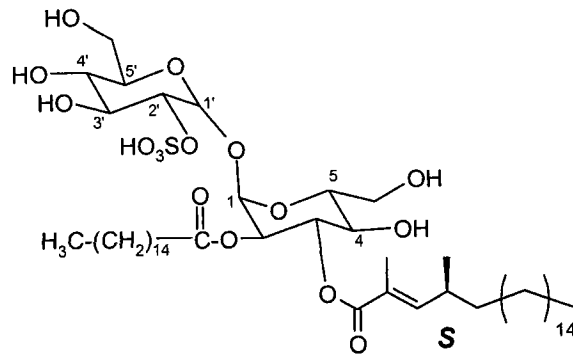
[0074] $-l = 2, q = 12$ 且 $r = 2$ ；

[0075] $-l = 3, q = 12$ 且 $r = 2$ ；

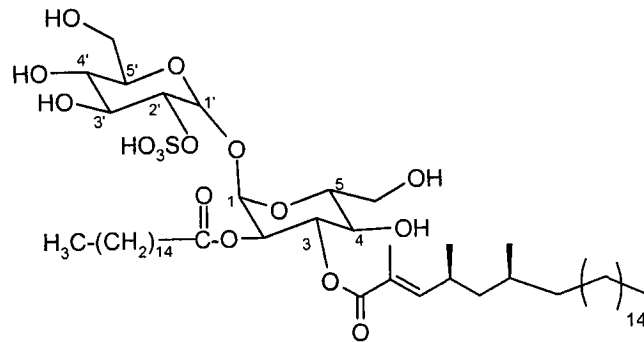
[0076] $-l = 4, q = 12$ 且 $r = 2$ ；

[0077] $-l = 1, q = 16$ 且 $r = 1$ ；

- [0078] $-1 = 2, q = 16$ 且 $r = 1$;
 [0079] $-1 = 3, q = 16$ 且 $r = 1$;
 [0080] $-1 = 4, q = 16$ 且 $r = 1$;
 [0081] $-1 = 1, q = 16$ 且 $r = 2$;
 [0082] $-1 = 2, q = 16$ 且 $r = 2$;
 [0083] $-1 = 3, q = 16$ 且 $r = 2$;或者
 [0084] $-1 = 4, q = 16$ 且 $r = 2$;
 [0085] 其中 p 为 6-22, 和 T^2 和 T^1 为甲基。
 [0086] 本发明更具体地涉及下式的化合物 :
 [0087]

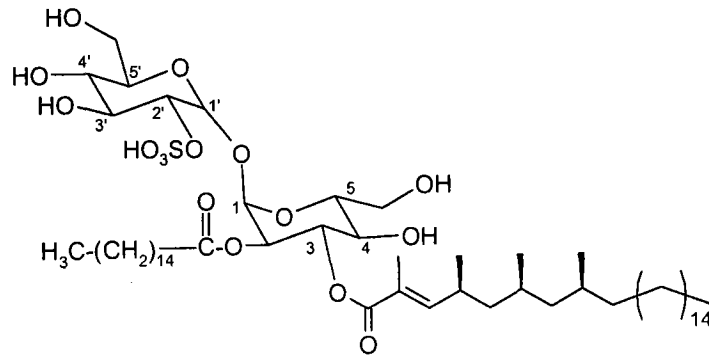


(II.1)

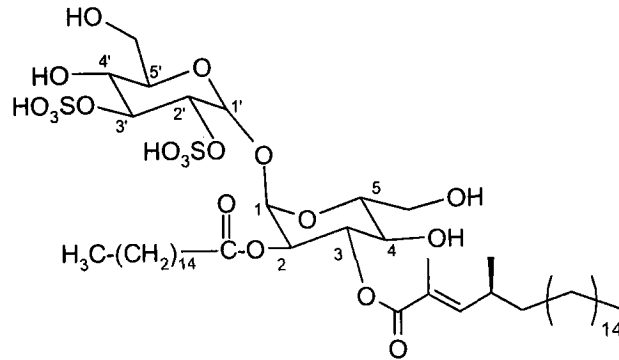


(II.2)

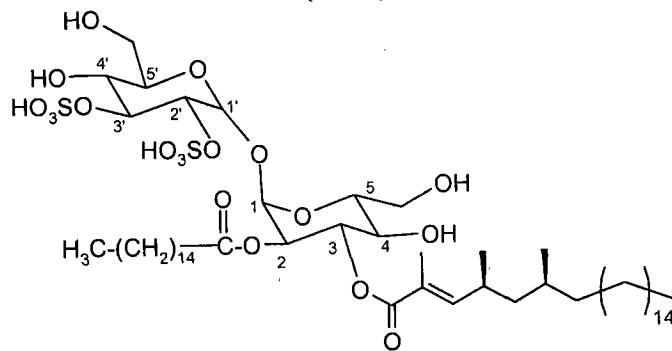
[0088]



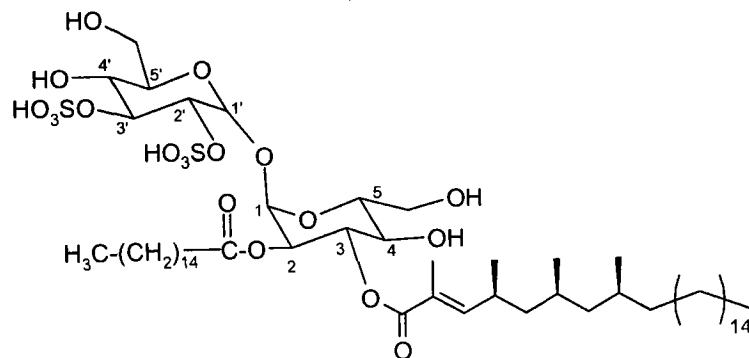
(II.3)



(II.4)

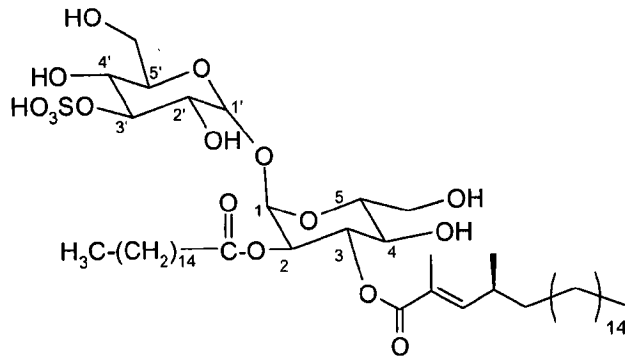


(II.5)

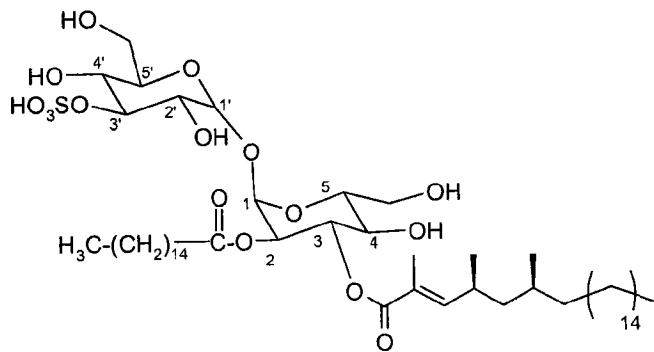


(II.6)

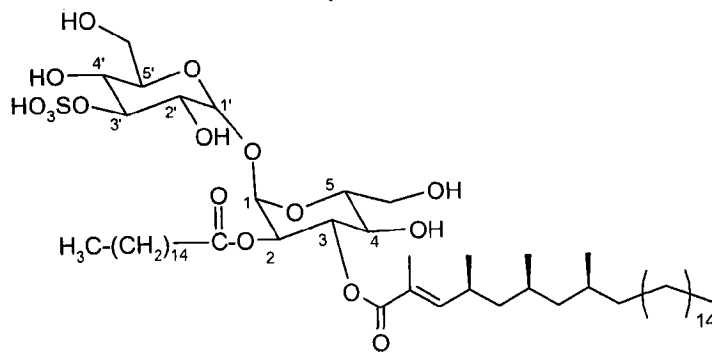
[0089]



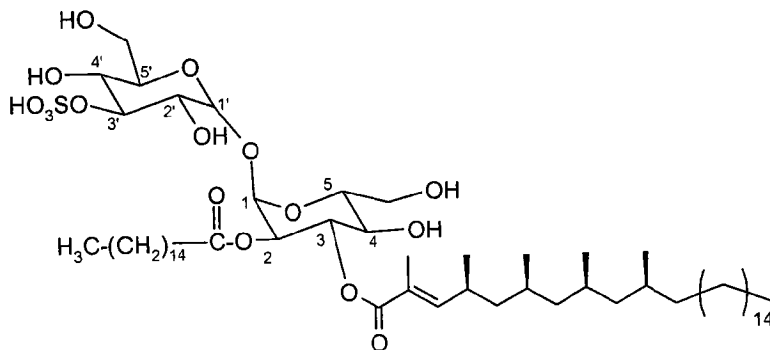
(II.7)



(II.8)



(II.9)



(II.10)

[0090] 及其相应的盐,

[0091] 及其对映异构体,非对映异构体,其混合物和药学上可接受的盐或酯。

[0092] 如本文中所述的,“药学上可接受的盐”指所公开的化合物的衍生物,其中通过形成其酸或碱盐而改变母体化合物。所述药学上可接受的盐包括母体化合物与例如非毒性无机或有机酸形成的常规的非毒性盐或季铵盐。例如,这种常规的非毒性盐包括那些衍生自无机酸,例如盐酸、硫酸、氨基磺酸、磷酸、硝酸等的盐;和由有机酸,例如乙酸、丙酸、琥珀酸、酒石酸、柠檬酸、谷氨酸、苯甲酸、水杨酸、甲苯磺酸、草酸等制备的盐。

[0093] 本发明的药学上可接受的盐可以由含有碱性或酸性结构部分的母体化合物通过常规的化学方法合成。通常,这种盐可以通过使游离酸或碱形式的这些化合物与化学计量量的适当的碱或酸在水或有机溶剂,或者在二者的混合物中反应而制得。通常,优选非水介质,例如醚、乙酸乙酯、乙醇、异丙醇或乙腈。适当的盐系列在Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., Mack Publishing Company, Easton, PA, 1985, p. 1418 中可以找到,其内容据此结合进来作为参考。

[0094] 根据另一个实施方案,本发明涉及一种包含至少两种不同的诸如上面定义的式 I 化合物的组合物。

[0095] 本发明还涉及包含至少一种如上定义的化合物或者如上定义的组合物,并结合有药学上可接受的载体的组合物。

[0096] 药学上可接受的载体尤其包括脂质体。

[0097] 所述组合物还可以包含疫苗助剂。用于人类个体或者动物的疫苗助剂对所属领域熟练技术人员来说是公知的,这种盐系列可以在例如“A compendium of vaccine adjuvants and excipients”,第 2 版,Vogel 等中找到。特别地,特定的疫苗助剂包括例如铝盐或 M59。

[0098] 本发明尤其涉及一种上面定义的药物组合物,其特征不在于提供的药物组合物为意图用于口服或可注射途径的形式。

[0099] 本发明更尤其涉及一种上面定义的药物组合物,其特征不在于其包含一种或多种可用于治疗或预防结核病的其它产品,例如 BCG 或分枝杆菌蛋白。

[0100] BCG 代表卡介苗,目前用于接种的 BCG 的不同菌株在 Behr M. A. 等, Science(1999) 284 :1520-1523 中作了特别描述。

[0101] 措词“分枝杆菌蛋白”指由分枝杆菌属细菌基因组,和特别地由结核分枝杆菌基因组编码的蛋白或其片段,有利地这种蛋白可以为重组体。根据优选的实施方案,所述分枝杆菌蛋白为结核分枝杆菌抗原。

[0102] 可用于治疗或预防结核病的其它产品特别地包括免疫调节剂,例如细胞因子、DNA 片段编码的结核分枝杆菌抗原、活结核分枝杆菌缺失突变体,例如缺失了有毒基因的突变体,或者活重组 BCG,例如 BCG 表达的结核分枝杆菌抗原。

