



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102348668 A

(43) 申请公布日 2012.02.08

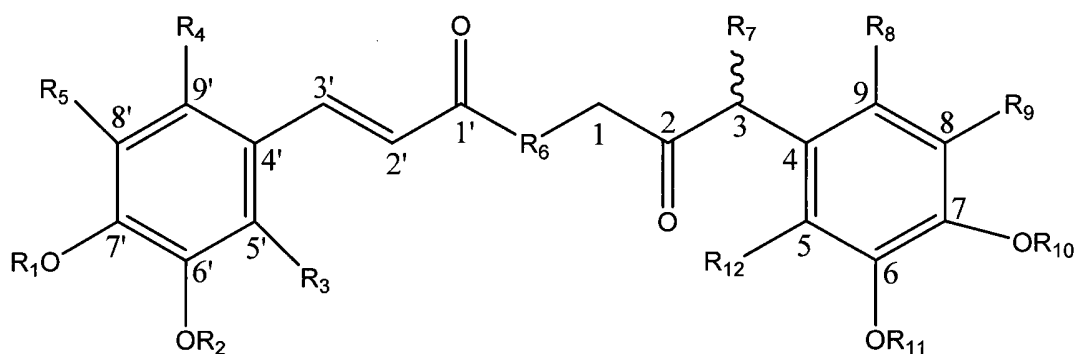
(21) 申请号 200980158058.6 *007C 43/215*(2006.01)
(22) 申请日 2009.12.28 *A61K 31/05*(2006.01)
(30) 优先权数据 *A61K 31/09*(2006.01)
61/143,925 2009.01.12 US *A61P 35/00*(2006.01)
(85) PCT申请进入国家阶段日
2011.09.13
(86) PCT申请的申请数据
PCT/IB2009/055970 2009.12.28
(87) PCT申请的公布数据
W02010/079406 EN 2010.07.15
(71) 申请人 培力(香港)健康产品有限公司
地址 中国香港
申请人 港大科桥有限公司
(72) 发明人 A·S·刘 L·H·C·杨 C·C·S·威
C·B·J·李
(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限
公司 11285
代理人 张广育 胡洪慧
(51) Int. Cl.
007C 39/21(2006.01)

权利要求书 3 页 说明书 18 页
序列表 1 页 附图 9 页

(54) 发明名称
化合物及其用于治疗炎症和调节免疫应答的
用途

(57) 摘要
本发明提供了化合物和包含这些化合物的组
合物,它们具有免疫调节活性和 / 或抗炎症活性。

1. 一种具有下式的分离的化合物：



其中，

R_1 是烷基；

R_2 是 H 或烷基；

R_3 、 R_4 和 R_5 独立地是 -H、酰基、卤素、卤代烷基、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH；

R_6 是 -O 或 -NH；

R_7 是 -H、烷基、烷氧基、羟基烷基、羟基或卤素；

R_8 、 R_9 和 R_{12} 独立地是 -H、酰基、卤素、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH；

R_{10} 是 H 或烷基；并且

R_{11} 是 H 或烷基。

2. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物来自植物。

3. 权利要求 1 的化合物，其中所述植物选自总状升麻 (*Cimicifuga racemosa*)、升麻 (*Cimicifuga foetida*) 和大三叶升麻 (*Cimicifuga heracleifolia*)。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 R_2 是 H， R_3 是 H， R_4 是 H。

5. 权利要求 1 的化合物，其中 R_1 是甲基基团。

6. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物调节哺乳动物的免疫活性。

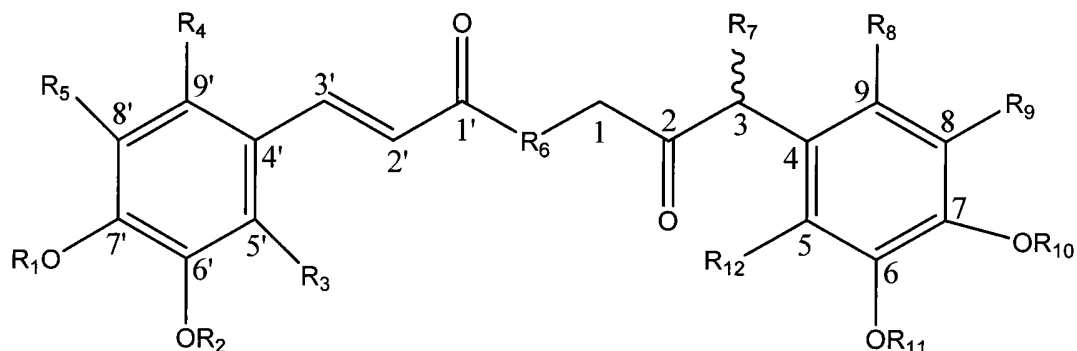
7. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物具有炎症活性。

8. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物抑制 TNF- α 的诱导。

9. 权利要求 8 的化合物，其中所述化合物抑制 LPS 诱导的 TNF- α 产生达至少 50%。

10. 权利要求 1 的化合物，其中所述化合物基本上是纯的。

11. 一种药物组合物，包含具有下式的分离的化合物：



其中，

R_1 是烷基；

R_2 是 H 或烷基；

R_3 、 R_4 和 R_5 独立地是 -H、酰基、卤素、卤代烷基、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH；

R_6 是 -O 或 -NH；

R_7 是 -H、烷基、烷氧基、羟基烷基、羟基或卤素；

R_8 、 R_9 和 R_{12} 独立地是 -H、酰基、卤素、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH；

R_{10} 是 H 或烷基；并且

R_{11} 是 H 或烷基，

其中所述组合物还包含可药用载体。

12. 权利要求 11 的药物组合物，其中所述化合物来自植物。

13. 权利要求 11 的药物组合物，其中 R_2 是 H， R_3 是 H， R_4 是 H。

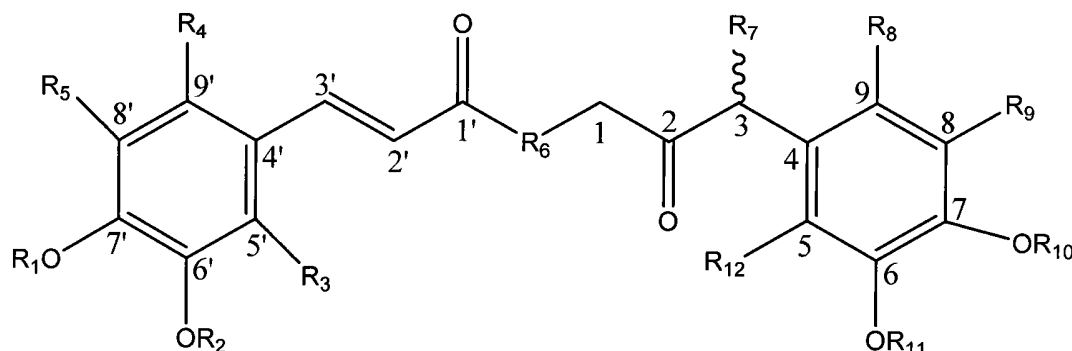
14. 权利要求 13 的药物组合物，其中 R_1 是甲基基团。

15. 权利要求 11 的药物化合物，其中所述组合物调节免疫活性。

16. 权利要求 11 的药物组合物，其中所述组合物减少炎症。

17. 权利要求 11 的药物组合物，其中所述组合物抑制 TNF- α 诱导。

18. 一种用于治疗受试者以减少炎症并且 / 或者以调节免疫应答的方法，其中所述方法包括向需要这类治疗的受试者给予有效量的具有下式的分离的化合物：



其中，

R_1 是烷基；

R_2 是 H 或烷基；

R_3 、 R_4 和 R_5 独立地是 -H、酰基、卤素、卤代烷基、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH；

R_6 是 -O 或 -NH；

R_7 是 -H、烷基、烷氧基、羟基烷基、羟基或卤素；

R_8 、 R_9 和 R_{12} 独立地是 -H、酰基、卤素、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH；

R_{10} 是 H 或烷基；并且

R_{11} 是 H 或烷基。

19. 权利要求 18 的方法，其中所述受试者是人。

20. 权利要求 18 的方法，其中 R_2 是 H， R_3 是 H， R_4 是 H。

21. 权利要求 20 的方法，其中 R_1 是甲基基团。

22. 权利要求 18 的方法，用于减少炎症。

23. 权利要求 18 的方法,其中 TNF- α 活性被抑制。

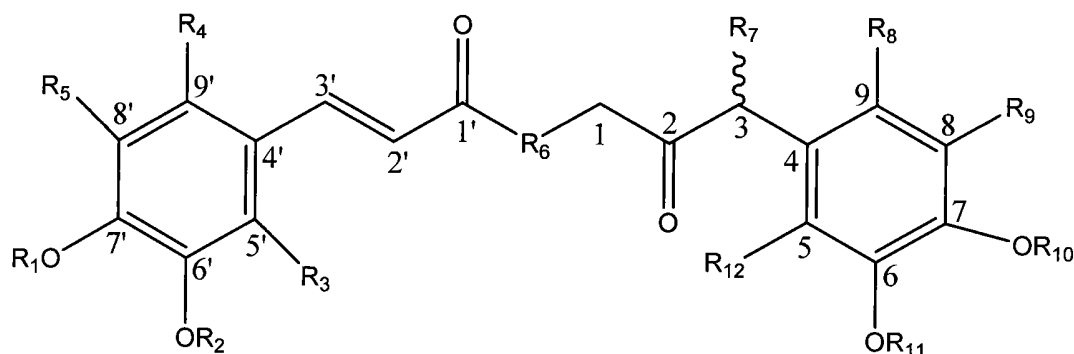
24. 权利要求 18 的方法,用于治疗与感染、环境毒素、自身免疫病症、心血管疾病、肠炎、变态反应、移植物排斥、病理免疫细胞增殖或活性以及 / 或者呼吸系统炎症相关的病症。

25. 权利要求 18 的方法,用于治疗选自类风湿性关节炎、银屑病、心血管疾病、炎性肠病、感染性休克和移植物抗宿主排斥的病症。

26. 权利要求 18 的方法,其中所述受试者是哺乳动物。

27. 权利要求 26 的方法,其中所述哺乳动物是牛。

28. 一种用于抑制 ERK1/2 磷酸化和 / 或压抑 NF- κ B 活化的方法,其中所述方法包括对需要这类抑制和 / 或压抑的受试者给予有效量的具有下式的化合物:



其中,

R_1 是烷基;

R_2 是 H 或烷基;

R_3 、 R_4 和 R_5 独立地是 -H、酰基、卤素、卤代烷基、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH;

R_6 是 -O 或 -NH;

R_7 是 -H、烷基、烷氧基、羟基烷基、羟基或卤素;

R_8 、 R_9 和 R_{12} 独立地是 -H、酰基、卤素、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH;

R_{10} 是 H 或烷基;并且

R_{11} 是 H 或烷基。

29. 权利要求 28 的方法,其中 R_1 是甲基, R_2 是 H, R_3 是 H, 和 R_4 是 H。

30. 权利要求 28 的方法,用于调节 NF- κ B 和 / 或 ERK1/2 下游的细胞内活性和 / 或细胞外活性。

化合物及其用于治疗炎症和调节免疫应答的用途

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求以 2009 年 1 月 12 日提交的流水号为 61/143,925 的美国临时申请的优先权,该临时申请通过引用的方式全文——包括所有图和序列——纳入本文。

背景技术

[0003] 人对损伤、癌症、微生物侵入等应答时,进行炎症反应以控制所述病理状态并且以开始修复过程。在炎症过程中,多种免疫细胞——包括 T 淋巴细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞——被募集至感染部位并产生细胞因子以促进免疫应答。在这些细胞因子中,肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 是介导所述免疫防御的一种主要的促炎性蛋白。

[0004] 除急性期反应外,TNF- α 已被表明参与多种慢性疾病——包括肿瘤发生和类风湿性关节炎 (RA)——的发展。TNF- α 产生的失调被证明参与肿瘤发生——包括肿瘤生长¹、细胞增殖²和侵入³的起始——的不同阶段。对于肿瘤细胞增殖,TNF- α 上调特定的生长因子从而介导恶性生长。所述细胞因子促进有利于血管生长的血管发生,以支持肿瘤迁移,并因此在肿瘤转移中起到关键作用。例如,胶质母细胞瘤迁移和金属蛋白酶的诱导在对 TNF- α 效应的应答中显著增强⁴。

[0005] TNF- α 介导的慢性疾病发病的实例包括类风湿性关节炎和炎症肠病。类风湿性关节炎患者在滑膜组织中有低级隐性炎症。已经知道,TNF- α 在发炎关节处过量产生导致对关节软骨和周围骨的缓慢破坏。

[0006] 在感染的急性期中——例如在脓毒病的情况下,公知 TNF- α 的不受控制的产生可造成对宿主的有害效应。脓毒病是非冠心病加护病房中的第二常见死亡诱因,和高收入国家中的第 10 大死亡诱因⁵。导致脓毒病的感染的临床结果主要与细菌性内毒素(例如脂多糖 [LPS]) 对宿主免疫细胞——特别是单核细胞或巨噬细胞——的过度刺激有关⁶⁻⁸。LPS 过度刺激的巨噬细胞还会产生高水平的介导体,例如白细胞介素-1 (IL-1)、IL-6 和 TNF- α ⁹。这些介导体牵涉脓毒病的发病机理之中,并且被发现是对宿主死亡起作用的因素。开发定向抑制 TNF- α 产生的新型疗法可有助于协助对上述这些急性病和慢性病的治疗。

[0007] 在暴露于病原体和内毒素后,细胞内信号传递通路——包括特异性的激酶和转录因子——被活化,以诱导 TNF- α 的表达。有丝分裂原激活的蛋白 (MAP) 激酶和核因子 κ B (NF- κ B) 参与病原体诱导的 TNF- α 表达已被记录¹⁰⁻¹²。分枝杆菌、禽流感和 HIV-1 Tat 蛋白是通过 MAP 激酶进行的 TNF- α 诱导物¹³⁻¹⁵。

