



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101845009 A

(43) 申请公布日 2010.09.29

(21) 申请号 201010165711.6

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2003.07.29

C07C 403/24 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 31/223 (2006.01)

60/399,194 2002.07.29 US

A61P 9/10 (2006.01)

60/467,973 2003.05.05 US

A61P 35/00 (2006.01)

60/472,831 2003.05.22 US

A61P 1/16 (2006.01)

60/473,741 2003.05.28 US

60/485,304 2003.07.03 US

(62) 分案原申请数据

03823260.X 2003.07.29

(71) 申请人 卡达克斯药物公司

地址 美国夏威夷

(72) 发明人 S·F·洛克伍德 S·奥马利

D·G·沃塔马尔 L·M·希克斯

H·杰克逊 G·纳多尔斯基

(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 袁志明

权利要求书 1 页 说明书 74 页 附图 38 页

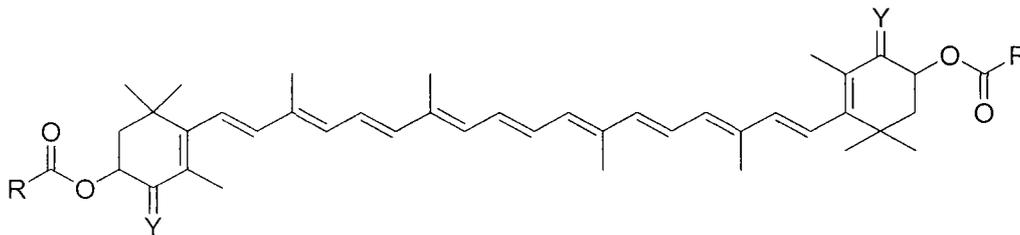
(54) 发明名称

用于抑制和改善疾病的类胡萝卜素结构类似物

(57) 摘要

本发明涉及用于抑制和改善疾病的类胡萝卜素结构类似物。本发明还涉及该类胡萝卜素结构类似物的组合物和用途。本发明的类胡萝卜素结构类似物可用于抑制和/或改善与活性氧种类,活性氮种类,自由基和/或非自由基有关的疾病的发生,例如抑制和/或改善局部缺血-再灌注损伤、抑制和/或改善肝脏疾病以及抑制和/或改善癌症。

1. 具有以下结构的化合物：



其中

各个 Y 独立地为 O 或 H₂；

各个 R 为 R¹；

各个 R¹ 独立地为 -烷基 -NR₃²⁺、-烷基 -NR₂²、-氨基酸 -NH₃⁺ 或 -氨基酸 -NH₂；并且

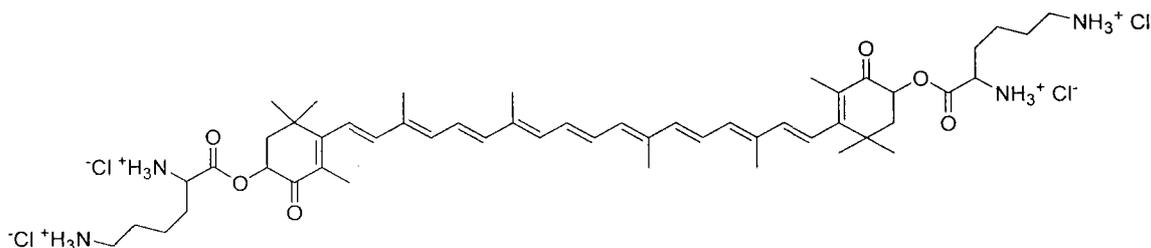
各个 R² 独立地为 H、烷基或芳基。

2. 权利要求 1 的化合物，其中 R 为 -氨基酸 -NH₃⁺。

3. 权利要求 1 的化合物，其中 R 为 -CH(NH₂)CH₂CH₂CH₂CH₂NH₂ 或 -CH(NH₃)⁺CH₂CH₂CH₂CH₂NH₃⁺。

4. 权利要求 1 的化合物，其中 R 为 -烷基 -NR₃²⁺。

5. 权利要求 1 ~ 4 任一项的化合物，其中所述化合物具有以下结构：



6. 药物组合物，其包含权利要求 1 ~ 5 任一项中所述的化合物。

7. 权利要求 1 ~ 5 任一项中所述的化合物在制备用于治疗局部缺血 - 再灌注损伤的药物中的用途。

8. 权利要求 1 ~ 5 任一项中所述的化合物在制备用于治疗癌细胞和癌前细胞的药物中的用途。

9. 权利要求 1 ~ 5 任一项中所述的化合物在制备用于治疗肝脏疾病的药物中的用途。

用于抑制和改善疾病的类胡萝卜素结构类似物

[0001] 本申请是申请号为 03823260. X、申请日为 2003 年 7 月 29 日、发明名称为“用于抑制和改善疾病的类胡萝卜素结构类似物”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明总体上涉及医药和合成化学领域。更具体而言,本发明涉及类胡萝卜素类似物的合成和应用。

背景技术

[0003] 心血管疾病 (CVD),特别是冠状动脉疾病 (CAD),仍是美国 and 全世界死亡的主导原因。CVD 是全世界死亡率和发病率的主导原因。轻度至中度降低心血管风险,从而导致急性冠脉综合征的急诊部就诊和住院治疗减少,可以产生明显的临床和公共卫生益处。

[0004] 对抗氧化剂的广泛研究已表明它们是初级和二级预防心血管疾病的有效治疗剂。CVD 仍是美国所有种族死亡的主导原因;现在大约 6 千万美国人患有某种形式的 CVD。如果可以消除 CVD 则在美国的预期寿命将增加差不多 7 年。由 CVD 导致的绝对死亡数自 1996 年以来已有所降低,但是它在美国仍是单一最大死亡原因,其总年度医疗保健负担大于 \$3000 亿 (包括心脏病发作和中风)。

[0005] 局部缺血是特定的组织缺乏足够的含氧血供。局部缺血是许多急性和慢性疾病状况的基础,所述疾病包括但不限于:

[0006] ● 心肌梗塞,或 MI

[0007] ● 不稳定性心绞痛

[0008] ● 稳定性心绞痛

[0009] ● 经皮经腔冠状动脉血管成形术 (PTCA) 后的突然重闭

[0010] ● 血栓形成性中风 (中风总数的 85%)

[0011] ● 栓塞性血管闭塞

[0012] ● 外周血管机能不全

[0013] ● 器官移植

[0014] ● 深静脉血栓形成,或 DVT

[0015] ● 留置导管闭塞

[0016] 局部缺血也可能成为选择性操作中的一个问题,例如:预定的器官移植;预定的冠状动脉分流移植手术 (CABG);和预定的经皮经腔冠状动脉血管成形术 (PTCA)。这些情况中的每一种的共同之处是再灌注损伤现象:在将含氧血流重新引入到先前局部缺血的区域时产生活性氧种类 (ROS),随后发生反常额外的组织损害。特别地,在急性心肌梗塞 (AMI) 和急性血栓形成性中风中使用溶栓疗法 - 以及用 PTCA 进行外科血管再形成 - 通常伴有局部缺血心肌和 / 或脑的再灌注。临床结果随着在急性血栓形成后实现早期开放而改善,但并非不用付出代价 (即“再灌注损伤”)。

[0017] 目前的治疗允许再灌注药理学活性剂,包括重组组织型纤溶酶原活化物 (r-TPA)、

阿尼普酶 (APSAC)、链激酶和尿激酶。近来的研究已表明早期外科再灌注带来AMI之后的最佳临床结果。但是,外科再灌注仅在 15-20%的美国医疗中心可获得,而在全世界则更少。因此,药理学再灌注对可预见的未来而言可能仍是临床上适当的和重要的。

[0018] 溶栓治疗在大约 20%的梗塞动脉的再灌注中是不成功的。在成功地进行再灌注的动脉中,大约 15%突然重闭(24 小时之内)。系统炎症的衡量指标(例如 C-反应蛋白或 CRP 的血清水平)与这些患者的临床重闭十分相关。心肌抢救作用似乎在急性斑块破裂和血栓形成之后的 2-6 小时“治疗窗”内最大。在急性血栓形成性或血栓栓塞性中风中,这种治疗窗甚至更窄,通常小于血栓形成后 3 小时。在局部缺血性中风 3 小时内施用重组组织型纤溶酶原活化物显著地改善临床结果,但增加出血的风险。

[0019] 在局部缺血期间,许多细胞经历与缺氧有关的生物化学和病理学变化,但保持潜在活力。因此这些潜在存活的细胞是再灌注期中的“战场”。局部缺血引起受影响的组织发生变化,并可能最终导致处于危险的心肌的收缩带和 / 或凝固坏死。局部缺血心肌的病理变化包括但不限于:

- [0020] ● 自由基和 ROS 产生
- [0021] ● ATP 丧失和缺陷 ATP 再合成
- [0022] ● 磷酸肌酸丧失
- [0023] ● 细胞外钾丧失
- [0024] ● 心肌产生主动张力的能力丧失
- [0025] ● 细胞肿胀
- [0026] ● 酸中毒
- [0027] ● 离子稳态丧失
- [0028] ● 结构破坏
- [0029] ● 电不稳定和心律失常发生
- [0030] ● 脂膜过氧化物
- [0031] ● 谷胱甘肽和其它内源性 / 外源性抗氧化剂消耗(包括维生素 C 和 E 和类胡萝卜素)

[0032] 对尚未不可逆地达到坏死阈的局部缺血心肌的援救是再灌注损伤中干预的焦点。

[0033] 间隙连接是一种在大部分动物细胞类型中发现的独特类型的细胞间连接。它们形成使相邻细胞的细胞质互相连接的水性通道,并使小(小于大约 1 千道尔顿)细胞质组分的直接细胞间交换成为可能。通过对接由各个相邻细胞提供的两个半通道(“连接子”)跨越其间的胞外空间创建间隙连接。每个半通道是 6 个连接蛋白分子的低聚物。

[0034] 连接蛋白 43 是所发现的第二种连接蛋白基因,它编码在确立的细胞系和组织中最广泛表达的连接蛋白中的一种。由连接蛋白 43 形成的间隙连接涉及发育、心脏功能和生长调控。

[0035] CVD 的一个共同的表现是心律失常。一般认为心律失常是心脏电活动的紊乱,其表现为心率或心律异常。心律失常患者可能经历从心悸至昏晕(“晕厥”)的广泛症状。

[0036] 心血管系统中的主要连接蛋白为连接蛋白 43。认为在血管壁细胞,特别是内皮细胞之中细胞反应的间隙连接协调对于血管舒缩张力的局部调节和循环稳态的维持而言是关键性的。控制连接蛋白 43 的上调还可以有助于保持心脏组织中的电稳定性。保持心脏

组织中的电稳定性可以有益于每年数十万患有某些类型心血管疾病 [例如局部缺血性心脏病 (IHD) 和心律失常] 的人的健康, 并可以防止处于高度心律失常风险的患者发生心源性猝死。

[0037] 通常认为癌症的特征是不受控的、异常的细胞生长。前述的连接蛋白 43 还与细胞生长控制有关。连接蛋白 43 所致的生长控制可能归因于连接蛋白 43 与间隙连接通讯有关。保持、恢复或增加功能性间隙连接通讯抑制转化细胞的增殖。因此, 上调和 / 或控制连接蛋白 43 的可获得性可以潜在地抑制和 / 或改善癌细胞的扩散。

[0038] 慢性肝损伤, 不管其病因如何, 可以造成从急性和慢性炎症至早期纤维化, 并最终至肝硬化和晚期肝脏疾病 (ESRD) 的进行性病理范围。初始损伤继发的炎症事件级联, 包括释放细胞因子和形成活性氧种类 (ROS), 活化肝星形细胞 (HSC)。HSC 产生细胞外基质组分 (ECM), 包括胶原, 并且在产生肝纤维化的过程中是关键。

[0039] 晚期肝脏疾病 [表现为肝硬化或肝细胞癌 (HCC)] 是美国与疾病有关的死亡的第 8 个主导原因。由病毒感染、酒精滥用、药物诱导的毒性、铁和铜超负荷以及许多其它因素导致的肝的慢性炎症可以引发肝纤维化。肝细胞损害的副产物活化枯否细胞, 其然后释放多种细胞因子、ROS (特别包括超氧化物阴离子) 和其它旁分泌和自分泌因子, 进而作用于肝星形细胞 (HSC)。目前认为纤维发生级联中的关键细胞是 HsC- 负责产生 ECM 的细胞类型。体外证据表明, ROS 可以诱导 HSC 细胞。在所有慢性肝脏疾病患者中观察到氧化应激的间接标记物 (例如硫代巴比妥酸活性种类或 TBARS) 的水平升高。此外, 慢性肝脏疾病患者的谷胱甘肽、谷胱甘肽过氧化物酶、超氧化物歧化酶、类胡萝卜素和 α -生育酚 (维生素 E) 的水平明显较低。提供这些内源性和 / 或外源性抗氧化剂逆转许多慢性肝脏疾病的征象, 包括病程的代用标记和肝纤维化的直接衡量指标。因此, 它们可能是肝脏疾病治疗干预的有效药剂。

发明内容

[0040] 在某些实施方案中, 施用类胡萝卜素的结构类似物可以抑制和 / 或改善治疗对象疾病的发生。可以用类胡萝卜素的结构类似物治疗的疾病可以包括涉及产生活性氧种类和 / 或其它自由基种类 (例如单线态氧, 这是一种活性氧种类但不是自由基) 的任何疾病。在某些实施方案中, 水溶性类胡萝卜素类似物可以用于治疗涉及产生活性氧种类的疾病。活性氧种类和其它自由基与非自由基种类对 DNA、蛋白和脂质的氧化涉及许多人类疾病。自由基可能是以下病症的主要原因, 可使身体对其它引发疾病的因子更敏感, 可抑制内源性防御和修复过程, 和 / 或可促进初期疾病的进展。本领域技术人员施用类胡萝卜素的结构类似物 - 包括考虑治疗药物递送的药代动力学和药效学 - 预期可抑制和 / 或改善所述病症。在第一类病症中, 主要是单一器官受影响, 其证据是在疾病的病理中涉及自由基和 / 或非自由基。这些实例不应被看作是限定, 其它病症对本领域技术人员来说是显而易见的。

[0041] 头、眼、耳、鼻和咽喉 : 与年龄相关的黄斑变性 (ARMD)、视网膜脱离、高血压性视网膜疾病、葡萄膜炎、脉络膜炎、玻璃体炎、眼出血、退化性视网膜损伤、白内障生成和白内障、早产儿视网膜病变、美尼尔病、药物诱导的耳毒性 (包括氨基糖苷和速尿毒性)、感染性和特发性耳炎、中耳炎、感染性和过敏性鼻炎、头颈部癌症 ;

[0042] 中枢神经系统 (脑和脊髓) : 老年性痴呆 (包括阿尔茨海默痴呆)、尼曼 - 皮克病、

神经毒素反应、高压氧效应、帕金森氏病、脑和脊髓外伤、高血压性脑血管损伤、中风（血栓栓塞性、血栓形成性和出血性）、感染性脑炎和脑膜炎、变应性脑脊髓炎和其它脱髓鞘疾病、肌萎缩性侧索硬化（ALS）、多发性硬化、神经元蜡样脂褐质沉积症、共济失调 - 毛细血管扩张综合征、铝、铁和其它重金属超负荷、原发性脑癌 / 恶性肿瘤和脑转移瘤；

[0043] 心血管：动脉硬化、动脉粥样硬化、外周血管疾病、心肌梗塞、慢性稳定性心绞痛、不稳定性心绞痛、特发性手术损伤（CABG、PTCA 期间）、炎性心脏疾病 [由 C- 反应蛋白（CRP）和髓过氧化物酶（MPO）衡量并受其影响]、低密度脂蛋白氧化（ox-LDL）、心肌病、心律失常（局部缺血性和心肌梗塞后诱导的）、充血性心衰（CHF）、药物毒性（包括亚德里亚霉素和阿霉素）、克山病（硒缺乏）、锥虫病、酒精性心肌病、静脉停滞和损伤（包括深静脉血栓形成或 DVT）、血栓性静脉炎；

[0044] 肺：哮喘、反应性气道疾病、慢性阻塞性肺病（COPD 或肺气肿）、氧过多、高压氧效应、香烟烟雾吸入效应、环境氧化剂污染物效应、急性呼吸窘迫综合征（ARDS）、支气管肺发育不良、矿物尘肺、阿霉素毒性、博来霉素毒性、百草枯和其它杀虫剂毒性、化学性肺炎、特发性肺间质纤维化、感染性肺炎（包括真菌）、结节病、石棉沉着病、肺癌（小细胞和大细胞）、炭疽感染、炭疽毒素接触；

[0045] 肾：高血压性肾病、终末期肾病、糖尿病性肾病、感染性肾小球肾炎、肾病综合征、变应性肾小球肾炎、I-IV 型超敏反应、肾同种移植排斥、肾炎性抗肾小球基底膜疾病、重金属肾毒性、药物诱导的（包括氨基糖苷、速尿和非甾体抗炎药）肾毒性、横纹肌溶解、肾癌；

[0046] 肝：四氯化碳肝损伤、内毒素和脂多糖肝损伤、慢性病毒感染（包括肝炎感染）、感染性肝炎（非病毒性病因）、血色素沉着、肝豆状核变性病、对乙酰氨基酚过量、充血性心衰伴肝充血、肝硬化（包括酒精性、病毒性和特发性病因）、肝细胞癌、肝转移瘤；

[0047] 胃肠：炎性肠病（包括克罗恩氏病、溃疡性结肠炎和肠易激综合征）、结肠癌、息肉病、感染性憩室炎、中毒性巨结肠、胃炎（包括幽门螺杆菌感染）、胃癌、食管炎（包括巴瑞特氏食道症）、胃食管反流疾病（GERD）、惠普尔病、胆石病、胰腺炎、血 β - 脂蛋白缺乏症、感染性胃肠炎、痢疾、非甾体抗炎药诱导的毒性；

[0048] 造血 / 血液：Pb（铅）中毒、药物诱导的骨髓抑制、原卟啉光氧化、淋巴瘤、白血病、卟啉症、寄生虫感染（包括疟疾）、镰状细胞性贫血、地中海贫血、蚕豆病、恶性贫血、范康尼氏贫血、感染后贫血、特发性血小板减少性紫癜、自身免疫缺陷综合征（AIDS）；

[0049] 泌尿生殖：感染性前列腺炎、前列腺癌、良性前列腺肥大（BPH）、尿道炎、睾丸炎、睾丸扭转、子宫颈炎、宫颈癌、卵巢癌、子宫癌、阴道炎、阴道痉挛；

[0050] 肌肉骨骼：骨关节炎、类风湿性关节炎、肌腱炎、肌营养不良、退化性椎间盘疾病、退化性关节疾病、运动诱导的骨骼肌损伤、腕管综合征、格林 - 巴利综合征、佩吉特骨病、强直性脊椎炎、异位骨形成；和

[0051] 体表：日照射损伤（包括晒斑）、热损伤、化学和接触性皮肤病（包括漆树属皮炎）、牛皮癣、布卢姆氏综合征、粘膜白斑病（特别是口）、感染性皮炎、卡波济氏肉瘤。

[0052] 第二类是多器官病症，其病理已在某些方面令人信服地与自由基和非自由基损伤相关联：衰老（包括与年龄相关的免疫缺陷和过早衰老疾病）、癌症、心血管疾病、脑血管疾病、辐射损伤、酒精介导的损害（包括韦 - 科综合征）、局部缺血 - 再灌注损害、炎性和自身免疫疾病、药物毒性、淀粉样疾病、超负荷综合征（铁、铜等）、多系统器官衰竭和内毒素血

[0061] 各个 R^3 可以独立地为氢或甲基。 R^1 和 R^2 可以独立地为 H、具有一个或多个取代基的无环烯烃或包含一个或多个取代基的环。在某些实施方案中,取代基可以至少部分亲水。这些类胡萝卜素衍生物可以用于药物组合物。在一个实施方案中,包括通式结构 (I) 的类胡萝卜素结构类似物的药物组合物可以用于治疗再灌注损伤。

[0062] 本文所用的术语“二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物”、“dAST”、“Cardax”、“Cardax™”、“rac”和“虾青素二琥珀酸酯衍生物 (ADD)”代表二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物用于不同立体异构体和水性配方的不同命名法,并代表目前优选但是例举性的用于预期使用这种类胡萝卜素结构类似物的实施方案。二酸二琥珀酸酯虾青素衍生物 (astaCOOH) 是用于闪光光解研究以直接与非酯化的“外消旋”(即立体异构体的混合物) 虾青素进行比较的质子化形式的衍生物。“Cardax-C”是二钠盐二琥珀酸酯二维生素 C 衍生物(衍生物 XXIII),用于超氧化物阴离子清除实验,通过电子顺磁共振 (EPR) 成像来测定。

[0063] 附图的简要说明

[0064] 参照以下与附图结合对目前优选但只不过是例示性的本发明的实施方案所作的详细说明将更为完全地理解以上的简要说明和本发明方法和装置的进一步的目标、特征和优点。

[0065] 图 1 为在自然界中发现的几种“母体”类胡萝卜素结构的图示;

[0066] 图 2 描述用电子顺磁共振 (EPR) 成像监测的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物对活性氧种类超氧化物阴离子的作用;

[0067] 图 3 描述用电子顺磁共振 (EPR) 成像监测的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 / 游离维生素 C 溶液对活性氧种类超氧化物阴离子的作用;

[0068] 图 4 描述用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物静脉内制剂 (Cardax™) 预处理的雄性 Sprague-Dawley 大鼠中梗塞大小相对减小的图示;

[0069] 图 5 描述为当前研究合成的内消旋虾青素 (3R,3'S- 或 3S,3'R- 二羟基- β , β -胡萝卜素-4,4'-二酮;dAST) 的全反式(全-E)二钠盐二琥珀酸酯衍生物的化学结构(显示为全-E 二阴离子 bolamphiphile);

[0070] 图 6 描述 25°C 下在乙醇中的 dAST 的紫外-可见吸收光谱(室长度 1cm, $c = 1.05 \times 10^{-5} M$)。摩尔吸收系数示于括号内。吸收光谱的第二衍生曲线表示近 UV 区的峰的确切位置和隐藏的主要谱带的振动精细结构;

[0071] 图 7 描述 Ringer 缓冲液 (pH 7.4, 室长度 1cm, $c = 1.85 \times 10^{-5} M$, $t = 37^\circ C$) 中的 dAST 的吸收光谱。显示了摩尔吸收系数;

[0072] 图 8 描述通过以低 L/P 比率用在 Ringer 缓冲液 (pH 7.4) 中的 dAST 滴定人血清白蛋白 (HSA) 而获得的诱导的 CD 和 UV/Vis 光谱。HSA 的浓度为 $1.6 \times 10^{-4} M$, 而加入配体为等份试样的 DMSO 储备溶液(室长度 1cm, $t = 37^\circ C$)。显示了在不同 L/P 值下测定的曲线。插图:在溶液中总内消旋类胡萝卜素浓度的基础上计算的诱导的 CD 和吸收谱带的摩尔圆二色性吸收系数 ($\Delta \epsilon$, 以 $M^{-1} cm^{-1}$ 为单位) 和摩尔吸收系数 (ϵ , 以 $M^{-1} cm^{-1}$ 为单位);

[0073] 图 9 描述通过用以上 L/P 比率为 1 的在 Ringer 缓冲液 (pH 7.4) 中的 dAST 滴定 HSA 而获得的诱导的 CD 和 UV/Vis 光谱。HSA 的浓度为 $2.3 \times 10^{-4} M$, 而加入的配体为等份试样的 DMSO 储备溶液(室长度 1cm, $t = 37^\circ C$)。显示了 L/P 值为 1.2、2.0、2.9、4.1、5.7 和 7.4 时测定的曲线。CD 强度随配体浓度平行地增加;