[0103] 如本文中所述的,结核病指由结核分枝杆菌导致的人体内的疾病,还指在动物体内的相应疾病。

[0104] 根据另一个实施方案,本发明涉及产品,所述产品包含

[0105] - 至少一种上面定义的化合物,和

[0106] - 至少一种可用于治疗或预防结核病的其它产品,例如 BCG 或分枝杆菌蛋白

[0107] 作为组合制剂同时、分别或依次用于治疗或预防结核病。

[0108] 本发明还涉及至少一种上面定义的化合物或上述组合物用于制备意图治疗或预

防结核病的药物,特别是疫苗的用途。

[0109] 任选地,所述疫苗可以包含疫苗助剂,例如上面描述的助剂。

[0110] 本发明涉及至少一种上面定义的化合物或如上定义的组合物作为免疫反应活化剂,更尤其作为炎性反应活化剂的用途。

[0111] “免疫反应活化剂”意指在体外或体内能够活化免疫反应的组分或过程,尤其是免疫系统的细胞的化合物,所述免疫系统细胞例如为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、诸如树突状细胞或巨噬细胞、单核细胞或粒细胞的抗原呈递细胞 (APC)。

[0112] “炎性反应活化剂”意指在体外或体内能够活化炎性反应的组分或过程,例如血细胞渗出、毛细血管渗透、巨噬细胞活化或发热的化合物。

[0113] 本发明还涉及至少一种如上定义的化合物或者如上定义的组合物用于诱导 T 淋巴细胞,特别是 CD1- 限制性 T 淋巴细胞的用途。所述活化作用可以在体内或体外进行。

[0114] 可以通过若干种方法评价 T 淋巴细胞的活化,例如测量细胞增殖或细胞因子的产生,例如 IFN- γ (干扰素- γ)、IL-2 (白介素-2)、IL-4 (白介素-4) 或 TNF- α (肿瘤坏死因子 α)。

[0115] CD1- 限制性 T 淋巴细胞是被 CD1 分子所提供的抗原活化的 T 淋巴细胞。

[0116] 本发明还涉及至少一种如上定义的化合物或者如上定义的组合物用于诱导 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 或颗粒溶素的产生的用途。

[0117] 这种产生诱导可以在体外或体内进行。IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 或颗粒溶素的产生可以例如通过免疫分析法,例如 ELISA (酶联免疫吸附测定) 或 EIA (酶免疫分析) 来测量。

[0118] 本发明还涉及至少一种如上定义的化合物或者上述组合物用于制备用来诊断结核分枝杆菌感染的组合物的用途。

[0119] 由于目前的试验 (结核菌素或所谓的“PPD”试验) 不能从那些实际上感染了潜伏结核病的 PPD⁺ 病人中区分出接受了 BCG 的那些 PPD⁺ 个体,因此可以说明结核病的诊断很困难。

[0120] 因此高度希望提供一种专用于结核分枝杆菌感染的试验。

[0121] 现在本发明的化合物使其成为可能。

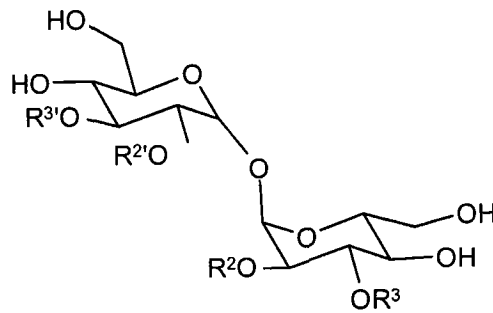
[0122] 本发明的化合物对结核分枝杆菌属具有高度特异性。其可以用于将 PPD⁺ 个体识别为接种了 BCG 的个体和实际上被结核病感染的个体。

[0123] 根据进一步的方面,本发明因此提供一种诊断结核分枝杆菌感染的方法,其包括下列步骤:

[0124] - 提供来自 PPD⁺ 个体的生物试样;

[0125] - 使所述试样与式 (X) 化合物接触;

[0126]



(X)

[0127] 其中：

[0128] $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 相同或不同，独立地选自 H、 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ ，条件是 $R^{2'}$ 、 $R^{3'}$ 中的至少一个为 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ ；

[0129] 优选地， $R^{2'}$ 为 SO_3H 或 SO_3^-/M^+ ， $R^{3'}$ 为 H。

[0130] $-\text{M}^+$ 为金属阳离子，例如 Na^+ 、 K^+ 。

[0131] R^2 、 R^3 相同或不同，独立地选自：

[0132] a) 脂肪酰基

[0133] b) $\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ -\text{C}-\text{X} \end{array}$ ，其中 X 为任选被一个或多个取代基取代的不饱和直链或支链烃链；

[0134] 及其对映异构体、非对映异构体、其混合物和药学上可接受的盐或酯，

[0135] - 评价 T 淋巴细胞的活化；和

[0136] - 对比给药所述化合物之前和之后的 T 淋巴细胞的活化。

[0137] T 淋巴细胞被激活 (ie)，例如给药本发明的化合物后释放的 $\text{IFN-}\gamma$ 增加的那些个体感染了结核分枝杆菌。

[0138] 本发明还提供一种诊断结核病的试剂盒，其包括：

[0139] - 式 (X) 的化合物；

[0140] - 树突状细胞；

[0141] - 检测 T 淋巴细胞的活化，例如 $\text{IFN-}\gamma$ 的释放的装置。

[0142] 通常，使用任意的人 $\text{IFN-}\gamma$ ELISA 检测试剂盒（例如，购自 BDPharmingen），测量用树突状细胞和硫酸糖脂刺激 48 小时后在上清液中释放出的 $\text{IFN-}\gamma$ ，从而检测 T 细胞的硫酸糖脂活化作用。

[0143] 本发明还涉及本发明的化合物用于评价由重组结核分枝杆菌制备的疫苗的效果的用途。已经使用由结核分枝杆菌或牛分枝杆菌 BCG 获得的重组活菌来研发疫苗，其可以例如过表达蛋白。非常希望评价这种疫苗是否有效和是否对给药的病人起保护作用。本发明的诊断方法使评价成为可能。

[0144] 本发明还涉及用于式 (X) 化合物的特定配体。

[0145] 如本文中所意图的，“特定的配体”涉及能够被制备或者诱导出的、特异性结合在本发明化合物上的任何化合物。

[0146] 特定的配体特别地包括抗体和适体 (aptamer)。

[0147] 术语“抗体”涉及全抗体，尤其是单克隆抗体，还涉及保留了特异性结合到本发明化合物上的能力的抗体片段，例如 Fab、 Fab' 、 $\text{F}(\text{ab}')_2$ 、Fv 或 scFv 片段。

[0148] 抗体制剂是所属领域技术人员公知的。通常,通过各种途径,例如肌肉内、血管内或腹膜内途径将本发明的化合物的制剂给药于动物,例如小鼠、大鼠、兔或山羊。为了提高抗体的产生,在第一次给药之后可以额外给药。之后,抗体得自从动物体取出的血液或者得自血液衍生物,例如血清或血浆,并且任选使用例如亲和色谱法进行纯化。特别地可以按照 Koller & Milstein(1975)Nature 256 :495-499 的描述制备单克隆抗体。

[0149] “适体”可为肽型或为核酸(例如,脱氧核糖核酸或核糖核酸)型。特别地可使用公知的 SELEX 方法或按照 Ellington & Szostak(1990)Nature 346 :818-22 中的描述制备核酸适体。肽适体可按照 Cohen 等,(1998)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :14272-7 中的描述获得。

[0150] 式 (X) 包括作为参考结合入本文的 WO 2004/092192 中公开的式 (I),以及本发明的式 (I) 和 (II) 的化合物。优选地,式 (X) 化合物是式 (I) 和 (II) 的那些物质及上面公开的其优选实施方案。

[0151] 根据进一步的方面,本发明还涉及如上定义的式 (I) 化合物的制备方法。

[0152] 本发明的化合物和方法可以以所属领域那些熟练技术人员公知的许多方式制备。所述化合物可以例如通过应用或者改变下述方法,或者按照熟练技术人员所能理解的变化形式来合成。适当的变化和取代是非常明显和公知的或者所属领域那些熟练技术人员从科技文献中可以很容易地获得。

[0153] 尤其,这种方法可以在 R. C. Larock, Comprehensive Organic Transformations, VCH publishers, 1989 中找到。

[0154] 试剂和原料是可以商购获得的,或者所属领域的一个普通技术人员通过公知技术可以容易地合成。

[0155] 在下文中描述的反应中,可以保护希望存在于终产物中的反应性官能团,例如羟基、氨基、亚氨基、硫醇基或羧基,以避免其不希望地参与到反应中。可以按照标准操作方法使用常规的保护基团,例如参见 T. W. Green 和 P. G. M. Wuts, Protective Groups in Organic Chemistry, John Wiley and Sons, 1991 ; J. F. W. McOmie, Protective Groups in Organic Chemistry, Plenum Press, 1973。

[0156] 通常在适当的溶剂中进行反应。可以使用各种溶剂,只要其对反应或涉及的试剂没有不利作用。适当的溶剂的例子包括:烃,其可以为芳香族、脂肪族或脂环族烃,例如己烷、环己烷、苯、甲苯和二甲苯;酰胺,尤其是脂肪酰胺,例如二甲基甲酰胺;和醚,例如乙醚和四氢呋喃。

[0157] 反应可以在宽泛的温度范围内进行。总的来说,我们发现方便的是在约 0°C - 约 150°C (更优选约室温 - 约 100°C) 下进行反应。取决于许多因素,特别地是反应温度和试剂的性质,反应所需的时间也可以变化很大。但是,只要反应在上面列出的优选条件下进行,则约 3 小时 - 约 20 小时的时间通常就足够了。

[0158] 可以通过常规方式从反应混合物中回收如此制备的化合物。例如,可以通过从反应混合物中蒸除溶剂而回收化合物,或者如果必要在从反应混合物中蒸除溶剂之后,将剩余物倾入水中,之后用水不溶性有机溶剂萃取并从萃取物中蒸除溶剂。此外,如果希望可以通过各种公知的技术,例如重结晶、再沉淀或者各种色谱技术,特别是柱色谱或制备性薄层色谱进行进一步纯化。

[0159] 根据进一步的目的,本发明提供一种制备如上定义的式 (I) 化合物的方法,其包括下列步骤:

[0160] - 磺化;和

[0161] - 用相应的式 (IV) 和 (IV') 化合物

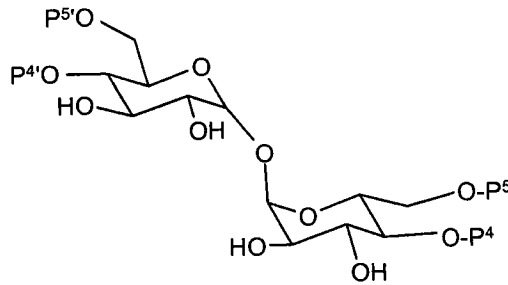
[0162] R^2X R^3Y

[0163] (IV) (IV')

[0164] 其中 R^2 和 R^3 如式 (I) 中所定义的, X 和 Y 独立地代表卤素原子或 OH;

[0165] 酰化式 (III) 化合物:

[0166]



[0167] 其中, P^4 、 P^5 、 $P^{4'}$ 、 $P^{5'}$ 各自相同或不同,代表 H 或 OH- 保护基团,或者 P^4 和 P^5 和 / 或 $P^{4'}$ 和 $P^{5'}$ 一起形成环状 OH- 保护基团。

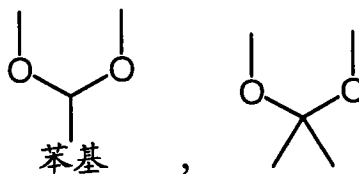
[0168] 可能需要一个或两个磺化或酰化反应。

[0169] 磺化和酰化步骤可以按照任意顺序连续或交替进行。

[0170] 如果适当,在酰化和 / 或磺化步骤之前和 / 或之后可能需要一个或多个保护和 / 或脱保护步骤。

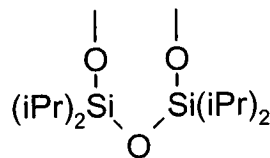
[0171] 这种保护基团包括缩醛或缩酮,例如

[0172]



[0173] 或者二齿保护基团,例如

[0174]