[0008] 在人中有三种已知的 MAP 激酶亚型——包括细胞外信号调节的激酶-1/2 (ERK 1/2)、p38MAP 激酶和 c-Jun N 末端激酶 (JNK)¹⁶⁻²⁰。它们可通过导致对转录因子例如 NF- κ B 的活化的蛋白质磷酸化级联转导多种细胞外刺激。NF- κ B 的活化在细胞因子——包括 IL-6 和 TNF- α ——产生中是至关重要的¹³⁻¹⁵。该过程通过如下方式发生:经 I- κ B 激酶 (IKK) 信号体复合物在 Ser32 和 Ser36 磷酸化 I- κ B,然后是蛋白体降解²¹以及因此的 I- κ B 和 NF- κ B 亚基解离²²。然后,将活化的 NF- κ B 从细胞质移位至细胞核,它在细胞核中结合至反应性基因的启动子区中的 κ B 结合位点,导致起始促炎介导物的转录。因为 NF- κ B 的不

适当活化与很多人疾病相关²³,它已被认为是治疗介入的可能靶标。

[0009] 非甾体类抗炎药 (NSAID)——包括阿司匹林、布洛芬和吲哚美辛——公知用于改善与炎性疾病 (例如类风湿性关节炎和炎性肠病) 相关的急性和慢性疼痛。然而,它们对于治疗晚期类风湿性关节炎和相关自身免疫性疾病无效。对于这些病症,使用类固醇和细胞性毒药,例如甲氨喋呤和环磷酰胺。这些药物和严重副作用——包括胃肠刺激、严重出血和骨髓抑制——相关。

[0010] 近年来,已经开发了免疫治疗物,其目标是中和 TNF- α 并抑制其不利的促炎症作用。这些治疗物包括可溶性 TNF- α 受体 (Enbrel) 和抗 -TNF- α 抗体 (英夫利昔单抗)。虽然它们在阻断疾病发展中是新颖且有效的,但它们是昂贵的治疗方案。

[0011] 已经进行大量工作来努力从天然来源——特别是从微生物、植物和海洋生物——开发生物活性剂。植物可作为新药物的替代性的和补充性的来源,原因是它们包含可能具有强生物效应的多种以前未知的 化学物。

[0012] 中药已经被中国人实践了 2-3 千年。中药涉及疾病的病理以及诊断、治疗和预防。中药材已经被记载于许多药典中。草药的经典参考文献之一是李时珍在 14 世纪晚期写的《本草纲目》。该书包含约 2,500 项草药和其他产物 (包括动物和矿物) 的条目。

[0013] 中药中使用的草药是可市购的。常用草药包括人参 (*Ginseng radix*)、当归 (*Angelica sinensis radix*)、黄芪 (*Astragali radix*)、甘草 (*glycyrrhiza uralensis Fisch.*, *Glycyrrhiza glabra L.* 或 *Glycyrrhiza inflata Bat*——优选 *Glycyrrhiza uralensis Fisch*——的根茎) 和黄芩 (*Scutellariae radix*)。通常,获得的是干燥形式的草药,有时已经磨成粉末。

[0014] 升麻根茎 (*Cimicifuga rhizome*) 在美国东部和加拿大有长久且多样的药用历史²⁶。在历史上,本土的美洲印第安人使用升麻根茎治疗多种病症,包括全身乏力、疟疾、风湿病、肾功能异常、咽喉痛,月经不调和更年期²⁶⁻²⁸。在亚洲国家——包括中国、日本和韩国,总状升麻 (*Cimicifuga racemosa*) 及其相似物大三叶升麻 (*Cimicifuga heracleifolia*)、升麻 (*Cimicifuga foetida*) 和兴安升麻 (*Cimicifuga dahurica*) 已被用做中草药来治疗发热、疼痛和炎症^{29,30}。

[0015] 以前的研究证明了总状升麻提取物对组胺、缓激肽和环氧合酶 -2 (COX-2) 介导的炎症作用的抑制效应³¹。通过其对活性氧簇的清除效应,所述提取物还对甲萘醌诱导的 DNA 损伤有保护效应³²。另外,大三叶升麻提取物已被证明具有抗呼吸道合胞病毒的抗病毒活性³⁰。在最近的研究中,升麻提取物被证明可诱导肝癌细胞的凋亡和细胞周期停滞,这些是抑制肿瘤进展的关键性效应³³。还有,总状升麻对更年期调节反应的作用已被很好地研究³⁶。这些数据表明,总状升麻的成分可能发挥类似于雌激素的功能。其他研究表明,总状升麻扰乱细胞因子信号传递,目的是介导其他生物功能³⁷。

[0016] 如今,在用于类风湿性关节炎、银屑病、银屑病关节炎和强直性脊柱炎的治疗中,单克隆 TNF- α 抗体在控制疾病进展中发挥重要作用。类似地,在克罗恩病患者中已经进行了多项随机的、双盲的、安慰剂对照的临床试验。这些临床试验的结果表明,TNF- α 抗体 (英夫利昔单抗) 对所述患者具有有利效应⁴¹。

[0017] 另外,最近的研究表明,炎症反应——包括 TNF- α 产生——在心血管病 (CVD) 发病机理中发挥重要作用。已经提出,TNF- α 可使动脉粥样硬化生成和导致其破裂的动脉

粥样硬化斑块不稳定,导致 CVD 患者心肌梗塞或中风。

[0018] 在微生物感染中,巨噬细胞被活化以产生介导免疫应答的细胞因子。根据侵入微生物及其生物学性质,宿主免疫系统利用不同组的细胞因子来局部地和全身地对抗侵入病原体。

[0019] 一个好的实例是分枝杆菌感染,其中促炎细胞因子 TNF- α 通过传播炎症在宿主存活中发挥关键作用,以通过形成肉芽肿而包含所述微生物⁴²。TNF- α 在控制分枝杆菌生长中的保护性作用是通过接受抗-TNF- α 抗体疗法的患者中结核病复发来举例说明的⁴³。

[0020] 虽然促炎细胞因子的效应是保护性的,但它们的过量产生对所述宿主可能有不利效应。事实上,促炎细胞因子不受控制的诱导可以导致并发症,例如低血压、器官衰竭,甚至死亡^{44,45}。事实上, TNF- α 在内毒素血症患者中的过量产生可导致严重的有害症状。在慢性疾病例如类风湿性关节炎中,已知 TNF- α 过量表达是破坏因素,并且与进行性关节破坏有关⁴⁶。

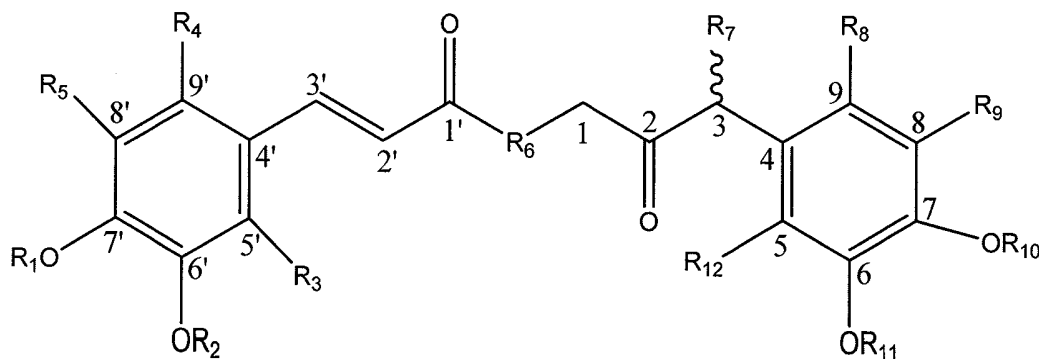
发明内容

[0021] 本发明提供了化合物以及包含这些化合物的组合物,所述化合物和组合物具有免疫调节活性和/或抗炎症活性。在一些实施方案中,由于这些化合物对 TNF- α 的效应,它们具有并非与炎症特异性相关的免疫调节活性。

[0022] 本发明的一个实施方案涉及一种从草药分离的化合物。有利地,该化合物具有强抗炎效应和免疫调节效应。

[0023] 因此,本发明涉及具有以下结构的基本上纯的抗炎症化合物:

[0024]



[0025] 其中,

[0026] R_1 是烷基;

[0027] R_2 是 H 或烷基;

[0028] R_3, R_4 和 R_5 独立地是 -H、酰基、卤素、卤代烷基、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH;

[0029] R_6 是 -O 或 -NH;

[0030] R_7 是 -H、烷基、烷氧基、羟基烷基、羟基或卤素;

[0031] R_8, R_9 和 R_{12} 独立地是 -H、酰基、卤素、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH;

[0032] R_{10} 是 H 或烷基;并且

[0033] R_{11} 是 H 或烷基；

[0034] 有利地, 在一个实施方案中, 本发明的化合物可以抑制 LPS 诱导的 TNF- α 产生 (AL-to-David, 请考虑用 IP 语言加上这一点: 由于其对内毒素 (LPS) 效应的强抑制, 本发明的化合物可以应用于内毒素血症之外, 包括出现在自身免疫病中的炎症病症和其他相关病症。

[0035] 本发明还涉及包含可药用载体和本发明的抗炎化合物的药物组合物。在一个优选的实施方案中, 所述组合物包含抗炎化合物作为活性成分。

[0036] 本发明还涉及使用所述化合物或包含所述化合物的组合物用于抑制动物 (优选哺乳动物, 包括人) 的炎症的方法。本发明还涉及使用所述化合物或包含所述化合物的组合物用于调节动物 (优选哺乳动物, 包括人) 的免疫活性的方法。

[0037] 附图说明 μ

[0038] 图 1 示出从总状升麻提取 B22EES1-8-3 的方案。将总状升麻 (1.8kg) 磨碎并通过连续超声处理以 500mL milli-Q 水提取 1 小时。然后, 将所收集的上清液以乙酸乙酯 (EtOAc) (1 : 1) 分配。所生成的经干燥的 EtOAc 提取物复原, 然后以己烷 ($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$)、EtOAc 和丁醇 ($n\text{-BuOH}$) 连续分配。使用生物测定法指导的分级分离方案, 将对 LPS 诱导的 TNF- α 产生显示抑制效应的级分进行硅胶 60A (35-75 μm) 色谱和使用梯度洗脱的反相高效液相色谱, 直到得到具有抗炎活性的单一化合物。

[0039] 图 2A-2B 示出 B22EES1-8-3 的 HPLC 色谱图和 UV 吸光度。通过反相 HPLC 纯化所述化合物, 所述反相 HPLC 使用从 25% -90% 的乙腈以 1mL min^{-1} 的流速进行梯度洗脱。(A) 使用光二极管阵列检测器在 254、210 和 280nm 下检测到单峰值。B22EES1-8-3 在大约 9.4min 洗脱。(B) B22EES1-8-3 的 UV 吸光度在 290 和 325nm 下最大化, 这表明它具有共轭的芳香体系。

[0040] 图 3 示出 B22EES1-8-3 的 ^1H (上图) 和 ^{13}C NMR (下图) 谱。使用氘代甲醇 (methanol- d) 作为溶剂在 500MHz 下 (对于 ^1H) 和在 125.765MHz 下 (对于 ^{13}C NMR) 操作, 通过 Bruker 500MHz DRX NMR 谱仪阐明 B22EES1-8-3 的结构。

[0041] 图 4A-4B 示出总状升麻的生物测定法指导的分级分离。以 100 $\mu\text{g/mL}$ 的不同总状升麻级分处理原代血巨噬细胞 (PBMac) 并持续 24 小时, 然后加入 20ng/mL LPS 并维持 3 小时。然后, 进行 TNF- α 和 GAPDH 的 RT-PCR (A) 和定量 RT-PCR (B) 测定。所示结果代表至少 3 个独立实验, 其细胞获自不同供体。* 与相应对照相比 $P < 0.05$ 。

[0042] 图 5A-5B 示出 B22EES1-8-3 和地塞米松对 LPS 诱导的 TNF- α 生产的抑制。以 (A) 140 μM B22EES1-8-3 或 (B) 1.3 或 5.1 μM 地塞米松 (Dex) 孵育 PBMac 持续 24 小时, 然后加入 1ng/mL 和 10ng/mL LPS 再维持 24 小时。收集所述培养上清液, 并且通过 ELISA 测定 TNF- α 。结果显示为 6 次独立实验的平均值 \pm 标准差 (S. D.), 其细胞获自不同供体。* 与相应对照相比 $P < 0.05$ 。

[0043] 图 6A-6C 示出 B22EES1-8-3 对 LPS 诱导的 ERK1/2 和 p38MAP 激酶的磷酸化 (磷酸基) 以及 NF- κB p65 的核易位的效应。以 B22EES1-8-3 (140 μM) 孵育 PBMac 持续 24 小时, 然后加入 10ng/mL LPS 另外维持 15 分钟。收获细胞质蛋白 (A、B) 和核蛋白 (C), 用于蛋白质印迹分析: (A) 细胞质蛋白: 磷酸-ERK1/2 和总 ERK1/2。(B) 细胞质蛋白: 磷酸-p38 和总 p38 激酶。(C) 核蛋白: 上图, NF- κB p65 和核纤层蛋白 B; 下图, NF- κB p65 的凝胶照片中

相应泳道的强度。所示结果代表至少 3 次独立实验,其细胞获自不同供体。*与相应对照相比 $P < 0.05$ 。

[0044] 图 7A-7B 示出 CF22EES1-8(A) 和 CH22EES1-8(B) 的 HPLC 色谱图。在总状升麻提取步骤后提取草药升麻和大三叶升麻。将它们的提取物 (CF22EES1-8 和 CH22EES1-8) 注入至使用与 B22EES1-8-3 相同的条件的 HPLC,并记录色谱图。所述色谱图显示存在化合物 (标有*),其保留时间在大约 9.4 分钟。

[0045] 图 8A-8C 示出 (A)B22EES1-8-3、(B)CF22EES1-8 和 (C)CH22EES1-8 的 UPLC 色谱图和 HRESI-MS 谱。在总状升麻提取步骤后提取草药升麻和大三叶升麻。将它们的级分 (CF22EES1-8 和 CH22EES1-8) 注入至使用与 B22EES1-8-3 相同条件的 HPLC 偶联的高分辨率 ESI-TOF-MS。所述色谱图显示存在化合物 (标有*),其保留时间在大约 6 分钟,离子峰在 $357m/z$ 。