[0074] 图 10 描述通过用以上 L/P 比率为 1 的在 0.1M pH 7.4 磷酸盐缓冲液中的 dAST 滴定 HSA 而获得的诱导的 CD 和 UV/Vis 光谱。HSA 的浓度为 $2.2 \times 10^{-4} \text{M}$, 而加入的配体为等份试样的 DMSO 储备溶液 (室长度 1cm, $t = 37^\circ \text{C}$)。显示了 L/P 值为 1.2、2.0、2.9、4.1、5.7、9.0、10.6 和 13.1 时测定的曲线。CD 强度随配体浓度平行地增加;

[0075] 图 11 描述关于两种内消旋类胡萝卜素分子的右手性排列的例示, 对于它们激子相互作用在 CD 光谱中产生长波正和短波负卡滕效应。灰色分子位于纸平面的后面;

[0076] 图 12 描述 (上图): 在 37°C 下在 0.1M pH 7.4 磷酸盐缓冲液中测定的 dAST 导致的 HAS 的荧光猝灭。HSA 和配体的最初和最终浓度分别在 $4.2 \times 10^{-6} \text{M}$ – $4.0 \times 10^{-6} \text{M}$ 和 $1.3 \times 10^{-6} \text{M}$ – $1.4 \times 10^{-5} \text{M}$ 之间变化。在曲线上标注 L/P 比率。(下图): 单独的 DMSO 对 HSA 固有荧光的影响。实验条件如正文;

[0077] 图 13 描述脂肪酸-游离 HSA 的 X-射线晶体结构。显示了 HSA 的亚结构域和两个主要药物结合位点。虚线表示域间裂隙的空间尺寸, 而星号表示 Trp214 的位置。dAST 分子的 3 和 3' 手性碳原子之间的原子间距离为 28 \AA ;

[0078] 图 14 描述二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物 (图注中的 "rac") 诱导鼠胚胎成纤维细胞 (10T1/2) 中的功能性间隙连接通讯。如正文所述将融合培养物处理 4 天, 然后测定转移荧光染料荧光黄的能力。箭头表示注射荧光黄的细胞;

[0079] 图 15A 描述用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的混合物处理的细胞中的连接蛋白 43 蛋白表达, 通过定量 Western 印迹分析来评价。认为上面的条带代表装配为间隙连接的磷酸化形式的蛋白; 下面的条带代表未装配的蛋白 (Saez, 1998)。泳道 1: 1: 2 乙醇 (EtOH)/ H_2O (仅仅溶剂的阴性对照); 泳道 2: TTNPB, 一种合成的类维生素 A, 在丙酮中, 浓度 10^{-8}M (阳性对照); 泳道 3: 乙酸视黄酯, 在丙酮中, 浓度 10^{-5}M (阳性对照); 泳道 4: 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物 ("rac"), 浓度 10^{-5}M , 在 1: 2EtOH/ H_2O 配方中递送; 泳道 5: 3R, 3' R 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物, 浓度 10^{-5}M , 在 1: 2EtOH/ H_2O 配方中递送; 泳道 6: 3S, 3' S 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物, 浓度 10^{-5}M , 在 1: 2EtOH/ H_2O 配方中递送; 和泳道 7: 内消旋二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物, 浓度 10^{-5}M , 在 1: 2EtOH/ H_2O 配方中递送;

[0080] 图 15B 描述用考马斯蓝染色的免疫印迹, 表明所有条带的相同蛋白载量。这证明免疫标记的差别不是人为地由装载和 / 或转移至膜上的总蛋白的变异性导致的;

[0081] 图 15C 描述与阳性对照和仅用溶剂处理的对照相比二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物对连接蛋白 43 蛋白表达的相对诱导水平的数字分析。泳道如图 15A。将折叠诱导相对于 1: 2EtOH/ H_2O 处理的阴性对照中对照水平的 Cx43 表达进行归一化, 将其设定为任意单位 = 1.0;

[0082] 图 15D 描述用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物处理的鼠胚胎成纤维细胞 (10T1/2) 中 Cx43 蛋白表达的剂量-反应曲线, 它由定量 Western 印迹分析法来评价。上面的条带认为代表装配为间隙连接的磷酸化形式的蛋白; 下面的条带代表未装配的蛋白。泳道 1: 1: 2EtOH/ H_2O (仅溶剂的阴性对照)。泳道 2: TTNPB, 在丙酮中, 浓度 10^{-8}M (阳性对照)。泳道 3: 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 ("rac"), 浓度 10^{-5}M , 在 1: 2 的 EtOH/ H_2O 配方中递送。泳道 4: 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 ("rac"), 浓度 $5 \times 10^{-6} \text{M}$, 在 1: 2 的 EtOH/ H_2O 配方中递送。泳道 5: 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物

(" rac"), 浓度 10^{-6} M, 在 1 : 2EtOH/H₂O 配方中递送 ;

[0083] 图 15E 描述与阳性对照和仅用溶剂处理的对照相比二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物对连接蛋白 43 蛋白表达的相对诱导水平的数字分析。泳道如图 15D。将折叠诱导相对于 1 : 2EtOH/H₂O 处理的对照中对照水平的 Cx43 表达进行归一化, 将其设定为任意单位 = 1.0 ;

[0084] 图 16 描述二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物增加 Cx43 免疫反应性连接斑块的装配。如上述用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物将 10T1/2 细胞融合培养物处理 4 天 : (1) 浓度 10^{-5} M, 在 1 : 2EtOH/H₂O 中 ; (2) 用 1 : 2EtOH/H₂O 作为仅溶剂的阴性对照 ; 或 (3) TTNPB, 浓度 10^{-8} M, 在四氢呋喃 (THF) 溶剂中, 作为阳性对照。如正文所述用 Cx43 抗体将细胞免疫染色。A 组 : 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物, 浓度 10^{-5} M, 在 1 : 2EtOH/H₂O 中 ; C 组 : 1 : 2EtOH/H₂O, 作为溶剂对照 ; E 组 : TTNPB, 浓度为 10^{-8} M, 在四氢呋喃 (THF) 溶剂中, 作为阳性对照。B、D 和 F 组 : 分别对 A、C 和 E 组进行数字分析, 表明固定设置的阈值以上的像素是荧光强度阳性。黄色箭头 : 免疫反应性连接斑块 ; 红色箭头 : 细胞核位置。注意到用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物处理的培养物中连接免疫反应性斑块的数量和强度比仅用溶剂处理的对照组大。C 和 D 组所示的连接斑块代表对照组中罕见的斑块 ; 这些培养物中的大部分细胞为 Cx43 染色阴性 ;

[0085] 图 17 描述为目前研究合成的虾青素的二钠二琥珀酸二酯的 4 种立体异构体 (显示为全 -E 几何异构体) ; 将立体异构体的混合物或单独的立体异构体用于分别的应用 (见图注) ;

[0086] 图 18 描述由 DEPMP0 自旋阱检测的在纯水性配方中的虾青素的二钠二琥珀酸酯衍生物对超氧化物阴离子信号的平均抑制百分率。混合物 = 立体异构体的统计混合物 [1 : 2 : 1 比率的 3S, 3' S, 内消旋 (3R, 3' S 和 3' R, 3S), 3R, 3' R]。将水性配方中的各衍生物相对于不加入化合物时检测的对照 EPR 信号 (根据惯例设为 0% 抑制) 进行标准化。注意到水中 3S, 3' S 制剂缺乏对超氧化物的抑制作用。在每种情况下, 水性配方的效力小于在 EtOH 中的相应配方 (图 19) ;

[0087] 图 19 描述由 DEPMP0 自旋阱检测的在乙醇配方中的虾青素的二钠二琥珀酸酯衍生物对超氧化物阴离子信号的平均抑制百分率。混合物 = 立体异构体的统计混合物 [1 : 2 : 1 比率的 3S, 3' S, 内消旋 (3R, 3' S 和 3' R, 3S), 3R, 3' R]。混合物、内消旋和 3R, 3' R 储备溶液为 1 : 2 乙醇 / 水 (33¹/₃% EtOH) ; 3S, 3' S 储备溶液为 1 : 1 乙醇 / 水 (50% EtOH)。在分离的嗜中性白细胞试验中最终的 EtOH 浓度分别为 0.3% 和 0.5%。将在乙醇配方中的各衍生物相对于不加入化合物时检测的对照 EPR 信号 (根据惯例设为 0% 抑制) 进行标准化 ;

[0088] 图 20 描述由 DEPMP0 自旋阱检测的虾青素的二钠二琥珀酸酯衍生物的立体异构体的混合物对超氧化物阴离子信号的平均抑制百分率 (在 1 : 2EtOH/ 水配方中测试 ; 在分离的嗜中性白细胞试验中最终 EtOH 浓度 0.3%)。随着衍生物的浓度增加, 抑制作用以非线性、依赖于剂量的方式增加。在 3mM 下, 观察到对超氧化物阴离子信号接近完全的抑制 (95.0% 抑制) ;

[0089] 图 21 描述由 DEPMP0 自旋阱检测的盐酸盐二赖氨酸虾青素衍生物对超氧化物阴离

子信号的平均抑制百分率。此衍生物高度水溶 (> 50mg/ml), 且在此测定中优异的自由基猝灭能力不需要助溶剂。将此衍生物的超氧化物阴离子抑制作用与图 20 关于在纯水性配方中形成超分子装配体的衍生物所示的抑制作用进行比较;

[0090] 图 22 描述黑小鼠单剂经口管饲之后非酯化的游离虾青素的血浆浓度对时间的标准图。在血浆中仅检测到非酯化的游离虾青素, 证明类胡萝卜素类似物在哺乳动物肠中完全脱酯化, 如先前所述;

[0091] 图 23 描述黑小鼠单剂经口管饲之后非酯化的游离虾青素的肝浓度对时间的标准图。在肝中仅检测到非酯化的游离虾青素, 也证明 (参见关于血浆的图 22) 类胡萝卜素类似物在哺乳动物肠中完全脱酯化, 如先前所述。在每个时间点, 非酯化的游离虾青素的肝水平大于血浆中观察到的水平, 这是一个新的发现, 表明游离类胡萝卜素在此研究所用的新乳剂载体中的实体器官递送得到大大改善;

[0092] 图 24 描述通过经口管饲 500mg/kg 的二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物对脂多糖 (LPS) 诱导的小鼠肝损伤的影响 (通过血清丙氨酸氨基转移酶或 ALT 升高来测定)。各组测试 3 只动物。对照动物接受单独的盐水 (假处理的对照; 图的左侧部分) 或不含二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物的乳剂 (载体对照)。假处理的动物接受新衍生物表现出对 ALT 的背景水平无影响; 接受含 500mg/kg 的新衍生物的口服乳剂的小鼠表现出 ALT 诱导水平降低, 表明在 LPS 损害之后抗肝坏死的保护作用;

[0093] 图 25 描述用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物静脉内配方 (Cardax™) 预处理的雄性 Sprague-Dawley 大鼠中梗塞大小相对减小的图示。可看到剂量和梗塞大小减小之间的线性关系。梗塞大小减小水平接近对局部缺血预处理观察到的结果;

[0094] 图 26 描述用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物静脉内配方 (Cardax™) 预处理的雄性 Sprague-Dawley 大鼠中梗塞大小的相对减小的图示;

[0095] 图 27 描述使用闪光光解得到的二酸二琥珀酸酯虾青素衍生物 (astaCOOH) 的瞬间吸收 vs. 延迟。实验在乙腈 (MeCN) 中使用 nitronaftalin (NN) 作为光敏剂来进行。所得的光谱证明二酸二琥珀酸酯虾青素衍生物表现与作为自由基猝灭剂的非酯化的游离外消旋虾青素相同 (形成类胡萝卜素自由基阳离子), 鉴定该衍生物为在口服和静脉递送之后在体内产生非酯化的游离虾青素的活性“软药物”;

[0096] 图 28 描述使用闪光光解得到的参照化合物非酯化的游离外消旋虾青素 (asta) 的瞬间吸收 vs. 延迟。实验在乙腈 (MeCN) 中使用 nitronaftalin (NN) 作为光敏剂来进行。所得的光谱几乎可叠加在二酸二琥珀酸酯虾青素衍生物 (astaCOOH) 所得的光谱上, 表明两种化合物具有相同的自由基-阳离子形成性能;

[0097] 图 29 描述用抗连接蛋白 43 抗体进行聚丙烯酰胺凝胶 Western 印迹的图示;

[0098] 图 30 描述用抗连接蛋白 43 抗体, 然后在 Biorad 成像仪上进行 HRP 化学发光而得到的 Western 印迹定量光密度图像的图示;

[0099] 图 31 描述在服药后 96 小时由阳性对照 (TTNPB, 有效的合成类维生素 A) 和受试化合物 (二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物, 在四种水和 / 或乙醇 (EtOH) / 水配方中: H₂O-10-5、H₂O-10-6、H₂O-10-7 和 EtOH/H₂O-10-5) 相对于无菌水对照 (H₂O) 对连接蛋白 43 表达的相对折叠诱导的图;

[0100] 图 32 描述在给黑小鼠经口管饲在乳剂载体中的 500mg/kg 二钠二琥珀酸酯虾青素

衍生物 (ADD) 11 天之后血浆和肝中非酯化的游离虾青素的平均水平图。所达到的血浆和肝中的峰值和谷值水平都 > 200nM, 其被认为在体内对氧化应激和肝损伤有保护作用。在第 11 次服药后 6 小时肝中所得的峰值水平为必需的保护水平的近 9 倍 (1760nM) ;

[0101] 图 33 描述由 DEPMPO 自旋阱检测的二钠盐二琥珀酸酯二维生素 C 衍生物 [衍生物 (XXIII)] 对超氧化物阴离子信号的平均抑制百分率。当衍生物浓度增加时, 抑制作用以依赖于剂量的方式增加。在 60 μ M 下, 观察到对超氧化物阴离子信号接近完全的抑制作用。此衍生物水溶性也十分高, 并无需助溶剂将其引入试验中 (见图 21)。该新衍生物在自由基猝灭效率方面与以 1 : 2 与维生素 C 配制的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的配方相当 (见图 3), 表明这种衍生物的活性、“软药物”性能。这种共同抗氧化剂 (co-antioxidant) 衍生物策略将相对自由基清除效力 (如果与二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物相比) 增加 50 倍 ;

[0102] 图 34 描述非酯化的游离虾青素 (作为立体异构体的全反式混合物) 对 MCA 诱导的小鼠胚胎成纤维细胞 (10T1/2) 的肿瘤转化的影响。非酯化的游离虾青素在口服和静脉内施用新类胡萝卜素衍生物之后在体内快速产生, 并在血液和实体器官中检测到高浓度 (见图 22 和 23)。非酯化的游离青虾素表现出肿瘤转化降低水平 (100%) 超过类似浓度的在本测定中测试的任何其它类胡萝卜素, 证明此化合物对癌症化学预防应用的效用增加 ;

[0103] 图 35 描述虾青素处理的平皿与对照平皿的比较 (见关于图 34 的描述) ;

[0104] 图 36 描述虾青素 (作为立体异构体混合物) 与前面测试的类胡萝卜素在此实验室用此试验所进行的比较 (见关于图 34 的描述) ;

[0105] 图 37 描述用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物静脉内配方 (Cardax™) 预处理的雄性新西兰兔中梗塞大小的相对减小的图示。当与在啮齿动物中以相同剂量和相同预处理方案观察到的梗塞大小减小进行比较时, 在兔模型中观察到梗塞大小的减小增加 38% ;和

[0106] 图 38 描述用二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物静脉内配方 (Cardax™) 预处理的雄性新西兰兔中血浆 C-反应蛋白 (CRP) 的循环水平的相对减小的图示。通过皮下注射 1% 巴豆油来刺激发生急性期反应的对照兔 (单独盐水注射) 表现出相对于基线 (在再灌注时所取的静脉样品) 循环 CRP 水平平均增加 23.5%。相比之下, Cardax™ 处理的动物 (50mg/kg) 表现出相对于基线循环 CRP 水平平均降低 (-15.7%), 表明 Cardax™ 的有效抗炎作用。

[0107] 详述

[0108] “母体”类胡萝卜素可以总体上指用作类胡萝卜素结构类似物合成的起始骨架的天然化合物。类胡萝卜素衍生物可以衍生自天然存在的类胡萝卜素。例如, 天然存在的类胡萝卜素可以包括番茄红素、番茄紫素、番茄黄素、虾青素、 β -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质和 / 或角黄素。

[0109] 类胡萝卜素是一组主要由植物、酵母和微藻类产生的天然色素。目前相关化合物家族的数量超过 600 种已有描述的成员, 不包括 Z 和 E 异构体。在人血清或组织中已发现 50 种。人和其它动物不能从头合成类胡萝卜素, 必须从其饮食中获得它们。所有的类胡萝卜素具有共同的化学特征, 例如聚类异戊二烯结构、形成发色团的长多烯链和中央双键周围接近对称。两个 C_{20} 香叶草基香叶草基二磷酸酯分子的尾至尾连接产生母体 C_{40} 碳骨架。不含氧化官能团的类胡萝卜素称为“胡萝卜素”, 反映它们的烃属性 ; 氧化胡萝卜素已知为“叶黄素”。在分子的一端或两端的环化产生 7 个确定的末端基团 (代表性结构如图 1 所示)。

[0110] 证实的自然界中类胡萝卜素的功能包括集光、光保护以及分别在显微生物、哺乳动物和鸟类中的保护性和与性有关的着色。较近的观察是类胡萝卜素抗人与年龄有关的疾病的保护作用,作为细胞内复杂抗氧化剂网络的一部分。这种作用由各类胡萝卜素的生理化学性能和它们在生物体内的功能之间的紧密关系所赋予。分子中心部分的交替双键和单键的长系统(在多烯链全长上使 π -轨道电子离域)赋予类胡萝卜素独特的分子形状、化学反应性和光吸收性能。此外,环绕 C=C 双键的异构产生可以分离为单独化合物(已知为 Z("顺式")和 E("反式")或几何异构体)的明显不同的分子结构。在大于 600 种所述的类胡萝卜素中,在自然界中有时见到甚至更多数目的理论上可能的单 Z 和多 Z 异构体。Z 双键的存在在邻近的氢原子和 / 或甲基之间制造更大的空间位阻,因此 Z 异构体与对应的全 -E 形式相比通常热力学稳定性较小,而化学反应性更大。全 -E 构型是延伸的、线性和刚性分子。相比之下, Z 异构体不是简单的线性分子(所谓的“弯曲链”异构体)。多烯链中任何 Z 的存在产生弯曲链分子。Z-异构体结晶或聚集的趋势比全 -E 小得多,而 Z 异构体比其全 -E 对应物更容易在体内溶解、吸收和转运。这对于哺乳动物的肠内(例如口服)和肠胃外(例如静脉内、动脉内、肌内和皮下)服药而言具有重要意义。

[0111] 具有手性中心的类胡萝卜素可以作为 R(rectus) 或 S(sinister) 构型存在。例如,虾青素(在 3 和 3' 碳具有 2 个手性中心)可以作为 4 种可能的立体异构体存在:3S, 3' S;3R, 3' S 和 3S, 3' R(内消旋形式);或 3R, 3' R。各个立体异构体的相对比例可能随天然来源而变。例如,雨生红球藻(Haematococcus pluvialis) 微藻粉为 99% 3S, 3' S 虾青素,并且可能是占优势的人进化虾青素来源。磷虾(3R, 3' R)和酵母来源与微藻来源相比产生不同的立体异构体组合物。合成虾青素,由大制造商如 Hoffmann-LaRoche AG、Buckton Scott(USA) 或 BASF AG 生产,以非酯化的游离虾青素的 1 : 2 : 1 立体异构体混合物 [3S, 3' S;3R, 3' S, 3' R, 3S(内消旋);3R, 3' R] 的确定的几何异构体混合物提供。来自鲑科鱼的天然来源虾青素主要是单一立体异构体(3S, 3' S),但包含几何异构体的混合物。来自天然来源雨生红球藻(Haematococcus pluvialis) 的虾青素可以包含近 50% Z 异构体。如上述,Z 构象改变可能在类胡萝卜素分子的两部分之间产生更高的位阻,使它稳定性降低,反应性增大,并在低氧张力下对反应性更敏感。在这种情况下,相对于全 -E 形式,Z 形式:(1) 可能首先降解;(2) 可能更好地抑制活性氧种类如超氧化物阴离子攻击细胞;和(3) 可能优先减缓自由基形成。总之,Z 形式可能最初在热力学上有利以保护细胞和细胞膜的亲脂部分免受破坏。但是,重要的是注意到全 -E 形式的虾青素,与 β -胡萝卜素不同的是,以其在 β -紫罗酮环上二羟基-和二酮取代的形式,保持显著的口服生物利用度和抗氧化能力,并已证明其在大部分研究中具有超过 β -胡萝卜素的增大的效力。还推断全 -E 形式的虾青素在体内对细胞具有最大的膜稳定作用。因此,可能在天然和合成的立体异构体的混合物中全 -E 形式的虾青素在抗氧化机理中也非常重要,并可能是最适于特定药物制剂的形式。

[0112] 类胡萝卜素,特别是虾青素的抗氧化机理,包括单线态氧猝灭、直接自由基清除和脂质过氧化链断裂。类胡萝卜素的多烯链吸收单线态氧的激发能,通过沿链发生离域而有效地稳定能量转移,并将能量作为热消散至局部环境。从三重线态叶绿素(在植物中)或其它卟啉和原卟啉(在哺乳动物中)至类胡萝卜素的能量转移比到氧以形成高度反应性和破坏性单线态氧(1O_2)的可供选择的能量转移更容易发生。类胡萝卜素还可以接受来自单

线态氧的可能在原位形成的激发能,并再次将能量作为热消散至局部环境。这种单线态氧猝灭能力在心脏局部缺血、黄斑变性、卟啉症和单线态氧的产生具有破坏作用的其它病症中具有重要的意义。在物理猝灭机理中,类胡萝卜素分子可以再生(最常见)或丧失。类胡萝卜素还是优异的链断裂抗氧化剂,这是一种在抑制脂质过氧化中重要的机理。虾青素可以给不稳定的多不饱和脂肪酸(PUFA)自由基贡献氢(H),阻止链反应。过氧自由基还可以通过加到类胡萝卜素的多烯链而成为脂质过氧化物链终止的直接原因。适宜剂量的虾青素已显示出可完全抑制脂质体系统中的过氧自由基链反应。虾青素与维生素E共享这种单线态氧猝灭和直接自由基清除的双重抗氧化防御系统,并在大部分情况(特别在体内低氧张力下)下优于维生素E作为自由基清除剂和单线态氧物理猝灭剂。

[0113] 类胡萝卜素,特别是虾青素,是有效的直接自由基清除剂和单线态氧猝灭剂,具有用于抑制或改善再灌注损伤的治疗剂的所有期望的性质。合成具有“软药物”性能(即衍生形式的活性),具有与前体部分连接的生理学相关的可裂解键的新类胡萝卜素衍生物可以在血浆和实体器官中产生显著水平的游离类胡萝卜素。在非酯化的游离虾青素的情况下,这是一个特别有用的实施方案(以下非酯化的游离虾青素特有的特征):

[0114] ●天然形式脂溶;可以改造以变得更具水溶性

[0115] ●分子量为597道尔顿[大小<60道尔顿(Da),容易穿过血脑屏障或BBB]

[0116] ●类胡萝卜素特征性的长多烯链,在单线态氧猝灭和脂质过氧化链断裂中有效

[0117] ●对哺乳动物无维生素A原活性(消除人维生素A过多和类维生素A毒性的顾虑)。

[0118] 作为有效的单线态氧猝灭剂和直接自由基清除剂(特别是超氧化物阴离子)的抗氧化剂的给药应该通过影响纤维发生途径早期肝星形细胞的活化来限制肝纤维化和进展成肝硬化。因此,通过施用有效的抗氧化剂来降低ROS水平可能在防止HSC和枯否细胞活化方面是关键。这种保护性抗氧化作用似乎扩展至潜在治疗性抗氧化剂的范围,包括水溶性(例如维生素C、谷胱甘肽、白藜芦醇)和亲脂性(例如维生素E、 β -胡萝卜素、虾青素)活性剂。因此,水溶性和亲脂性活性剂合成组合的共同抗氧化剂衍生物策略是特别有用的实施方案。