[0175] 本发明的方法包括进一步的水解所述保护基团的步骤。该反应通常在酸性条件下进行。

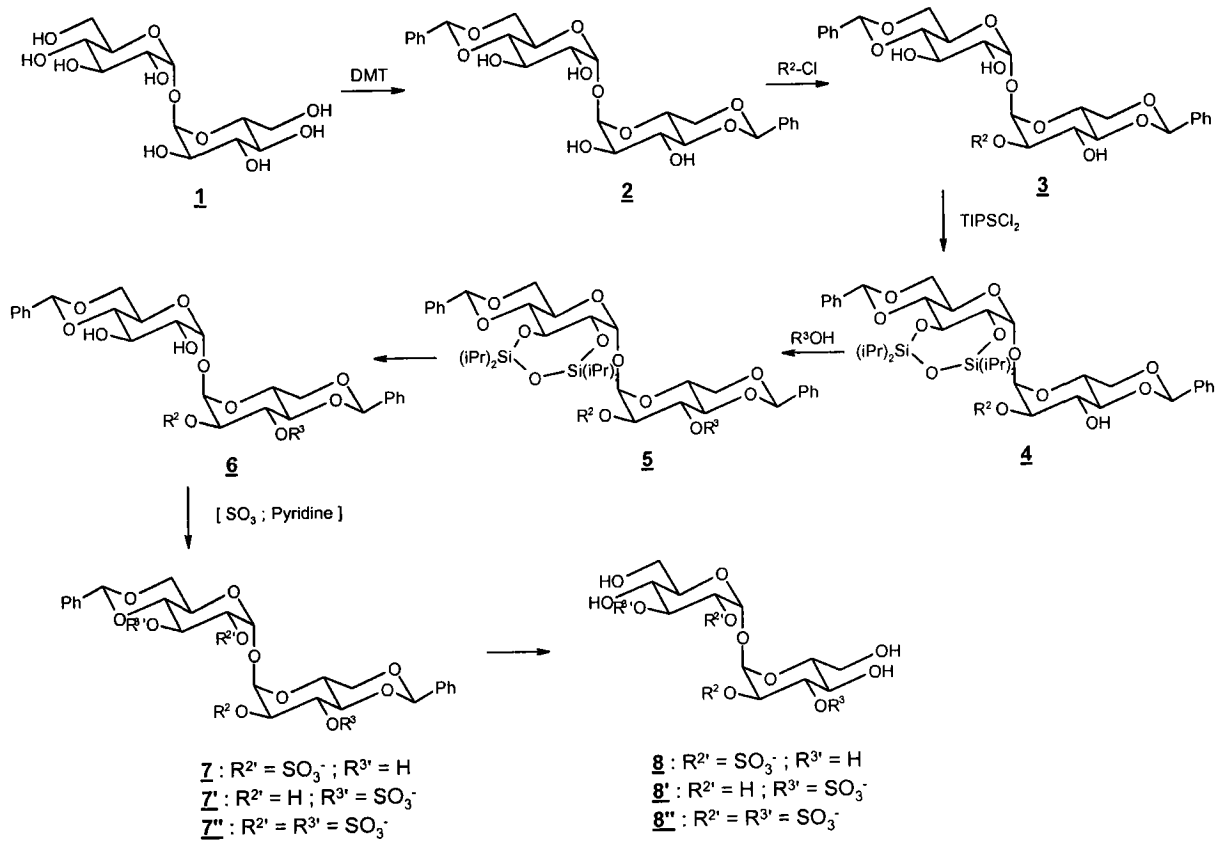
[0176] 所述磺化反应通常采用任意适当的磺化试剂进行,例如吡啶-三氧化硫配合物或者三甲胺-三氧化硫配合物。

[0177] 所述的两个必需的酰化反应可以在一个或两个步骤中进行。酰化步骤通常采用偶联试剂,例如 DMAP 和 / 或 DCC 来进行。

[0178] 本发明的方法还包括分离希望的化合物的最终步骤。

[0179] 下列方案中说明了本发明的代表性方法：

[0180]

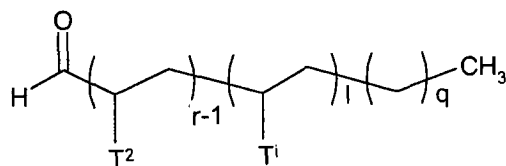


[0181] 使用过量的磺化试剂可以获得 2' ,3' 双磺化化合物 (7'')。3' - 磺化化合物 (7') 作为磺化反应的副产物而得到；通常，磺化反应的选择性约为 5/1。化合物 7, 7' 和 7'' 经色谱分离。

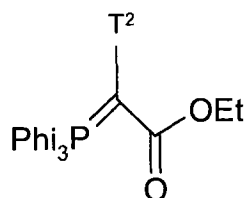
[0182] 式 (IV) 化合物通常可以商购获得。

[0183] 优选地，当 R³ 代表如上定义的 b) 链时，式 (IV') 化合物可以通过应用或者改变下列说明性方案而制得：

[0184]



(V')



(VI)。

[0190] 上述的制备式 (IV') 化合物的方法特别有利, 因为其生成了具有希望的立体化学的化合物。

[0191] 可以通过应用或者改变实施例中的试验条件和 / 或起始产品来进行所述方法。

[0192] 附图简述

[0193] 图 1 和图 2

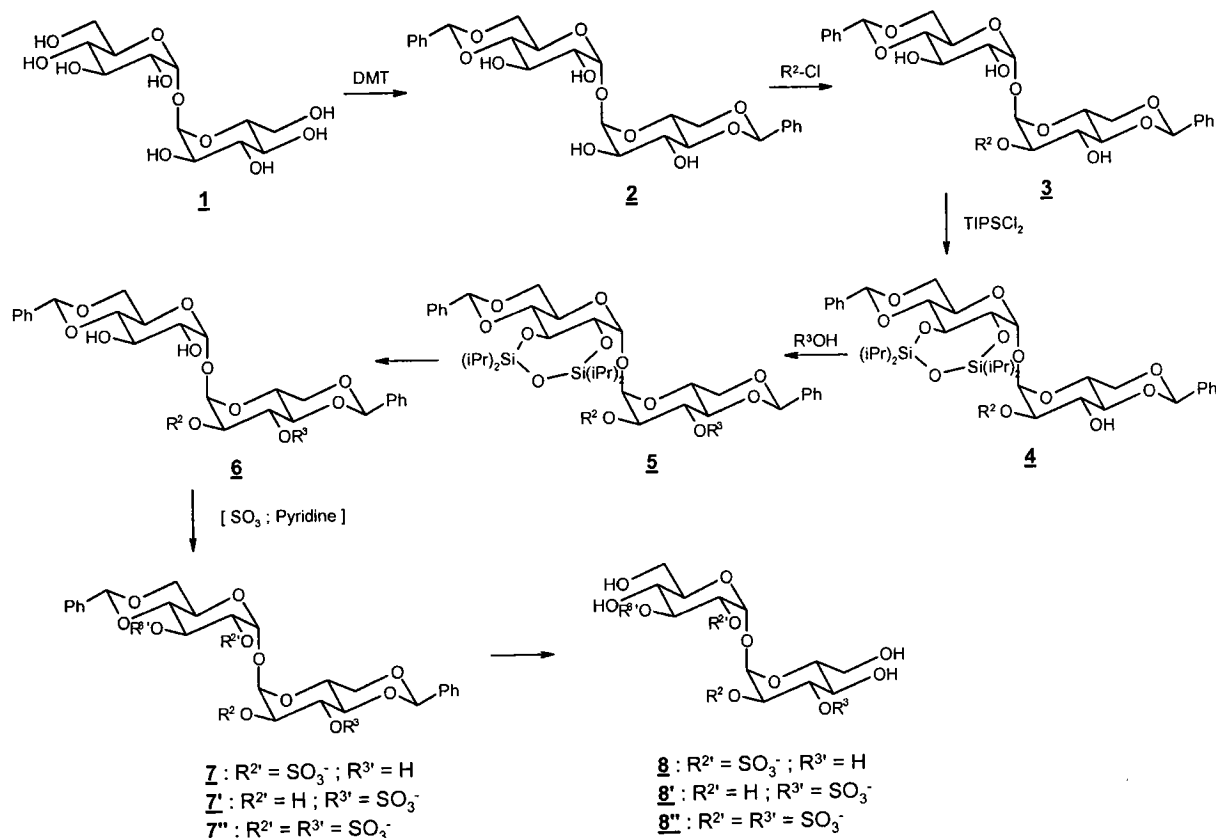
[0194] 图 1 和 2 代表 T 细胞克隆 Z4B27 响应本发明化合物和对比化合物的刺激 (横轴) 而产生的 IFN- γ 的量 (pg/mL, 纵轴)。

实施例

[0195] 实施例 1: 本发明的化合物的合成

[0196] A. 硫脂的合成

[0197]



[0198] 1. α, α -海藻糖的亚苄基化

[0199] 将 α, α -海藻糖二水合物 (1eq.) 在绝对乙醇 (0.4M) 中回流 30 分钟以脱水。之后将干燥的剩余物 **1** 悬浮在干燥的 N,N-二甲基甲酰胺 (DMF, 0.4M) 中, 将 α, α -二甲氧基甲苯 (DMT, 2eq.) 和 10-樟脑磺酸 (CSA, 0.05eq.) 一起加入。在轻微真空下于旋转蒸发器上加热混合物 (60°C) 1 小时以除去甲醇。之后加入更多的 DMT (0.25eq.) 和 CSA (0.01eq.), 并将混合物再次加至旋转蒸发器中。反应结束时, 蒸发 DMF。在碳酸氢钠水溶液 (5%) 中搅拌混合物过夜, 得到结晶的二缩醛 **2**。将产物溶解在沸腾的乙醇中、加入热水并缓慢冷却以进行重结晶。最后, 过滤白色结晶 **2**, 用水和石油醚洗涤并干燥 (84%)。

[0200] 2. 位置 2 的酰化

[0201] 使二缩醛 **2** (1eq.)、4-二甲基氨基吡啶 (DMAP, 1eq.) 和酰氯 (1.3eq) 在干燥的吡啶 (0.6M) 中沸腾回流 25 小时。以 45% 的产率得到单-酰基化的产物 **3**。

[0202] 3. 位置 2' 和 3' 上的甲硅烷基化

[0203] 向 **3** (1eq.) 在吡啶 (0.1M) 中的冰冷溶液中加入 1,3-二氯-1,1,3,3-四异丙基二硅氧烷 (1.2eq.)。室温下搅拌 2 天后, 将混合物倾入到冰水中并用乙酸乙酯萃取产物。经快速色谱纯化以 58% 的产率得到为糖浆状产物 **4**。

[0204] 4. 位置 3 的酰化

[0205] 在干燥的甲苯 (0.1M 的酸) 中, 于微波下用酸性 $R^3\text{OH}$ (从部分 B 中获得) (1eq.)、DMAP (1eq.) 和 DCC (1.5eq.) 处理化合物 **4** (1.5eq.) 15 分钟。最后, 蒸发溶剂并用快速色谱纯化二酰基化的产物 **5**。反应产率高度依赖于所用的酸的结构 (25-60%)。

[0206] 5. 脱甲硅烷基化

[0207] 在 40°C 的 $\text{Bu}_4\text{NF}/\text{THF}$ 溶液 (1M, 用三氟乙酸酸化使 $\text{pH} \approx 6$, 40eq.) 中加热化合物

5 (1eq.) 24 小时。以 90% 的产率得到结晶产物 6。

[0208] 6. 硫酸化

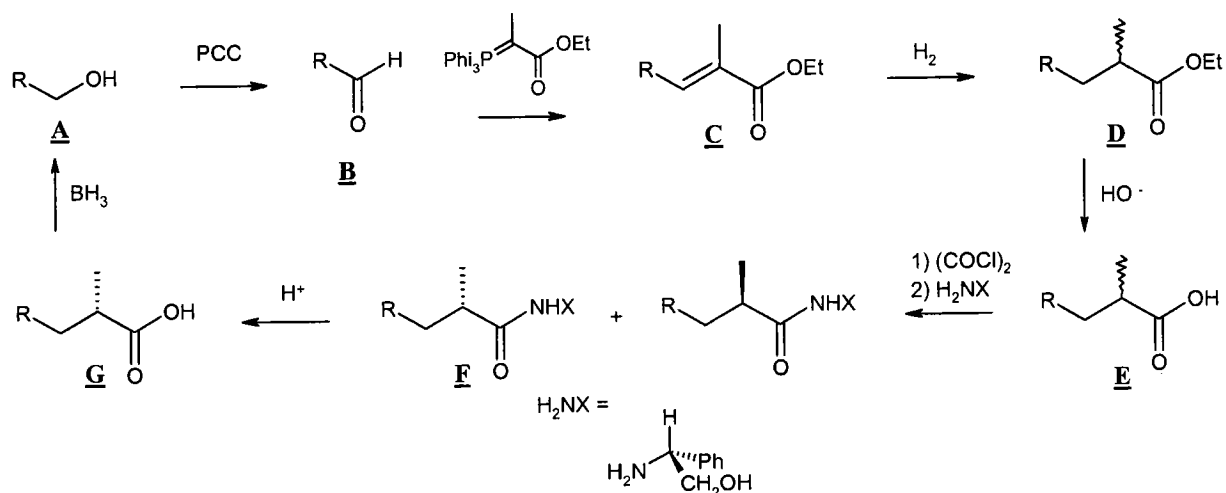
[0209] 向 6 (1eq.) 的吡啶 (0.06M) 溶液中加入吡啶-三氧化硫配合物的 DMF (0.5M, 3eq.) 溶液, 在室温下搅拌混合物。2 天后, 蒸发混合物, 剩余物经硅胶色谱得到 7 (62%)、其 3'-硫酸化异构体 7' 和 2', 3'-二硫酸化化合物 7''。