[0046] 序列说明

[0047] SEQ ID NO :1 是可用于本发明的引物。

[0048] SEQ ID NO :2 是可用于本发明的引物。

[0049] SEQ ID NO :3 是可用于本发明的引物。

[0050] SEQ ID NO :4 是可用于本发明的引物。

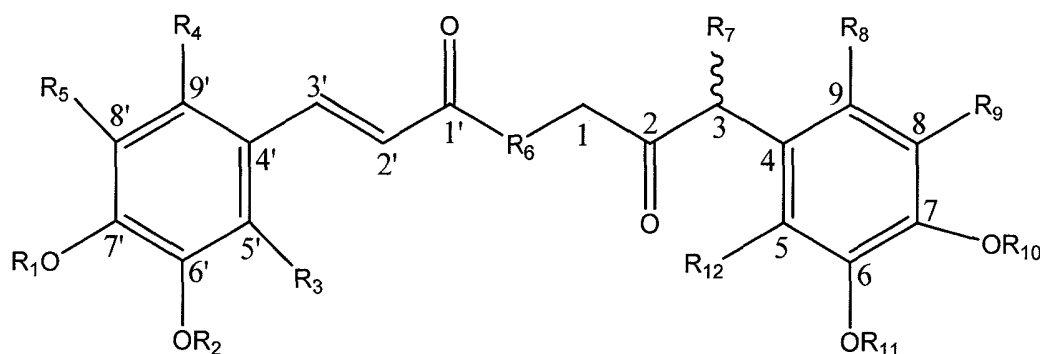
具体实施方式

[0051] 已经根据本发明确定了新型且有利的化合物。有利地是,这些分子具有有用的免疫调节性质和 / 或抗炎性质。本发明还提供了包含这些化合物的组合物,以及用于治疗受试者的炎性病症和免疫病症的方法。

[0052] 本发明的一个实施方案涉及一种从草药分离的化合物。有利地是,该化合物具有强抗炎效应和免疫调节效应。

[0053] 因此,本发明涉及一种具有下式的基本上纯的抗炎化合物。

[0054]



[0055] 其中

[0056] R₁ 是烷基;

[0057] R₂ 是 H 或烷基;

[0058] R₃、R₄ 和 R₅ 独立地是 -H、酰基、卤素、卤代烷基、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH;

[0059] R₆ 是 -O 或 -NH;

[0060] R₇ 是 -H、烷基、烷氧基、羟基烷基、羟基或卤素;

[0061] R_8 、 R_9 和 R_{12} 独立地是 -H、酰基、卤素、氨基、烷基氨基、羟基、烷基、羟基烷基或 -COOH；

[0062] R_{10} 是 H 或烷基；并且

[0063] R_{11} 是 H 或烷基；

[0064] “烷基”是指 1-8 个碳原子的直链饱和单价基团或 3-8 个碳原子的支链饱和单价基团。它可包括 1-4 个碳原子或 1-3 个碳原子的烃基，所述烃基可能是直链的。实例有甲基、乙基、丙基、2-丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、戊基等。

[0065] “酰基”是指基团 -C(O)R，其中 R 是氢、烷基或环烷基或杂环烷基。实例包括甲酰基、乙酰基、乙羰基等。

[0066] “卤素”是指氟、氯、溴或碘，例如溴和氯。

[0067] “卤代烷基”是指被一个或多个相同或不同卤原子取代的烷基，例如 -CH₂Cl、-CH₂Br、-CF₃、-CH₂CH₂Cl、-CH₂CCl₃ 等。

[0068] “氨基”意欲是指基团 -NH₂。

[0069] “烷氨基”是指基团 -NHR 或 -NR₂，其中每个 R 独立地是烷基基团。实例包括甲基氨基、(1-甲基乙基)氨基、甲基氨基、二甲基氨基、甲基乙基氨基、二(1-甲基乙基)氨基等。

[0070] “羟基”意欲是指基团 -OH。

[0071] “羟烷基”是指被一个或多个，优选一个、两个或三个羟基基团取代的如本文定义的烷基基团。代表性实例包括但不限于羟甲基、2-羟乙基、2-羟丙基、3-羟丙基、1-(羟甲基)-2-甲丙基、2-羟丁基、3-羟丁基、4-羟丁基、2,3-二羟丙基、2-羟基-1-羟甲基、2,3-二羟丁基、3,4-二羟丁基和 2-(羟甲基)-3-羟基-丙基，优选 2-羟乙基、2,3-二羟丙基和 1-(羟甲基)2-羟乙基。

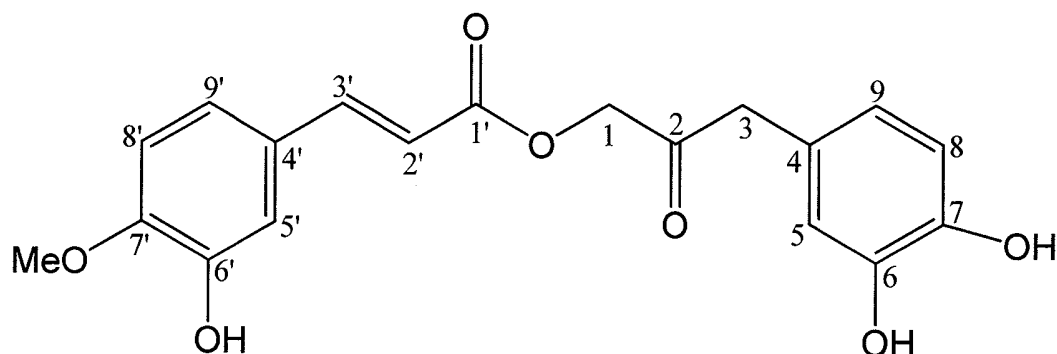
[0072] “烷氧基”意欲是指基团 -OR_a，其中 R_a 是烷基。示例性烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基等。

[0073] 本发明还涉及分离的对映异构化合物。本发明化合物的分离的对映异构形式基本上彼此分离（即对映异构体过量）。换句话说，所述化合物的“R”形式基本上无所述化合物的“S”形式，并且因此为“S”形式的对映异构体过量。相反，所述化合物的“S”形式基本上无所述化合物的“R”形式，并且因此为“R”形式的对映异构体过量。在本发明的一个实施方案中，所述分离的对映异构化合物是至少约 80% 的对映异构体过量。在一个优选的实施方案中，所述化合物是至少约 90% 的对映异构体过量。在一个更优选的实施方案中，所述化合物是至少约 95% 的对映异构体过量。在一个甚至更优选的实施方案中，所述化合物是至少约 97.5% 的对映异构体过量。在一个最优选的实施方案中，所述化合物是至少约 99% 的对映异构体过量。

[0074] 本文使用的术语“受试者”描述了生物体，包括哺乳动物，例如灵长类，可以对其提供用本发明的组合物进行的治疗。可受益于所公开的治疗方法的哺乳动物物种包括但不限于猿、黑猩猩、猩猩、人、猴；以及家养动物，例如狗、猫、马、牛、猪、绵羊、山羊、鸡、小鼠、大鼠、豚鼠和仓鼠。

[0075] 在一个具体实施方案中，本发明涉及本文中称为 B22EES1-8-3（缩写为 B8-3）的化合物，该化合物在 5 轮提取后被鉴定。B8-3 的结构为：

[0076]



[0077] 有利地,该化合物抑制 TNF- α 诱导。

[0078] 在鉴定 B8-3 后,将其生物活性与标准的免疫抑制药物地塞米松进行比较。以 B8-3 进行的孵育改善 LPS 正调节的 TNF- α 生产超过 50% (图 5A),这与地塞米松的效应相当 (图 5B)。

[0079] 地塞米松是一种用于治疗多种自身免疫疾病的有效药物。不幸地是,公知使用地塞米松对患者有副作用。因为 B8-3 是从包括升麻和大三叶升麻的草本分离的,这些草本在人使用中的毒性已经被很好地试验了数百年。

[0080] 而且,已经确定,MAP 激酶和 NF- κ B 的活化可被 B8-3 消除。这两种介导体在细胞因子生产中起到关键作用并因此调节多个免疫应答。B8-3 还可根据本发明用于调节 TNF- α 的下游效应物。

[0081] 使用独特的分离和生物测定法指导的方法,将 B8-3 从总状升麻和其中国对应物中分离。B8-3 对细胞因子调节的效应是经由其在调节信号传递激酶和转录因子活性中的活性而出现。B8-3 抑制促有丝分裂剂诱导的炎症反应,这使得该分子可用于治疗多种临床病症。由于 TNF- α 的过量生产是有毒的并且可导致严重的并发症,限制过度的炎症反应可有利于在进行临床治疗的患者。这是确定总状升麻和其中国对应物中的活性抗炎化合物的首次研究。本发明的化合物还可用于治疗与感染有关的炎症,所述感染包括但不限于由病毒、细菌、真菌、酵母和其他微生物引起的感染。另外,本发明的化合物可以用于治疗多种因素介导的炎症,所述因素包括但不限于干扰素、白细胞介素和环境毒素。

[0082] 本发明的化合物和药物组合物可用于治疗或改善任何疾病、病症或障碍中的炎症症状,所述疾病、病症或障碍中免疫和 / 或炎症抑制是有利的。其中本发明的化合物和组合物可用于抑制不需要的免疫应答和炎症的炎性疾病、病症或障碍包括但不限于关节炎 (包括但不限于类风湿性关节炎),以及关节或肌肉骨骼系统的其他疾病、病症或障碍,上述疾病、病症或障碍中免疫和 / 或炎症抑制是有利的。

[0083] 而且,所述化合物和组合物还可用于治疗或改善与以下疾病有关的炎症:动脉粥样硬化;动脉硬化;动脉粥样硬化性心脏病;再灌注损伤;心跳停止;心肌梗塞;血管炎性疾病,包括脑血管疾病(中风);呼吸窘迫综合征;以及这样的其他心肺疾病、病症或障碍,即其中免疫和 / 或炎症抑制将是有利的。

[0084] 另外,所述化合物和组合物还可用于治疗或改善与以下疾病有关的炎症:消化性溃疡;溃疡性结肠炎、克罗恩病、肠应激综合征、其他炎性肠病以及这样的其他胃肠道疾病、病症或障碍,即其中免疫和 / 或炎症抑制将是有利的;肝纤维化;肝硬化和这样的其他肝脏疾病、病症或障碍,即其中免疫和 / 或炎症抑制将是有利的;甲状腺炎和这样的其他腺疾

病、病症或障碍,即其中免疫和 / 或炎症抑制将是有利的;以及肾小球肾炎和这样的其他肾和泌尿系统疾病、病症或障碍,即其中免疫和 / 或炎症抑制将是有利的。

[0085] 另外,所述化合物和组合物还可用于治疗或改善与以下疾病有关的炎症:创伤后炎症;败血症性休克;传染性疾病,其中免疫和 / 或炎症抑制将是有利的;炎症并发症和手术副作用,其中免疫和 / 或炎症抑制将是有利的;骨髓移植和这样的其他移植并发症和副作用,即其中免疫和 / 或炎症抑制将是有利的;炎症并发症和 / 或免疫并发症以及基因治疗的副作用,例如由于病毒载体的感染;以及与获得性免疫缺陷综合征(AIDS)相关的炎症。

[0086] 而且,所述化合物和组合物还可用于抑制与炎症不相关的巨噬细胞或 T 细胞相关的免疫应答方面。所述化合物和组合物能够抑制巨噬细胞或 T 细胞活性,包括但不限于巨噬细胞抗原呈递活性、巨噬细胞细胞因子生产、T 细胞细胞因子生产、T 细胞粘附活性、T 细胞增殖等。因此,所述肽、肽衍生物和组合物可用于压抑或抑制体液免疫应答和 / 或细胞免疫应答。

[0087] 所述化合物和组合物还可通过减少单核细胞和淋巴细胞的数量来用于治疗或改善单核细胞和白细胞增殖疾病,例如白血病。

[0088] 本发明的化合物和药物组合物还可用于预防和 / 或治疗以下情况下的移植物排斥:移植天然或人工细胞、组织和器官例如角膜、骨髓、器官、晶状体、起搏器、天然和人工皮肤组织等。

[0089] 所述化合物和组合物还可用于治疗或改善与以下疾病有关的炎症:超敏感性、变态反应、哮喘、系统性红斑狼疮、胶原病或者这样的其他自身免疫疾病、病症或障碍,即其中免疫和 / 或炎症抑制是有利的。

[0090] 所述化合物和组合物还可用于治疗或改善与以下疾病相关的炎症:耳炎和其他耳鼻咽喉疾病、病症或障碍,其中免疫和 / 或炎症抑制是有利的;皮炎和其他皮肤疾病、病症或障碍,其中免疫和 / 或炎症抑制是有利的;牙周病和其他牙疾病、病症或障碍,其中免疫和 / 或炎症抑制是有利的。

[0091] 另外,所述化合物和组合物还可用于治疗或改善与以下疾病相关的炎症:后葡萄膜炎、中间葡萄膜炎、前葡萄膜炎、结膜炎、脉络膜视网膜炎、葡萄膜视网膜炎、视神经炎、眼内炎症例如视网膜炎和黄斑囊样水肿、交感性眼炎、巩膜炎、视网膜色素变性、退行性眼底病的免疫和炎症成分、眼外伤的炎症成分、感染造成的眼部炎症、增生性玻璃体视网膜病变、急性缺血性视神经病变、过度瘢痕形成例如青光眼滤过手术后、抗眼移植物的免疫和 / 或炎症反应以及这样的其他免疫和炎症相关的眼疾病、病症或障碍,即其中免疫和 / 或炎症抑制是有利的。