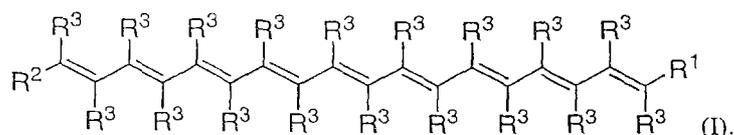
[0119] 一般将维生素E看作参照抗氧化剂。与维生素E相比,类胡萝卜素更有效地猝灭在均匀的有机溶剂和脂质体系统中的单线态氧。它们在脂质体系统中也是更好的链断裂抗氧化剂。已证实它们在体内的功效和效力增加。它们在低氧张力和低浓度下特别有效,这使它们成为局部缺血是组织损伤和病理的重要部分的疾病状况中特别有效的药剂。这些类胡萝卜素在口服之后还具有对肝的天然向性。因此,类胡萝卜素的治疗给药应该在限制纤维变性方面提供比维生素E更大的益处。

[0120] 与使用某些类胡萝卜素和类胡萝卜素结构类似物有关的问题包括:(1)在天然和合成来源中提供的复杂的异构体混合物,包括非类胡萝卜素污染物,导致诸如FDA的机构所要求的安全性和效力试验高代价的增加;(2)对治疗对象给药后生物利用度有限;和(3)区别诱导细胞色素P450酶(这种酶家族表现出种特异性差别,在将动物研究外推到人研究时必须考虑)。

[0121] 在一个实施方案中,母体类胡萝卜素可以具有任何天然存在的类胡萝卜素的结构。可以用作母体化合物的天然存在的类胡萝卜素的某些实例如图1所示。

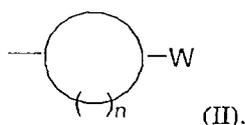
[0122] 在某些实施方案中,所述类胡萝卜素衍生物可以包括具有结构 (I) 的化合物:

[0123]



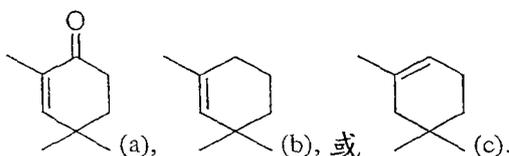
[0124] 各个 R^3 可以独立地为氢、甲基、烷基、链烯基或芳族取代基。 R^1 和 R^2 可以独立地为 H、具有至少一个取代基的无环烯烃或者具有通式结构 (II) 的具有至少一个取代基的环:

[0125]



[0126] 其中 n 可以介于 4-10 个碳原子之间。 W 为所述取代基。取代基可以至少部分亲水。亲水取代基可以有助于增加类胡萝卜素衍生物的水溶性。在某些实施方案中,类胡萝卜素衍生物可以至少部分水溶。所述环可以包括至少一个手性中心。所述无环烯烃可以包括至少一个手性中心。所述环可以包括至少一个不饱和度。在某些环实施方案中,所述的环可以是芳族的。所述环可以包括取代基。取代基可以是亲水性的。在某些实施方案中,所述环可以包括,例如 (a)、(b) 或 (c):

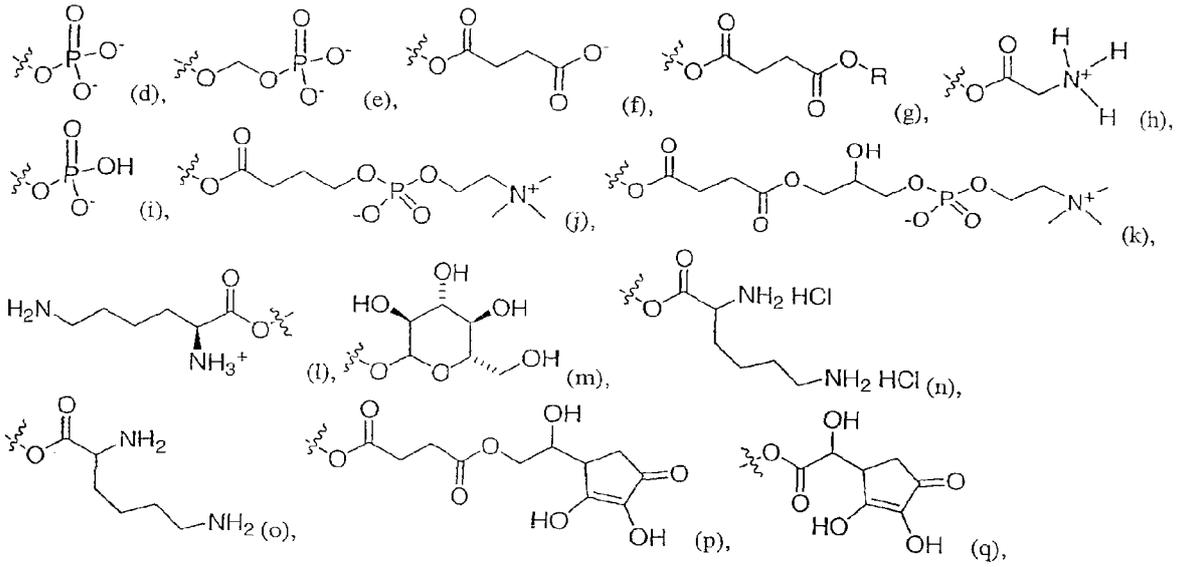
[0127]



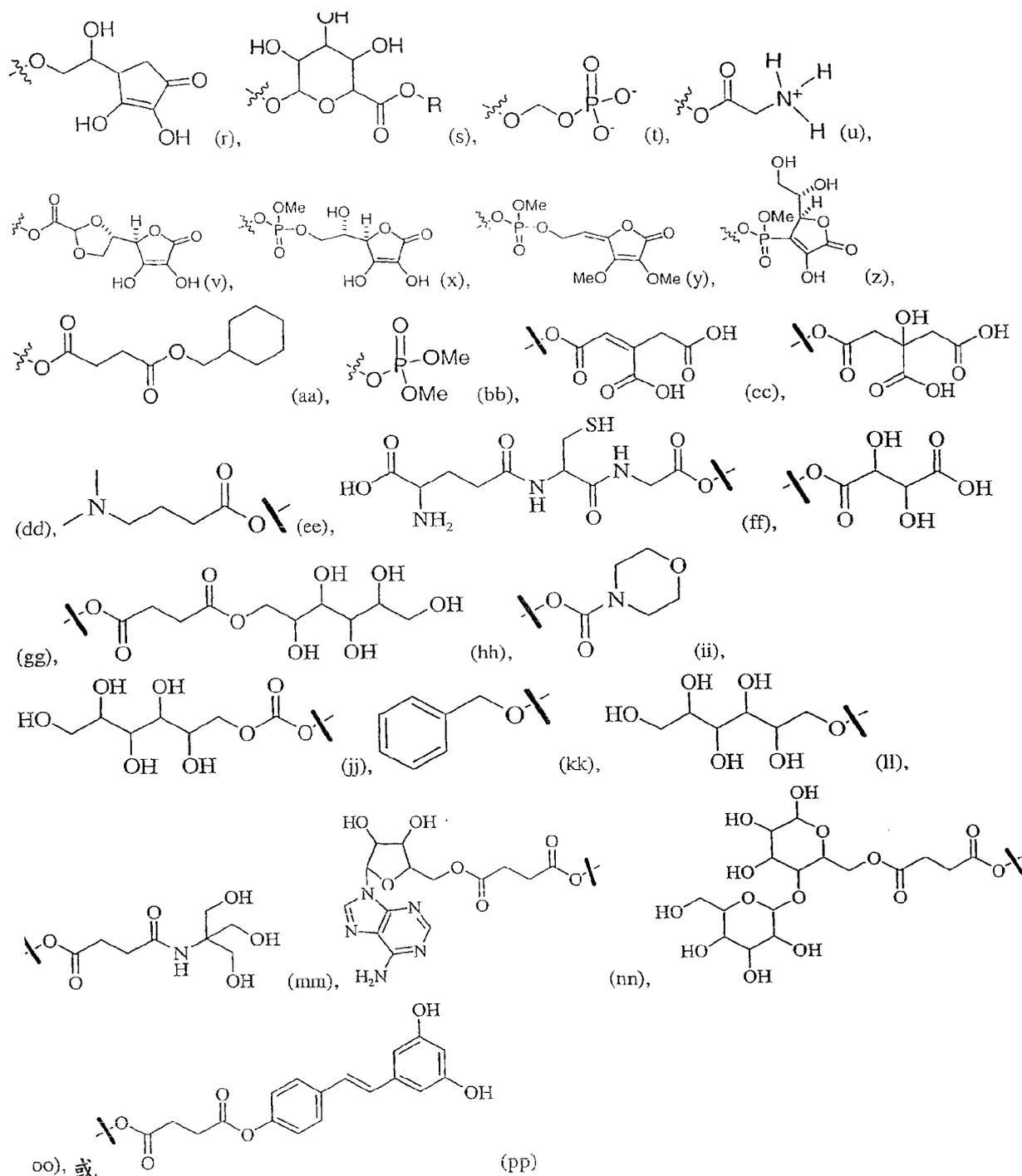
[0128] 在某些实施方案中,取代基可以包括,例如羧酸、氨基酸、酯、链烷醇、胺、磷酸酯、琥珀酸酯、氨基乙酸酯、醚、葡糖苷、糖或羧酸盐。

[0129] 在某些实施方案中,各个取代基 $-W$ 可以独立地包括 $-XR$ 。各个 X 可以独立地包括 O、N 或 S。在某些实施方案中,各个取代基 $-W$ 可以独立地包含氨基酸、酯、氨基甲酸酯、酰胺、碳酸酯、醇、磷酸酯或磺酸酯。在某些取代基实施方案中,取代基可以包括,例如 (d)-(pp):

[0130]



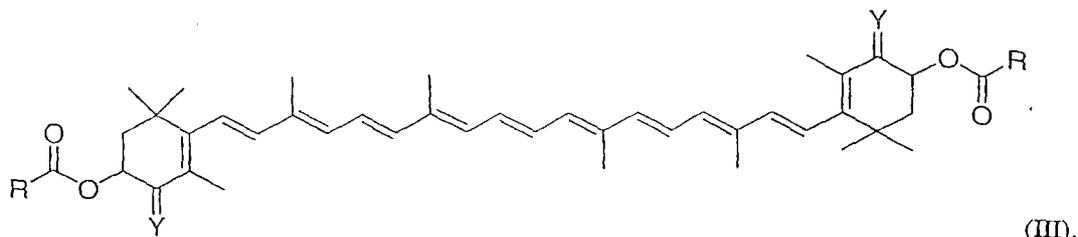
[0131]



[0132] 其中各个R例如独立地为-烷基-NR₃⁺、-芳族-NR₃⁺、-烷基-CO₂⁻、-芳族-CO₂⁻、-氨基酸-NH₃⁺、-磷酸化氨基酸-NH₃⁺、聚乙二醇、右旋糖酐、H、烷基或芳基。在某些实施方案中，取代基可以包括(d)-(pp)的任何组合。在某些实施方案中，带负电的取代基可以包括碱金属，一种金属或不同碱金属的组合（在有超过一个带负电的取代基的实施方案中），作为抗衡离子。碱金属可以包括但不限于钠、钾和/或锂。

[0133] 虽然以上的结构和随后的结构描述E构型的烯烃，但这不应被看作是限定。本文所讨论的化合物可以包括烯烃为Z构型的实施方案或者包括在相同的分子内Z和E构型组合的烯烃。本文所述的化合物可以在Z和E构型之间天然转化，和/或在两种构型之间平衡存在。

[0134] 在一个实施方案中,化合物可以包括具有结构 (III) 的类胡萝卜素衍生物:

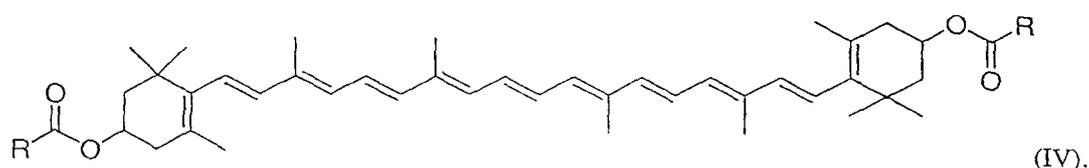


[0135] 各个 Y 可以独立地为 O 或 H₂。各个 R 可以独立地为 OR¹ 或 R¹。

[0136] 各个 R¹ 可以独立地为 -烷基 -NR₃²⁺、-芳族 -NR₃²⁺、-烷基 -CO₂⁻、-芳族 -CO₂⁻、-氨基酸 -NH₃⁺、-磷酸化氨基酸 -NH₃⁺、聚乙二醇、右旋糖酐、H、烷基、肽、聚赖氨酸或芳基。此外,各个 R² 可以独立地为 H、烷基或芳基。所述类胡萝卜素衍生物可以包括至少一个手性中心。

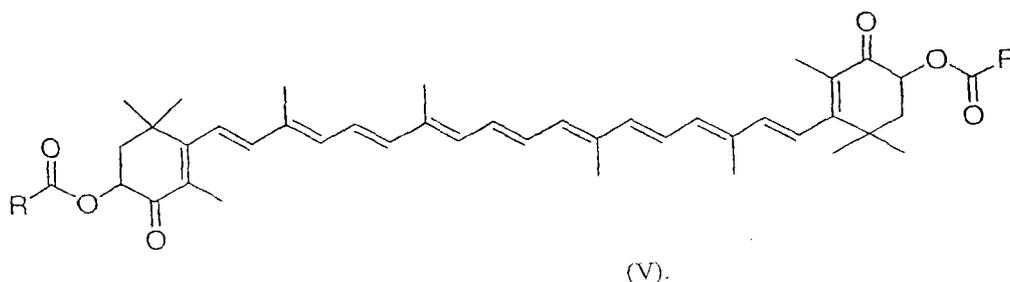
[0137] 在一个特定的实施方案中,其中 Y 为 H₂,所述类胡萝卜素衍生物具有结构 (IV)

[0138]



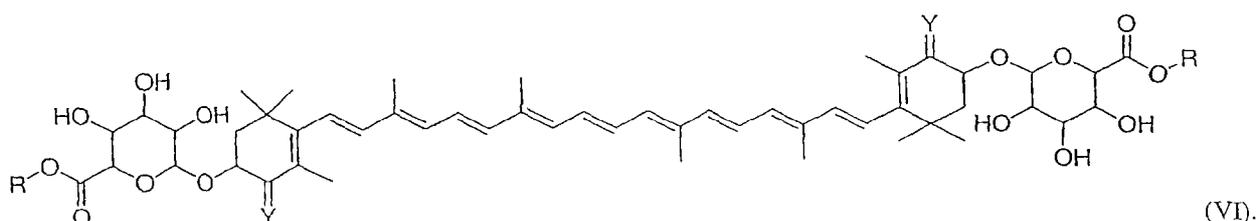
[0139] 在一个特定的实施方案中,其中 Y 为 O,所述类胡萝卜素衍生物具有结构 (V)

[0140]



[0141] 在一个实施方案中,化合物可以包括具有结构 (VI) 的类胡萝卜素衍生物

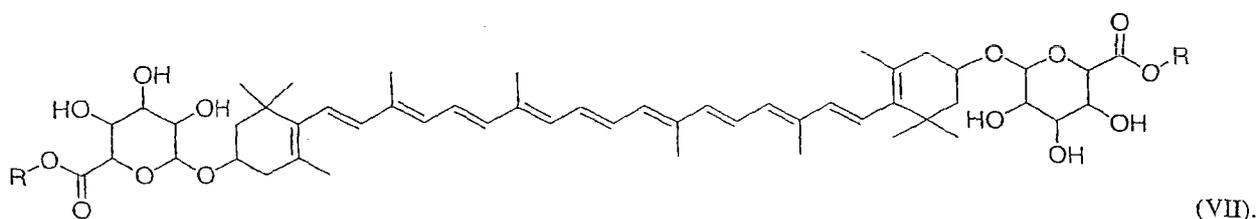
[0142]



[0143] 各个 Y 可以独立地为 O 或 H₂。各个 R 可以独立地为 H、烷基或芳基。所述类胡萝卜素衍生物可以包括至少一个手性中心。

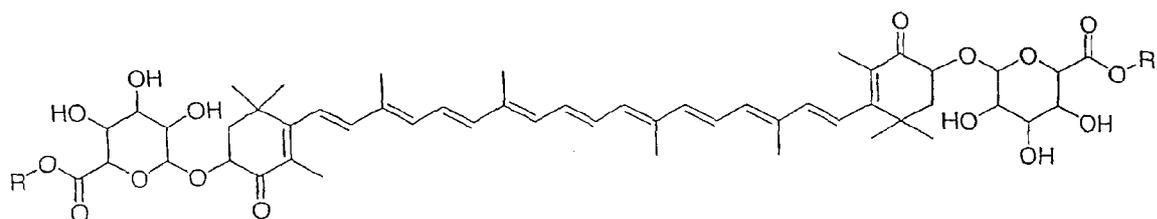
[0144] 在一个特定的实施方案中,Y 可以为 H₂,所述类胡萝卜素衍生物具有结构 (VII)

[0145]



[0146] 在 Y 为 O 的一个特定的实施方案中,类胡萝卜素衍生物具有结构 (VIII)

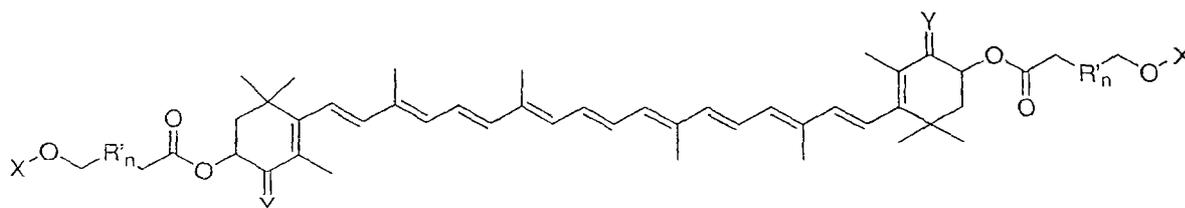
[0147]



(VIII).

[0148] 在一个实施方案中,化合物可以包括具有结构 (IX) 的类胡萝卜素衍生物:

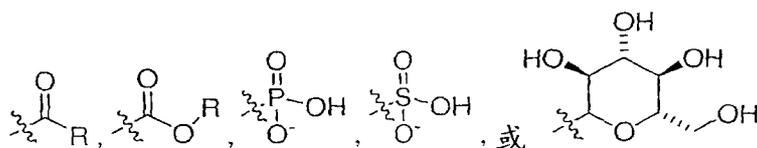
[0149]



(IX).

[0150] 各个 Y 可以独立地为 O 或 H₂。各个 R' 可以为 CH₂。n 可以为 1-9。各个 X 可以独立地为

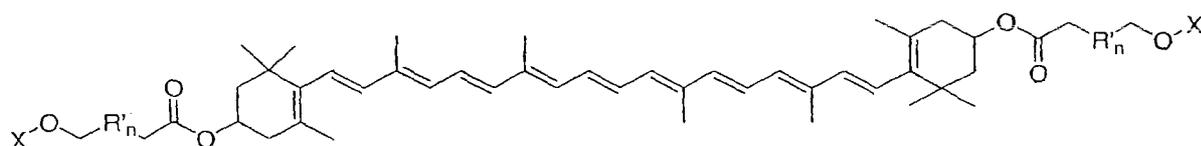
[0151]



[0152] 各个 R 可以独立地为 -烷基 -NR₃⁺、-芳族 -NR₃⁺、-烷基 -CO₂⁻、-芳族 -CO₂⁻、-氨基酸 -NH₃⁺、-磷酸化氨基酸 -NH₃⁺、聚乙二醇、右旋糖酐、H、烷基或芳基。各个 R¹ 可以独立地为 H、烷基或芳基。所述类胡萝卜素衍生物可以包括至少一个手性中心。

[0153] 在 Y 为 H₂ 的一个特定的实施方案中,所述类胡萝卜素衍生物具有结构 (X)

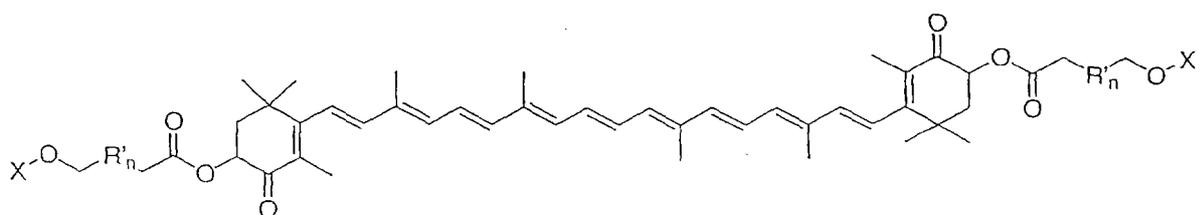
[0154]



(X).

[0155] 在 Y 为 O 的一个特定的实施方案中,所述类胡萝卜素衍生物具有结构 (XI)

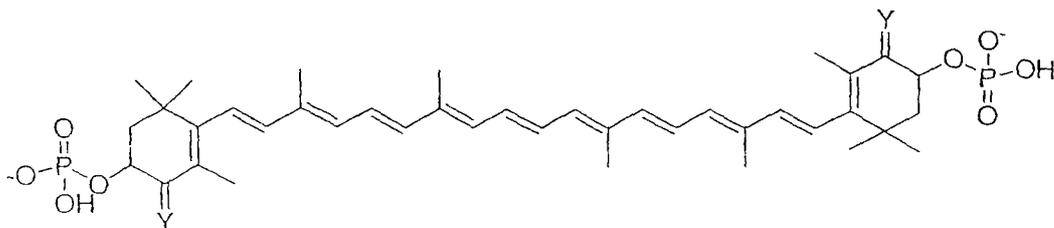
[0156]



(XI).

[0157] 在一个实施方案中,化合物可以包括具有结构 (XII) 的类胡萝卜素衍生物,

[0158]

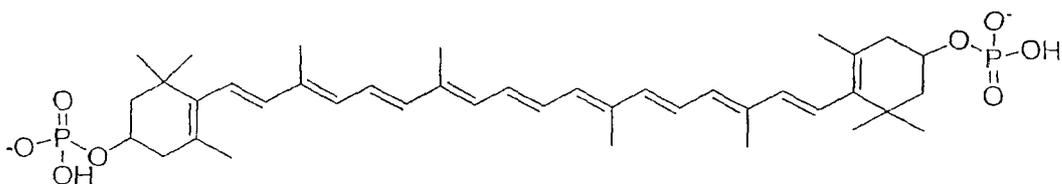


(XII).

[0159] 各个Y可以独立地为O或H₂。所述类胡萝卜素衍生物可以包括至少一个手性中心。

[0160] 在一个特定的实施方案中，Y可以为H₂，所述类胡萝卜素衍生物具有结构(XIII)

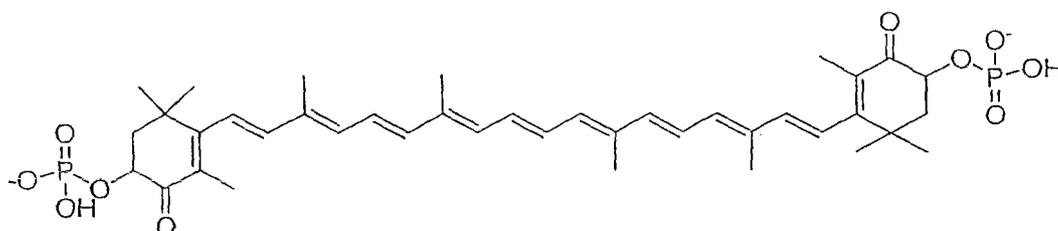
[0161]



(XIII).