[0210] 7. 缩醛的水解

[0211] 室温下用氯仿 / 甲醇 / 1.7% H₂SO₄ (60/40/8) 溶液处理二亚苄基衍生物 7, 7' 或 7'' 2 天。用 NaHCO₃ 溶液使反应混合物呈中性。经该脱保护作用定量得到相应的二酰基化硫酸糖脂 8, 8' 或 8''。

[0212] B. 酸的合成

[0213]



[0214] 1. 醇的氧化

[0215] 室温、氮气下, 将醇 A (1eq.) 加入到快速搅拌的溶于干燥的二氯甲烷中的氯铬酸吡啶鎓盐 (2eq.) 和乙酸钠 (5eq.) 中 (0.4M 的 A)。搅拌 1.5 小时后加入乙醚并过滤混合物。粗产物 B 未经进一步纯化。

[0216] 2. 维悌希反应

[0217] 向 B (1eq.) 的干燥二氯甲烷 (0.6M) 溶液中加入 1-乙氧羰基亚乙基三苯基膦 (1-carboethoxyethylidene triphenylphosphorane) (1.2eq.)。之后在室温下搅拌混合物过夜, 得到酯 C。由 A 得到的 2 个步骤的产率为 87%。

[0218] 3. 氢化

[0219] 在乙酸乙酯 (0.4M) 中使用 10% 的钯碳作为催化剂对共轭酯 C (1eq.) 进行氢化。以 77% 得到饱和酯 D, 其为 1/1 的 C-2 位上的对映异构体 (非对映异构体) 混合物。

[0220] 4. 皂化

[0221] 110°C 下, 在氢氧化钾 (12eq.) 的水 / 乙醇 2/3 (0.2M) 溶液中将酯 D (1eq.) 加热过夜。该反应定量得到相应的酸 E, 其为 C-2 位上的外消旋 (1/1 的非对映异构体) 混合物。

[0222] 5. 酰胺化

[0223] 回流下将酸 E (1eq.) 与草酰氯一起加热 (10eq.) 1 小时。减压下除去过量的试剂。将干燥的二氯甲烷 (0.4M) 和 DMAP (1.2eq.), 以及随后的 (R)-2-苯基甘氨酸 (1.1eq.) 加入到粗酰氯中, 在室温下将反应混合物搅拌过夜。经快速色谱使非对映异构体得到分离。2S

非对映异构体 E 是极性较小的化合物, 其以 36% 的产率分离出。

[0224] 6. 酸解

[0225] 在硫酸 (3N) 溶于 1/1 二氧己环 / 水混合物所得的溶液 (0.02M) 中将酰胺 E (1eq.) 回流过夜, 定量释放出 2S- 酸 G。

[0226] 7. 还原

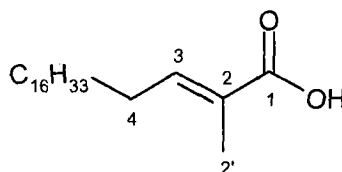
[0227] 将酸 G (1eq.) 溶解在 BH_3 的 THF (1M, 1.7eq.) 溶液中, 在室温下搅拌该混合物过夜。加入乙醇, 之后加入 80% 的含水乙酸, 用 $NaHCO_3$ 使混合物呈中性。定量得到纯物质形式的醇。

[0228] 重复整个反应次序以在脂肪酸链上引入其它甲基支链。

[0229] 按照上述方式皂化不饱和酯 C, 得到不饱和酸。

[0230] 得到下列酸:

[0231]



[0232] $C_{21}H_{40}O_2$

[0233] $M = 324.5474g/mol$

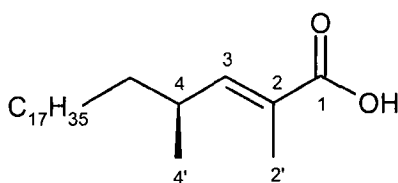
[0234] (2E)-2-甲基二十碳-2-烯酸

[0235] 白色结晶

[0236] RMN 1H (250MHz, $CDCl_3$)

[0237] $\delta = 0.88ppm$ (t, H-t, $^3J = 6.5Hz$); $\delta = 1-1.7ppm$ (m, H 脂肪族); $\delta = 1.84ppm$ (d, H-2', $d, ^4J_{2'-3} = 1.5Hz$); $\delta = 2.19ppm$ (quad, H-4, $^3J_{4-3} = ^3J_{4-5} = 7Hz$); $\delta = 6.9ppm$ (tq, H-3, $^3J_{3-4} = 7Hz$ 和 $^4J_{3-2} = 1.5Hz$)

[0238]



[0239] $C_{24}H_{46}O_2$

[0240] $M = 366.628g/mol$

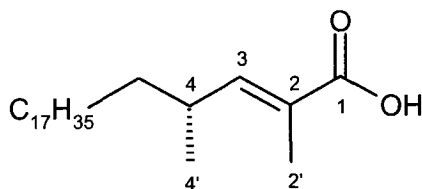
[0241] (2E, 4S)-2,4-二甲基二十二碳-2-烯酸

[0242] 白色结晶

[0243] RMN 1H (250MHz, $CDCl_3$)

[0244] $\delta = 0.87ppm$ (t, H-t, $^3J = 6.5Hz$); $\delta = 1.0ppm$ (d, H-4', $^3J_{4'-4} = 6.5Hz$); $\delta = 1.1-1.6ppm$ (m, H 脂肪族); $\delta = 1.84ppm$ (d, H-2', $d, ^4J_{2'-3} = 1.5Hz$); $\delta = 2.5ppm$ (m, H-4); $\delta = 6.65ppm$ (dq, H-3, $^3J_{3-4} = 10Hz$ 和 $^4J_{3-2} = 1.5Hz$)

[0245]



[0246]



[0247]

$M = 366.628\text{g/mol}$

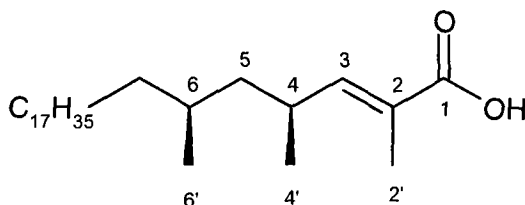
[0248] (2E,4R)-2,4-二甲基二十二碳-2-烯酸

[0249] 白色结晶

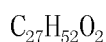
[0250] RMN ^1H (250MHz, CDCl_3)

[0251] $\delta = 0.88\text{ppm}$ (t, H-t, $^3J = 6.5\text{Hz}$) ; $\delta = 1.01\text{ppm}$ (d, H-4', $^3J_{4',-4} = 6.5\text{Hz}$) ; $\delta = 1.1-1.5\text{ppm}$ (m, H 脂肪族) ; $\delta = 1.85\text{ppm}$ (d, H-2', $^4J_{2',-3} = 1.5\text{Hz}$) ; $\delta = 2.5\text{ppm}$ (m, H-4) ; $\delta = 6.67\text{ppm}$ (dquad, H-3, $^3J_{3-4} = 10\text{Hz}$ 和 $^4J_{3-2'} = 1.5\text{Hz}$) ;

[0252]



[0253]



[0254]

$M = 408.7087\text{g/mol}$

[0255] (2E,4S,6S)-2,4,6-三甲基二十四碳-2-烯酸

[0256] (Phtienoic acid)

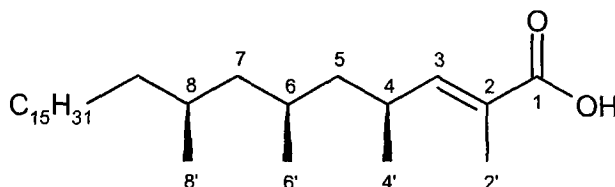
[0257] 白色结晶

[0258] $[\alpha]_D^{25} = +13.8$ (氯仿)[0259] RMN ^1H (250MHz, CDCl_3)

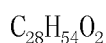
[0260] $\delta = 0.82\text{ppm}$ (d, H-6', $^3J_{6',-6} = 6.5\text{Hz}$) ; $\delta = 0.88\text{ppm}$ (t, H-t, $^3J = 7\text{Hz}$) ; $\delta = 0.99\text{ppm}$ (d, H-4', $^3J_{4',-4} = 6.5\text{Hz}$) ; $\delta = 1.05-1.4\text{ppm}$ (m, H 脂肪族) ; $\delta = 1.85\text{ppm}$ (d, H-2', $^4J_{2',-3} = 1.5\text{Hz}$) ; $\delta = 2.6\text{ppm}$ (m, H-4) ; $\delta = 6.66\text{ppm}$ (d, H-3, $^3J_{3-4} = 10\text{Hz}$, $^4J_{3-2'} = 1.5\text{Hz}$)

[0261] RMN ^{13}C (250MHz, CDCl_3)[0262] $\delta = 12.1\text{ppm}$, C-6' ; $\delta = 14.1\text{ppm}$, C-t ; $\delta = 19-32\text{ppm}$, C 脂肪族[0263] $\delta = 37.6\text{ppm}$, C-2' ; $\delta = 44.4\text{ppm}$, C-5 ; $\delta = 125\text{ppm}$, C-2 ; $\delta = 151.2\text{ppm}$, C-3。

[0264]



[0265]



[0266]

$M = 422.7356\text{g/mol}$

[0267] (4S,6S,8S)-2,4,6,8-四甲基二十四碳-2-烯酸

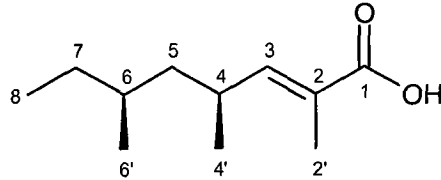
[0268] 无色油

[0269] $[\alpha]_D^{25} = +15$ (氯仿)

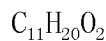
[0270] $\text{RMN } ^1\text{H}(300\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$

[0271] $\delta = 0.83\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-8', {}^3\text{J}_{8'-8} = 6.3\text{Hz})$; $\delta = 0.85\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-6', {}^3\text{J}_{6'-6} = 6.3\text{Hz})$; $\delta = 0.9\text{ppm}(\text{t}, \text{H}-\text{t}, {}^3\text{J} = 6.6\text{Hz})$; $\delta = 1.01\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-4', {}^3\text{J}_{4'-4} = 6.6\text{Hz})$; $\delta = 1.1-1.5\text{ppm}(\text{m}, \text{H 脂肪族})$; $\delta = 1.88\text{ppm}(\text{s}, \text{H}-2')$; $\delta = 2.67\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-4)$; $\delta = 6.69\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-3, {}^3\text{J}_{3-4} = 10.2\text{Hz})$

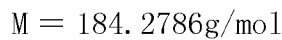
[0272]



[0273]



[0274]



[0275] (4S,6S)-2,4,6-三甲基辛-2-烯酸

[0276] 无色油

[0277] $[\alpha]_D^{25} = +53.2$ (氯仿)

[0278] $\text{RMN } ^1\text{H}(250\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$

[0279] $\delta = 0.86\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-6', {}^3\text{J}_{6'-6} = 5.5\text{Hz})$; $\delta = 0.88\text{ppm}(\text{t}, \text{H}-8, {}^3\text{J}_{8-7} = 7\text{Hz})$; $\delta = 1.03\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-4', {}^3\text{J}_{4'-4} = 6.6\text{Hz})$; $\delta = 1.1-1.5\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-5, \text{H}-6, \text{H}-7)$; $\delta = 1.89\text{ppm}(\text{s}, \text{H}-2')$; $\delta = 2.67\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-4)$; $\delta = 6.7\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-3, {}^3\text{J}_{3-4} = 10\text{Hz})$;

[0280] $\text{RMN } ^{13}\text{C}(300\text{MHz}, \text{CDCl}_3)$

[0281] $\delta = 11.2\text{ppm}, \text{C}-8$; $\delta = 12.1\text{ppm}, \text{C}-2'$; $\delta = 19.0\text{ppm}, \text{C}-6'$; $\delta = 20.4\text{ppm}, \text{C}-4'$