[0092] 而且,所述化合物和组合物还可用于治疗或改善与以下疾病相关的炎症:自身免疫疾病、病症或障碍,其中在中枢神经系统(CNS)以及在任何其他器官中免疫和 / 或炎症抑制都是有利的;帕金森病;帕金森病治疗导致的并发症和 / 或副作用;AIDS 相关的痴呆复合病(HIV 相关脑病);德维克病;西德纳姆舞蹈病;阿耳茨海默病和这样的其他中枢神经系统的退行性疾病、病症或障碍,即其中免疫和 / 或炎症抑制是有利的;中风的炎症成分;小儿麻痹症后期综合征;精神病症的免疫和炎症成分;脊髓炎;脑炎;亚急性硬化性全脑炎;脑脊髓炎;急性神经病变;亚急性神经病变;慢性神经病变;格林-巴利

(Guillain-Barre) 综合征 ; 西德纳姆舞蹈病 ; 重症肌无力 ; 脑假瘤 ; 唐氏综合征 ; 亨廷顿氏病 ; 肌萎缩侧索硬化 ; 中枢神经系统 (CNS) 压抑、CNS 创伤、脑血管意外 (中风) 或者 CNS 感染或缺氧缺血的炎症成分 ; 肌萎缩和营养不良的炎症成分 ; 以及这样的中枢和外周神经系统的免疫和炎症相关的疾病、病症或障碍, 即其中免疫和 / 或炎症抑制是有利的。

[0093] 还在另一个实施方案中, 本发明的化合物和组合物可用于在已失去其免疫赦免的免疫赦免部位 (例如脑、眼和睾丸) 处恢复免疫赦免。

[0094] 在一个实施方案中, 本发明提供了分离的化合物。本文使用的“分离的”是指已经被从其天然存在的任何环境移出的化合物。例如, 分离的 B8-3 不是指存在于总状升麻中的 B8-3 化合物。在优选的实施方案中, 本发明的化合物纯度为至少 75%, 优选纯度至少 90%, 更优选纯度超过 95%, 最优选纯度超过 99% (基本上纯的)。

[0095] 本发明还提供了包含以能够与可药用载体结合的形式本发明的化合物的治疗组合物或药物组合物。在本文中, 所述化合物可以是例如分离的或者基本上纯的。术语“载体”是指与所述化合物一块给药的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这类药物载体可以是无菌液体, 例如水和油, 包括石油例如矿物油 ; 植物油例如花生油、大豆油和芝麻油 ; 动物油 ; 或者合成来源的油。盐水溶液、葡萄糖 (dextrose) 水溶液和甘油溶液也可应用为液体载体, 特别是用于可注射溶液。用于治疗或改善中枢神经系统中炎症的特别优选的药物载体是可以穿透血 / 脑屏障的载体。本文使用的载体不包括天然植物材料, 因为其天然存在。

[0096] 合适的药物赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、二醇、水、乙醇等。根据需要, 所述治疗组合物还可包含少量的润湿剂、乳化剂或 pH 缓冲剂。这些组合物可以取以下形式 : 溶液、悬液、乳剂、片剂、胶囊、粉剂、持续释放的制剂等。所述组合物可以用传统粘合剂和载体 (例如甘油三酯) 配制。合适药物载体的实例记载在 E. W. Martin 的 “Remington’ s Pharmaceutical Sciences” 中。这类组合物包含治疗有效量的治疗组合物和合适量的载体, 以提供用于适合给予患者的形式。所述制剂应适合所述给药模式。

[0097] 在一个实施方案中, 所述组合物是根据常规步骤配制, 作为适合用于对人局部注射给药的药物组合物。一般而言, 用于局部注射给药的组合物为溶于无菌等渗水性缓冲物中的溶液。如果需要, 所述组合物还包括增溶剂和局部麻醉剂例如利多卡因, 以减轻注射部位的疼痛。通常, 所述成分分开地提供, 或者以单位剂型形式混合在一起, 例如, 为在标明活性剂的量的密封容器 (例如安瓿或囊) 中的冻干粉末或无水浓缩物。如果通过注射给予所述组合物, 可以提供用于注射的无菌水或者盐水的安瓿, 使得可在给药之前混合所述成分。

[0098] 本发明的治疗组合物或药物组合物可配制为中性形式或者盐形式。可药用盐包括与游离氨基基团形成的盐, 例如源自盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐 ; 以及与游离羧基基团形成的盐, 例如源自钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2- 乙氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

[0099] 本发明还提供了对所述化合物的修饰, 使得它一旦被给予受试者将更加稳定, 即一旦被给药, 它与未修饰的化合物相比有更长有效时间。这类修饰是本领域技术人员公知的, 例如聚乙二醇衍生化 (PEG 化 (PEGylation))、微胶囊化等。

[0100] 在治疗具体疾病、病症或障碍中有效的本发明治疗组合物或药物组合物的量取决于所述疾病、病症或障碍的性质, 并且可以通过标准的临床技术测定。一般而言, 所述剂量

范围为从约 0.001mg/kg 至约 2mg/kg 变化。另外,体外测定法可任选地应用于帮助鉴定最佳剂量区间。应用于所述制剂中的精确剂量还将依赖于给药途径以及疾病、病症或障碍的严重度,并且应根据医生的判断和每个患者的情况确定。有效剂量可外推自源自体外或动物模型试验系统的剂量反应曲线。例如,为了基于从大鼠研究产生的数据获得对于人的有效 mg/kg 剂量,将大鼠中的有效 mg/kg 剂量除以 6。

[0101] 本发明还提供了一种包含一个或多个容器的药包或试剂盒,所述容器装有本发明药物组合物的一种或多种成分例如化合物、载体。

[0102] 本发明的化合物还可以根据中药实践配制。通过标准的临床技术,在治疗具体疾病、病症或障碍中有效的制剂的组成和剂量将取决于所述疾病、病症或障碍的性质。

[0103] 处方量的中药可容易地制成适合对人和动物给药的任何药物形式。合适的形式包括,例如酏剂、煎剂和干浸膏粉。这些药物可以口服、经静脉注射或粘膜施用。所述活性成分还可以配制成胶囊剂、粉剂、片剂 (pallet)、锭剂、栓剂、口服液剂、巴氏杀菌的胃肠悬浮注射剂、少量或大量注射剂、冷冻的粉末注射剂、巴氏杀菌的粉末注射剂等。所有上述方法都是本领域技术人员已知的,记载于书籍中并通常被草药医生使用。

[0104] 酏剂是通过将草药悬浮在醇溶液例如葡萄酒或饮料酒中而制备。在悬浮一段时间后,可将所述液体(所述醇溶液)给药,例如每天 2-3 次,每次一茶勺。

[0105] 煎剂是通常形式的草药制品。它传统上在粘土罐中制备,但也可以在玻璃容器、釉质容器或不锈钢容器中制备。可以将所述制剂在水中浸泡一段时间,然后使之沸腾并慢沸至水量减少至例如一半。

[0106] 提取物是草药的基本组分的浓缩制品。一般而言,通过将所述草药悬浮在适当选择的溶剂中而从所述草药提取基本组分,所述溶剂一般是水、乙醇/水的混合物、甲醇、丁醇、异丁醇、丙酮、己烷、石油醚或其他有机溶剂。可以借助浸软、渗滤、再渗滤、逆流萃取、涡轮萃取(turboextraction)或者通过二氧化碳超临界(温度/压力)萃取而进一步促进所述提取过程。在过滤除去草药碎片后,可借助喷雾干燥、真空烘箱干燥、流体床干燥或冷冻干燥,将所述提取溶液进一步蒸发并因此浓缩,得到软提取物(浓稠浸膏)和/或最终得到经干燥的提取物——干燥浸膏。所述软提取物或干提取物还可进一步溶解在合适的液体中至用于给药的所需浓度,或者被加工成例如丸剂、胶囊剂、注射剂等形式。

[0107] 材料和方法

[0108] 植物材料

[0109] 总状升麻购自 Glenbrook Farms Herbs and Such, Campbellsville, Kentucky。大三叶升麻、升麻和兴安升麻购自草药市场,随后由 Purapharm 就其种类进行验证。

[0110] 生物活性分子的提取和分离

[0111] 用于植物提取的步骤在图 1 中显示。简而言之,将总状升麻(1.8kg)碾碎,匀浆,然后悬浮在 milli-Q 水中(1:5)1 小时,同时进行连续超声处理。将上清液通过分析滤纸过滤,然后以乙酸乙酯(EtOAc)(1:1)分配 3 次。将所得到的 EtOAc 提取物在真空中浓缩至干(35°C),得到 14.97g 暗褐色残留物。将所述残留物再配制于甲醇(MeOH)中,然后通过以己烷($n\text{-C}_6\text{H}_{14}$)分配进行分级分离。将所述 MeOH 级分浓缩并再配制于 H_2O 中,然后以 EtOAc 和丁醇($n\text{-BuOH}$)连续分配。得到 4 个级分,称为 $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ 、EtOAc、 $n\text{-BuOH}$ 和 H_2O 。

[0112] 将对 LPS 诱导的 TNF- α 生产表现出抑制效应的级分使用 $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ 、EtOAc 和 MeOH

进行另外的硅胶 60A (35–75 μm) 色谱, 以得到 6 个级分。通过反相高效液相色谱 (HPLC) (Lichrospher 100RP C18EC 5 μm , 250 \times 4.6mm ID), 使用流速为 1mL min^{-1} 的 25% 乙腈 (CH_3CN) 至 90% CH_3CN 梯度洗脱而进一步纯化所述活性级分。

[0113] 在 254、210 和 280nm 下, 使用 Agilent 1200 系列的快速扫描光二极管矩阵检测器组实现峰值检测。在 200nm 和 300nm 之间以 1nm 的间隔扫描洗脱峰值, 以测定最大和最小吸光度。

[0114] 通过重复使用 HPLC 的纯化过程, 在大约 9.4 分钟时洗脱了单一化合物, 在 290 和 325nm 下具有最大 UV 吸光度, 这表明它具有共轭芳香体系。该化合物 (B22EES1–8–3) 显示出抗炎活性。

[0115] 阐明分子结构

[0116] 所生成的纯化合物 (B22EES1–8–3) 的结构可通过如下方式阐明: 使用 Bruker 500MHz DRX NMR 核磁共振仪, 对于 ^1H 在 500MHz 下且对于 ^{13}C NMR 在 125.765MHz 下操作, 使用氘代甲醇作为溶剂。无畸变极化转移增强 (DEPT) 实验是使用 135° 的转移脉冲进行, 以得到对于 CH 和 CH_3 的阳性信号以及对于 CH_2 的阴性信号。在 micrOTOF II 411ESI–TOF 质谱仪 (Bruker Daltonics) 上进行 HR–ESI–MS。以阴性电喷雾 (ESI) 模式, 在 100 至 1600m/z 的扫描区间下, 以 2Hz 的采样速率获得数据集。ESI 参数如下: 毛细管, 3.2kV; 雾化器压力, 4bar; 干 415 气体流速, 8L/min; 干气体温度, 200°C 。

[0117] 所述化合物的 ^{13}C NMR 谱显示在以下的信号: δ 68.6 (t, C-1), 204.6 (s, C-2), 46.4 (t, C-3), 126.1 (s, C-4), 117.7 (d, C-5), 146.7 (s, C-6), 145.8 (s, C-7), 116.7 (d, C-8), 122.1 (d, C-9), 168.3 (s, C-1'), 115.3 (d, C-2'), 147.6 (d, C-3'), 128.9 (s, C-4'), 114.9 (d, C-5'), 148.2 (s, C-6'), 151.8 (s, C-7'), 112.6 (d, C-8'), 123.1 (d, C-9') 和 56.5 (q, MeO-7')。另外, 所述化合物在其 HR–ESI–MS 中显示 m/z 357.0952 的 $[\text{M}]^-$ 离子峰, 与分子式 $\text{C}_{19}\text{H}_{17}\text{O}_7$ (计算值 357.0974) 一致。

[0118] 使用 HPLC–UV 和 UPLC–TOF–MS 测定升麻和大三叶升麻中 B22EES1–8–3 的存在情况

[0119] 依照上文描述的总状升麻提取步骤提取草药升麻和大三叶升麻。依照用于分离 B22EES1–8–3 的色谱条件, 将草药升麻和大三叶升麻的提取物 (CF22EES1–8 和 CH22EES1–8) 注入带有 PDA 检测器的 HPLC。记录各个样品的色谱图。还将 CF22EES1–8 和 CH22EES1–8 分别注入装配 Xterra MSC18 柱 (150 \times 2.1mmID, 3.5522 μm) 的 Acquity UPLC 系统 (Waters, USA)。使用 25% 乙腈 (CH_3CN) 至 90% CH_3CN 梯度洗脱, 以 200 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速进行色谱分离。使用 micrOTOF II ESI–TOF 质谱仪 (Bruker Daltonics) 检测洗脱的化合物。以阴性电喷雾 (ESI) 模式, 在 100 至 1600m/z 的扫描区间下, 以 2Hz 的采样速率获得数据集。ESI 参数如下: 毛细管, 3.2kV; 雾化器压力, 4bar; 干气体流速, 8L/min; 干气体温度, 200°C 。

[0120] 通过与 B22EES1–8–3 的标准物比较它们的峰值, 测定 B22EES1–8–3 在升麻和大三叶升麻的提取物中的存在情况。

[0121] 化学试剂

[0122] 来自大肠杆菌 (*E. coli*) 的内毒素 (lipopolysaccharide, LPS) 购自 Sigma, 并且被用作 TNF- α 表达的诱导物。地塞米松 (Sigma) 被用作对照药物来抑制 TNF- α 的 LPS 诱导。

[0123] 细胞培养和原代血巨噬细胞分离

[0124] 通过如发明人以前报道中所述的 Ficol1-Paque (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 密度梯度离心^{14,15,34}, 自 Hong Kong Red Cross 提供的健康供体血液的血沉棕黄层 (buffy coat) 中分离人外周血单核细胞 (PBMC)。简而言之, 以每分钟 3000 转 (rpm) 离心所述血沉棕黄层 15 分钟, 以分离所述血细胞和所述血浆。将所述热灭活血清过滤备用。