[0162] 在Y为O的一个特定的实施方案中，所述类胡萝卜素衍生物具有结构(XIV)

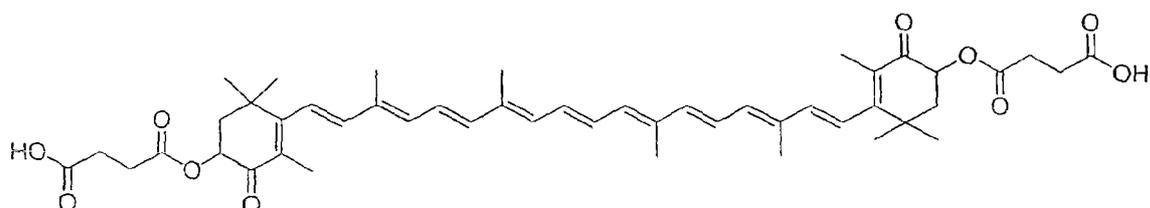
[0163]



(XIV).

[0164] 在某些实施方案中，化合物可以包括具有结构(XV)的二琥珀酸酯类胡萝卜素衍生物

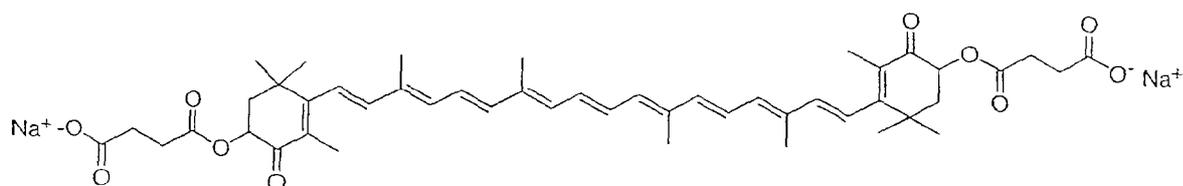
[0165]



(XV).

[0166] 在某些实施方案中，化合物可以包括具有结构(XVI)的二钠盐二琥珀酸酯类胡萝卜素衍生物

[0167]

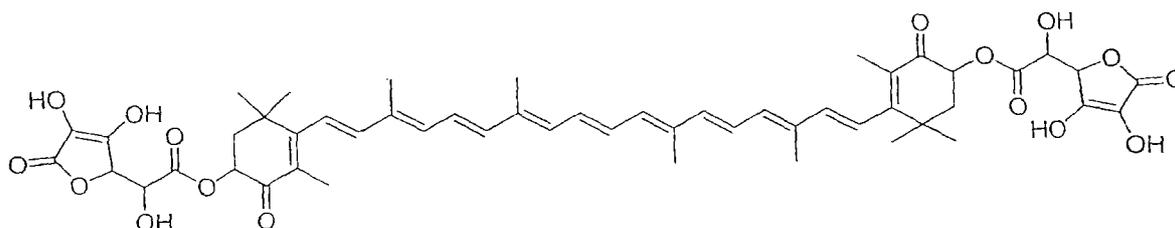


(XVI).

[0168] 在某些实施方案中，化合物可以包括具有与类胡萝卜素偶联的共同抗氧化剂(co-antioxidant)，特别是一个或多个维生素C类似物(即L抗坏血酸)的类胡萝卜素衍生物。某些实施方案可以包括与类胡萝卜素偶联的维生素C的羧酸和/或羧酸酯衍生物(例

如结构 (XVII)。

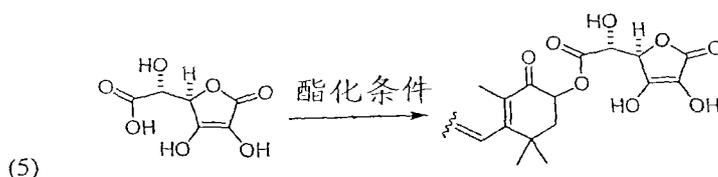
[0169]



(XVII).

[0170] Carbohydr. Res. 1978, 60, 251-258 公开如 EQN. 5 所述抗坏血酸 C-6 位的氧化

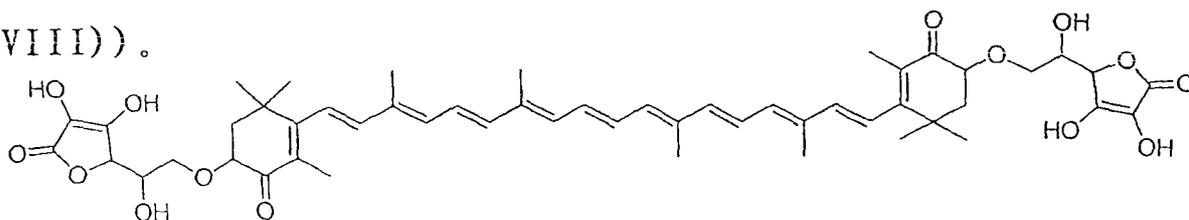
[0171]



[0172] 某些实施方案可以包括与类胡萝卜素偶联的维生素 C 和 / 或维生素 C 类似物。维生素 C 可以通过醚键与类胡萝卜素偶联 (例如结构

[0173]

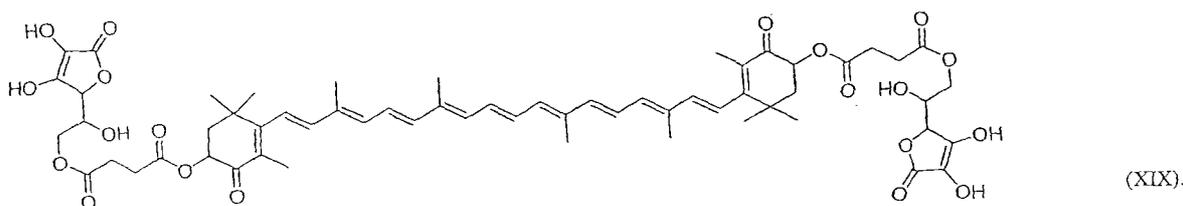
(XVIII))。



(XVIII).

[0174] 某些实施方案可以包括与类胡萝卜素偶联的维生素 C 二琥珀酸酯类似物 (例如结构 (XIX))。

[0175]

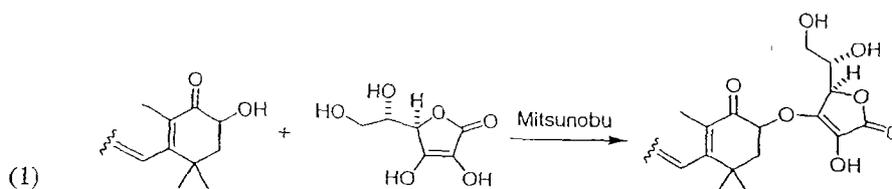


(XIX).

[0176] 某些实施方案可以包括类胡萝卜素和 / 或类胡萝卜素衍生物与共同抗氧化剂, 特别是维生素 C 和 / 或维生素 C 类似物组合的溶液或药物制剂。药物制剂可以包括大约 2 : 1 比率的维生素 C 和类胡萝卜素。

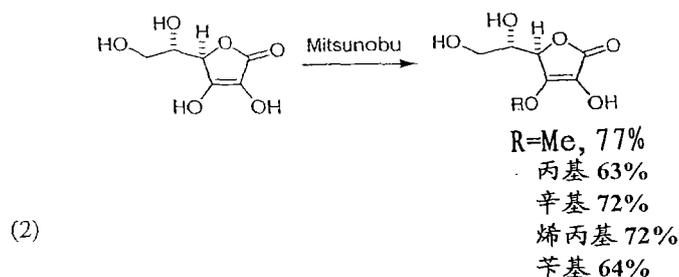
[0177] 在某些实施方案中, 可以将类胡萝卜素 (例如虾青素) 与维生素 C 偶联形成醚键。醚键可以用如 EQN. 1 所述的 Mitsunobu 反应来形成。

[0178]



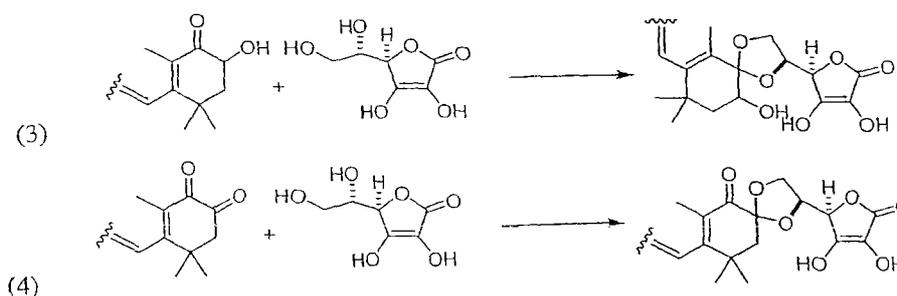
[0179] 在某些实施方案中,维生素 C 可以被选择性酯化。维生素 C 可以在 C-3 位被选择性酯化(例如 EQN. 2)。J. Org. Chem. 2000, 65, 911-913 公开用伯醇在未受保护的抗坏血酸的 C-3 位进行选择性酯化。

[0180]



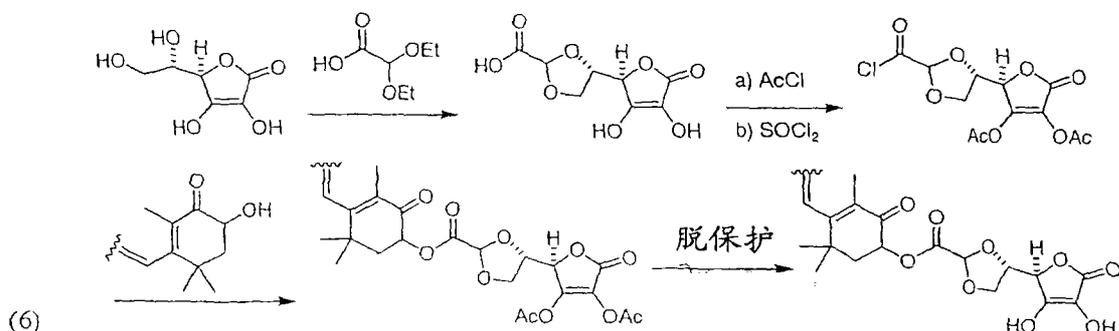
[0181] 在某些实施方案中,可以将类胡萝卜素与维生素 C 偶联。可以在 C-6, C-5 二醇位置将维生素 C 偶联到类胡萝卜素,如 EQNS. 3 和 4 所述,形成缩醛。

[0182]



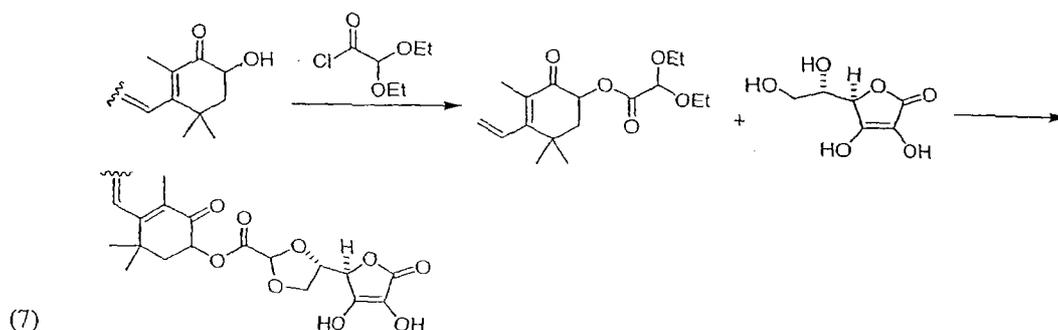
[0183] 在某些实施方案中,可以用二羟乙酸接头将类胡萝卜素偶联到水溶性部分(例如维生素 C),如 EQN. 6 所述。Tetrahedron 1989, 22, 6987-6998 公开类似的缩醛形成

[0184]



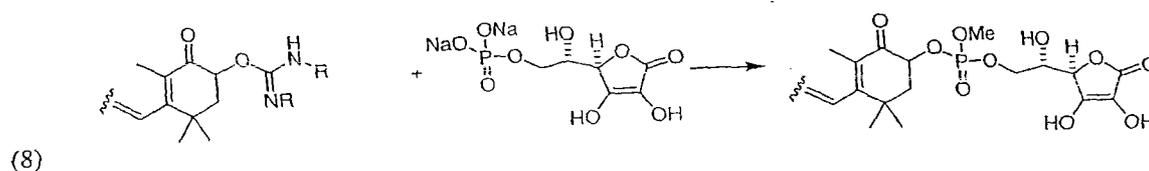
[0185] 在某些实施方案中,可以用二羟乙酸接头将类胡萝卜素偶联到水溶性部分(例如维生素 C),如 EQN. 7 所述。J. Med. Chem. 1988, 31, 1363-1368 公开二羟乙酸氯化物。

[0186]



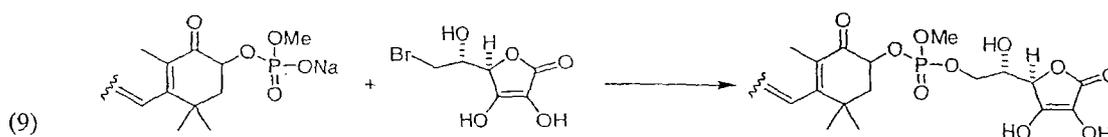
[0187] 在某些实施方案中,可以用磷酸酯接头将类胡萝卜素偶联到水溶性部分(例如维生素 C),如 EQN. 8 所述。Carbohydr. Res. 1988, 176, 73-78 公开 L- 抗坏血酸 6- 磷酸酯。

[0188]



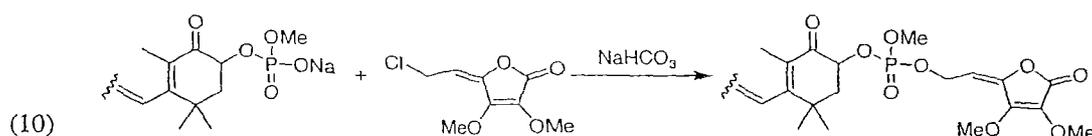
[0189] 在某些实施方案中,可以用磷酸酯接头将类胡萝卜素偶联到水溶性部分(例如维生素 C),如 EQN. 9 所述。Carbohydr. Res. 1979, 68, 313-319 公开维生素 C 的 6- 溴代衍生物。Carbohydr. Res. 1988, 176, 73-78 公开维生素 C 的 6- 溴代衍生物与磷酸酯的反应。

[0190]



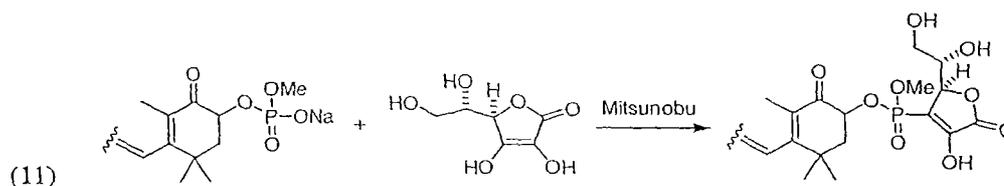
[0191] 在某些实施方案中,可以用磷酸酯接头将类胡萝卜素偶联到水溶性部分(例如维生素 C),如 EQN. 10 所述。J. Med. Chem. 2001, 44, 1749-1757 和 J. Med. Chem. 2001, 44, 3710-3720 公开烯丙基氯衍生物和它与亲核试剂,包括磷酸酯在弱碱性条件下的反应。

[0192]



[0193] 在某些实施方案中,可以用磷酸酯接头将类胡萝卜素偶联到水溶性部分(例如维生素 C),如 EQN. 11 所述。可以用伯醇在未受保护的抗坏血酸的 C-3 位进行选择性酯化而将维生素 C 偶联到类胡萝卜素。

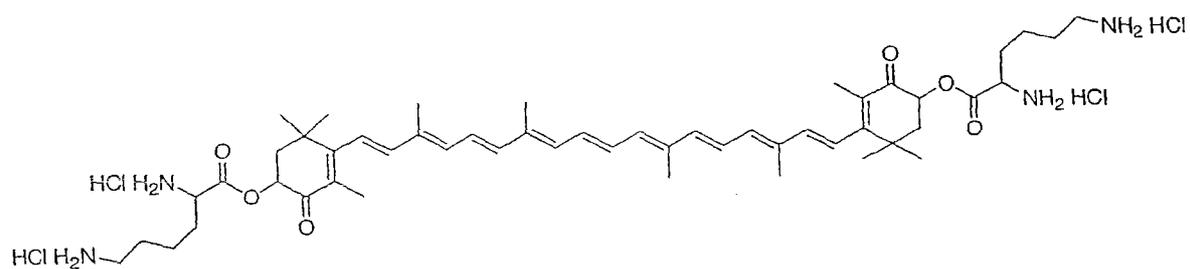
[0194]



[0195] 在某些实施方案中,化合物可以包括含有偶联到类胡萝卜素上的一个或多个氨基酸(例如赖氨酸)和/或氨基酸类似物(例如赖氨酸盐酸盐)的类胡萝卜素衍生物[例如

结构 (XX)]。

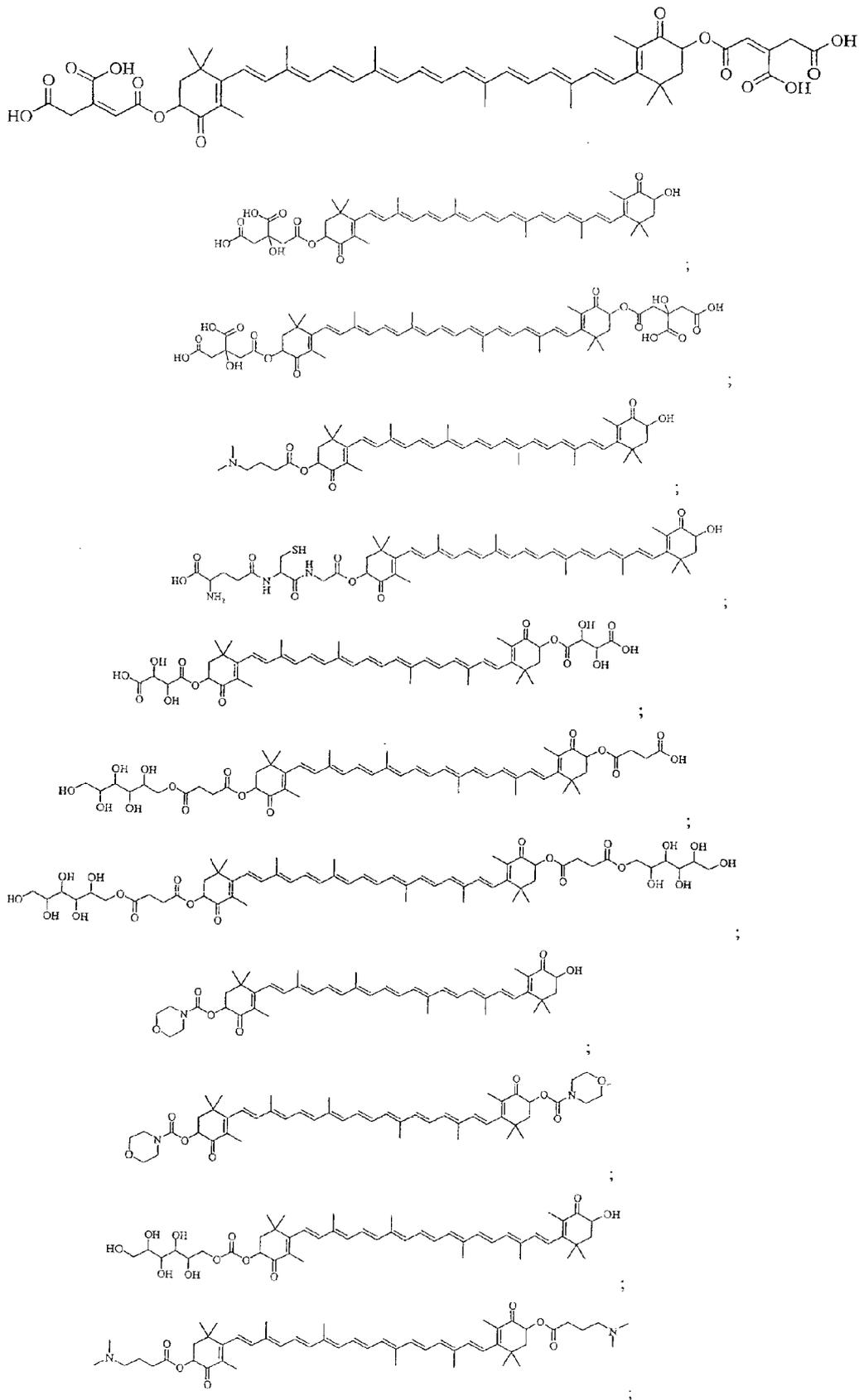
[0196]



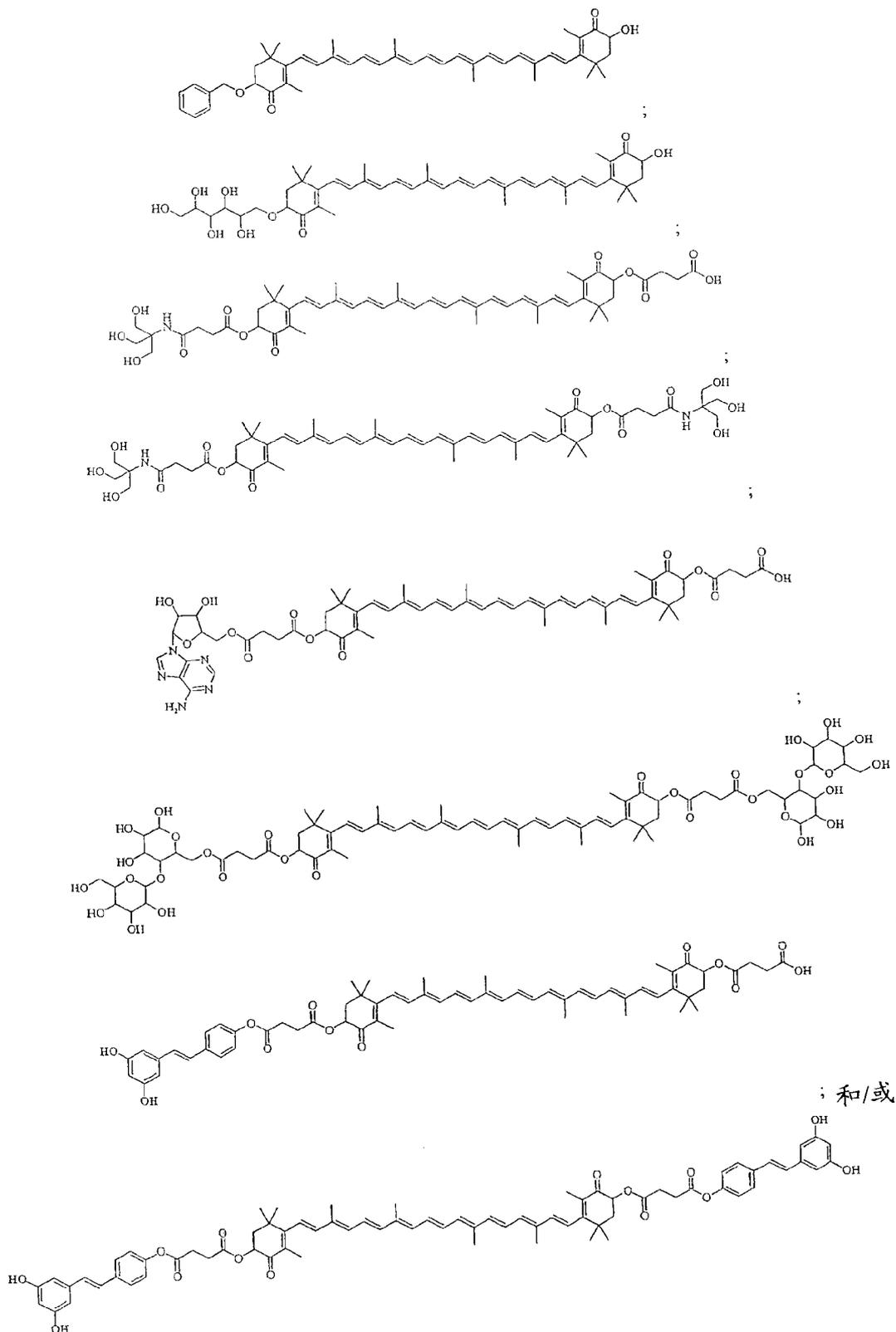
(XX).