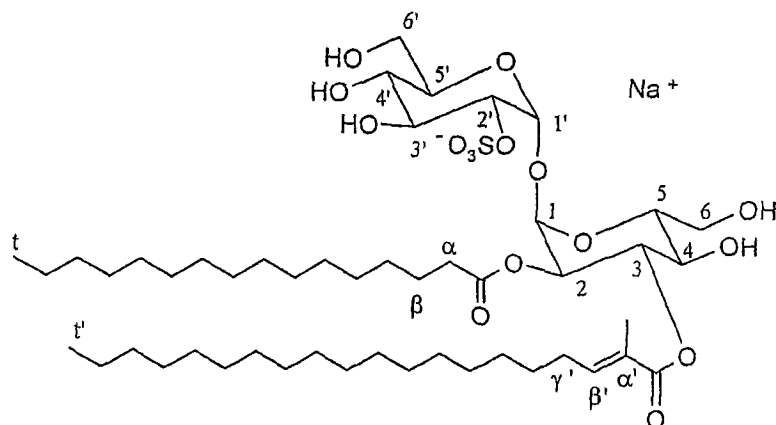
[0282] $\delta = 30.0\text{ppm}, \text{C}-7$; $\delta = 31.1\text{ppm}, \text{C}-4$; $\delta = 32.3\text{ppm}, \text{C}-6$; $\delta = 44.1\text{ppm}, \text{C}-5$

[0283] $\delta = 125.5\text{ppm}, \text{C}-2$; $\delta = 151.1\text{ppm}, \text{C}-3$; $\delta = 174.1\text{ppm}, \text{C}-1$ 。

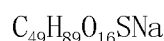
[0284] 采用上述步骤制备了本发明的下列化合物。

[0285] 化合物 a:

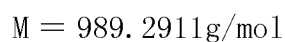
[0286]



[0287]



[0288]



[0289] 2-O-十六烷酰基-3-O-(2-基二十碳-2-烯酰基)-2'-O-硫酸根

[0290] $-\alpha, \alpha' -D-$ 海藻糖

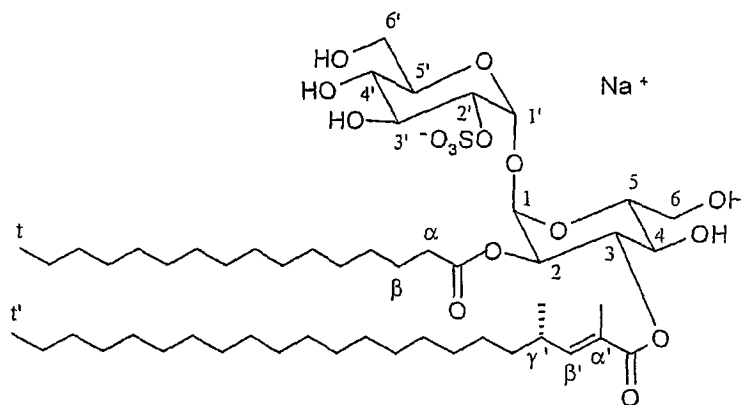
[0291] RMN 1H (250MHz, $CDCl_3/MeOD$ 4/1)

[0292] $\delta = 0.89\text{ppm}$ (t, 3H-t, 3H-t', $^3J = 7\text{Hz}$) ; $\delta = 1-1.6\text{ppm}$ (m, H 脂肪族) ; $\delta = 1.81\text{ppm}$ (d, $(CH_3)_\alpha$, $^4J = 1\text{Hz}$) ; $\delta = 2.2\text{ppm}$ (m, 2H- α , 2H- γ') ; $\delta = 3.3-4.7\text{ppm}$ (m, H-2', H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6_{ax}, H-6'_{ax}, H-6_{eq}, H-6'_{eq}) ; $\delta = 4.95\text{ppm}$ (dd, H-2, $^3J_{2-1} = 4\text{Hz}$ 和 $^3J_{2-3} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 5.29\text{ppm}$ (d, H-1, $^3J_{1-2} = 4\text{Hz}$) ; $\delta = 5.45\text{ppm}$ (t, H-3, $^3J_{3-4} = ^3J_{3-2} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 5.52\text{ppm}$ (d, H-1', $^3J_{1'-2'} = 4\text{Hz}$) ; $\delta = 6.8\text{ppm}$ (tquad, H- β' , $^2J_{\beta'-\gamma'} = 7.5\text{Hz}$, $^4J = 1\text{Hz}$)。

[0293] MALDI-Tof(阴离子模式) :M/Z = 965.75

[0294] 化合物 b :

[0295]



[0296] $C_{52}H_{95}O_{16}SNa$

[0297] $M = 1031.3717\text{g/mol}$

[0298] 3-O-(2,4S-二甲基二十二碳-2-烯酰基)-2-O-十六烷酰基-2'-O-硫酸

[0299] 根 $-\alpha, \alpha' -D-$ 海藻糖

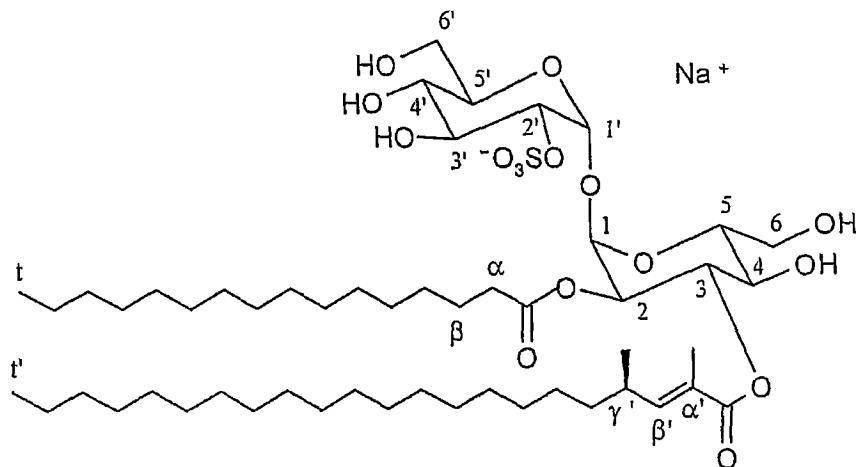
[0300] RMN 1H (250MHz, $CDCl_3/MeOD$ 4/1)

[0301] $\delta = 0.9\text{ppm}$ (t, 3H-t, 3H-t', $^3J = 6.5\text{Hz}$) ; $\delta = 0.99\text{ppm}$ (d, $(CH_3)_\gamma$, $^3J = 6.5\text{Hz}$) ; $\delta = 1.1-1.6\text{ppm}$ (m, H 脂肪族) ; $\delta = 1.82\text{ppm}$ (d, $(CH_3)_\alpha$, $^4J = 1\text{Hz}$) ; $\delta = 2.22\text{ppm}$ (t, 2H- α , $^3J = 7\text{Hz}$) ; $\delta = 2.46\text{ppm}$ (m, H- γ') ; $\delta = 3.4-4.4\text{ppm}$ (m, H-2', H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6_{ax}, H-6'_{ax}, H-6_{eq}, H-6'_{eq}) ; $\delta = 4.87\text{ppm}$ (dd, H-2, $^3J_{2-1} = 4\text{Hz}$ 和 $^3J_{2-3} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 5.29\text{ppm}$ (d, H-1, $^3J_{1-2} = 4\text{Hz}$) ; $\delta = 5.44\text{ppm}$ (t, H-3, $^3J_{3-4} = ^3J_{3-2} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 5.51\text{ppm}$ (d, H-1', $^3J_{1'-2'} = 4\text{Hz}$) ; $\delta = 6.57\text{ppm}$ (dquad, H- β' , $^3J_{\beta'-\gamma'} = 10\text{Hz}$, $^4J = 1\text{Hz}$)。

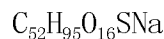
[0302] MALDI-Tof(阴离子模式) :M/Z = 1007.59

[0303] 化合物 c :

[0304]



[0305]



[0306]

$$M = 1031.3717g/mol$$

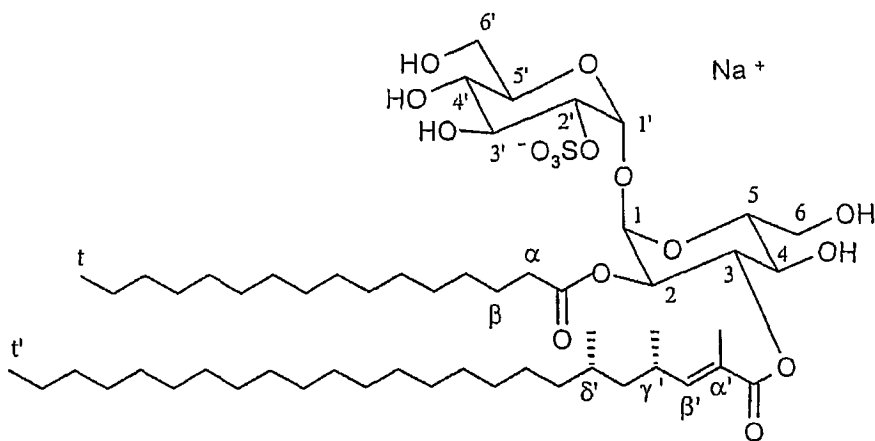
[0307] 3-O-(2,4S-二甲基二十二碳-2-烯酰基)-2-O-十六烷酰基-2'-O-硫酸[0308] 根- α, α' -D-海藻糖[0309] RMN 1H (250MHz, $CDCl_3/MeOD$ 4/1)

[0310] $\delta = 0.89ppm(t, 3H-t, 3H-t', ^3J = 6.5Hz)$; $\delta = 0.99ppm(d, (CH_3)_{\gamma'}, ^3J = 6.5Hz)$; $\delta = 1-1.6ppm(m, H \text{ 脂肪族})$; $\delta = 1.82ppm(d, (CH_3)_{\alpha'}, ^4J = 1Hz)$; $\delta = 2.21ppm(t, 2H-\alpha, ^3J = 7.5Hz)$; $\delta = 2.5ppm(m, H-\gamma')$; $\delta = 3.3-4.7ppm(m, H-2', H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', H-6_{ax}, H-6'_{ax}, H-6_{eq}, H-6'_{eq})$; $\delta = 4.95ppm(dd, H-2, ^3J_{2-1} = 4Hz \text{ 和 } ^3J_{2-3} = 10Hz)$; $\delta = 5.29ppm(d, H-1, ^3J_{1-2} = 4Hz)$; $\delta = 5.45ppm(t, H-3, ^3J_{3-4} = ^3J_{3-2} = 10Hz)$; $\delta = 5.52ppm(d, H-1', ^3J_{1'-2'} = 4Hz)$; $\delta = 6.57ppm(dquad, H-\beta', ^3J_{\beta', -\gamma'} = 10Hz, ^4J = 1Hz)$ 。

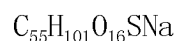
[0311] MALDI-ToF(阴离子模式):M/Z = 1007.49

[0312] 化合物 d:

[0313]



[0314]



[0315]

$$M = 1073.4523g/mol$$

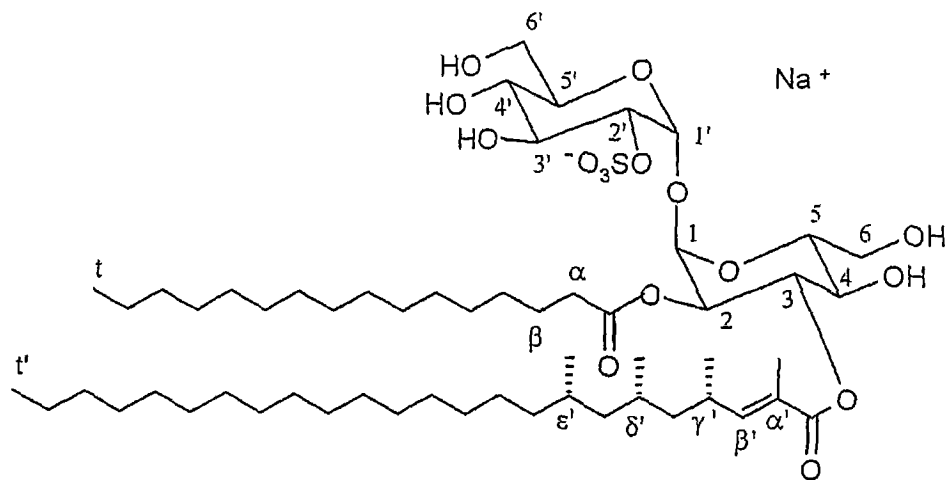
[0316] 2-O-十六烷酰基-2'-O-硫酸根-3-O-[(E)-(4S,6S)-2,4,6-三甲基二十[0317] 四碳-2-烯酰基]- α, α' -D-海藻糖[0318] RMN 1H (500MHz, $CDCl_3/MeOD$ 4/1)