[0125] 用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 以 1 : 1 的比例稀释所述细胞层。将所述稀释的细胞缓慢覆盖于 Ficol1-Paque 上并以 2300rpm 离心 20 分钟, 用于从红细胞中分离单核细胞。将所述单核细胞层除出并以 RPMI 1640 培养基洗涤, 直至上清液清澈。

[0126] 最后, 将所述细胞再悬浮于添加 5% 自体血清的 RPMI 1640 培养基中, 并培养 1 小时。然后除去非粘附性细胞, 并将剩下的粘附性细胞在 37°C 和 5% 二氧化碳 (CO₂) 下进一步再孵育 24 小时。

[0127] 使所述粘附性单核细胞脱离并将其接种于组织培养板上, 再孵育 7-14 天, 目的是使所述原代血单核细胞分化成原代血巨噬细胞 (PBMac)。

[0128] 分离 RNA 和反转录

[0129] 通过 TRIzol (Invitrogen) 从进行或未进行总状升麻级分处理的原代血巨噬细胞提取总 RNA。通过使用 SuperScriptII 系统 (Invitrogen) 依照制造商的说明书将信使 RNA (mRNA) 反转录 (RT) 成互补 DNA (cDNA)。

[0130] 多聚酶链反应 (PCR) 和实时 RT-PCR

[0131] 靶基因的半定量 PCR 测定是在 25 μ l 反应混合物中进行, 所述反应混合物包含 1.5mM MgCl₂、0.2mM 的每种脱氧核苷三磷酸、0.25 μ M 的每种引物、2 单位的 Taq 聚合酶 (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ) 和 1 μ l 的 cDNA。用于 TNF- α 和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 的 PCR 引物组如下所示。TNF- α (上游: 5' -GGCTCCAGGCGGTGCTTGTC-3' (SEQ ID NO:1); 下游: 5' -AGACGGCGATGCGGCTGATG-3' (SEQ ID NO:2)) 和 GAPDH (上游: 5' -ACCACAGTCCATGCCATCAC-3' (SEQ ID NO:3); 下游: 5' -TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3' (SEQ ID NO:4))。用于 PCR 的热循环条件是 94°C 维持 30 秒, 60°C 维持 30 秒和 72°C 维持 1 分钟。该循环反应重复 24 个以上循环。

[0132] 通过使用 Applied Biosystems **TaqMan**[®] Universal Master Mix 依照制造商的说明书进行定量 RT-PCR。TNF- α TaqMan 探针购自 Applied Biosystems, 18s RNA 被用作内部参照。在每个定量 RT-PCR 测定中, 对样品进行 3 次重复试验。

[0133] 酶联免疫吸附测定 (ELISA)

[0134] 将经或未经 B22EES1-8-3 预处理的且经 LPS 处理的 PBMac 的培养上清液以不同的时间间隔收集, 并在 -70°C 下保存。通过特异性针对该细胞因子的 ELISA 试剂盒 (R&D system, Minneapolis, MN) 测量所述分泌的 TNF- α 水平。

[0135] 制备细胞提取物

[0136] 为了收集全细胞裂解物, 将 PBMac 以冷 PBS 洗涤并在冷裂解缓冲液 (50mM 三(羟甲基)氨基甲烷-氯 (Tris-Cl) [pH7.4]; 150mM 氯化钠 (NaCl); 50mM 氟化钠 (NaF); 10mM β -甘油磷酸盐; 0.1mM 乙二胺四乙酸 (EDTA); 10% 甘油; 1% Triton X-100; 1mM 苯甲基磺酰氟 (PMSF); 1mM 原钒酸钠; 2 μ g/mL 胃蛋白酶抑制剂 A; 2 μ g/mL 抑酶肽和 2 μ g/mL 亮抑酶

肽) 中孵育 20 分钟。然后, 在 4°C 下将所述裂解物离心 20 分钟。收集上清液并将其保存在下至 -70°C 直至使用。

[0137] 为了收集核蛋白提取物, 将所述处理的细胞以 PBS 洗涤, 并再悬浮于缓冲液 A (10mM 4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸 (HEPES) [pH7.9]、10mM 氯化钾 (KCl)、0.1mM EDTA、0.1mM 乙二醇四乙酸 (EGTA)、1mM 二硫苏糖醇 (DTT)、0.5mM 苯甲基磺酰氟 (phenylmethanesulphonyl fluoride 或 phenylmethylsulphonyl fluoride) (PMSF)、2 μg 抑酶肽、1mM 原钒酸钠、2 μg/mL 胃蛋白酶抑制剂 A、2 μg/mL 亮抑酶肽和 50mM NaF) 中维持 15 分钟。在这之后, 加入终浓度 0.625% 的 NP-40 并剧烈混合, 使细胞裂解。

[0138] 将所述细胞裂解物离心, 并收集含细胞质蛋白的上清液, 在 -70°C 下保存。将所述核沉淀物再悬浮于缓冲液 C (20mM HEPES [pH 7.9]、0.4M NaCl、1mM EDTA、1mM EGTA、1mM DTT 和 1mM PMSF) 中在冰上维持 15 分钟以完全裂解核膜。然后, 将所述核裂解物离心, 收集含核蛋白的上清液, 并在 -70°C 下保存^{34,35}。

[0139] 蛋白质印迹分析

[0140] 将全细胞裂解物 (20 μg) 或核蛋白 (2 μg) 通过十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 分离, 并转移至硝酸纤维素膜, 用于以分别特异性针对磷酸化形式或完整形式的 ERK1/2 和 p38MAPK (Cell Signaling Technology, Beverly, MA)、NF-κ B p65 蛋白和核纤层蛋白 B (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 的抗体探测过夜。将所述膜以缀合有辣根过氧化物酶 (BD Transduction Lab, San Diego, CA) 的相应第二抗体孵育。通过使用增强化学发光试剂盒 (Amersham Pharmacia Biotech) 显影所述信号。为了量化来自所述蛋白质印迹的结果, 扫描所述凝胶, 并通过 BioRad 的计算机程序 Quantity One 分析带强度。

[0141] 本发明的范围不限于具体实施例和其中有关的建议步骤和用途, 原因是可以在本发明对本领域技术人员提供的信息范围内进行修改。

[0142] 对本发明更完整的理解可以通过参考本发明的化合物、组合物和方法的以下具体实施例来获得。如下实施例举例说明了实施本发明的步骤。这些实施例不应被解释为限制性的。对本发明技术人员来说很清楚的是, 所述实施例涉及使用可市购自己知来源 (例如化学品供应库房 (chemical supply house)) 的物质和试剂, 因此未提供关于它们的详细信息。

[0143] 实施例 1- 提取并鉴定 B22EES1-8-3

[0144] 通过以下方式得到浅褐色粉末: 重复分配从总状升麻根茎制备的 EtOAc 级分, 并且在硅胶和反相 HPLC 上依序进行色谱。详细步骤总结在图 1 中。

[0145] 使用 HPLC, 在大约 9.4 分钟洗脱所述化合物, 为在波长 254、210 和 280nm 下具有 UV 吸光度的单一化合物 (图 2A)。在图 2B 中, 所述化合物的 UV 吸光度在 290 和 325nm 下最大, 这表明它具有共轭的芳香体系。所述化合物在其 HR-ESI-MS 中显示在 m/z 357.0952 下的 [M]⁻ 离子峰。与 ¹H 和 ¹³C 谱数据 (图 3) 结合, 它被阐明为 B22EES1-8-3。

[0146] 实施例 2- 生物测定

[0147] 总状升麻中负责抑制 LPS 诱导的 TNF-α 表达的化学化合物被鉴定。LPS 公知是 TNF-α 的强诱导物, 并且不使用细胞毒性剂不能容易地抑制其效应。

[0148] 将在原代巨噬细胞中对 TNF-α 诱导的细菌内毒素 (脂多糖, LPS) 刺激用作炎性

疾病的模型,原因是 TNF- α 产生是关键免疫应答的指示物。

[0149] 将从总状升麻分离的个体提取物与 PBMac 孵育 24 小时,然后加入 LPS 再维持 3 小时。将所述经处理的样品的总 RNA 分离并使用特异性人 TNF- α 引物进行 RT-PCR 测定。这些结果表明级分 B22EES1 抑制 LPS 诱导的 TNF- α mRNA 表达(图 4A,第 2 和 4 道)。在 B22EES1 的亚级分中,仅 B22EES1-4 和 B22EES1-8 保持对 TNF- α 诱导的抑制活性(图 4A,第 12 和 20 道)。

[0150] 实施例 3-B22EES1-8-3 对 LPS 诱导的细胞因子生产的效应

[0151] 在将 B22EES1-8 鉴定为负责对 TNF- α 的抑制效应后,将上文描述的 B22EES1-8 亚级分的活性分离并分析。单一分子,即 B22EES1-8-3(缩写为 B8-3)被发现是所述草药提取物中负责抗炎症效应的活性化合物。

[0152] 为了确认 B8-3 在抑制 TNF- α 生产中的活性,将 B8-3 与 PBMac 孵育 24 小时,然后加入浓度为 1ng/mL 和 10ng/mL 的 LPS 并维持 24 小时。收集培养上清液并通过 ELISA 测量所分泌的 TNF- α 的水平。

[0153] 在 LPS 浓度为 1ng/mL 和 10ng/mL 时,B8-3 分别抑制了 LPS 诱导的 TNF- α 蛋白生产达 $47 \pm 19\%$ 和 $58 \pm 30\%$ (图 5A,第 4 道对比第 5 道,第 6 道对比第 7 道)。

[0154] 为了进一步比较 B8-3 与现有药物的效率,将地塞米松(强免疫抑制性皮质类固醇)被用作原型。将 PBMac 以地塞米松处理 24 小时,然后加入浓度为 1ng/mL 和 10ng/mL 的 LPS 并维持 24 小时。

[0155] 结果证明,在浓度为 1.3 和 5.1 μ M 时,地塞米松分别导致 LPS 诱导的 TNF- α 生产的显著抑制达 $32 \pm 7.5\%$ 和 $25 \pm 6.3\%$ (图 5B)。

[0156] 实施例 4-B8-3 导致的细胞因子下调的分子机制

[0157] 阐明了 B8-3 抑制 LPS 诱导的 TNF- α 生产所涉及的分子通路。已经明确记载了,在 LPS 处理的细胞中细胞因子生产的活化是通过 LPS 与其受体的结合而初始³⁸。在结合所述受体后,信号传递激酶的级联被活化。在所活化的激酶中,MAP 激酶在 LPS 诱导的细胞因子生产中起到关键作用。以前的研究表明,LPS 和其他病原体对 TNF- α 的诱导需要 ERK1/2 和 p38MAPK 的磷酸化和活化^{13,14,39}。

[0158] 为了研究 MAP 激酶在 TNF- α 生产的 B8-3 抑制中的功能,将 PBMac 以 B8-3 处理 24 小时,然后加入 LPS 维持 15 分钟。随后收集蛋白质样品并进行蛋白质印迹。

[0159] 结果表明,LPS 处理导致对两种不同 MAP 激酶(即 ERK1/2 和 p38

[0160] MAPK) 的磷酸化(图 6,第 2 道)。以 B8-3 预处理时,ERK1/2 的磷酸化(图 6A,第 2 道对比第 4 道),而不是 LPS 诱导的 p38MAPK 的磷酸化(图 6B,第 2 道对比第 4 道)受到抑制。

[0161] 这些结果证明,B8-3 的抗炎症活性可能部分地是由于其抑制 ERK1/2 磷酸化。

[0162] 沿着响应于 LPS 处理的由 MAP 激酶调节的信号传递通路,转录因子 NF- κ B 的活化在诱导促炎细胞因子(包括 TNF- α)中起到关键作用⁴⁰。NF- κ B 的活化涉及对其特异性抑制物 I κ B 的降解以及 NF- κ B 亚基从细胞质易位至细胞核。根据本发明,加入 B8-3 并维持 24 小时,然后加入 LPS,减少了 NF- κ B p65 亚基至细胞核中的易位。

[0163] 结果表明,将 B8-3 加入 PBMac 并维持 24 小时,然后加入 LPS,减少了核级分中 p65NF- κ B 的量(图 6C,第 2 道对比第 4 道),表明 p65NF- κ B 至细胞核中的易位被 B8-3 抑

制。一般而言, B8-3 可抑制 LPS 诱导的激酶活性以及它们随后对用于 TNF- α 转录的核转录因子的活化。因此, 本发明的化合物可用于调节在与炎症病症相关的细胞事件级联中 NF- κ B 和 / 或 ERK1/2 下游的细胞内和 / 或细胞外活性。

[0164] 实施例 5- 使用 HPLC-UV 测定 B22EES1-8-3 在升麻和大三叶升麻中的存在情况

[0165] 在相同的 HPLC 条件下, 将 B8-3 的保留时间和 UV 吸光度与 CF22EES1 和 CH22EES1-8 的色谱图中的特征峰进行比较。在图 7A 和 B 中, 两个样品都具有保留时间为约 9.4min 的峰, 并且它们各自的 UV 吸光度与 B8-3 的 UV 吸光度相同 (图 2A&B)。这些结果表明, 包括升麻和大三叶升麻的草药含有 B8-3。

[0166] 实施例 6- 使用 UPLC-TOF-MS 测定 B22EES1-8-3 在升麻和大三叶升麻中的存在情况

[0167] 在相同的 UPLC 和 ESI-MS 条件下, 将 B8-3 的保留时间和荷质比与 CF22EES1-8 和 CH22EES1-8 的色谱图和谱中的特征峰进行比较。在图 8B 和 C 中, 两个样品都具有保留时间为约 6min 的峰, 具有与化合物 1 相同的在 m/z 357 的离子峰 (图 8A)。这些结果表明, 包括升麻和大三叶升麻的草药含有 B8-3。

[0168] 参考文献

[0169] 1. Aggarwal BB, Shishodia S, Sandur SK, Pandey MK, Sethi G. Inflammation and cancer :how hot is the link ? Biochem Pharmacol. 2006 ;72 :1605-1621.

[0170] 2. Woodworth CD, McMullin E, Iglesias M, Plowman GD. Interleukin 1 alpha and tumor necrosis factor alpha stimulate autocrine amphiregulin expression and proliferation of human papillomavirus-immortalized and carcinoma-derived cervical epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995 ;92 :2840-2844.