[0197] 在某些实施方案中,类胡萝卜素衍生物可以包括:

[0198]



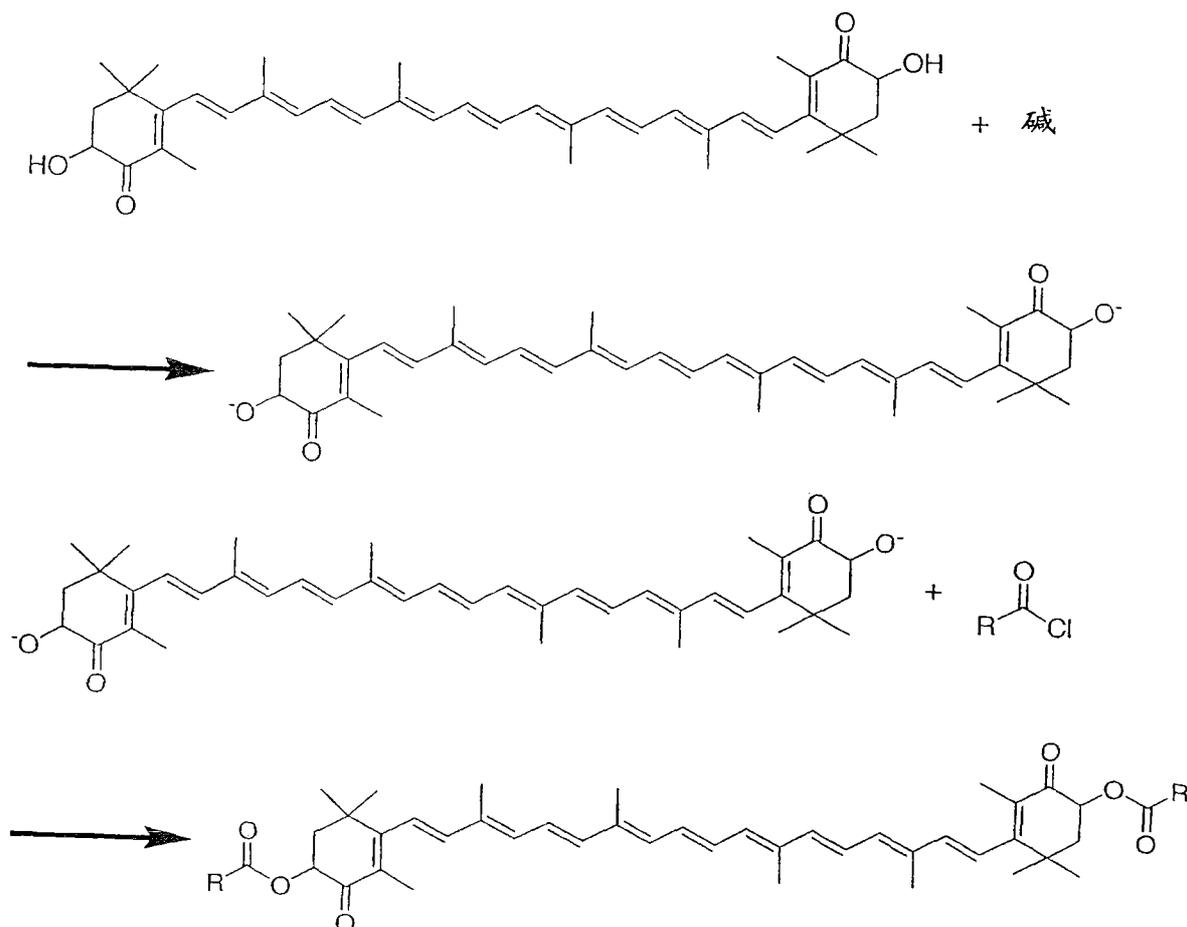
[0200]



[0201] 在一个实施方案中,所述类胡萝卜素衍生物可以由天然存在的类胡萝卜素合成。所述类胡萝卜素可以包括图1中所述的结构2A-2E。在某些实施方案中,类胡萝卜素衍生物

可以由包含一个或多个醇取代基的天然存在的类胡萝卜素合成。在其它实施方案中,所述类胡萝卜素衍生物可以由包含一个或多个醇取代基的天然存在的类胡萝卜素的衍生物合成。所述合成可以产生单一立体异构体。所述合成可以产生类胡萝卜素衍生物的唯一几何异构体。所述合成/合成流程可以包括在母体类胡萝卜素上进行的任何在先纯化或分离步骤。实例可以包括但不限于 3S,3' S 全-E 类胡萝卜素衍生物,其中母体类胡萝卜素为虾青素。合成流程可以包括对类胡萝卜素和/或取代基前体的不同官能团进行保护,然后脱保护。可以用碱将醇脱质子。可以使脱质子的醇与具有好的离去基团的取代基前体反应。所述的碱可以包括本领域技术人员已知的任何非亲核碱,例如二甲基氨基吡啶。脱质子的醇可以用作亲核试剂与取代基前体反应置换离去基团。离去基团可以包括但不限于 Cl、Br、甲苯磺酰基、对溴苯磺酰基、甲磺酰基或三氟甲磺酰基。这些仅是可以使用的离去基团的几个实例,还有更多是本领域技术人员已知并且显而易见的。在某些实施方案中,取决于所用的离去基团,可能甚至不必将醇脱质子。在其它实例中,离去基团可以是内在的,并可以随后包括在类胡萝卜素衍生物最终的结构中,一个非限制性的实例可以包括酐或应变环醚。例如,可以使脱质子的醇与琥珀酸酐反应。在一个实施方案中,可以进一步将虾青素的二琥珀酸酯转化成二钠盐。制备所述的某些特定实施方案的合成流程的实例在实施例部分作了描述。以下所述的实例是关于制备类胡萝卜素衍生物的合成流程的一个一般性非限制性实例。

[0202]



[0203] 局部缺血-再灌注 (I/R) 损伤:病理生理特征

[0204] 再灌注局部缺血心肌导致处于危险的组织发生明显的细胞和局部改变,从而使由

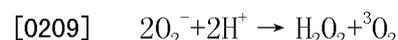
局部缺血侵害产生的损伤恶化。具体而言,再灌注后发生血管和微血管损伤、内皮机能障碍、细胞坏死加速和粒细胞活化。

[0205] 血管和微血管损伤由补体活化,循环和局部 C- 反应蛋白与暴露的细胞上的 C1q 和磷酸胆碱相互作用形成膜攻击复合物 (MAC), 然后发生细胞死亡和内皮通透性增加, 受影响的内皮和活化的白细胞产生超氧化物阴离子 (O_2^-), 微栓子、细胞因子释放 (特别是 IL-6), 血小板活化伴随 IIbIIIa 受体活化, 然后释放 ADP 和 5- 羟色胺而导致。然后发生内皮机能障碍, 随后由机能障碍的内皮产生超氧化物阴离子, 进一步破坏受影响的内皮, 形成正反馈循环。已表明局部缺血 - 再灌注导致脉管系统的早期和严重损伤, 从而进一步危害肌细胞存活。粒细胞活化也在再灌注期间发生。这种细胞系的活化和脱粒导致释放髓过氧化物酶 (MPO)、弹性蛋白酶、蛋白酶和氧衍生的自由基和非自由基种类 (最重要的是在“呼吸爆发”之后的超氧化物阴离子、次氯酸盐、单线态氧和过氧化氢)。氧衍生的自由基和非自由基 (例如单线态氧) 种类涉及许多与局部缺血和再灌注有关的损害, 且已清楚地表明脂质过氧化是再灌注的后果, 如由硫代巴比妥酸活性物质 (TBARS)、丙二醛 (MDA) 或共轭二烯形成来测定。

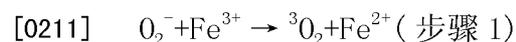
[0206] 冠状血管内皮和心肌本身局部缺血损伤创建有利于产生能够损害组织的自由基和其它非自由基氧衍生种类的条件, 其在此总称为活性氧种类 (“ROS”)。人的基于内皮的黄嘌呤脱氢酶 - 黄嘌呤氧化酶系统是超氧化物阴离子 (O_2^-) 的一个来源。人心肌缺乏这种酶系统。在健康组织中, 90% 的酶作为脱氢酶 (D) 形式存在; 它在局部缺血组织中转化成氧化酶 (O) 形式。(O)- 形式, 使用分子氧为电子受体, 在冠脉内皮中产生超氧化物阴离子 O_2^- 。从而可获得超氧化物阴离子以在局部环境中制造其它组织损害。超氧化物阴离子本身不是生物系统中最具反应性或破坏性的自由基种类。但是, 它是某些寿命较短和较长的、更具破坏性的自由基和 / 或 ROS 如羟基基团、过氧化氢、单线态氧和过氧自由基的来源。因此, 可以认为它是 I/R 损伤中的“关键”基团。以下显示了形成这些重要氧化剂的超氧化物自由基的生物反应:

[0207] (1) 超氧化物阴离子可以接受单一电子 (“一价还原”), 产生过氧化物 (O_2^{-2})。然后过氧化物偶联 2 个质子形成过氧化氢 (H_2O_2)。 H_2O_2 容易通过细胞膜扩散, 且不能容易地从细胞质中排除, 其中它可以与细胞组分反应或活化中心炎性级联如核因子 kappa-B (NF-kappa-B), 所述级联也涉及 I/R 损伤中的其它炎性损害。

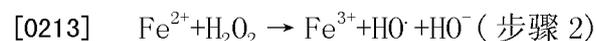
[0208] (2) 超氧化物阴离子一般自身发生反应产生过氧化氢和氧 (“歧化”)。超氧化物歧化可以是自发的或由酶超氧化物歧化酶 (SOD) 催化, 它是一种导致形成氧化 SOD 的反应:



[0210] (3) 超氧化物阴离子可以用作还原剂, 并给金属阳离子提供单一电子 (“一价还原”)。例如, 在以下的两步法中, 高铁 (Fe^{3+}) 被还原, 然后用作催化剂以将过氧化氢 (H_2O_2) 转化成羟基自由基 (HO^\cdot)。



[0212] 然后, 还原的金属阳离子亚铁 (Fe^{2+}) 催化断裂过氧化氢的氧 - 氧键。这产生一个羟基自由基 (HO^\cdot) 和一个氢氧化物离子 (HO^-)。所述反应已知为 Fenton 反应, 其在再灌注损伤中特别重要, 其中铁和 / 或铜区室化丧失 (一般通过红细胞 RBC 溶血):



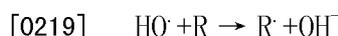
[0214] 羟基自由基容易穿过细胞膜。羟基自由基损害是“扩散速率限制的”，也就是说，损害可能施加的 3 维距离与基团的扩散速率有关。羟基自由基是一种特别具有毒性的 ROS。羟基自由基可以加到有机底物（由以下反应中的 R 表示），并形成本身为自由基的羟基化加合物。在局部缺血 - 再灌注损伤的情况下，内皮和肌细胞膜中的多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 对羟基自由基损害特别敏感：



[0216] 以上形成的加合物还可以在金属阳离子或分子氧存在下氧化。这形成氧化的稳定产物。在第一种情况下，额外的电子转移至金属离子，而在第二种情况下转移至氧（形成超氧化物）。两种加合物自由基还可以彼此反应形成氧化的、稳定的和交联的产物和水。这是膜蛋白氧化中的一个重要过程：

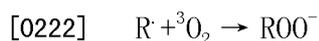


[0218] 此外，羟基自由基可以通过从这些分子中抽取电子而氧化有机底物：

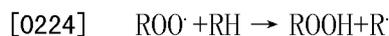


[0220] 氧化底物 (R) 为自由基。这些自由基可以在链式反应中与其它分子反应。

[0221] 类胡萝卜素是特别有效的脂质 - 过氧化链断裂剂。在一种情况下，与基态氧的反应产生过氧化自由基 (ROO[•])：



[0223] 过氧化自由基非常具有活性。它们可与其它有机底物在链式反应中反应：



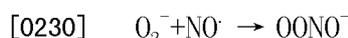
[0225] 链式反应在 PUFAs 和其它敏感性膜脂质的氧化损害中是常见的。

[0226] 氧消耗率的测定是链式反应的开始和进行的一个指示。重要的是注意到在脂质体模型系统中，适宜剂量的非酯化的游离虾青素能够完全抑制链式反应和伴随的氧消耗。

[0227] (4) 超氧化物阴离子可以与羟基自由基 (HO[•]) 反应形成单线态氧 (¹O₂*)。单线态氧不是一种自由基，但在心脏生物系统中具有高度活性和破坏性。单线态氧涉及膜结合蛋白如 5' - 核苷酸酶的破坏，所述酶在维持和恢复血管扩张化合物如腺苷的局部浓度中具有重要性（表现对人梗塞大小的减小有效）：



[0229] (5) 超氧化物阴离子还可以与自由基氧化氮 (NO[•]) 反应，产生过氧亚硝酸 (OONO⁻)。过氧亚硝酸是生物系统中具有高度活性和破坏性的分子。



[0231] 多形核白细胞 (PMNs)，特别是嗜中性白细胞，和活化的巨噬细胞是氧衍生的自由基和非自由基种类的丰富来源。位于吞噬细胞细胞膜中的 NADPH 氧化酶系统是刺激后自由基的重要来源。PMNs 和活化的巨噬细胞快速地消耗“呼吸爆发”中的氧，并将其转化成超氧化物阴离子，然后转化成过氧化氢 (H₂O₂)，以及大量的单线态氧。PMNs 还是次氯酸盐 - 另一种破坏性活性氧种类的来源。虽然在感染中在吞噬细胞活性中重要，但在局部缺血和再灌注期间的局部环境中，这些 ROS 攻击局部区域中的正常和受损的宿主细胞而发生进一步的细胞损伤。

[0232] 嗜中性白细胞是延长心肌局部缺血之后再灌注期间的氧自由基的一个主要来源，特别是在实验性梗塞的动物模型中。许多先前的研究已证实在局部缺血 - 再灌注期间形成

氧自由基,但很少指出这种自由基在体内的来源或已检查了延长的心肌局部缺血中的自由基产生。嗜中性白细胞在先前局部缺血的组织中大量募集,并被认为通过局部释放多种介质,主要是氧自由基来诱导损伤。先前,活化的嗜中性白细胞对再灌注损伤和潜在心肌抢救的贡献仍不清楚。已提出一种方法用于检测自由基,特别是超氧化物阴离子,这种方法不干扰自由基产生的血源机理。

[0233] 开胸和闭胸的狗经历主动脉和冠脉窦导管插入 (Dutilio 等人,2001)。不注入化学物质。取而代之,将血液抽至预填充自旋阱的注射器,并用电子顺磁共振 (EPR) 光谱法分析。在冠脉闭塞 90 分钟后,氧自由基的经心浓度在再流动后 10 分钟升高数倍,并保持至少 1 小时明显升高。自由基大部分来源于嗜中性白细胞,特别是超氧化物阴离子。这些自由基在施用以下物质后表现出明显降低:(1) 嗜中性白细胞 NADPH-氧化酶抑制剂和(2) 抗嗜中性白细胞 CD18-粘附分子的单克隆抗体 (R15.7)。设计第一种干预用于减少嗜中性白细胞呼吸爆发,而第二种用于减少嗜中性白细胞募集至再灌注损伤部位。通过单克隆抗体 R15.7 导致的自由基产生减少还与明显较小的梗塞大小有关,并与伴随的无再流动区域减少有关。第一次证明,活化的嗜中性白细胞是延时局部缺血后体内再灌注心脏中氧化剂的主要来源,这种现象是长久存在的,且抗嗜中性白细胞干预可以有效地防止再灌注期间氧自由基经心浓度的增加。在这些实验性梗塞的动物模型中,在冠脉闭塞之前预先存在的病理的缺乏可能过分强调嗜中性白细胞募集和活化对 I/R 损伤的促进作用;但实际上在人动脉粥样硬化的情况下,已驻留在“危险区域”的活化的巨噬细胞和活化的 T 淋巴细胞也可大大促进 I/R 损伤。

[0234] 局部缺血导致受影响区域细胞中 ATP 耗尽。在通常“泄漏”大约 5% 健康组织中加工的电子的线粒体电子转运链水平下,当呼吸链大量减少时有利于进一步泄漏部分还原的氧种类(特别是 O_2^-)。这主要在局部缺血期间发生。局部细胞环境中的净效应是从抗氧化至促氧化的氧化还原状态平衡的倾斜,同时其吸收附加的自由基危害而不造成进一步细胞损害的能力减小。

[0235] 预防局部缺血-再灌注损伤:用于先前动物和/或人试验的药理学活性剂

[0236] 在动物模型或有限的人试验中评价了以下化合物作为急性心肌梗塞 (AMI) 期间减少局部缺血-再灌注损伤和/或心肌抢救的治疗剂。大部分是生物抗氧化剂。

[0237] ● 超氧化物歧化酶(和衍生物或模拟物)

[0238] ● 过氧化氢酶

[0239] ● 谷胱甘肽和谷胱甘肽过氧化物酶

[0240] ● 黄嘌呤氧化酶抑制剂

[0241] ● 维生素 B、C、E(和衍生物)

[0242] ● 钙拮抗剂

[0243] ● ACE 抑制剂

[0244] ● 巯基硫醇化合物(特别是 N-乙酰半胱氨酸)

[0245] ● 铁螯合剂(甲磺酸去铁胺)

[0246] ● 抗炎剂(例如布洛芬)

[0247] ● 磷酸肌酸

[0248] ● N-2-巯基丙酰甘氨酸 (MPG)

[0249] ● 普罗布考（和衍生物）

[0250] ● 褪黑激素

[0251] ● 辅酶 Q-10

[0252] Singh 和印度合作者的开创性研究之前证明急性心肌梗塞人患者的内源性抗氧化剂耗尽,而补充抗氧化剂混合物和 / 或辅酶 Q10(一种有效的亲脂性抗氧化剂)单一疗法在 AMI 后 30 天有效实现心肌抢救和改善传统上硬的临床终点(例如总心源性死亡和非致命再梗塞)。AMISTAD 试验证明腺苷在三个分别的患者组中作为心肌抢救试剂的有用性。RheothRx™(一种流变试剂)也有效地作为人试验中的抢救剂,但肾毒性继发后被弃用。最近,Medicure, Inc. 在与 Duke Clinical Research Institute 合作的小型 II 期初步研究中证明维生素 B 衍生物可用于心肌抢救。因此,现在更好地理解在先前对 I/R 损伤的回顾中认识到的“翻译”问题(从实验性梗塞的动物模型中的效力至人临床效力)。但是,商业上的机会窗口仍然存在,因为尚未有药剂被特别批准用作人用抢救试剂。

[0253] 心肌局部缺血 - 再灌注损伤治疗的时间选择

[0254] 如以上讨论,早期再灌注急性心肌梗塞(主要采用药理学或手术再灌注)终止由于局部缺血导致的细胞死亡,但矛盾地导致进一步的损伤 - 最可能通过氧化机理。Horwitz 等人(1999)在 57 只狗中确定了机会窗口,在此期间抗氧化剂必须以治疗浓度存在以防止在局部缺血 90 分钟和随后再灌注 48 小时期间发生再灌注损伤。在该试验中进行的统计分析关注鉴定引起梗塞大小差别的组成员成分,并揭示治疗持续时间是主要的决定因素。如果在再灌注第 1 个小时内的任何时间开始,则大于或等于 3 小时的输注明显减小梗塞大小。Dulio 等人(2001)在犬模型中通过证明反映过氧化自由基链反应的氧消耗在再灌注后 10 分钟开始以及自由基活性在再灌注的至少第 1 小时保持升高来进一步澄清这个问题。Singh 等人(1996)先前在人患者中证明,在 MI 后平均 13 小时起始抗氧化剂治疗,并持续 28 天,则心肌抢救以及改善硬的临床终点(非致命再梗塞,死亡)是可能的。因此,具有长半衰期的血浆抗氧化剂可能特别适于这种情况,因为它们可以以负荷剂量给药,并在整个关键的 AMI 后早期(0-24 小时)在血浆中衰变。口服类胡萝卜素的血浆半衰期范围从叶黄素(“氧化的”类胡萝卜素包括虾青素、辣椒黄素、叶黄素和玉米黄质)的大约 21 小时至胡萝卜素(“炔”类胡萝卜素如番茄红素)的 222 小时。在 Horwitz 等人(1999)的试验中超氧化物歧化酶及其模拟物在人研究中的血浆抗氧化剂半衰期(7 分钟)与关于叶黄素的近 21 小时和关于胡萝卜素的近 9 天的半衰期的明显差别突出了在人 AMI 中类胡萝卜素的药代动力学优点和对抗 I/R 损伤的潜在的心脏保护作用。

[0255] 抗氧化剂在再灌注损伤中的关键评价 : 人研究

[0256] 在 Singh 等人(1994)进行的研究中,与对照患者相比表现 AMI 的患者的维生素 A、C、E 和 β -胡萝卜素平均水平明显降低。AMI 患者的脂质过氧化物明显升高。AMI 和低维生素血浆水平之间的负关系在调节这些患者的吸烟和糖尿病之后仍然明显。类似地,Levy 等人(1998)研究了 38 名 AMI 患者,他们与年龄相匹配的健康对照对象相比表现出维生素 A、E 和 β -胡萝卜素水平明显降低。在血栓溶解之后,治疗患者血清中的脂质过氧化产物明显升高。溶栓治疗还导致血浆维生素 E 水平明显降低。这些描述的研究表明在呈现 AMI 时经历急性冠脉事件的患者的抗氧化剂维生素血清水平可能降低。在急性情况下用抗氧化剂化合物进行药理学干预可能会纠正抗氧化剂维生素缺乏和全身抗氧化状态。

[0257] 在初级和 / 或二级预防 CVD 的情况下用抗氧化剂进行前瞻性人干预试验同样有限,但大多数是成功的。4/5 目前的人研究强烈支持维生素 E 在减少心脏病风险和并发症率方面的有效性。对患有明显肾病的患者进行的抗氧化剂对晚期肾病中的心血管疾病的二级预防研究揭示,给予 800IU/ 天的天然来源维生素 E 的患者的非致命性 MI 降低 70%。类似地,如本文所提到的,许多药剂现已成功地用于人的心肌抢救应用。

[0258] 在急性情况下静脉内递送低分子量化合物以抑制或改善 I/R 损伤需要评价它的免疫原性。对快速输注化合物的输血类型和其它不良反应的发生率应该最小化。分子量 < 1000Da 的化合物,例如阿司匹林、孕酮和虾青素可能不具有免疫原性,除非与载体复合。当分子量增加到 1000-6000Da 时,例如胰岛素和 ACTH,化合物可能是或可能不是免疫原性的。当分子量增加至 > 6000Da 时,化合物可能是免疫原性的。此外,脂质很少具有免疫原性,同样除非与载体复合。虾青素,作为一种叶黄素类胡萝卜素,其天然形式具有高度脂溶性。它的尺寸也小 (597Da)。因此,可注射的虾青素结构类似物在恰当的配方中的免疫原性可能性低,是用于目前治疗适应症的特别理想的化合物。