[0319] $\delta = 0.86\text{ppm}(\text{d}, (\text{CH}_3)_{\delta'}, {}^3\text{J} = 6.5\text{Hz})$; $\delta = 0.88\text{ppm}(\text{t}, 3\text{H}-\text{t}, 3\text{H}-\text{t}', {}^3\text{J} = 7\text{Hz})$; $\delta = 0.97\text{ppm}(\text{d}, (\text{CH}_3)_{\gamma'}, {}^3\text{J} = 6.5\text{Hz})$; $\delta = 1-1.6\text{ppm}(\text{m}, \text{H 脂肪族})$; $\delta = 1.82\text{ppm}(\text{d}, (\text{CH}_3)_{\alpha'}, {}^4\text{J} = 1.5\text{Hz})$; $\delta = 2.22$ 和 2.26ppm (2个五重峰, $2\text{H}-\alpha$, ${}^3\text{J}_{\alpha-\beta} = 8\text{Hz}$, ${}^2\text{J} = 16\text{Hz}$); $\delta = 2.62\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-\gamma')$; $\delta = 3.5-3.8\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-4, \text{H}-4', \text{H}-5', \text{H}-6, 2\text{H}-6')$; $\delta = 3.94\text{ppm}(\text{t}, \text{H}-3', {}^3\text{J}_{3'-2'} = {}^3\text{J}_{3'-4'} = 10\text{Hz})$; $\delta = 3.97\text{ppm}(\text{dd}, \text{H}-6, {}^2\text{J} = 12\text{Hz}$, ${}^3\text{J}_{6-5} = 3\text{Hz})$; $\delta = 4.23\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-2', \text{H}-5)$; $\delta = 4.97\text{ppm}(\text{dd}, \text{H}-2, {}^3\text{J}_{2-1} = 3.6\text{Hz}$ 和 ${}^3\text{J}_{2-3} = 10\text{Hz})$; $\delta = 5.25\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-1, {}^3\text{J}_{1-2} = 3.6\text{Hz})$; $\delta = 5.43\text{ppm}(\text{t}, \text{H}-3, {}^3\text{J}_{3-4} = {}^3\text{J}_{3-2} = 10\text{Hz})$; $\delta = 5.46\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-1', {}^3\text{J}_{1'-2'} = 3.6\text{Hz})$; $\delta = 6.54\text{ppm}(\text{dq}, \text{H}-\beta', {}^3\text{J}_{\beta', -\gamma'} = 10\text{Hz}$, ${}^4\text{J} = 1.5\text{Hz})$

[0320] MALDI-Tof(阴离子模式):M/Z = 1049.47

[0321] 化合物 e:

[0322]



[0323] $\text{C}_{56}\text{H}_{103}\text{O}_{16}\text{SNa}$

[0324] $M = 1087.4792\text{g/mol}$

[0325] 2'-O-硫酸根-2-O-十六烷酰基-3-O-[(4S,6S,8S)-2,4,6,8-四甲基二十

[0326] 四碳-2-烯酰基]- α, α' -D-海藻糖

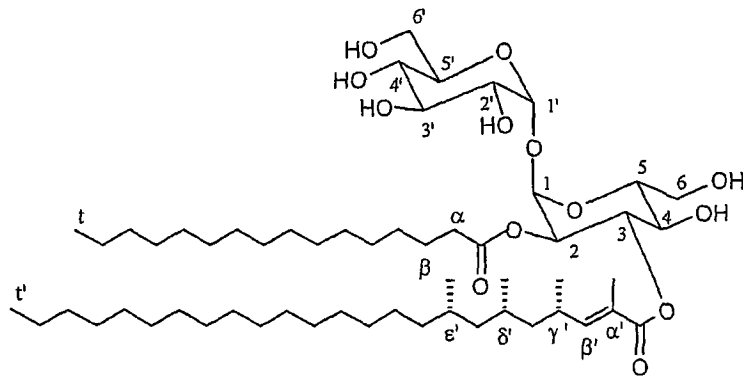
[0327] RMN ^1H (250MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 4/1)

[0328] $\delta = 0.89\text{ppm}(\text{t}, 3\text{H}-\text{t}, 3\text{H}-\text{t}', {}^3\text{J} = 6.5\text{Hz})$; $\delta = 0.82$; 0.84 和 0.97ppm (3d, $(\text{CH}_3)_{\gamma'}$, $(\text{CH}_3)_{\delta'}$, $(\text{CH}_3)_{\epsilon'}$); $\delta = 1-1.6\text{ppm}(\text{m}, \text{H 脂肪族})$; $\delta = 1.84\text{ppm}(\text{d}, (\text{CH}_3)_{\alpha'}, {}^4\text{J} = 1\text{Hz})$; $\delta = 2.24\text{ppm}(\text{m}, 2\text{H}-\alpha)$; $\delta = 2.6\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-\gamma')$; $\delta = 3-4.5\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-2', \text{H}-3', \text{H}-4, \text{H}-4', \text{H}-5, \text{H}-5', 2\text{H}-6, 2\text{H}-6')$; $\delta = 4.96\text{ppm}(\text{dd}, \text{H}-2, {}^3\text{J}_{2-1} = 4\text{Hz}$ 和 ${}^3\text{J}_{2-3} = 10\text{Hz})$; $\delta = 5.27\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-1, {}^3\text{J}_{1-2} = 4\text{Hz})$; $\delta = 5.43\text{ppm}(\text{t}, \text{H}-3, {}^3\text{J}_{3-4} = {}^3\text{J}_{3-2} = 10\text{Hz})$; $\delta = 5.48\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-1', {}^3\text{J}_{1'-2'} = 4\text{Hz})$; $\delta = 6.54\text{ppm}(\text{dq}, \text{H}-\beta', {}^3\text{J}_{\beta', -\gamma'} = 10.2\text{Hz}$, ${}^4\text{J} = 1\text{Hz})$ 。

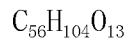
[0329] MALDI-Tof(阴离子模式):M/Z = 1063.66

[0330] 化合物 f:

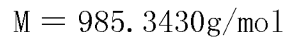
[0331]



[0332]



[0333]

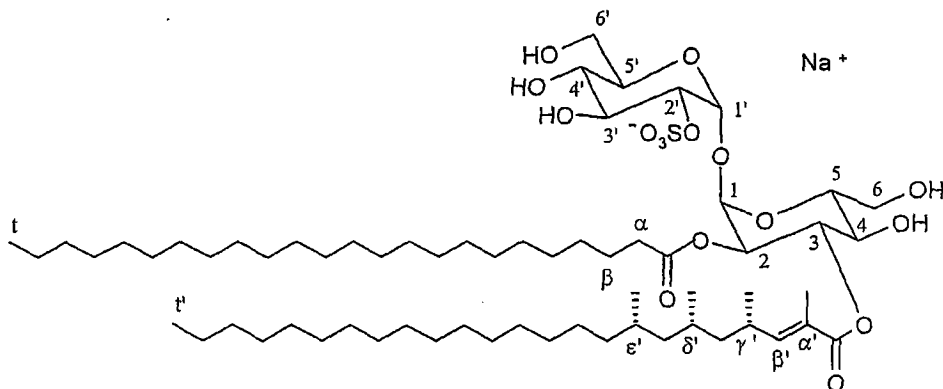
[0334] 2-O-十六烷酰基-3-O-[(4S,6S,8S)-2,4,6,8-四甲基二十四碳-2-烯酰[0335] 基]- α, α' -D-海藻糖[0336] RMN ^1H (250MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 4/1)

[0337] $\delta = 0.77\text{ppm}$ (t, 3H-t, 3H-t', $^3J = 6, 5\text{Hz}$) ; $\delta = 0.7 ; 0.72$ 和 0.86ppm (3d, $(\text{CH}_3)_{\gamma'}$, $(\text{CH}_3)_{\delta'}$, $(\text{CH}_3)_{\epsilon'}$) ; $\delta = 1-1.5\text{ppm}$ (m, H脂肪族) ; $\delta = 1.73\text{ppm}$ (d, $(\text{CH}_3)_{\alpha'}$, $^4J = 1.5\text{Hz}$) ; $\delta = 2.13\text{ppm}$ (m, 2H- α) ; $\delta = 2.5\text{ppm}$ (m, H- γ') ; $\delta = 3.2-3.9\text{ppm}$ (m, H-2', H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', 2H-6, 2H-6') ; $\delta = 4.84\text{ppm}$ (dd, H-2, $^3J_{2-1} = 4\text{Hz}$ 和 $^3J_{2-3} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 5.0\text{ppm}$ (d, H-1, $^3J_{1-2} = 4\text{Hz}$) ; $\delta = 5.16\text{ppm}$ (d, H-1', $^3J_{1'-2'} = 4\text{Hz}$) ; $\delta = 5.36\text{ppm}$ (t, H-3, $^3J_{3-4} = ^3J_{3-2} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 6.43\text{ppm}$ (dq, H- β' , $^3J_{\beta', -\gamma'} = 10.2\text{Hz}$, $^4J = 1\text{Hz}$) 。

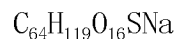
[0338] MALDI-Tof(阴离子模式) :M/Z = 1007.61

[0339] 化合物 g :

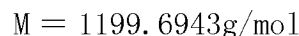
[0340]



[0341]



[0342]

[0343] 2'-O-硫酸根-2-O-二十四烷酰基-3-O-[(4S,6S,8S)-2,4,6,8-四甲基二[0344] 十四碳-2-烯酰基]- α, α' -D-海藻糖[0345] RMN ^1H (250MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 4/1)

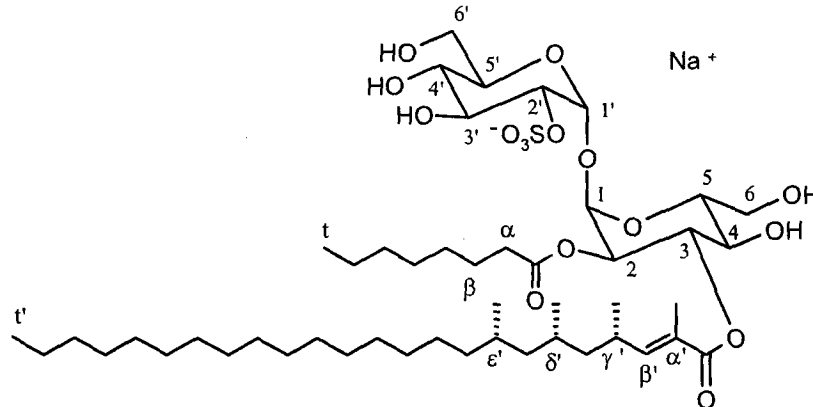
[0346] $\delta = 0.6-0.9\text{ppm}$ (m, 3H-t, 3H-t', $(\text{CH}_3)_{\gamma'}$, $(\text{CH}_3)_{\delta'}$, $(\text{CH}_3)_{\epsilon'}$) ; $\delta = 1-1.5\text{ppm}$ (m, H脂肪族) ; $\delta = 1.73\text{ppm}$ (d, $(\text{CH}_3)_{\alpha'}$, $^4J = 1\text{Hz}$) ; $\delta = 2.1\text{ppm}$ (m, 2H- α) ; $\delta = 2.5\text{ppm}$ (m, H- γ') ; $\delta = 3.1-4.5\text{ppm}$ (m, H-2', H-3', H-4, H-4', H-5, H-5', 2H-6, 2H-6') ; $\delta = 4.8\text{ppm}$ (dd, H-2, $^3J_{2-1} = 4\text{Hz}$ 和 $^3J_{2-3} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 5.16\text{ppm}$ (d, H-1, $^3J_{1-2} = 4\text{Hz}$) ; δ

= 5.3ppm(t, H-3, ${}^3J_{3-4} = {}^3J_{3-2} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 5.46\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-1', {}^3J_{1'-2'} = 4\text{Hz})$; $\delta = 6.43\text{ppm}(\text{dq}, \text{H}-\beta', {}^3J_{\beta',-\gamma'} = 10.2\text{Hz}, {}^4J = 1\text{Hz})$

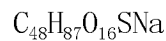
[0347] MALDI-Tof(阴离子模式) :M/Z = 1175.57

[0348] 化合物 h :

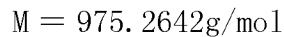
[0349]



[0350]



[0351]