[0171] 3. Montesano R, Soulie P, Eble JA, Carrozzino F. Tumour necrosis factor alpha confers an invasive, transformed phenotype on mammary epithelial cells. J Cell Sci. 2005 ;118 :3487-3500.

[0172] 4. Cheng SM, Xing B, Li JC, Cheung BK, Lau AS. Interferon-gamma regulation of TNFalpha-induced matrix metalloproteinase 3 expression and migration of human glioma T98G cells. Int J Cancer. 2007 ;121 :1190-1196.

[0173] 5. van der Poll T, Opal SM. Host-pathogen interactions in sepsis. Lancet Infect Dis. 2008 ;8 :32-43.

[0174] 6. Raetz CR. Biochemistry of endotoxins. Annu Rev Biochem. 1990 ;59 : 129-170.

[0175] 7. Bone RC. Gram-negative sepsis. Background, clinical features, and intervention. Chest. 1991 ;100 :802-808.

[0176] 8. Raetz CR, Ulevitch RJ, Wright SD, Sibley CH, Ding A, Nathan CF. Gram-negative endotoxin:an extraordinary lipid with profound effects on eukaryotic signal transduction. Faseb J. 1991 ;5 ;2652-2660.

[0177] 9. Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor :a pleiotropic cytokine and therapeutic target. Annu Rev Med. 1994 ;45 :491-503.

[0178] 10. Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV. Kappa

B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumornecrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med.* 1990 ;171 :35-47.

[0179] 11. Ziegler-Heitbrock HW, Sternsdorf T, Liese J, et al. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits NF-kappa B mobilization and TNF production in human monocytes. *J Immunol.* 1993 ;151 :6986-6993.

[0180] 12. Trede NS, Tsytsykova AV, Chatila T, Goldfeld AE, Geha RS. Transcriptional activation of the human TNF-alpha promoter by superantigen in human monocytic cells: role of NF-kappa B. *J Immunol.* 1995 ;155 :902-908.

[0181] 13. Cheung BK, Lee DC, Li JC, Lau YL, Lau AS. A role for double-stranded RNA-activated protein kinase PKR in Mycobacterium-induced cytokine expression. *J Immunol.* 2005 ;175 :7218-7225.

[0182] 14. Li JC, Lee DC, Cheung BK, Lau AS. Mechanisms for HIV Tat upregulation of IL-10 and other cytokine expression: kinase signaling and PKR-mediated immune response. *FEBS Lett.* 2005 ;579 :3055-3062.

[0183] 15. Lee DC, Cheung CY, Law AH, Mok CK, Peiris M, Lau AS. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent hyperinduction of tumor necrosis factor alpha expression in response to avian influenza virus H5N1. *J Virol.* 2005 ;79 :10147-10154.

[0184] 16. Davis RJ. The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem.* 1993 ;268 :14553-14556.

[0185] 17. Su B, Karin M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression. *Curr Opin Immunol.* 1996 ;8 :402-411.

[0186] 18. Chan-Hui PY, Weaver R. Human mitogen-activated protein kinase kinase mediates the stress-induced activation of mitogen-activated protein kinase cascades. *Biochem J.* 1998 ;336 (Pt 3) :599-609.

[0187] 19. Herlaar E, Brown Z. p38MAPK signalling cascades in inflammatory disease. *Mol Med Today.* 1999 ;5 :439-447.

[0188] 20. Ichijo H. From receptors to stress-activated MAP kinases. *Oncogene.* 1999 ;18 :6087-6093.

[0189] 21. Pando MP, Verma IM. Signal-dependent and-independent degradation of free and NF-kappa B-bound IkappaBalpha. *J Biol Chem.* 2000 ;275 :21278-21286.

[0190] 22. Abate A, Oberle S, Schroder H. Lipopolysaccharide-induced expression of cyclooxygenase-2 in mouse macrophages is inhibited by chloromethylketones and a direct inhibitor of NF-kappa B translocation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 1998 ;56 :277-290.

[0191] 23. Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-kappaB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem.* 1999 ;45 :7-17.

- [0192] 24. Grabley S, Thiericke R. Bioactive agents from natural sources : trends in discovery and application. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 1999 ;64 :101-154.
- [0193] 25. Habtemariam S. Natural inhibitors of tumour necrosis factor- α production secretion and function. *Planta Med.* 2000 ;66 :303-313.
- [0194] 26. Blumenthal M GAABJ. *Herbal Medicine : Expanded Commission E Monographs.* Newton, MA : Integrative Medicine Communications. 2000 :22-27.
- [0195] 27. Boon H SM. *The Pharmacology of 47 Common Herbs.* Kingston, Ontario, Canada : Quarry Health Books ;1999.
- [0196] 28. Kronenberg F, Fugh-Berman A. Complementary and alternative medicine for menopausal symptoms : a review of randomized, controlled trials. *Ann Intern Med.* 2002 ;137 :805-813.
- [0197] 29. Sakurai N, Nagai M. [Chemical constituents of original plants of *Cimicifugae rhizoma* in Chinese medicine] *Yakugaku Zasshi.* 1996 ;116 :850-865.
- [0198] 30. Sakai S, Kawamata H, Kogure T, et al. Inhibitory effect of ferulic acid and isoferulic acid on the production of macrophage inflammatory protein-2 in response to respiratory syncytial virus infection in RAW264.7 cells. *Mediators Inflamm.* 1999 ;8 :173-175.
- [0199] 31. Kim SJ, Kim MS. Inhibitory effects of *cimicifugae rhizoma* extracts on histamine, bradykinin and COX-2 mediated inflammatory actions. *Phytother Res.* 2000 ;14 :596-600.
- [0200] 32. Burdette JE, Chen SN, Lu ZZ, et al. Black cohosh (*Cimicifuga racemosa* L.) protects against menadione-induced DNA damage through scavenging of reactive oxygen species : bioassay-directed isolation and characterization of active principles. *J Agric Food Chem.* 2002 ;50 :7022-7028.
- [0201] 33. Tian Z, Pan R, Chang Q, Si J, Xiao P, Wu E. *Cimicifuga foetida* extract inhibits proliferation of hepatocellular cells via induction of cell cycle arrest and apoptosis. *J Ethnopharmacol.* 2007 ;114 :227-233.
- [0202] 34. Cheung BK, Lee DC, Li JC, Lau YL, Lau AS. A Role for Double-Stranded RNA-Activated Protein Kinase PKR in Mycobacterium-Induced Cytokine Expression. *J Immunol.* 2005 ;175 :7218-7225.
- [0203] 35. Schreiber E, Matthias P, Muller MM, Schaffner W. Rapid detection of octamer binding proteins with 'mini-extracts', prepared from a small number of cells. *Nucleic Acids Res.* 1989 ;17 :6419.
- [0204] 36. Duker EM, Kopanski L, Jarry H, Wuttke W. Effects of extracts from *Cimicifuga racemosa* on gonadotropin release in menopausal women and ovariectomized rats. *Planta Med.* 1991 ;57 :420-424.
- [0205] 37. Qiu SX, Dan C, Ding LS, et al. A triterpene glycoside from black cohosh that inhibits osteoclastogenesis by modulating RANKL and TNF α signaling pathways. *Chem Biol.* 2007 ;14 :860-869.

- [0206] 38. Lu YC, Yeh WC, Ohashi PS. LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*. 2008 ;42 :145-151.
- [0207] 39. Kim SH, Kim J, Sharma RP. Inhibition of p38 and ERK MAP kinases blocks endotoxin-induced nitric oxide production and differentially modulates cytokine expression. *Pharmacol Res*. 2004 ;49 :433-439.
- [0208] 40. Blackwell TS, Christman JW. The role of nuclear factor- κ B in cytokine gene regulation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 1997 ;17 :3-9.
- [0209] 41. Panes J, Gomollon F, Taxonera C, Hinojosa J, Clofent J, Nos P. Crohn's disease : a review of current treatment with a focus on biologics. *Drugs*. 2007 ;67 : 2511-2537.
- [0210] 42. Saunders BM, Britton WJ. Life and death in the granuloma : immunopathology of tuberculosis. *Immunol Cell Biol*. 2007 ;85 :103-111.
- [0211] 43. Clay H, Volkman HE, Ramakrishnan L. Tumor necrosis factor signaling mediates resistance to mycobacteria by inhibiting bacterial growth and macrophage death. *Immunity*. 2008 ;29 :283-294.
- [0212] 44. Ohlsson K, Bjork P, Bergenfeldt M, Hageman R, Thompson RC. Interleukin-1 receptor antagonist reduces mortality from endotoxin shock. *Nature*. 1990 ;348 :550-552.
- [0213] 45. Tracey KJ, Fong Y, Hesse DG, et al. Anti-cachectin/TNF monoclonal antibodies prevent septic shock during lethal bacteraemia. *Nature*. 1987 ;330 : 662-664.
- [0214] 46. Schett G. Review : Immune cells and mediators of inflammatory arthritis. *Autoimmunity*. 2008 ;41 :224-229.

[0001]

序列表

- <110> PuraPharm International (HK) Limited
Versitech Limited
- <120> 新型化合物及其用于治疗炎症和调节免疫反应的用途
- <130> PURA.100XC1PCT
- <150> 61/143,925
<151> 2009-01-12
- <160> 4
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> PCR Primer set for TNF-alpha (上游)
- <400> 1
ggctccaggc ggtgcttgtc c 21
- <210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> PCR Primer set for TNF-alpha (下游)
- <400> 2
agacggcgat gcggctgatg 20
- <210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> PCR Primer set for GAPDH (上游)
- <400> 3
accacagtcc atgcatcac 20
- <210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> PCR Primer set for GAPDH (下游)
- <400> 4
tccaccaccc tgttgctgta 20