[0259] 预防心律失常:用于先前的动物试验的药理学活性剂

[0260] Gutstein 等人 (2001) 进行的研究评价基因修饰的小鼠,其不能在心肌中表达连接蛋白 43 [Cx43 条件敲除 (CKO) 小鼠]。Gutstein 等人发现尽管 Cx43 CKO 小鼠具有正常心脏结构和收缩性能,但它们一致地发生心源性猝死,显然是由于自发的致命性室性心动过速。这些数据支持间隙连接通道特别是连接蛋白 43 在保持心脏电稳定性中的关键作用。能够由类胡萝卜素诱导的连接蛋白 43 是在人组织中最广泛表达的连接蛋白。因此,类胡萝卜素和类胡萝卜素结构类似物可以用于治疗心律失常。

[0261] 预防癌症:用于先前动物试验的药理学活性剂

[0262] 已主要在动物模型中评价类胡萝卜素在预防和治疗癌症方面的可能治疗价值。先前,类胡萝卜素的抗氧化性能是涉及类胡萝卜素及其在癌症预防中的应用的研究的焦点。Bertram 等人 (1991) 进行的研究指出虽然类胡萝卜素是抗氧化剂,但这种特定的性能似乎不是导致它们作为癌症化学预防剂的活性的主要因素。而是发现类胡萝卜素的活性与它们上调间隙连接通讯的能力十分相关。已推定间隙连接充当由生长受抑制的正常细胞产生的抗增殖信号的传送管道。能够由类胡萝卜素诱导的连接蛋白 43 是人组织中最广泛表达的连接蛋白。因此,上调连接蛋白 43 可能是类胡萝卜素用于化学预防人和其它动物的癌症的机理。而且最近 Nishino 等人 (2003) 进行的人研究证明通过长期口服给予的类胡萝卜素混合物 (10mg 番茄红素, α - 和 β - 胡萝卜素各 5mg) 有效地化学预防日本高危肝硬化患者的肝细胞癌。因此更显著地在肝内蓄积的具有更大效力的化学预防癌症的类胡萝卜素 (例如虾青素) 可能是特别有用的实施方案。类胡萝卜素用于治疗局部缺血 - 再灌注损伤、肝脏疾病、心律失常和癌

[0263] 症的应用

[0264] 本文所用的术语“抑制”和“改善”一般定义为防止和 / 或减轻疾病状态的负面结果。因此,本文所述的方法和组合物可能作为急性和慢性 (预防性) 形式均具有价值。

[0265] 本文所用的术语“局部缺血 - 再灌注损伤”一般定义为归因于对先前局部缺血的组织 (慢性或急性局部缺血) 的再氧化的病理情况,它包括动脉粥样硬化和血栓栓塞性血管疾病及其相关的疾病。具体而言,主要的疾病或过程包括心肌梗塞、中风、外周血管疾病、

静脉或动脉闭塞、器官移植、冠状动脉分流移植手术、经皮经腔冠状动脉血管成形术和心血管骤停和 / 或死亡包括在内,但它们不被视为是对在其各自的病理学中涉及局部缺血组织再灌注的其它病理过程的限制。

[0266] 本文所用的术语“心律失常”一般定义为不同于心搏的正常节律任何变化,包括窦性心律失常、早搏、心传导阻滞、房颤、房扑、室性心动过速、室颤、交替脉和阵发性心动过速。本文所用的术语“心律失常”一般定义为心脏电活动的紊乱,其表现为心率或心律的异常。心律失常最通常与心血管疾病,特别是局部缺血性心脏病有关。

[0267] 本文所用的术语“癌症”一般认为其特征是不受控的、异常的细胞生长。具体而言,癌可能指病态组织,包括致癌物引发的细胞和致癌物转化的细胞。

[0268] 本文所用的术语“类胡萝卜素结构类似物”可以一般定义为类胡萝卜素及其生物活性结构类似物。典型的类似物包括表现同等或提高的生物有用和相关的功能,但在结构上不同于母体化合物的分子。

[0269] 母体类胡萝卜素选自文献中所述的多于 600 种天然存在的类胡萝卜素和它们的立体和几何异构体。这些类似物可以包括但不限于酯、醚、碳酸酯、酰胺、氨基甲酸酯、磷酸酯和醚、硫酸酯、糖苷醚,含或不含间隔(接头)。

[0270] 本文所用的术语“多于一种类胡萝卜素结构类似物的协同组合”可以一般定义为包括一种类胡萝卜素结构类似物与一种或多种其它类胡萝卜素结构类似物或共同抗氧化剂组合(作为衍生物或在溶液和 / 或制剂中)的任何组合物。

[0271] 本文所用的术语“治疗对象”可以一般定义为所有哺乳动物,特别是人。

[0272] 本文所用的术语“给药”可以一般定义通过任何实现期望目标的方法施用药物或非处方药(OTC)或营养组合物。例如,给药可以包括肠胃外、皮下、静脉内、冠脉内、直肠、肌内、腹膜内、透皮或含服途径。可选择或同时地,给药可以通过口服途径。给药剂量取决于接受者的年龄、健康、体重和疾病状态,同时治疗的类型(如果有的话),治疗频率和目标效果的性质。本文所述的旨在抑制局部缺血-再灌注损伤的任何技术也可以用于抑制或改善肝脏疾病,非限制性实例为丙型肝炎感染。本文所述的涉及抑制和 / 或改善局部缺血-再灌注损伤的技术也可以用于抑制和 / 或改善心律失常。本文所述的涉及抑制和 / 或改善局部缺血-再灌注损伤的技术也可以用于抑制和 / 或改善癌症。

[0273] 一个实施方案可以包括给治疗对象单独或联合施用类胡萝卜素结构类似物,从而抑制和 / 或改善局部缺血-再灌注损伤的发生。所述类胡萝卜素结构类似物可以是水溶性和 / 或水可分散性衍生物。所述类胡萝卜素衍生物可以包括实质上增加天然存在的类胡萝卜素的水溶性的任何取代基。

[0274] 所述类胡萝卜素衍生物可以保持和 / 或改善母体类胡萝卜素的抗氧化性能。所述类胡萝卜素衍生物可以保持母体类胡萝卜素的无毒性能。所述类胡萝卜素衍生物相对于母体类胡萝卜素在对治疗对象给药时可以具有提高的生物利用度。所述母体类胡萝卜素可以天然存在。

[0275] 另一个实施方案可以包括给治疗对象施用包含多于一种类胡萝卜素结构类似物的协同组合的组合物,借此减少局部缺血-再灌注损伤的发生。所述组合物可以是类胡萝卜素衍生物的“外消旋的”(即潜在立体异构形式的混合物)混合物。还包括含有与药学上可接受的载体(例如人血清白蛋白)组合的类胡萝卜素结构类似物的药物组合物。在一

个实施方案中,可以将类胡萝卜素的类似物与人血清白蛋白(即 HSA)在溶剂中复合。HSA 可以用作药学上可接受的载体。

[0276] 在某些实施方案中,组合物可以包括 1.0 克或更少的特定类胡萝卜素结构类似物与 1.0 克或更少的一种或多种其它类胡萝卜素结构类似物和 / 或共同抗氧化剂组合的所有组合物,其量有效实现期望的目的。虽然个体治疗对象的需要有变化,但各个组分的有效量的最佳范围的确定在本领域技能范围内。典型地,类胡萝卜素结构类似物可以施用于哺乳动物,特别是人,参照被治疗局部缺血 - 再灌注损伤的哺乳动物或人的体重,口服剂量为 5-100mg/ 天。典型地,可以将类胡萝卜素结构类似物施用于哺乳动物,特别是人,参考被治疗再灌注损伤的哺乳动物或人的体重,肠胃外给药剂量为 5-500mg/ 天。在其它实施方案中,口服或肠胃外施用大约 100mg 类胡萝卜素结构类似物以治疗或预防局部缺血 - 再灌注损伤。

[0277] 单位口服剂量可以包括大约 0.25mg 至大约 1.0 克或大约 5-25mg 的类胡萝卜素结构类似物。单位肠胃外剂量可以包括大约 25mg-1.0 克或 25mg-500mg 的类胡萝卜素结构类似物。单位冠脉内剂量可以包括大约 25mg-1.0 克或 25mg-100mg 的类胡萝卜素结构类似物。单位剂量可以每天给药一次或多次,隔天给药,以负荷剂量或大丸药形式给药,或者在肠胃外溶液中滴定至常规接受的或新的生物化学代用标记或临床终点,这些属于本领域的技能。

[0278] 除了将类胡萝卜素结构类似物作为原料化学物质施用之外,可以将化合物作为包含有利于可药用的类胡萝卜素结构类似物加工的合适的药学上可接受的载体、防腐剂、赋形剂和助剂的药物制剂的一部分给药。制剂,特别是可以口服并可以用于优选类型的给药的制剂,例如片剂、软明胶、锭剂、糖锭和胶囊,以及可以直肠给药的制剂,例如栓剂,和用于注射或口服给药的适宜溶液,可以在如上述的提供类似生物利用度的剂量范围内与赋形剂一起制备。

[0279] 药物制剂可以本领域技术人员已知的方式制备,例如通过常规混合、制粒、制糖锭、软明胶包囊、溶解、提取或冻干方法。因此,口服药物制剂可以通过将活性化合物与固体和半固体赋形剂和适宜的防腐剂和 / 或共同抗氧化剂合并来获得。任选地,可以将所得的混合物研磨和加工。如果需要或必需的话,可以在加入适宜的助剂之后将所得的颗粒混合物用于获得片剂、软明胶、锭剂、胶囊或糖锭核心。

[0280] 适宜的赋形剂可以是填充剂,例如糖类(例如乳糖、蔗糖或甘露糖),糖醇(例如甘露醇或山梨醇),纤维素制剂和 / 或磷酸钙(例如磷酸三钙或磷酸氢钙)。此外,可以使用粘合剂,例如淀粉糊(例如玉蜀黍或玉米淀粉、小麦淀粉、米淀粉、马铃薯淀粉、明胶、黄芪胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和 / 或聚乙烯吡咯烷酮)。可以加入崩解剂(例如上述淀粉)和羧甲基淀粉、交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或藻酸或其盐(例如藻酸钠)。助剂首先是流动调节剂和润滑剂(例如二氧化硅、滑石、硬脂酸或其盐,例如硬脂酸镁或硬脂酸钙,和 / 或聚乙二醇或 PEG)。糖锭核心提供以适宜包衣,如果需要的话它耐受胃液。软明胶胶囊(“软明胶”)提供适宜包衣,所述包衣一般包含明胶和 / 或适宜的可食用染料。不含动物组分和可食的明胶胶囊因为广泛地使用和消耗而可能特别适用于本文所述的实施方案。为此目的,可以使用浓缩的糖溶液,它可以任选包含阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇(PEG)和 / 或二氧化钛、漆溶液和适宜的有机溶剂或溶剂混合物,包括二

甲亚砷 (DMSO)、四氢呋喃 (THF)、丙酮、乙醇或其它适宜的溶剂和助溶剂。为了生产耐胃液的包衣,可以使用适宜的纤维素制剂例如乙酰纤维素邻苯二甲酸酯或羟丙基甲基纤维素邻苯二甲酸酯的溶液。可以将染料或色素加到片剂或糖锭包衣或软明胶胶囊,例如用于识别和为了表征活性化合物剂量的组合,或者掩饰胶囊内容物用于临床或其它研究。

[0281] 可以口用的其它药物制剂包括由明胶制备的推入-配合胶囊和由明胶和增塑剂如甘油或山梨醇制备的软热封胶囊。推入-配合胶囊可以包含颗粒形式的活性化合物,其可以与填充剂如乳糖、粘合剂如淀粉和/或润滑剂如滑石或硬脂酸镁,以及任选地稳定剂和/或防腐剂混合。在软胶囊中,可以将活性化合物溶解或悬浮在适宜的液体,例如脂肪油如米糠油或花生油或棕榈油或液体石蜡中。在其它实施方案中,可以加入稳定剂和防腐剂。

[0282] 可以直肠使用的可能的药物制剂例如包括由活性化合物与栓剂基质的组合组成的栓剂。例如适宜的栓剂基质为天然或合成甘油三酯或链烷烃。此外,还可以使用由活性成分和基质的组合组成的明胶直肠胶囊。可能的基质材料例如包括液体甘油三酯、聚乙二醇或链烷烃。

[0283] 用于肠胃外给药的适宜的配方包括但不限于水溶性和/或水可分散性形式的活性化合物的水溶液,例如水溶性盐、酯、碳酸酯、磷酸酯或醚、硫酸酯、糖苷醚,以及间隔和/或接头。此外,可以施用作为适宜的油注射悬浮液的活性化合物的悬浮液,特别适于肌肉注射。可以使用适宜的亲脂性溶剂,助溶剂(例如 DMSO 或乙醇),或赋形剂,包括脂肪油如米糠油或花生油和/或棕榈油或合成脂肪酸酯如油酸乙酯或甘油三酯。水性注射悬浮液可以包含增加悬浮液粘度的物质,例如包括羧甲基纤维素钠、山梨醇、右旋糖酐和/或环糊精。环糊精(例如 β -环糊精)可以具体用于增加用于肠胃外注射类胡萝卜素结构类似物的水溶性。可以制备包含类胡萝卜素结构类似物和例如卵黄磷脂酰胆碱(E-PC)的混合物的脂质体配方用于注射。任选地,所述悬浮液还可以包含稳定剂,例如抗氧化剂如 BHT 或防腐剂如苯醇。

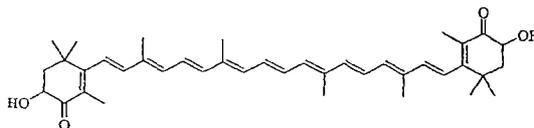
实施例

[0284] 现在已经描述了本发明,参照以下实施例更容易理解本发明,所述实施例仅以例示的方式提供,而不意在限定本发明。

[0285] 关于本文所述化合物的合成和表征,试剂购自商业来源并原样使用,除非另外指出。用于反应和分离的溶剂是试剂级并不经纯化使用,除非另外指出。所有以下反应在氮(N_2)气氛下进行,并避免直接光线。“外消旋”虾青素(为 1 : 2 : 1 比率的立体异构体 3S, 3' S、内消旋和 3R, 3' R 的混合物)购自 Divi's Laboratories, Ltd(Buckton Scott, India)。“外消旋”叶黄素和玉米黄质购自 Indofine Chemical Co., Inc.用 Uniplat 硅胶 GF 250 micron 板进行薄层色谱(TLC)。用于过程中控制(IPC)的 HPLC 分析用 Varian Prostar Series 210 液相色谱仪进行,该色谱仪具有 Alltech Rocket, Platinum-C18, 100\AA , $3\ \mu\text{m}$, $7\times 53\text{mm}$, PN 50523;温度: 25°C ;流动相:(A = 水;B = 10% 二氯甲烷 / 甲醇), 40% A/60% B(起始);8 分钟内线性梯度至 100% B;保持 100% B 4 分钟,1 分钟内线性梯度至 40% A/60% B;流速: 2.5mL/分 ;起始压力: 2050PSI ;PDA 检测器波长: 474nm 。用 Bruker Advance 300 记录 NMR,并用 ThermoFinnigan AQA 光谱仪进行质谱测定。用 Agilent 1100LC/MSD VL ESI 系统记录 LC/MS;柱: Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution ($4.6\times 75\text{mm}$, $3.5\ \mu\text{m}$,

USUT002736); 温度: 25°C; 起始压力: 107 巴; 流速: 1.0 ml/分; 流动相 (% A = 0.025% TFA, 在 H₂O 中, % B = 0.025% TFA, 在乙腈中) 方法 1 (化合物 8-21, 23-27, 30, 31): 70% A/30% B (初始), 5 分钟内分阶梯度至 50% B, 8.30 分钟内分阶梯度至 98% B, 在 98% B 保持 15.20 分钟, 15.40 分钟内分阶梯度至 30% B; 方法 2 (化合物 28, 29): 70% A/30% B (初始), 4 分钟内分阶梯度至 50% B, 7.30 分钟内分阶梯度至 90% B, 10.30 分钟内分阶梯度至 98% B, 保持在 98% B 15.20 分钟, 15.40 分钟内分阶梯度至 30% B; 方法 3 (化合物 22): 70% A/30% B (初始), 5 分钟内分阶梯度至 50% B, 8.30 分钟内分阶梯度至 98% B, 在 98% B 保持 25.20 分钟, 在 25.40 分钟内分阶梯度至 30% B; PDA 检测器: 470nm; LRMS: + 模式, ESI。

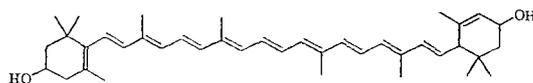
[0286]



(2E)

[0287] 虾青素 (2E). HPLC 保留时间: 11.629 分钟, 91.02% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 598 (M⁺+2H) (60), 597 (M⁺+H) (100); HPLC 保留时间: 12.601 分钟, 3.67% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 597 (M⁺+H) (100); HPLC 保留时间: 12.822 分钟, 5.31% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 597 (M⁺+H) (100)。

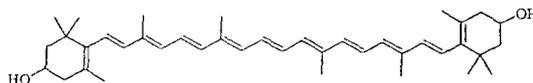
[0288]



(XXX)

[0289] 叶黄素 (XXX). HPLC 保留时间: 12.606 分钟, 100% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 568 (M⁺) (100)。

[0290]

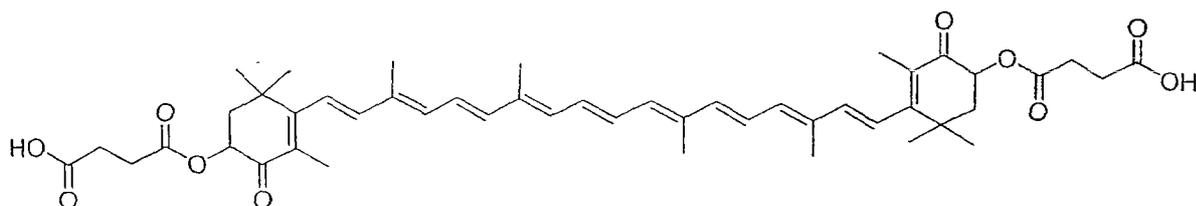


(XXXI)

[0291] 玉米黄质 (XXXI). HPLC 保留时间: 12.741 分钟, 100% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 568 (M⁺) (100)。

[0292] 实施例 1: 合成 XV (虾青素的二琥珀酸酯 (琥珀酸-(4-(18-[4-(3-羧基-丙酰氧基)-2,6,6-三甲基-3-氧代-环己-1-烯基]-3,7,12,16-四甲基-十八烷-1,3,5,7,9,11,13,15,17-壬烯基)-3,5,5-三甲基-2-氧代-环己-3-烯基)酯))

[0293]



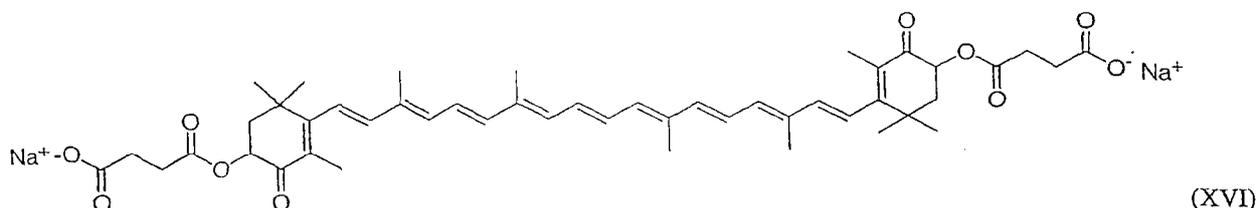
(XV)

[0294] 室温下往在 DCM ("二氯甲烷") (50 mL) 中的虾青素 2E (6.0 g, 10.05 mmol) 的溶

液加入 DIPEA ("N, N-二异丙基乙基胺") (35.012mL, 201mmol)、琥珀酸酐 (10.057g, 100.5mmol) 和 DMAP ("4-(二甲基氨基)吡啶") (0.6145g, 5.03mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 48 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水 /1M HCl (60mL/10mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。用 Na₂SO₄ 干燥合并的有机层, 并浓缩得到虾青素二琥珀酸酯 (XV) (100%)。HPLC 保留时间: 10.031 分钟, 82.57% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 798 (M⁺+2H) (52), 797 (M⁺+H) (100); HPLC 保留时间: 10.595 分钟, 4.14% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 797 (M⁺+H) (40), 697 (100); HPLC 保留时间: 10.966 分钟, 5.68% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 797 (M⁺+H) (100), 679 (31); HPLC 保留时间: 11.163 分钟, 7.61% (AUC); LRMS (ESI) M/Z (相对强度): 797 (M⁺+H) (38), 679 (100), 且无可检测的虾青素 2E。

[0295] 实施例 2: 合成 XVI (虾青素的二琥珀酸酯 (琥珀酸-(4-{18-[4-(3-羧基-丙酰氧基)-2,6,6-三甲基-3-氧代-环己-1-烯基]-3,7,12,16-四甲基-十八烷-1,3,5,7,9,11,13,15,17-壬烯基}-3,5,5-三甲基-2-氧代-环己-3-烯基)酯)的二钠盐)

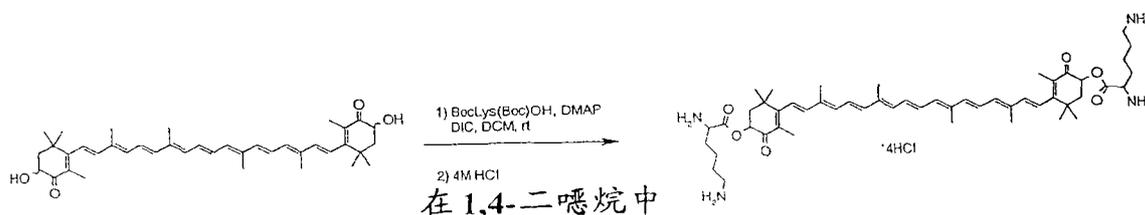
[0296]



[0297] 将虾青素的二琥珀酸酯 (2g, 2.509mmol) 和 200mL 乙醇在室温和氮气氛下于 500mL 圆底烧瓶中搅拌。一次性加入乙醇钠 (340mg, 5.019mmol, Acros#A012556101) 固体, 并将溶液搅拌过夜。第二天, 滤出沉淀, 用乙醇洗涤, 然后用二氯甲烷洗涤得到一种紫色固体, 虾青素的二琥珀酸酯的二钠盐, XVI [1.41g, 67%], 放置在高度真空管道中干燥。¹H-NMR (甲醇-d₄) δ 6.77-6.28 (14H, m), 5.53 (2H, dd, J = 12.6, 6.8), 2.68-2.47 (8H, m), 2.08-1.88 (22H, m), 1.37 (6H, s), 1.24 (6H, s); ¹³C NMR (CDCl₃) δ 196.66, 180.80, 175.01, 163.69, 144.12, 141.38, 138.27, 136.85, 136.12, 135.43, 132.35, 129.45, 126.22, 124.71, 72.68, 44.09, 38.63, 34.02, 32.34, 31.19, 26.86, 14.06, 13.19, 12.91; 质谱 +ESI, 819.43 一钠盐, 797.62 虾青素的二琥珀酸酯; HPLC 7.41 分钟 (99.84%)。

[0298] 实施例 3: 合成虾青素的 BocLys (Boc)OH 酯 (XXI)。

[0299]