[0352] 2-O-辛酰基-2'-O-硫酸根-3-O-[(4S,6S,8S)-2,4,6,8-四甲基二十四碳

[0353] -2-烯酰基]- α, α' -D-海藻糖

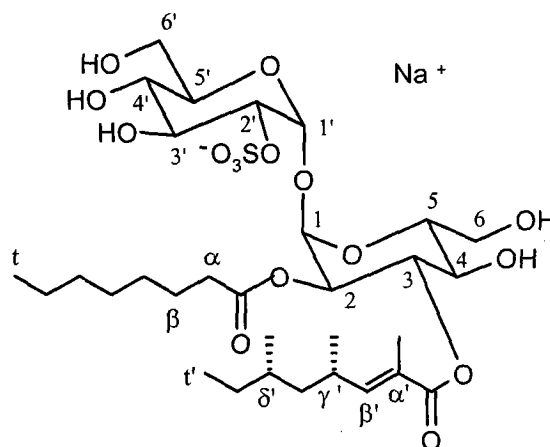
[0354] RMN ${}^1\text{H}$ (250MHz, $\text{CDCl}_3/\text{MeOD}$ 4/1)

[0355] $\delta = 0.65\text{ppm}(\text{d}, (\text{CH}_3)_\delta, {}^3J = 7\text{Hz})$; $\delta = 0.7\text{ppm}(\text{t}, 3\text{H}-\text{t}, 3\text{H}-\text{t}', {}^3J = 7\text{Hz})$; $\delta = 0.8\text{ppm}(\text{d}, (\text{CH}_3)_\gamma, {}^3J = 7\text{Hz})$; $\delta = 1.1-1.5\text{ppm}(\text{m}, \text{H 脂肪族})$; $\delta = 1.7\text{ppm}(\text{s}, (\text{CH}_3)_{\alpha'})$; $\delta = 2.1\text{ppm}(\text{t}, 2\text{H}-\alpha, {}^3J_{\alpha-\beta} = 7\text{Hz})$; $\delta = 2.5\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-\gamma')$; $\delta = 3.1-4.5\text{ppm}(\text{m}, \text{H}-2', \text{H}-3', \text{H}-4, \text{H}-4', \text{H}-5, \text{H}-5', 2\text{H}-6, 2\text{H}-6')$; $\delta = 4.8\text{ppm}(\text{dd}, \text{H}-2, {}^3J_{2-1} = 4\text{Hz}$ 和 ${}^3J_{2-3} = 10\text{Hz})$; $\delta = 5.15\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-1, {}^3J_{1-2} = 4\text{Hz})$; $\delta = 5.3\text{ppm}(\text{t}, \text{H}-3, {}^3J_{3-4} = {}^3J_{3-2} = 10\text{Hz})$; $\delta = 5.4\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-1', {}^3J_{1'-2'} = 4\text{Hz})$; $\delta = 6.4\text{ppm}(\text{d}, \text{H}-\beta', {}^3J_{\beta',-\gamma'} = 10.2\text{Hz})$ 。

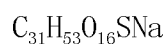
[0356] MALDI-Tof(阴离子模式) :M/Z = 951.43

[0357] 化合物 i :

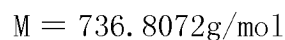
[0358]



[0359]



[0360]



[0361] 2-O-辛酰基-2'-O-硫酸根-3-O-[(4S,6S)-2,4,6-三甲基辛-2-烯酰

[0362] 基]- α, α' -D-海藻糖

[0363] RMN ^1H (600MHz, 冷冻探针, MeOD)

[0364] $\delta = 0.86\text{ppm}$ (d, $(\text{CH}_3)_{\delta}, {}^3\text{J} = 6.6\text{Hz}$) ; $\delta = 0.88\text{ppm}$ (t, 3H-t', ${}^3\text{J} = 7.2\text{Hz}$) ; $\delta = 0.9\text{ppm}$ (t, 3H-t, ${}^3\text{J} = 7.2\text{Hz}$) ; $\delta = 0.99\text{ppm}$ (d, $(\text{CH}_3)_{\gamma}, {}^3\text{J} = 7.2\text{Hz}$) ; $\delta = 1.1-1.6\text{ppm}$ (m, H脂肪族) ; $\delta = 1.85\text{ppm}$ (d, $(\text{CH}_3)_{\alpha}, {}^4\text{J} = 1.5\text{Hz}$) ; $\delta = 2.27$ 和 2.3ppm (2td, 2H- $\alpha, {}^3\text{J}_{\alpha-\beta} = 7.2\text{Hz}, {}^2\text{J} = 14.4\text{Hz}$) ; $\delta = 2.66\text{ppm}$ (m, H- γ') ; $\delta = 3.41\text{ppm}$ (t, H-4', ${}^3\text{J}_{4'-3} = {}^3\text{J}_{4'-5} = 9.3\text{Hz}$) ; $\delta = 3.66\text{ppm}$ (dd, 1H-6', ${}^3\text{J}_{6'-5} = 5.7$ 和 ${}^2\text{J} = 11.7\text{Hz}$) ; $\delta = 3.68\text{ppm}$ (t, H-4, ${}^3\text{J}_{4-5} = {}^3\text{J}_{4-3} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 3.75\text{ppm}$ (m, H-5', H-6, H-6') ; $\delta = 3.91\text{ppm}$ (dd, H-6, ${}^2\text{J} = 12\text{Hz}, {}^3\text{J}_{6-5} = 2.4\text{Hz}$) ; $\delta = 3.92\text{ppm}$ (t, H-3', ${}^3\text{J}_{3'-2} = {}^3\text{J}_{3'-4} = 9.3\text{Hz}$) ; $\delta = 4.19\text{ppm}$ (dd, H-2', ${}^3\text{J}_{2'-1} = 3.6\text{Hz}, {}^3\text{J}_{2'-3} = 9.3\text{Hz}$) ; $\delta = 4.24\text{ppm}$ (ddd, H-5, ${}^3\text{J}_{5-6} = 2.4\text{Hz}, {}^3\text{J}_{5-6} = 4.2\text{Hz}, {}^3\text{J}_{5-4} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 4.98\text{ppm}$ (dd, H-2, ${}^3\text{J}_{2-1} = 3.6\text{Hz}$ 和 ${}^3\text{J}_{2-3} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 5.27\text{ppm}$ (d, H-1, ${}^3\text{J}_{1-2} = 3.6\text{Hz}$) ; $\delta = 5.50\text{ppm}$ (d, H-1', ${}^3\text{J}_{1'-2} = 3.6\text{Hz}$) ; $\delta = 5.51\text{ppm}$ (t, H-3, ${}^3\text{J}_{3-4} = {}^3\text{J}_{3-2} = 10\text{Hz}$) ; $\delta = 6.52\text{ppm}$ (dquad, H- $\beta', {}^3\text{J}_{\beta-\gamma} = 10.2\text{Hz}, {}^4\text{J} = 1.5\text{Hz}$)

[0365] RMN ^{13}C (600MHz, 冷冻探针, MeOD)

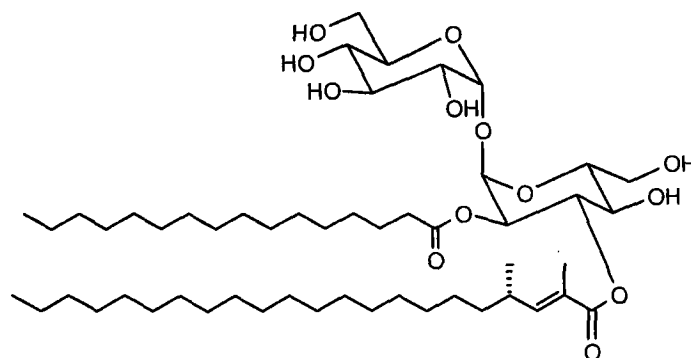
[0366] $\delta = 11.6\text{ppm}$, C-t' ; $\delta = 12.8\text{ppm}$, $(\text{CH}_3)_{\alpha}$; $\delta = 14.4\text{ppm}$, C-t ; $\delta = 19.5\text{ppm}$, $(\text{CH}_3)_{\delta}$; $\delta = 20.8\text{ppm}$, $(\text{CH}_3)_{\gamma}$; $\delta = 23.7\text{ppm}$, C-(t-1) ; $\delta = 26.0\text{ppm}$, C- β ; $\delta = 30$; 30.1 ; 32.8ppm , C辛酸 ; $\delta = 31.1\text{ppm}$, C-(t-1)' ; $\delta = 32.1\text{ppm}$, C- γ' ; $\delta = 33.6\text{ppm}$, C- δ' ; $\delta = 35.0\text{ppm}$, C- α ; $\delta = 45.3\text{ppm}$, C- ϵ' ; $\delta = 61.8\text{ppm}$, C-6 ; $\delta = 62.5\text{ppm}$, C-6' ; $\delta = 69.9\text{ppm}$, C-4 ; $\delta = 71.6\text{ppm}$, C-4' ; $\delta = 72.0\text{ppm}$, C-2 ; $\delta = 72.8\text{ppm}$, C-3' ; $\delta = 73.4\text{ppm}$, C-5 ; $\delta = 74.1\text{ppm}$, C-5' ; $\delta = 74.4\text{ppm}$, C-3 ; $\delta = 78.4\text{ppm}$, C-2' ; $\delta = 93.5\text{ppm}$, C-1 ; $\delta = 94.3\text{ppm}$, C-1' ; $\delta = 127.2\text{ppm}$, C- α' ; $\delta = 150.2\text{ppm}$, C- β' ; $\delta = 169.3\text{ppm}$, $(\text{C}=\text{O})_3$; $\delta = 174.3\text{ppm}$, $(\text{C}=\text{O})_2$.

[0367] MALDI-Tof(阴离子模式):M/Z = 713, 15

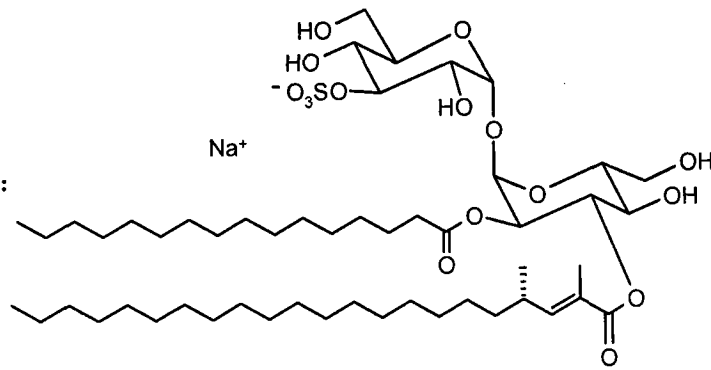
[0368] 以及下列化合物:

[0369] 化合物 j:

[0370]

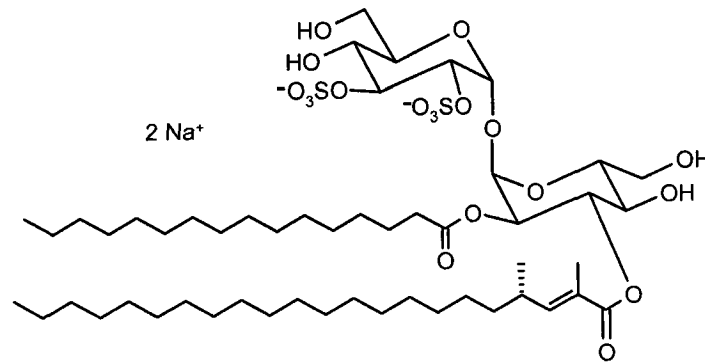


[0371] 化合物 k :



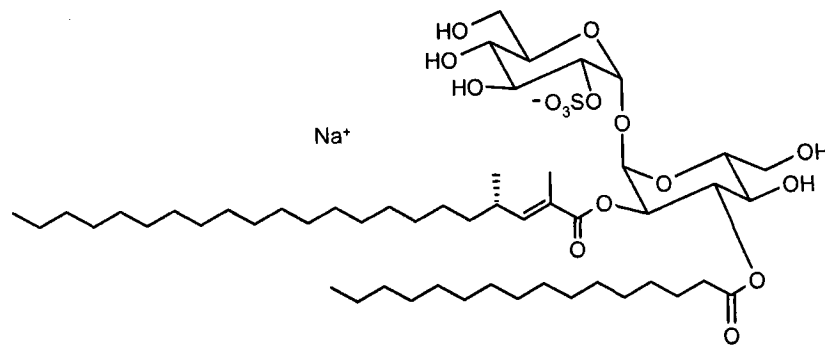
[0372] 化合物 l :

[0373]