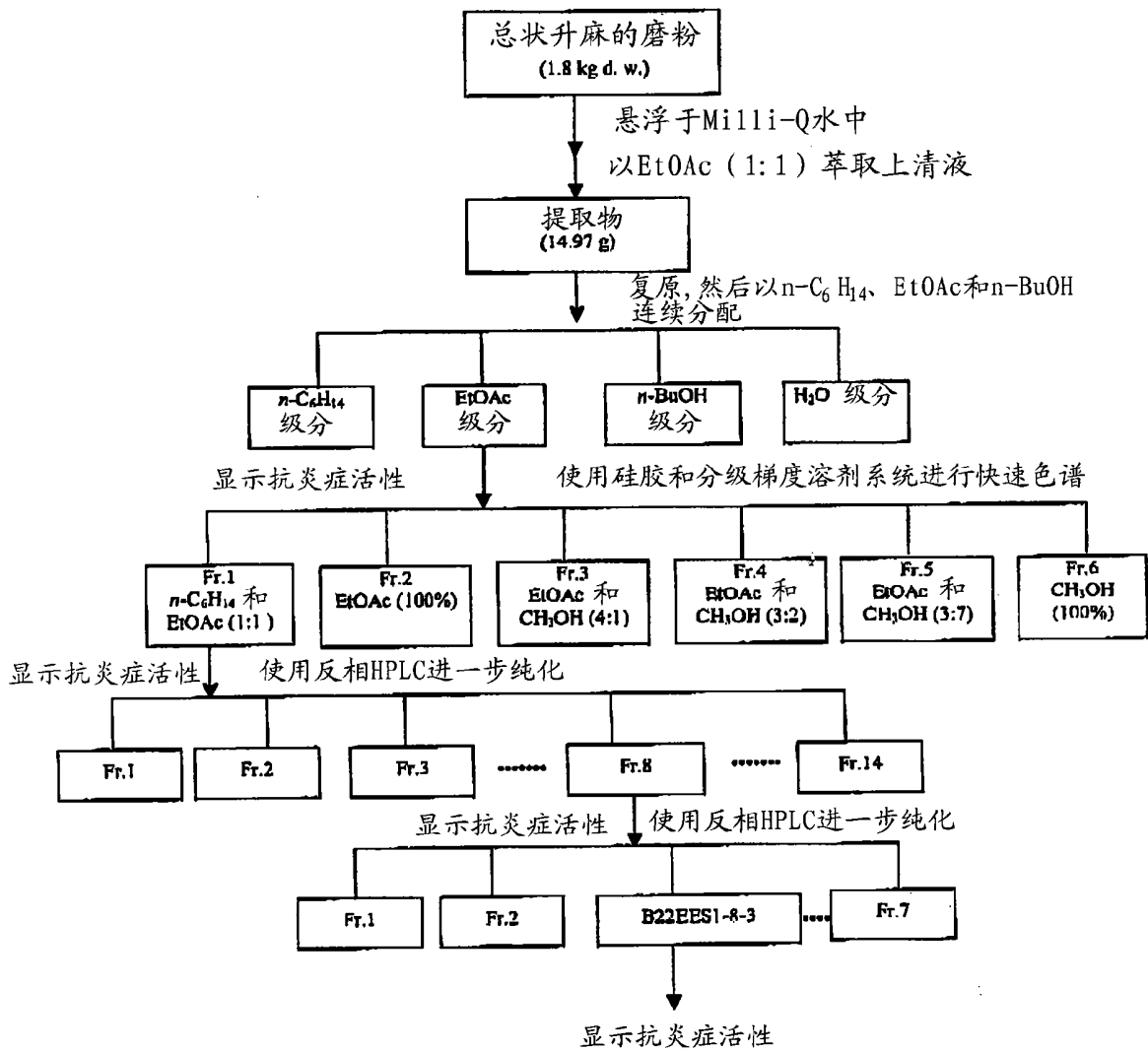


图 1

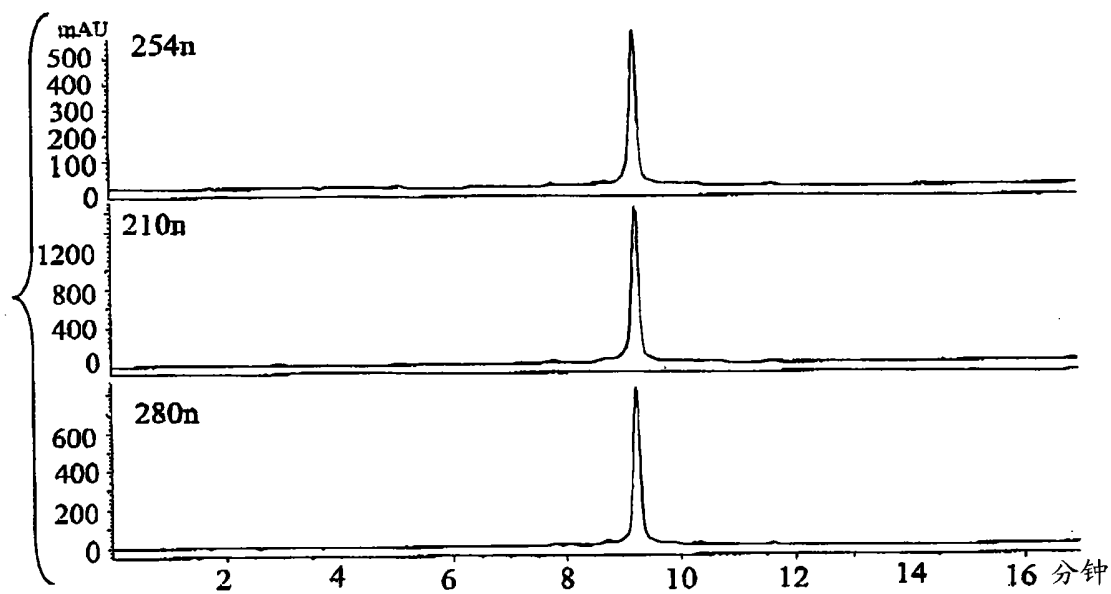


图 2A

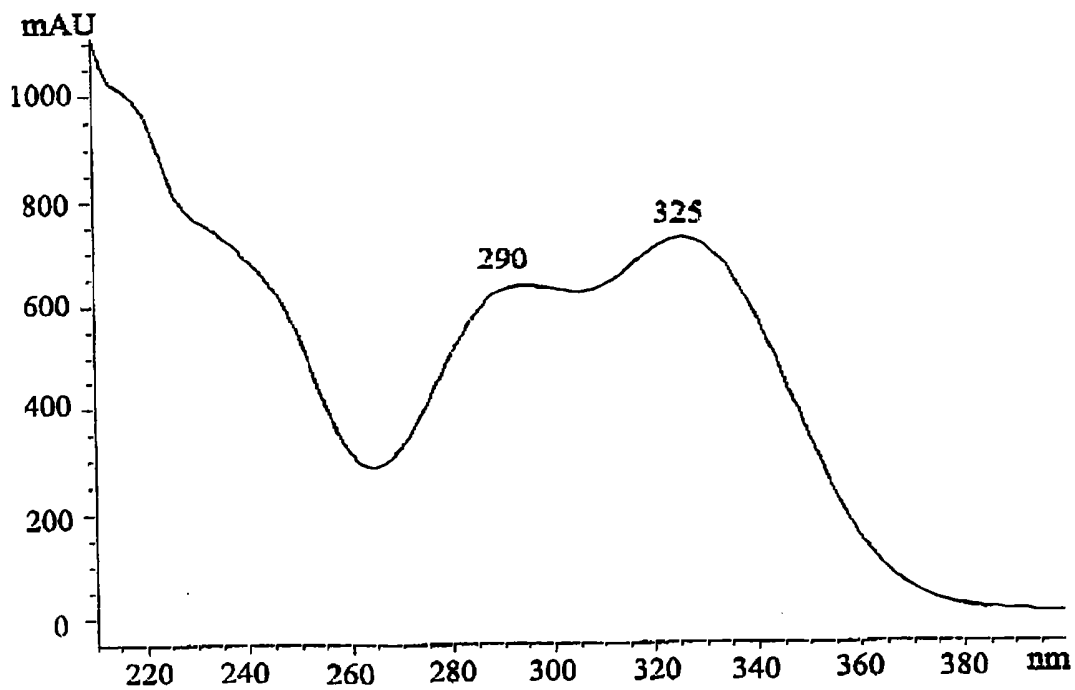


图 2B

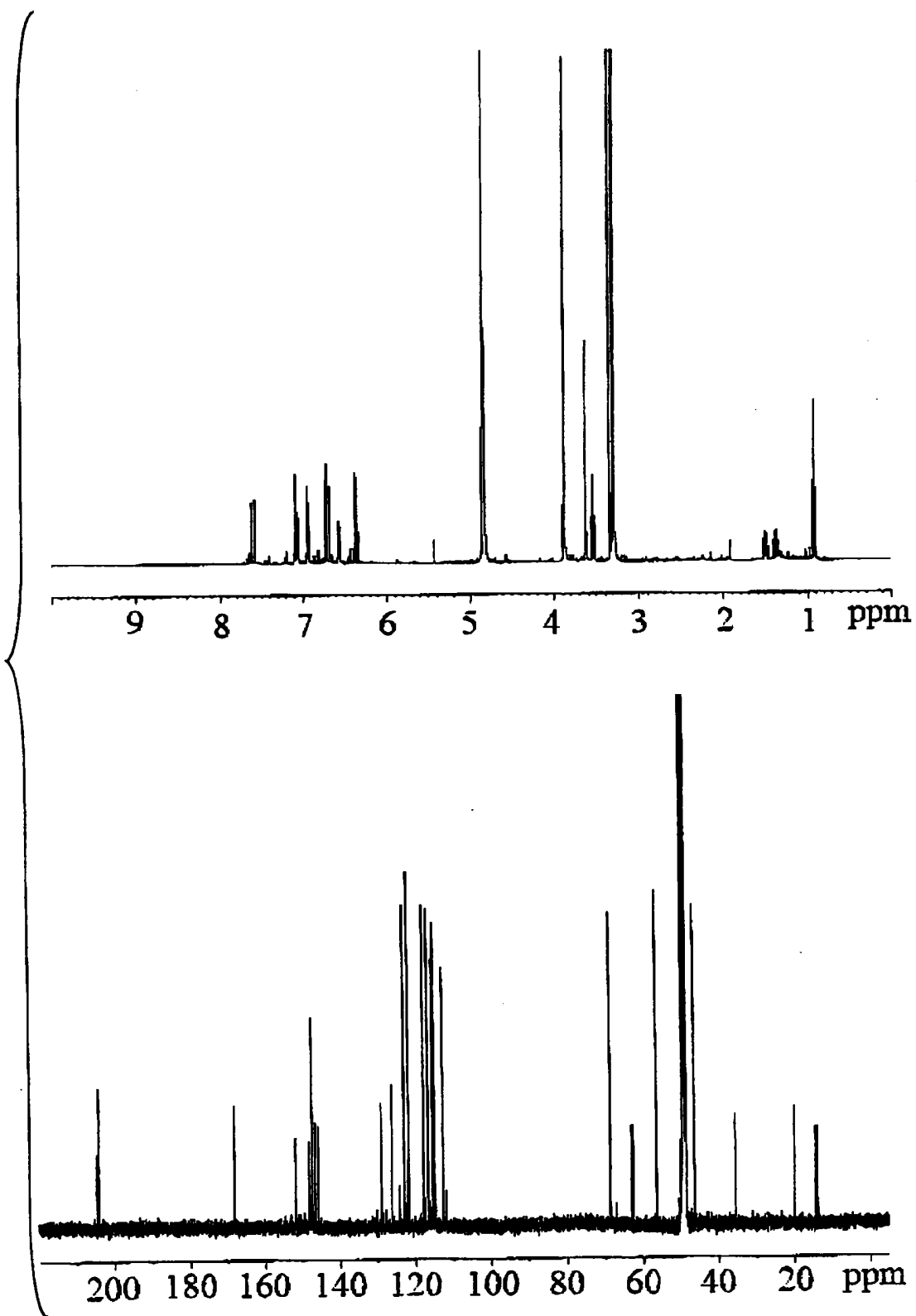


图 3

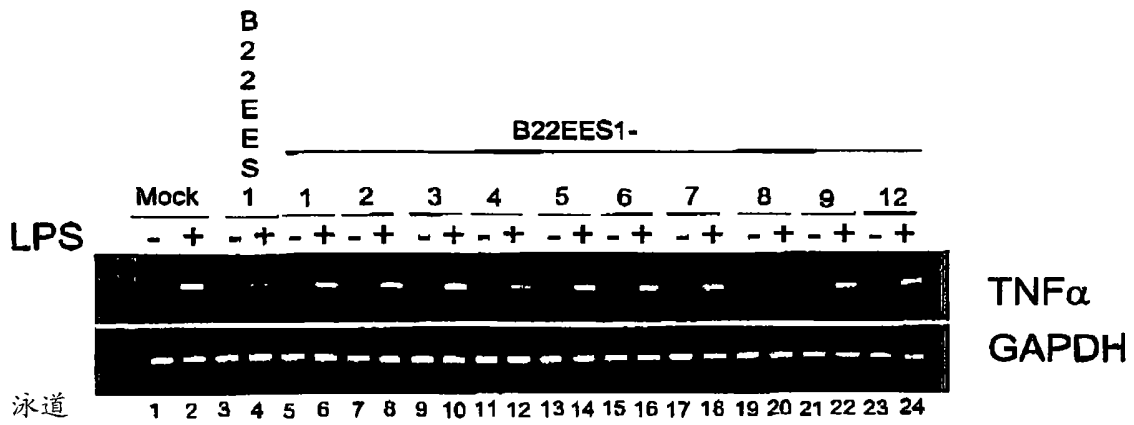


图 4A

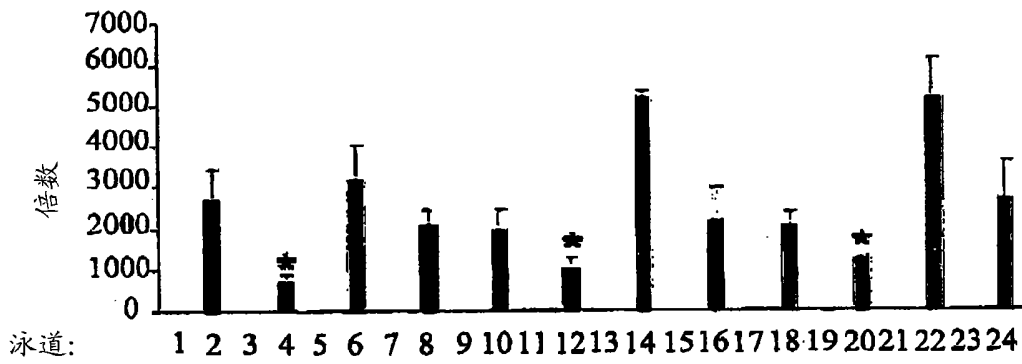


图 4B

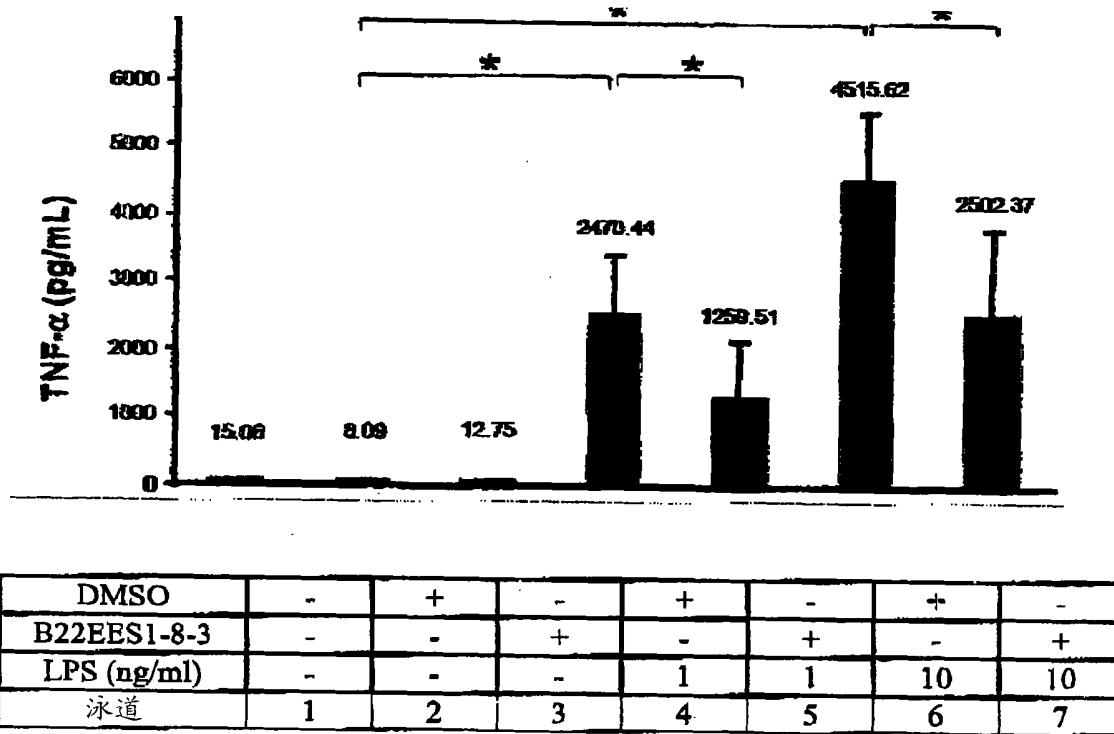


图 5A

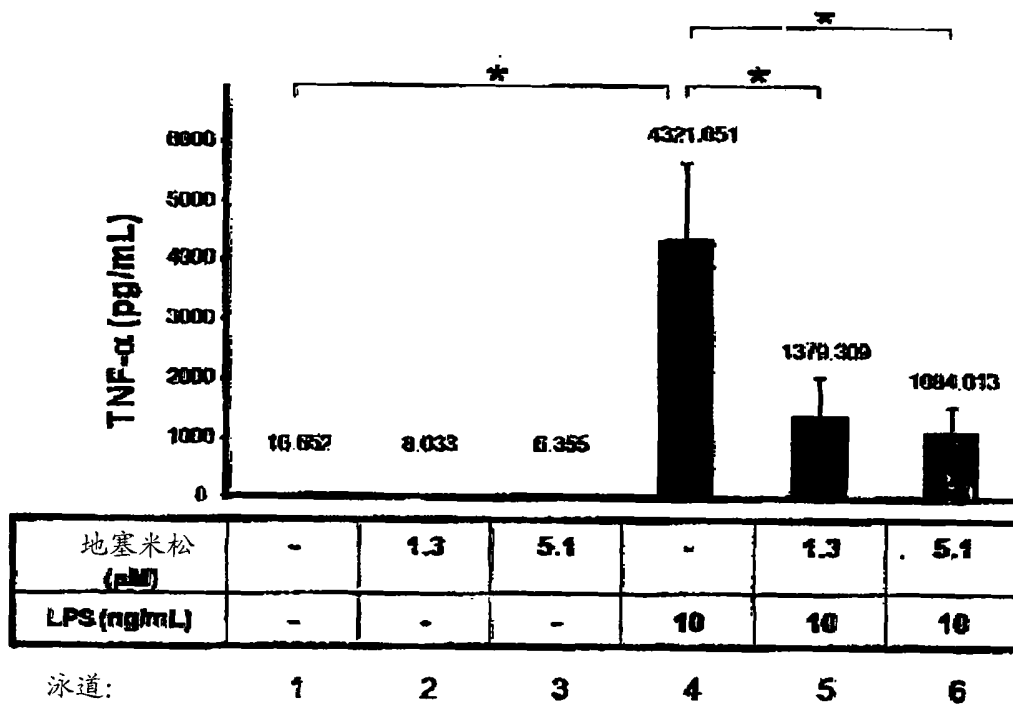


图 5B