[0300] HPLC: 柱: Waters Symmetry C18 3.5 微米 4.6mm × 150mm; 温度: 25°C; 流动相: (A = 0.025% TFA, 在 H₂O 中; B = 0.025% TFA, 在 MeCN 中), 95% A/5% B (起始); 线性梯度至 100% B 经历 12 分钟, 保持 4 分钟; 线性梯度至 95% B/5% A 经历 2 分钟; 线性梯度至 95% A/5% B 经历 4 分钟; 流速: 2.5ml/分; 检测器波长: 474nm。

[0301] 往在二氯甲烷 (500mL) 中的虾青素 2E (11.5g, 19.3mmol) 和 BocLys (Boc)

OH(20.0g, 57.7mmol) 的混合物加入 4-二甲基氨基吡啶 (DMAP) (10.6g, 86.6mmol) 和 1,3-二异丙基碳化二亚胺 ("DIC") (13.4g, 86.7mmol)。用铝箔覆盖圆底烧瓶, 并将混合物在室温和氮气氛下搅拌过夜。16 小时后, 根据 HPLC 和 TLC 反应不完全。将另外 1.5 当量的 DMAP 和 DIC 加到反应物, 2 小时后根据 HPLC 反应完全。然后将混合物浓缩至 100mL, 滤出一种白色固体 (1,3-二异丙基脲)。用硅胶 (10% -50% 庚烷 /EtOAc) 对滤液进行快速色谱处理得到目标产物, 为一种暗红色固体 (XXI) (28.2g, > 100% 产率)。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 7.24 (2H, t, J = 6.3Hz), 6.78 (2H, d, 5.0Hz), 6.57-6.27 (14H, m), 5.50-5.41 (2H, m), 3.99-3.97 (2H, d, 6.0Hz), 2.90 (4H, m), 2.03 (4H, m), 2.00 (6H, s), 1.97 (6H, s), 1.82 (6H, s), 1.70-1.55 (4H, m), 1.39-1.33 (36H, m), 1.24-1.13 (8H, m), 1.01-0.99 (6H, m), 0.86-0.83 (6H, m). HPLC: 21.3 分钟 (24.6% AUC); 22.0 分钟 (48.1% AUC); 22.8 分钟 (20.6% AUC). TLC (1 : 1 庚烷 /EtOAc : R_f0.41 ; R_f0.5 ; R_f0.56). 通过正模式流动注射在 Agilent 1100LC/MSD

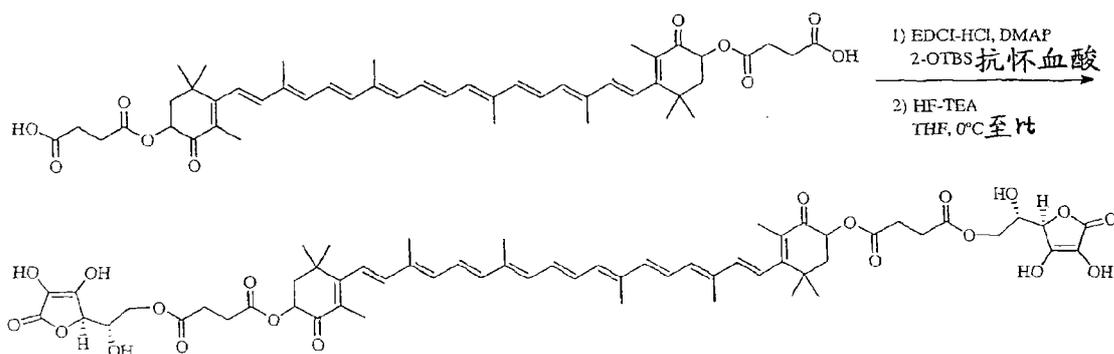
[0302] VL ESI 系统上进行 LC/MS 分析; 流动相 : A = 在 H₂O 中的 0.025% TFA; B = 在 MeCN 中的 0.025% TFA, 10% A/90% B (起始); 起始压力 : 10 巴; PDA 检测器 470nm. +ESI, m/z = 1276.1 (M+Na⁺).

[0303] 实施例 4 : 合成虾青素的二赖氨酸酯的四盐酸盐 (XX).

[0304] 将虾青素的 DiBocLys (Boc) 酯 (XXI) (20.0g, 16.0mmol) 和在 1,4-二噁烷中的 HCl (4.00M, 400mL, 1.60mol, 100eq) 的混合物于室温和氮气氛下搅拌。用铝箔盖住圆底烧瓶, 并将反应物搅拌 1 小时, 此时根据 HPLC 反应完全。沉淀标题化合物, 用过滤法收集, 用醚 (3×100mL) 洗涤, 并干燥 (14.7g, 92%, 根据 HPLC 为 91.6% 纯度)。将部分 (13.5g) 粗固体溶于 500mL 1 : 2 甲醇 / 二氯甲烷混合物, 并在氮气氛下搅拌。然后滴加乙醚 (168mL), 并用过滤法收集沉淀的固体得到目标产物, 为一种暗红色固体 (8.60g, 63.7% 产率)。¹H NMR (DMSO-d₆) δ 8.65 (6H, s), 8.02 (6H, s), 6.78-6.30 (14H, m), 5.59-5.51 (2H, m), 4.08 (2H, m), 2.77 (4H, m), 2.09-2.07 (4H, m), 2.01 (6H, s), 1.97 (6H, s), 1.90-1.86 (4H, m), 1.84 (6H, s), 1.61-1.58 (8H, m), 1.37 (6H, s), 1.22 (6H, s). HPLC : 7.8 分钟 (97.0% AUC)。用 Agilent 1100LC/MSD VL ESI 系统进行 LC/MS 分析, 所述系统具有 Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution 4.6×75mm, 3.5 微米, USUT002736; 温度 : 25°C; 流动相 : (% A = 0.025% TFA, 在 H₂O 中; % B = 0.025% TFA, 在 MeCN 中), 70% A/30% B (起始); 线性梯度至 50% B, 经历 5 分钟, 线性梯度至 100% B, 经历 7 分钟; 流速 : 1.0mL/分钟; 起始压力 : 108 巴; PDA 检测器 470nm. 质谱 +ESI, m/z = 853.9 (M+H⁺), m/z = 875.8 (M+NA⁺); LC 4.5 分钟。

[0305] 实施例 5 : 合成虾青素二琥珀酸酯的双-(2-OTBS 抗坏血酸)6-酯 (XXII)

[0306]



[0307] HPLC:柱:Waters Symmetry C18 3.5 微米 4.6mm×150mm;温度:25°C;流动相:(A = 0.025% TFA, 在水中;B = 0.025% TFA, 在乙腈中),95% A/5% B(起始);线性梯度至 100% B 经历 5 分钟,保持 10 分钟;线性梯度至 95% B 经历 2 分钟;线性梯度至 95% A/5% B 经历 3 分钟;流速:1.0mL/min;检测器波长:474nm。

[0308] 往在 600mL 二氯甲烷中的虾青素二琥珀酸酯 (XV) (20.00g, 25.1mmol) 的搅拌的溶液加入 4-二甲氨基吡啶 (DMAP) (6.13g, 50.2mmol)、2-O-叔丁基二甲基甲硅烷基 (OTBS) 抗坏血酸 (XXVI) (21.86g, 75.3mmol) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳化二亚胺盐酸盐 (EDCI-HCl) (12.02g, 62.75mmol)。14 小时后用硅胶 (1.0kg 硅胶, 洗脱剂 0.5% HOAc/5% MeOH/EtOAc) 对反应混合物进行快速色谱处理。将馏分 10 浓缩得到暗红色固体 (6.47g, 19.2% 产率, 根据 HPLC 为 58% AUC 纯度)。用硅胶 (600g 硅胶, 洗脱剂 0.25% HOAc/5% MeOH/EtOAc) 对粗产物进行快速色谱处理。将馏分 6-10 真空浓缩得到暗红色固体 (1.50g, 4.4% 产率, 根据 HPLC 为 94.8% AUC 纯度)。¹H-NMR(CDC₁₃) δ 11.13(2H, s), 6.78-6.28(14H, m), 5.43(2H, dd, J = 12.2, 7.1Hz), 5.34(2H, s), 4.78(2H, d, J = 5.4Hz), 4.11-4.07(6H, m), 2.69-2.65(8H, m), 2.05-1.97(22H, m), 1.81(6H, s), 1.33(6H, s), 0.92(18H, s), 0.15(6H, s), 0.14(6H, s);HPLC 13.4 分钟 [94.8% (AUC)];质谱 -ESI, m/z = 1340.6(M)。

[0309] 实施例 6:合成虾青素二琥珀酸酯的双抗坏血酸 6-酯 (XIX)。

[0310] 0°C 下往在 THF(5mL) 中的虾青素二琥珀酸酯的双-(2-OTBS 抗坏血酸)6-酯 (XXII) (100mg, 0.075mmol) 的搅拌溶液加入 HF·Et₃N(121 μL, 0.745mmol)。将反应物于 0°C 下搅拌 1 小时,然后温至室温。将反应物搅拌 2.5 小时,然后通过倾入包含 5mL IPAC 和 5mL 水的分液漏斗来终止反应。除去水层,并用水 (2×5mL) 洗涤有机层。通过旋转蒸发除去有机溶剂,得到一种暗红色固体,将其不经纯化而使用;¹H-NMR(CDC₁₃) δ 11.12(2H, s), 8.40(2H, s), 6.87-6.28(14H, m), 5.43-5.32(4H, m), 4.69(s, 2H), 4.09(s, 4H), 3.99(s, 2H), 2.68-2.50(m, 8H), 2.00-1.76(22H, m), 1.36-1.19(12H, m);HPLC 8.9 分钟 [80.7% (AUC)];质谱 +ESI, m/z = 1113.2(M+H⁺)。

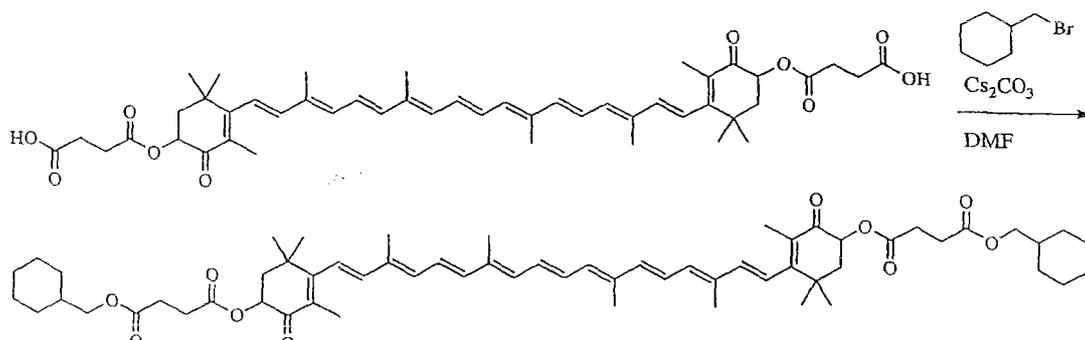
[0311] 实施例 7:合成虾青素二琥珀酸酯的双抗坏血酸 6-酯的钠盐 (XXIII)。

[0312] 室温下往在丙酮 (5mL) 中的粗品虾青素二琥珀酸酯的双抗坏血酸 6-酯 (XIX) (0.075mmol) 的搅拌的溶液加入原甲酸三乙酯 (62 μL, 0.373mmol)。将溶液搅拌 15 分钟,然后滴加在丙酮中的 2-乙基己酸钠的溶液 (93 μL, 0.019mmol, 0.20M)。通过过滤除去所得的沉淀。将滤液冷却至 0°C,并用附加的在丙酮中的 2-乙基己酸钠 (373 μL, 0.075mmol, 0.20M) 处理。将反应物搅拌 5 分钟,然后通过过滤收集固体物质,用丙酮 (5mL) 洗涤,并在高度真空下干燥得到一种暗红色固体 (27.8mg, 32.2% 产率);HPLC 8.9 分钟 [88.2%

(AUC)], 质谱 +APCI, $m/z = 1113.3 (M+3H-2Na^+)$ 。

[0313] 实施例 8 : 合成虾青素二琥珀酸酯的二环己基甲酯 (XXIV)。

[0314]

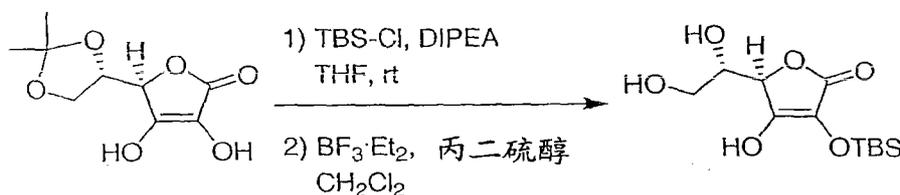


[0315] HPLC : 柱 : Alltech Rocket, Platinum-C18, 100Å, 3AM, 7×53mm ; 温度 : 25℃ ; 流动相 : (A = 0.025% TFA 在水中 ; B = 0.025% TFA, 在乙腈中), 70% A/30% B (起始) ; 保持 40 秒 ; 线性梯度至 50% B 经历 4 分 20 秒 ; 线性梯度至 100% B 经历 1 分 30 秒, 保持 4 分 40 秒 ; 线性梯度至 70% A/30% B, 20 秒 ; 流速 : 2.5mL/分 ; 检测器波长 : 474nm。

[0316] 室温和 N_2 气氛下往在 25mL 圆底烧瓶中的虾青素二琥珀酸酯 (XV) (100mg, 0.125mmol) 和 N,N -二甲基甲酰胺 (6.0mL) 的搅拌的溶液加入碳酸铯 (90.0mg, 0.275mmol), 并用铝箔覆盖。将反应物搅拌 15 分钟, 然后加入溴甲基环己烷 (52.0 μ L, 0.375mmol)。2 天后, 通过加入 4mL 碳酸氢钠饱和溶液终止反应, 并用 50mL 二氯甲烷稀释。用 25mL 水将稀释的溶液洗涤二次, 然后用无水硫酸钠干燥。将有机溶液过滤, 并用旋转蒸发法除去溶剂。用快速色谱法 (10-50% EtOAc/庚烷) 纯化粗残余物, 得到一种暗红色固体 (40.2mg, 32.5% 产率) ; 1H -NMR ($CDCl_3$) δ 7.03-6.17 (14H, m), 5.54 (2H, dd, $J = 12.9, 6.7$ Hz), 3.92 (4H, d, $J = 6.4$ Hz), 2.82-2.63 (8H, m), 2.08-1.92 (14H, m), 1.90 (6H, s), 1.75-1.62 (14H, m), 1.34-1.20 (22H, m) ; HPLC 8.9 分钟 [83.9% (AUC)] ; TLC (3 : 7EtOAc/庚烷 : R_f 0.38) ; 质谱 +ESI, $m/z = 989.6 (M+H^+)$ 。

[0317] 实施例 9 : 合成 2-OTBS-5,6-isopropyledine 抗坏血酸 (XXV)

[0318]



[0319] HPLC : Alltech Rocket, Platinum-C18, 100A, 3 μ m, 7×53mm, PN50523 ; 温度 : 25℃ ; 流动相 : (A = 0.025% TFA, 在水中 ; B = 0.025% TFA, 在乙腈中), 90% A/10% B (起始) ; 线性梯度至 30% B 经历 3 分钟 ; 线性梯度至 90% B 经历 3 分钟, 保持 2 分钟 ; 线性梯度至 90% A/10% B 经历 1 分钟, 然后保持 1 分钟 ; 流速 : 2.5mL/分 ; 检测器波长 : 256nm。

[0320] 室温下往在 1.00L THF 中的 5,6-isopropyledine 抗坏血酸 (100.0g, 463mmol) 的搅拌的溶液加入叔丁基二甲基甲硅烷基氯 (TBSCl) (76.7g, 509mmol), 然后在 30 分钟内

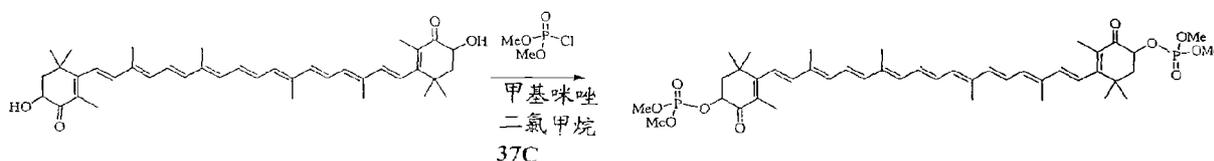
加入 N, N- 二异丙基乙基胺 (DIPEA) (161mL, 925mmol)。将反应物于室温下搅拌 14 小时, 然后真空浓缩。将混合物溶于甲基叔丁基醚 (MTBE) (1.00L), 并用 1M 碳酸钾 (1.00L) 在分液漏斗中萃取。再用 MTBE (1.00L) 萃取水层一次, 并用 2N HCl 将水层的 pH 调节至 pH 6。用乙酸异丙酯 (IPAC) (1.00L) 萃取水层二次, 并浓缩得到一种米色固体 (150.4g, 98% 产率); $^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6) δ 11.3 (1H, s), 4.78 (1H, d, $J = 2.0\text{Hz}$), 4.41-4.36 (1H, m), 4.11 (1H, dd, $J = 8.4, 7.4\text{Hz}$), 3.92 (1H, dd, $J = 8.4, 6.0$), 1.24 (3H, s), 1.23 (3H, s), 0.92 (9H, s), 0.14 (6H, s); HPLC 5.9 分钟 [91.6% (AUC)]; 质谱 -ESI, $m/z = 329.2$ (M-H)。

[0321] 实施例 10: 合成 2-OTBS 抗坏血酸 (XXVI)。

[0322] 室温和氮气气氛下往在 1.50L 二氯甲烷中的 2-OTBS-5,6-isopropylidene 抗坏血酸 (XXV) (150.4g, 455mmol) 的搅拌的溶液加入丙二硫醇 (54.0mL, 546mmol)。将溶液冷却至 -45°C , 然后以保持温度低于 -40°C 的速率滴加 $\text{BF}_3\text{-OEt}_2$ (58.0mL, 455mmol)。1 小时后, 根据 HPLC 反应完全。通过将冷反应混合物倾入含有 1.00L IPAC 和 500mL 饱和氯化铵溶液和 500mL 水的分液漏斗来终止反应。将有机层浓缩至一种白色固体。为了清除丙二硫醇, 将固体在二氯甲烷 (250mL) 中再浆化 2 小时, 加入庚烷 (1.00L), 并搅拌 1 小时。将混合物真空浓缩至 500mL 体积。将混合物过滤并真空干燥得到一种米色固体 (112.0g, 85% 产率): $^1\text{H-NMR}$ (DMSO d_6) δ 11.0 (1H, s), 4.89 (2H, s), 4.78 (1H, d, $J = 1.2\text{Hz}$), 3.82-3.80 (1H, m), 3.45-3.42 (2H, m), 0.923 (9H, s), 0.14 (6H, s); HPLC 4.9 分钟 [92.0% (AUC)]; 质谱 -ESI, $m/z = 289.0$ (M-H)。

[0323] 实施例 11: 合成虾青素的双 - 二甲基磷酸酯 (XXVII)。

[0324]

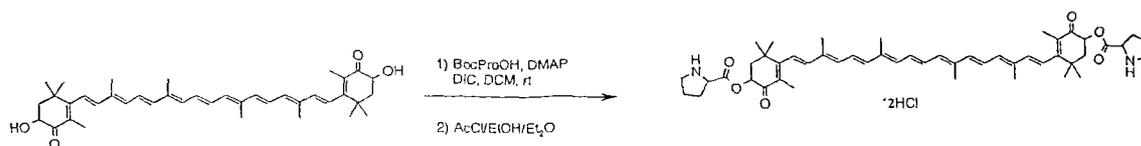


[0325] HPLC: Waters Symmetry C18, $3\mu\text{m}$, $4.6 \times 150\text{mm}$, WAT200632, 温度: 25°C ; 流动相: (A = 水; B = 10% DCM/MeOH), 10% A/90% B (起始); 线性梯度至 100% B 经历 9 分钟; 保持 100% B 经历 11min, 线性梯度至 10% A/90% B 经历 1 分钟; 流速: 1.0ml/分; 检测器波长: 474nm。

[0326] 37°C 下往在二氯甲烷中的虾青素 2E (500mg, 0.84mmol) 和甲基咪唑 (0.50ml, 6.27mmol) 的混合物加入溴代磷酸二甲酯 (2M, 5.04mL) (Ding, 2000)。24 小时后, 根据 HPLC 反应未完全, 加入溴代磷酸二甲酯 (2M, 5.04mL)。48 小时后, 根据 HPLC 反应未完全, 并加入溴代磷酸二甲酯 (2M, 5.04mL)。72 小时后, 根据 HPLC 反应完全。用二氯甲烷 (20mL) 稀释反应物, 并用水 (20mL) 终止反应。分离各层并再次用 20mL 二氯甲烷萃取水层。合并有机层, 并在真空下浓缩得到 2.69g (> 100% 产率)。 $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3) δ 6.58-6.14 (14H, m), 5.05-4.95 (2H, m), 3.91-3.60 (12H, m), 2.11-2.04 (4H, m), 2.04-1.92 (12H, m), 1.85 (6H, s), 1.26 (6H, s), 1.15 (6H, s). HPLC: 4.29 分钟 (86.7% AUC)。流动相: A = 0.025% TFA, 在 H_2O 中; B = 0.025% TFA, 在乙腈中, 10% A/90% B (起始); PDA 检测器 474nm. +ESI, $m/z = 813.62$ (M+1)。

[0327] 实施例 12: 合成虾青素的 BocProOH 酯 (XXVIII)。

[0328]



[0329] LC/MS 分析:在 Agilent 1100LC/MSD VL ESI 系统上进行 LC/MS 分析,所述系统含有 Zorbax Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution 4.6x75mm, 3.5 μ M, USUT002736; 温度:25 $^{\circ}$ C; 流动相:(% A = 0.025% TFA, 在 H₂O 中; % B = 0.025% TFA, 在 MeCN 中), 70% A/30% B(起始); 线性梯度至 50% B 经历 5 分钟, 线性梯度至 98% B 经历 3 分钟, 在 98% B 下保持 17 分钟; 流速:1.0ml/分; 起始压力:108 巴; PDA 检测器 470nm, 373nm, 214nm. LRMS: + 模式, ESI.

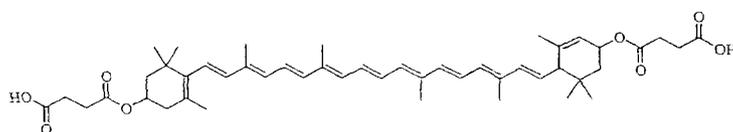
[0330] 往在二氯甲烷(500mL)中的虾青素 2E(5.00g, 8.38mmol) 和 BocProOH(10.8g, 50.3mmol) 的混合物加入 4-二甲氨基吡啶(DMAP)(6.14g, 50.3mmol) 和 1,3-二异丙基碳化二亚胺(DIC)(7.79mL, 50.3mmol)。将混合物在室温和氮气气氛下搅拌过夜。16 小时后, 根据 TLC 反应完全。然后将混合物浓缩至干, 并用 100mL 乙醚将粗残余物浆化, 通过硅藻土滤垫过滤。用硅胶(Et₂O)对滤液进行快速色谱处理得到目标产物, 为一种暗红色固体(8.56g, > 100% 产率)。LC: 17.5 分钟 [23.1% AUC]; 18.2 分钟 [45.1% (AUC)]; 19.4 分钟 [22.0% (AUC)]. TLC(3 : 2EtOAc/己烷: R_f 0.51; R_f 0.55; R_f 0.59). MS+ESI, m/z = 1013.8 (M+Na⁺).

[0331] 实施例 13: 合成虾青素的二脯氨酸酯的二盐酸盐 (XXIX).