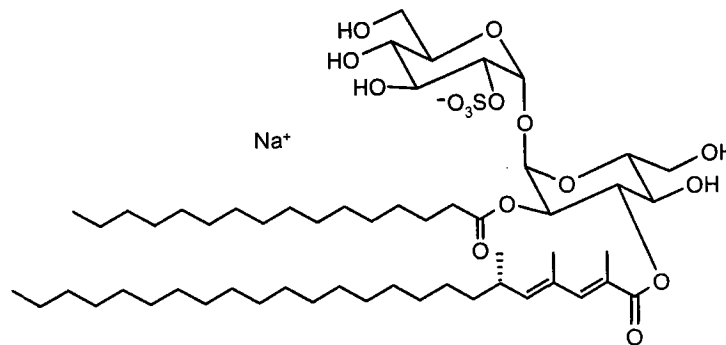
[0374] 化合物 m :

[0375]



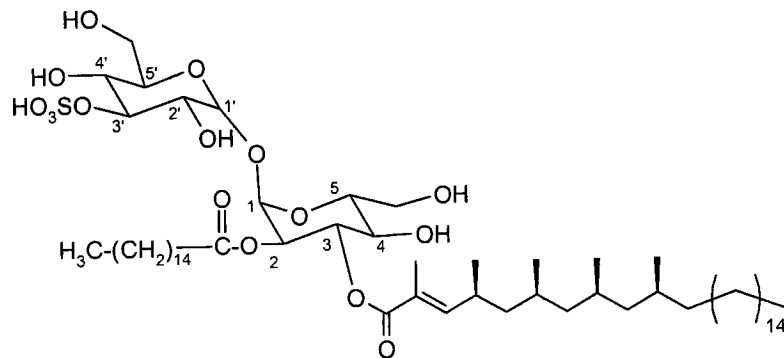
[0376] 化合物 n :

[0377]



[0378] 化合物 o :

[0379]



[0380] **实施例 2**: 结核分枝杆菌硫酸糖脂的离体 (ex vivo) 试验

[0381] 为了确定硫酸糖脂 - 抗原的免疫原性, 测量用纯化的硫酸糖脂刺激之后 IFN- γ 的释放。在 GM-CSF (500U/mL) 和 IL-4 (5ng/mL) 存在下培养 2×10^5 PBMC 每 / 孔 4 天。在此期间在 10% 的人血清中培养自体效应 T- 细胞。将硫酸糖脂 (10 μ g/mL) 加入到被照射的、CD1- 表达的抗原呈递细胞中。最后, 加入效应细胞 (2×10^5 / 孔), 18 小时之后借助 ELISA 测量 IFN- γ 在上清液中的释放。在 96- 孔免疫吸附剂板上进行 IFN- γ ELISA, 该板上涂覆 IFN- γ 捕获抗体 (2 μ g/mL) 并经历整夜。用含有 1% 牛血清白蛋白的 PBS 阻断非特异性结合位点。将上清液稀释至 1 : 1 并加至终体积为 100 μ l。室温下将板培养 2 小时并通过彻底洗涤 (3-4 次) 而除去板。最后, 经 1 小时加入生物素化抗 -IFN- γ 抗体 (2 μ g/mL)。为了检测免疫反应性的 IFN- γ , 经 30 分钟加入辣根 - 过氧化物酶。最后加入显色底物 (TMB, Endogen, MA, USA)。经 20 分钟的培养之后, 加入硫酸 (2%) 终止反应。在 480nm 波长处用光度测量法确定染色强度。为了估计上清液中的细胞因子浓度, 所有试验都包括具有已知浓度的 IFN- γ 标准。

[0382] **实施例 3**: 体内研究

[0383] 征集 PPD⁺ 供体 (结核菌素试验呈阳性) 和 PPD⁻ 供体 (结核菌素试验呈阴性) 并给药本发明的化合物。采用 ELISA 试验 (15pg/mL) 在各组的各个病人中评价 IFN- γ 的产生从而测量对硫酸糖脂的响应。对比各组的响应情况。

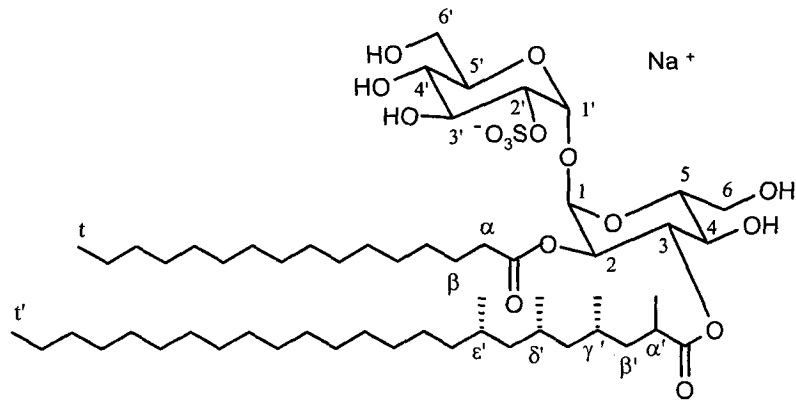
[0384] **实施例 4**: 抗原呈递试验

[0385] 测量按照 WO 2004/092192 中公开的方法制备的 T 细胞克隆 Z4B27 响应本发明化合物的刺激所产生的 IFN- γ 的释放。

[0386] 在加入 T 细胞 (5×10^4 / 孔, 一式三份) 之前, 在 37 $^{\circ}$ C 下用以声波处理过的抗原 (1-10 μ g/mL) 预培养 5×10^4 细胞 / 孔的 CD1+APC 2 小时。36 小时后使用 sandwich ELISA 试剂盒 (Instrumentation Laboratory) 测量释放的 TNF- α 和 IFN- γ 。数据被表示为三份试样的平均 ng/mL 或 pg/mL \pm SD。所有试验至少重复 2 次。

[0387] 图 1 中显示了本发明的化合物 e (cpd e) 的结果。其证明本发明的化合物与相应的未硫酸化的化合物 (参见化合物 f “cpd f”) 和 WO2004/092192 中公开的基于下式的对比化合物的相应的饱和化合物 (参见 “comp.”) 相比显示出更好的活性:

[0388]



[0389] 图 2 中示出的进一步结果显示了化合物 b 和 d (cpd b 和 cpd d) 的活性。

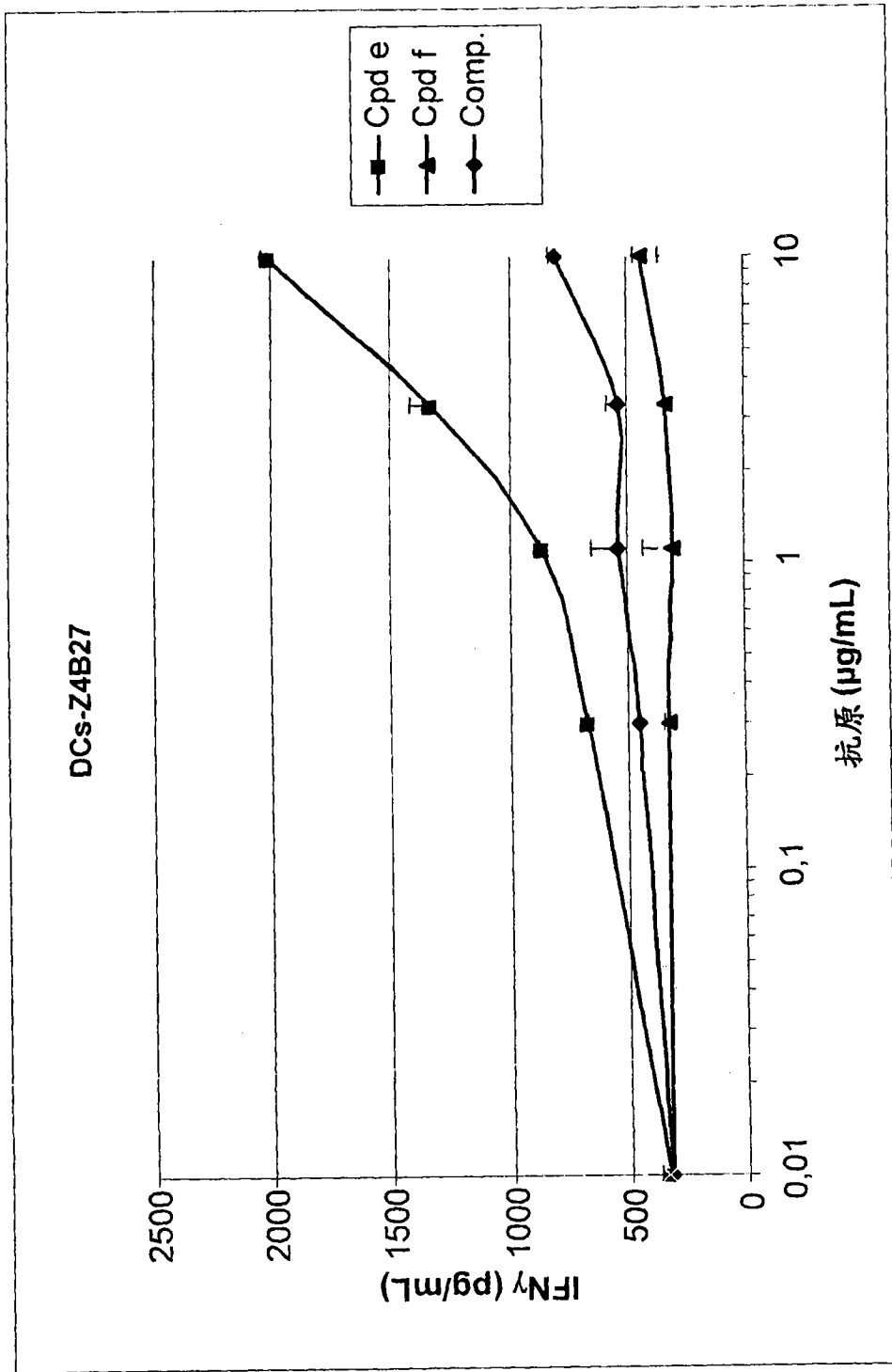


图 1

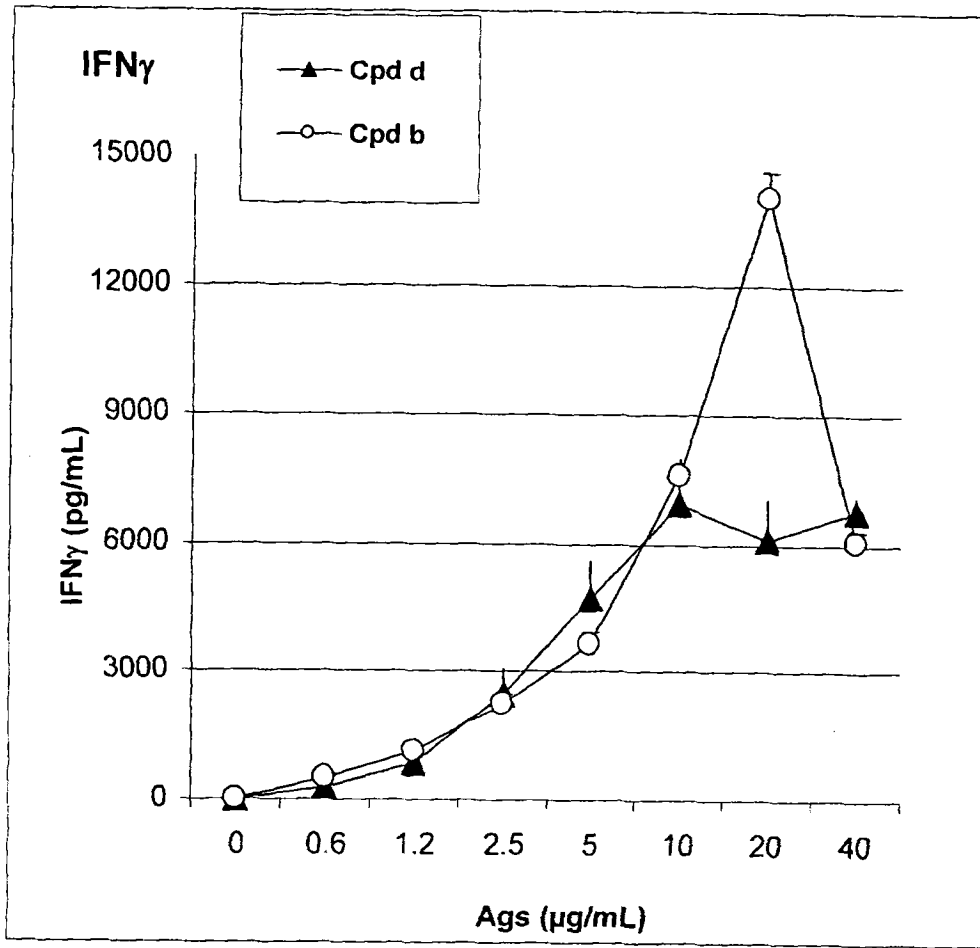


图 2