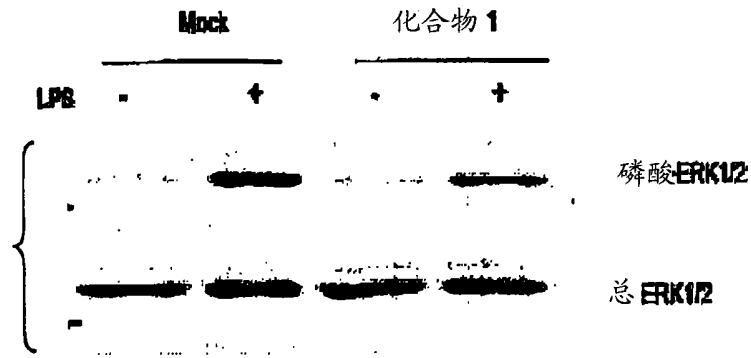


图 6A

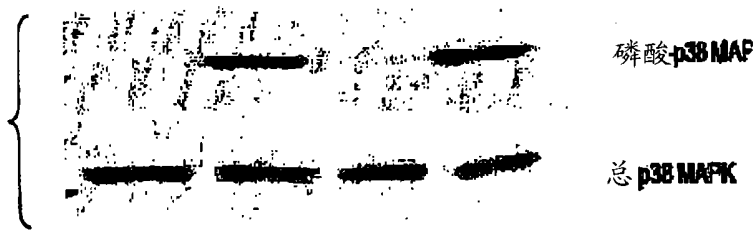


图 6B

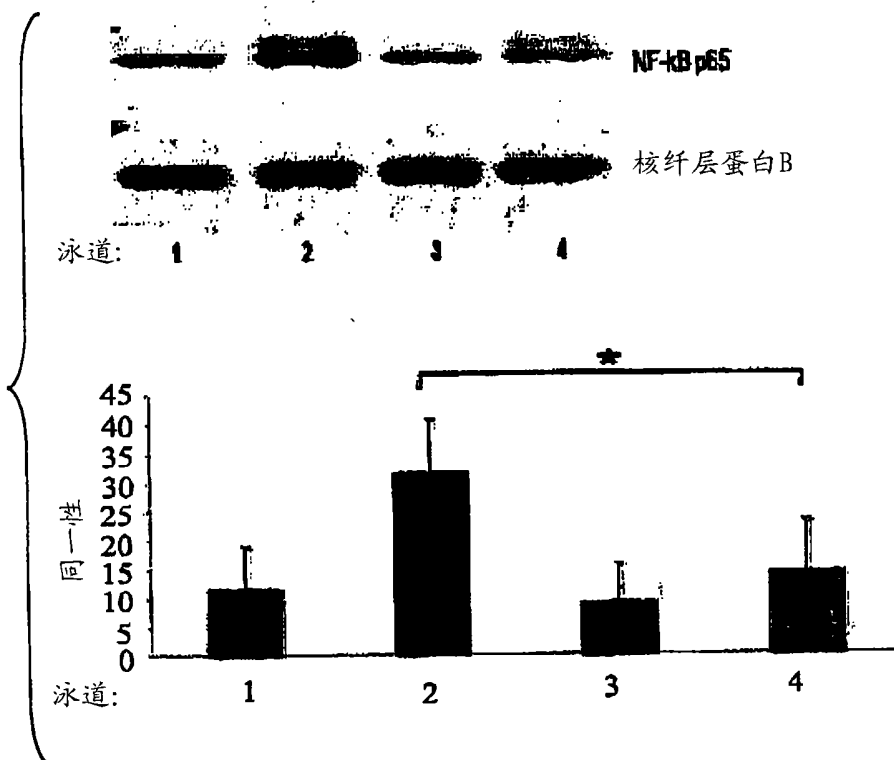


图 6C

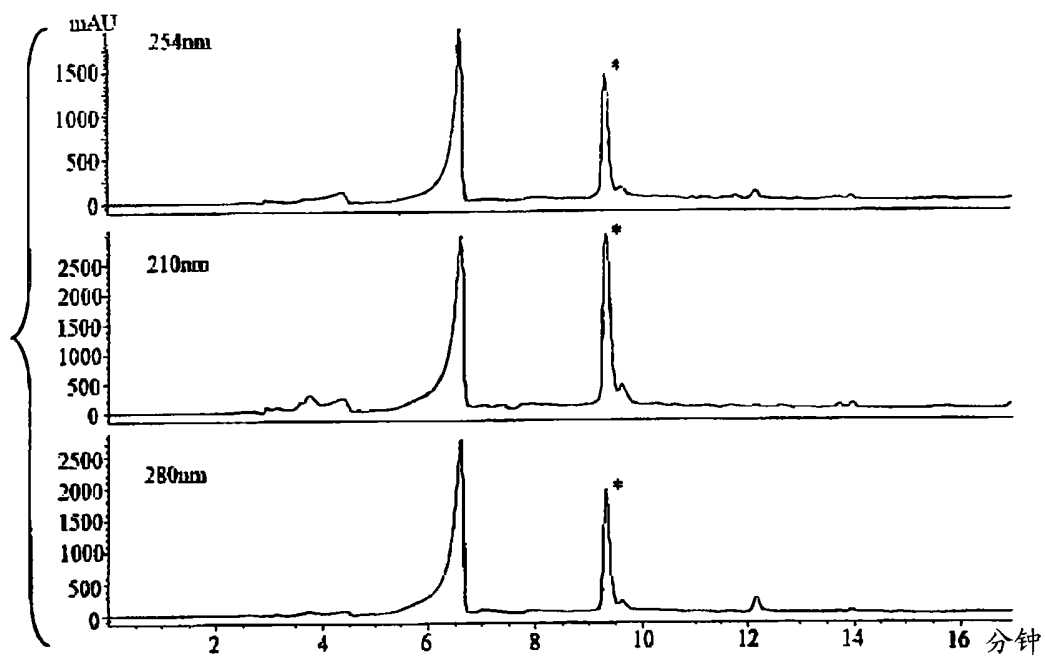


图 7A

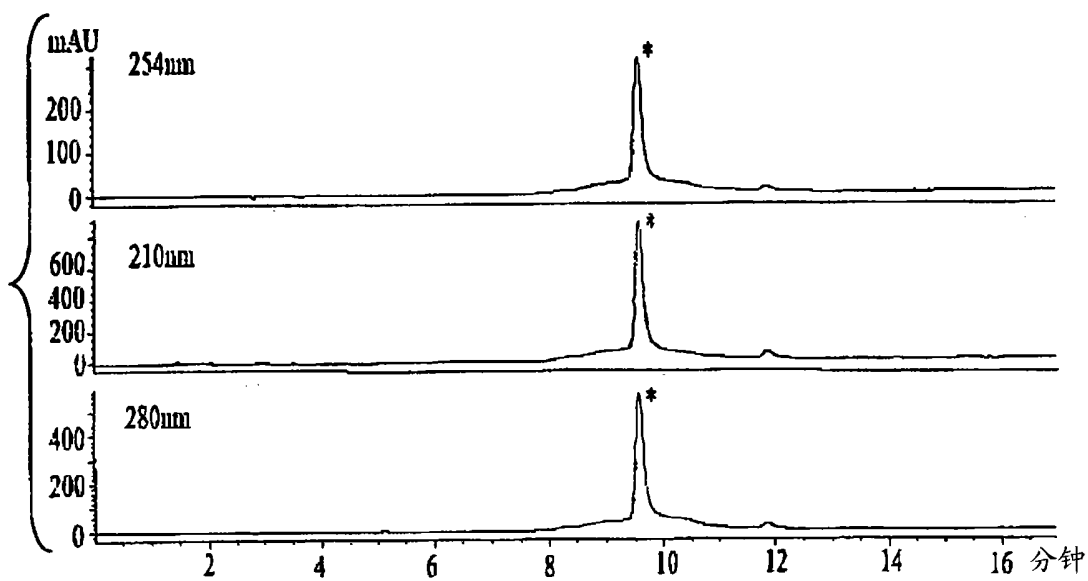


图 7B

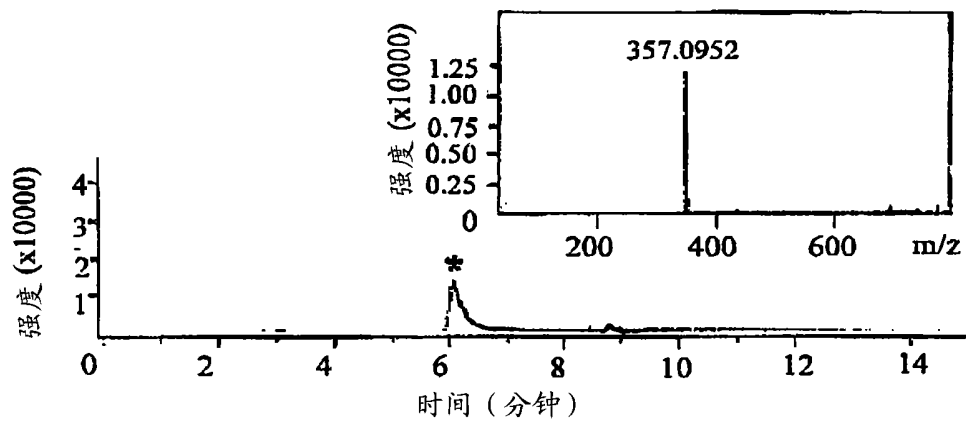


图 8A

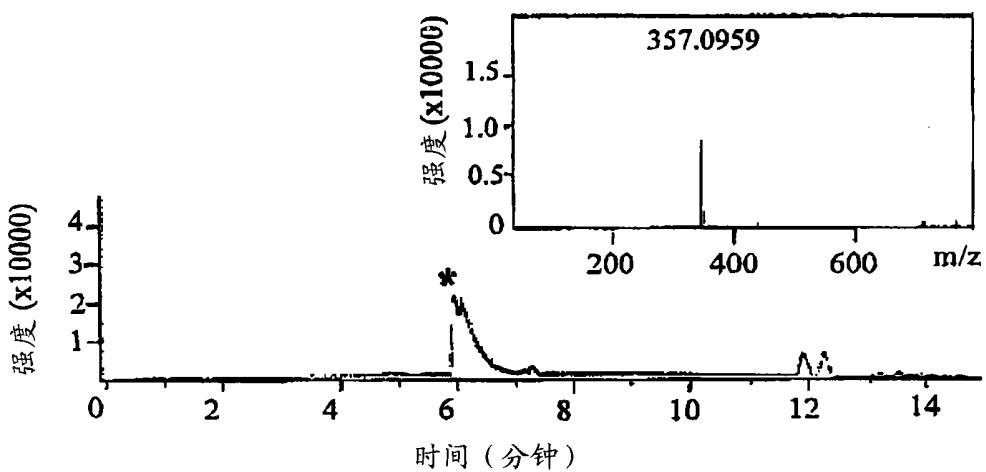


图 8B

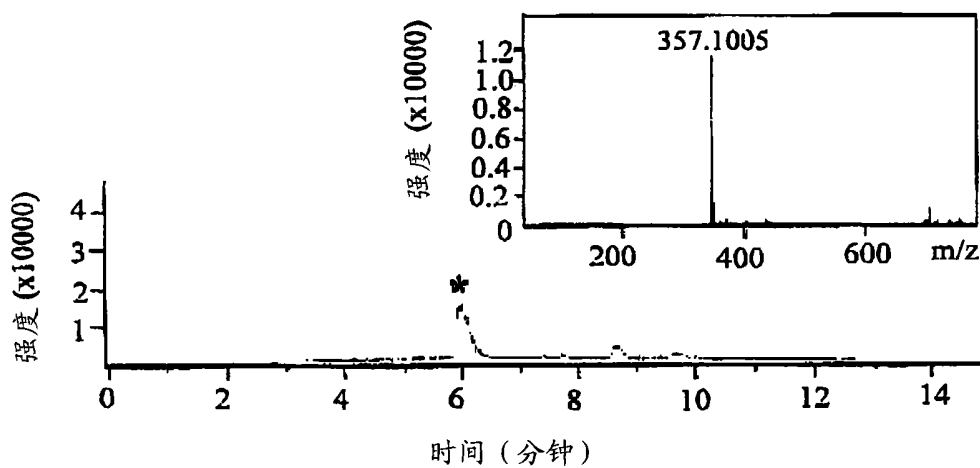


图 8C