[0332] 在氮气气氛下将乙醚(130mL) 和 EtOH(48.9mL, 838mmol) 的混合物冷却至 -78 $^{\circ}$ C。30 分钟内往冷却的混合物滴加乙酰氯(82.0mL, 838mmol)。从冷却浴中移出反应物, 并缓慢升温至室温。将烧瓶内容物倾入含有虾青素的 DiBocPro 酯 (XXVIII)(8.31g, 8.38mmol) 和搅拌棒的单独的圆底烧瓶。用铝箔覆盖烧瓶, 并将反应物在室温和氮气气氛下搅拌过夜。16 小时后, 根据 LC 反应完全。标题化合物沉淀并用过滤法收集, 用乙醚(3 \times 100mL) 洗并干燥(6.37g, 88.0% 粗产率, 根据 LC 为 75.2% 纯度)。LC: 8.00 分钟 [75.2% (AUC)]. MS+ESI, m/z = 791.7 (M+H⁺).

[0333] 实施例 14: 合成叶黄素二琥珀酸酯 (XXXII).

[0334]



(XXXII)

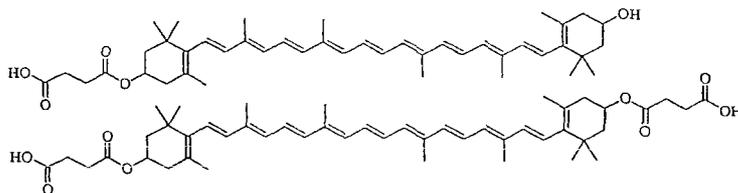
[0335] 室温下往在 DCM(2mL) 中的叶黄素 (XXX)(0.010g, 0.018mmol) 的溶液加入 DIPEA(0.063mL, 0.360mmol)、琥珀酸酐(0.036g, 0.360mmol) 和 DMAP(0.021g, 0.176mmol)。

[0336] 将反应混合物在室温下搅拌 48 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水/1M HCl(6mL/1mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。用 Na₂SO₄ 干燥合并的有机层, 并浓缩得到叶黄素二琥珀酸酯 (XXXII)(93.09%)。HPLC 保留时间: 11.765 分钟, 93.09% (AUC); LRMS (ESI)

m/z (相对强度) : 769 (M^+) (24), 651 (100), 且无可检测的叶黄素。

[0337] 实施例 15 : 合成玉米黄质的琥珀酸酯 (XXXIII, XXXIV)。

[0338]

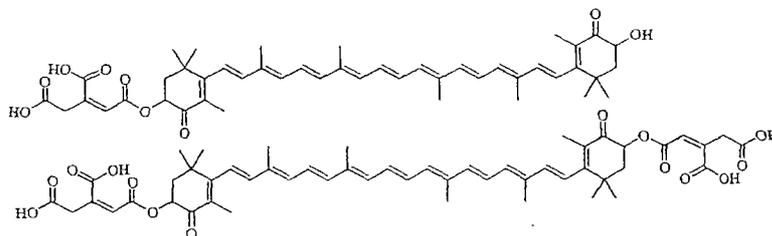


(XXXIII 和 XXXIV)

[0339] 室温下往在 DCM (2mL) 中的玉米黄质 (XXXI) (0.010g, 0.018mmol) 的溶液加入 DIPEA (0.063mL, 0.360mmol)、琥珀酸酐 (0.036g, 0.360mmol) 和 DMAP (0.021g, 0.176mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 48 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水 / 1M HCl (6mL/1mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。用 Na_2SO_4 干燥合并的有机层, 并浓缩得到玉米黄质一琥珀酸酯 (XXXIII) (2.86%)。HPLC 保留时间: 12.207 分钟, 2.86% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 669 ($M^+ + H$) (53), 668 (M^+) (100), 玉米黄质二琥珀酸酯 (XXXIV) (97.14%) HPLC 保留时间: 11.788 分钟, 67.42% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 792 ($M^+ + Na$) (42), 769 (M^+) (73), 651 (100); HPLC 保留时间: 13.587 分钟, 11.19% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 792 ($M^+ + Na$) (36), 769 (M^+) (38), 663 (100); HPLC 保留时间: 13.894 分钟, 18.53% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 769 (M^+) (62), 663 (77), 651 (100), 且无可检测的玉米黄质

[0340] 实施例 16 : 合成虾青素的乌头酸酯 (XXXV, XXXVI)。

[0341]

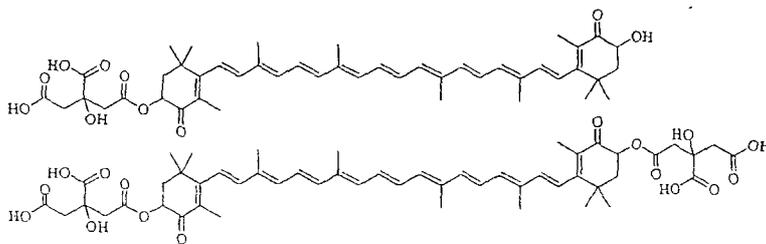


(XXXV 和 XXXVI)

[0342] 室温下往在 DCM/DMF ("N, N-二甲基甲酰胺") (4mL/2mL) 中的虾青素 2E (0.100g, 0.168mmol) 的溶液加入 DIPEA (0.878mL, 5.04mmol)、顺式乌头酸酐 (0.2622g, 1.68mmol) 和 DMAP (0.4105g, 3.36mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水 / 1M HCl (20mL/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到乌头酸一酯 (XXXV) (13.25%) HPLC 保留时间: 10.485 分钟, 4.95% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 777 ($M^+ + Na + 2H$) (57), 623 (100); HPLC 保留时间: 10.722 分钟, 8.30% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 777 ($M^+ + Na + 2H$) (6), 709 (100), 乌头酸二酯 (XXXVI) (27.67%) HPLC 保留时间: 9.478 分钟, 15.44% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 933 ($M^+ + Na + 2H$) (10), 831 (100); HPLC 保留时间: 9.730 分钟, 12.23% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 913 ($M^+ + 4H$) (4), 843 (100), 和虾青素 (44.40%)。

[0343] 实施例 17 : 合成虾青素的柠檬酸酯 (XXXVII, XXXVIII)。

[0344]

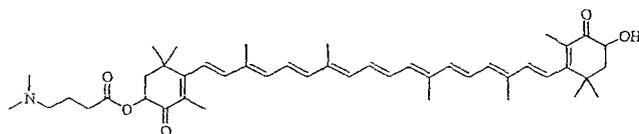


(XXXVII 和 XXXVIII)

[0345] 室温下往在 DCM(8mL) 中的柠檬酸 (0.5149g, 2.86mmol) 的悬浮液加入 DIPEA(1.167mL, 0.670mmol)、DIC(0.525mL, 3.35mmol)、DMAP(0.4094g, 3.35mmol) 和虾青素 (0.200g, 0.335mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水 /1M HCl (20mL/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到柠檬酸一酯 (XXXVII) (26.56%) HPLC 保留时间: 9.786 分钟, 17.35% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 773 ($M^+ + 3H$) (14), 771 ($M^+ + H$) (100); HPLC 保留时间: 9.989 分钟, 9.21% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 773 ($M^+ + 3H$) (50), 771 ($M^+ + H$) (100), 柠檬酸二酯 (XXXVIII) (7.81%) HPLC 保留时间: 8.492 分钟, 3.11% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 968 ($M^+ + Na$) (75), 967 (100), 946 ($M^+ + H$) (37); HPLC 保留时间: 8.708 分钟, 2.43% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 968 ($M^+ + Na$) (95), 946 ($M^+ + H$) (100); HPLC 保留时间: 8.952 分钟, 2.27% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 946 ($M^+ + H$) (19), 500 (100), 和虾青素 (21.26%)。

[0346] 实施例 18: 合成虾青素的二甲基氨基丁酸一酯 (XXXIX)。

[0347]

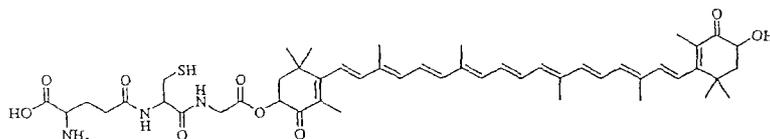


(XXXIX)

[0348] 室温下往在 DCM/DMF(3mL/3mL) 中的 4-(二甲基氨基)-丁酸盐酸盐 (0.2816g, 1.68mmol) 的悬浮液加入 DIPEA(0.878mL, 5.04mmol)、HOBT (“1-羟基苯并三唑”)-H₂O(0.3094g, 2.02mmol)、DMAP(0.4105g, 3.36mmol) 和虾青素 (0.100g, 0.168mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水 /1M HCl (20ml/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到 4-(二甲基氨基)丁酸一酯 (XXXIX) (24.50%) HPLC 保留时间: 9.476 分钟, 20.32% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 732 ($M^+ + Na$) (13), 729 (100); HPLC 保留时间: 9.725 分钟, 4.18% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 732 ($M^+ + Na$) (50), 729 (100), 和虾青素 (61.21%)。

[0349] 实施例 19: 合成虾青素的谷胱甘肽一酯 (L)。

[0350]



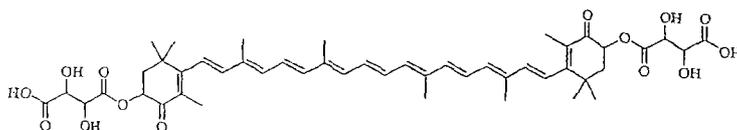
(L)

[0351] 室温下往在 DCM/DMF(3mL/3mL) 中的还原谷胱甘肽 (0.5163g, 1.68mmol) 的悬

浮液加入 DIPEA(0.878mL, 5.04mmol)、HOBT-H₂O(0.3094g, 2.02mmol)、DMAP(0.4105g, 3.36mmol)、DIC(0.316mL, 2.02mmol) 和虾青素 2E(0.100g, 0.168mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时,此时用 DCM 稀释反应物,用盐水 /1MHCl(20mL/3mL) 终止反应,然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到谷胱甘肽一酯 (L)(23.61%)HPLC 保留时间:9.488 分钟,16.64% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):886(M⁺)(13),810(54),766(100);HPLC 保留时间:9.740 分钟,3.57% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):886(M⁺)(24),590(78),546(100);HPLC 保留时间:9.997 分钟,3.40% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):886(M⁺)(25),869(85),507(100),和虾青素(68.17%)。

[0352] 实施例 20:合成虾青素的酒石酸二酯 (LI)。

[0353]

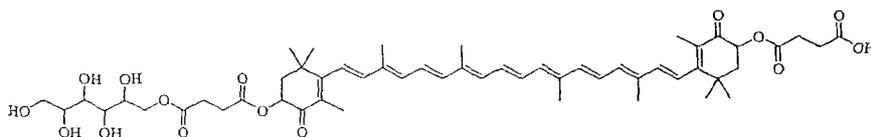


(LI)

[0354] 室温下往在 DCM/DMF(5mL/5mL) 中的 (L)-酒石酸(0.4022g, 2.68mmol) 的悬浮液加入 DIPEA(1.167mL, 0.670mmol)、HOBT-H₂O(0.5131g, 3.35mmol)、DMAP(0.4094g, 3.35mmol) 和虾青素 2E(0.200g, 0.335mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时,此时用 DCM 稀释反应物,用盐水 /1M HCl(20mL/3mL) 终止反应,然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到酒石酸二酯 (LI)(18.44%)HPLC 保留时间:9.484 分钟,14.33% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):884(M⁺+Na+H)(100),815(72),614(72);HPLC 保留时间:9.732 分钟,4.11% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):883(M⁺+Na)(100),539(72),和虾青素(67.11%)。

[0355] 实施例 21:合成虾青素二琥珀酸酯的山梨醇一酯 (LII)。

[0356]

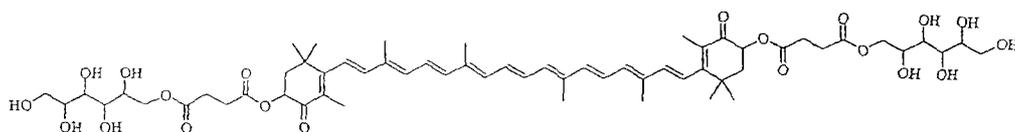


(LII)

[0357] 室温下往在 DMF(10mL) 中的虾青素二琥珀酸酯 (XV)(0.200g, 0.251mmol) 的溶液加入 DIPEA(1.312mL, 7.53mmol)、HOBT-H₂O(0.4610g, 3.01mmol)、DMAP(0.6133g, 5.02mmol) 和 (D)-山梨醇(0.4572g, 2.51mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时,此时用 DCM 稀释反应物,用盐水 /1M HCl(20mL/3mL) 终止反应,然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到山梨醇一酯 (LII)(3.52%)HPLC 保留时间:9.172 分钟,3.52% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):984(M⁺+Na)(28),503(100),和虾青素二琥珀酸酯(91.15%)。

[0358] 实施例 22:合成虾青素二琥珀酸酯的山梨醇二酯 (LIII)。

[0359]

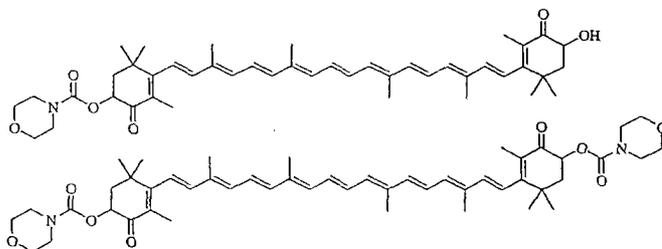


(LIII)

[0360] 室温下往在 DCM/DMF (3mL/3mL) 中的虾青素二琥珀酸酯 (XV) (0.100g, 0.125mmol) 的溶液加入 DIPEA (0.656mL, 3.76mmol)、HOBT-H₂O (0.2313g, 1.51mmol)、DMAP (0.3067g, 2.51mmol)、DIC (0.236mL, 1.51mmol) 和 (D)-山梨醇 (0.2286g, 1.25mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水 /1M HCl (20mL/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到山梨醇二酯 (LIII) (44.59%) HPLC 保留时间: 8.178 分钟, 11.58% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 1148 (M⁺+Na) (40), 545 (100); HPLC 保留时间: 8.298 分钟, 33.01% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 1148 (M⁺+Na) (20), 545 (100), 并无可检测的虾青素二琥珀酸酯。

[0361] 实施例 23: 合成虾青素的吗啉氨基甲酸酯 (LIV, LV)。

[0362]

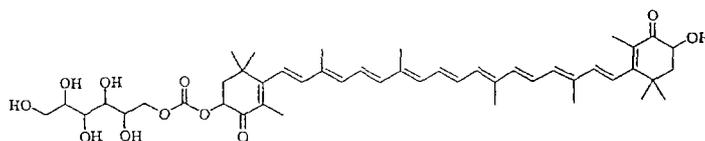


(LIV 和 LV)

[0363] 室温下往在 DCM/DMF (3mL/3mL) 中的虾青素 2E (0.100g, 0.168mmol) 的溶液加入 DIPEA (0.878mL, 5.04mmol)、DMAP (0.4105g, 3.36mmol) 和 4-吗啉碳酰氯 (0.196mL, 1.68mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水 /1M HCl (20mL/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到 4-吗啉一氨基甲酸酯 (LIV) (33.17%) HPLC 保留时间: 11.853 分钟, 29.01% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 710 (M⁺) (100); HPLC 保留时间: 13.142 分钟, 1.37% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 710 (M⁺) (100); HPLC 保留时间: 13.383 分钟, 2.79% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 710 (M⁺) (100), 4-吗啉二氨基甲酸酯 (LV) (33.42%) HPLC 保留时间: 12.049 分钟, 29.71% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 824 (M⁺+H) (54), 823 (M⁺) (100); HPLC 保留时间: 13.761 分钟, 1.29% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 823 (M⁺) (100), 692 (75); HPLC 保留时间: 14.045 分钟, 2.42% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 823 (M⁺) (100), 692 (8), 和虾青素 (22.10%)。

[0364] 实施例 24: 合成虾青素的甘露醇一碳酸酯 (LVII)。

[0365]

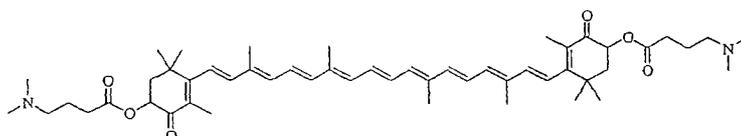


(LVII)

[0366] 0 °C 下往在 DCM(4mL) 中的虾青素 2E(0.100g,0.168mmol) 的溶液加入 DIPEA(0.585mL,3.36mmol) 和 1,2,2,2-四氯乙基氯甲酸酯(0.103mL,0.672mmol)。将反应混合物于 0 °C 下搅拌 2 小时,在室温下搅拌 1.5 小时,此时将 (D)-甘露醇(0.3060g,1.68mmol)、DMF(3mL) 和 DMAP(0.2052g,1.68mmol) 加到反应物。将反应混合物在室温下搅拌 24 小时,此时用 DCM 稀释反应物,用盐水(20mL) 终止反应,然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到甘露醇-碳酸酯(LVII)(10.19%)HPLC 保留时间:9.474 分钟,10.19%(AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):827(M⁺+Na)(50),804(M⁺)(25),725(58),613(100),和虾青素(53.73%)。

[0367] 实施例 25:合成虾青素的(二甲基氨基)丁酸二酯(LVIII)。

[0368]

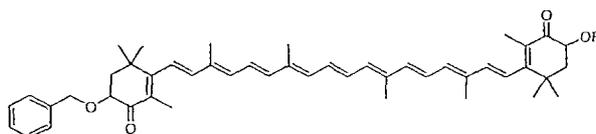


(LVIII)

[0369] 室温下往在 DCM/DMF(3mL/3mL) 中的 4-(二甲基氨基)丁酸盐(0.2816g,1.68mmol) 的悬浮液加入 DIPEA(0.878mL,5.04mmol)、DMAP(0.4105g,3.36mmol)、HOBT-H₂O(0.3094g,2.02mmol)、DIC(0.316mL,2.02mmol) 和虾青素 2E(0.100g,0.168mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时,此时用 DCM 稀释反应物,用盐水/1MHCl(20mL/3mL) 终止反应,然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到(二甲基氨基)丁酸二酯(LVIII)(77.70%)HPLC 保留时间:7.850 分钟,56.86%(AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):824(M⁺+H)(64),823(M⁺)(100);HPLC 保留时间:8.443 分钟,3.87%(AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):823(M⁺)(5),641(20),520(100);HPLC 保留时间:9.021 分钟,16.97%(AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):824(M⁺+H)(58),823(M⁺)(100),且无可检测的虾青素。

[0370] 实施例 26:合成虾青素的苄基一醚(LIX)。

[0371]

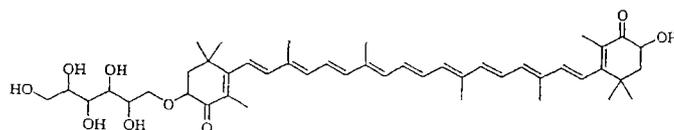


(LIX)

[0372] 0 °C 下往在 DCM/DMF(3mL/3mL) 中的虾青素 2E(0.100g,0.168mmol) 和苄基溴(0.400mL,3.36mmol) 的溶液加入 KHMDs(“双(三甲基甲硅烷基)酰胺钾”)(6.72mL;0.5M,在甲苯中,3.36mmol)。将反应混合物于 0 °C 下搅拌 1 小时,然后温至室温。将混合物于室温下搅拌 24 小时,此时用 DCM 稀释反应物,用盐水/1M HCl(20mL/3mL) 终止反应,然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到苄基一醚(LIX)(15.06%)HPLC 保留时间:12.705 分钟,15.06%(AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):686(M⁺)(93),597(100),和虾青素(67.96%)。

[0373] 实施例 27:合成虾青素的甘露醇一醚(LX)。

[0374]

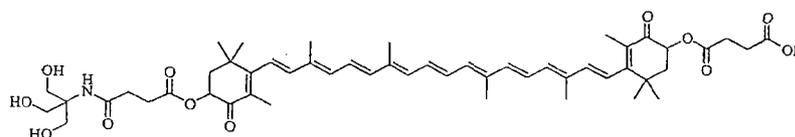


(LX)

[0375] 室温下往在 DCM(15mL) 中的虾青素 2E(0.200g, 0.335mmol) 的溶液加入 48% HBr(10mL) 和 H₂O(30mL)。用 DCM 萃取水层, 用 Na₂SO₄ 干燥合并的有机层, 并浓缩得到虾青素的溴化物衍生物, 为一种暗红色油。室温下往在 DCM/DMF(6mL/6mL) 中的粗溴化物的溶液加入 DIPEA(1.58mL, 9.09mmol)、DMAP(0.3702g, 3.03mmol) 和 (D)-甘露醇(0.5520g, 3.03mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 24 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水/1M HCl(20mL/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到甘露醇一醚(LX)(4.40%) HPLC 保留时间: 9.479 分钟, 4.40% (AUC); LRMS(ESI)m/z(相对强度): 783(M⁺+Na)(64), 710(66), 653(100), 和虾青素(79.80%)。

[0376] 实施例 28: 合成虾青素二琥珀酸酯的三(羟基甲基)氨基甲烷一酰胺(LXI)。

[0377]

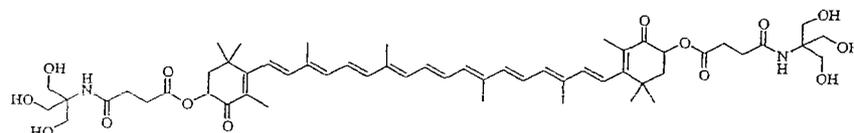


(LXI)

[0378] 室温下往在 DCM/DMF(3mL/3mL) 中的虾青素二琥珀酸酯(XV)(0.100g, 0.125mmol) 的溶液加入 DIPEA(0.653mL, 3.75mmol)、DMAP(0.3054g, 2.50mmol)、HOBT-H₂O(0.2297g, 1.50mmol) 和三(羟基甲基)氨基甲烷(0.1514g, 1.25mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水/1M HCl(20mL/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到三(羟基甲基)氨基甲烷一酰胺(LXI)(4.40%) HPLC 保留时间: 9.521 分钟, 3.50% (AUC); LRMS(ESI)m/z(相对强度): 923(M⁺+Na)(36), 900(M⁺)(80), 560(100); HPLC 保留时间: 9.693 分钟, 0.90% (AUC); LRMS(ESI)m/z(相对强度): 923(M⁺+Na)(11), 813(33), 500(100), 和虾青素二琥珀酸酯(84.34%)。

[0379] 实施例 29: 合成虾青素二琥珀酸酯的三(羟基甲基)氨基甲烷二酰胺(LXII)。

[0380]



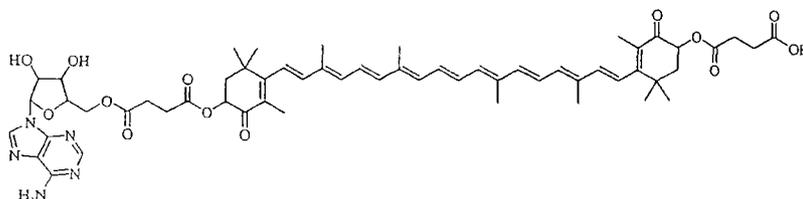
(LXII)

[0381] 室温下往在 DCM/DMF(3mL/3mL) 中的虾青素二琥珀酸酯(XV)(0.100g, 0.125mmol) 的溶液加入 DIPEA(0.653mL, 3.75mmol)、DMAP(0.3054g, 2.50mmol)、HOBT-H₂O(0.2297g, 1.50mmol)、DIC(0.235mL, 1.50mmol) 和三(羟基甲基)氨基甲烷(0.1514g, 1.25mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水/1M HCl(20mL/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到三(羟基甲基)氨基甲烷二酰胺

(LXII) (66.51%) HPLC 保留时间:8.086 分钟,19.34% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):1026(M^+ +Na) (22),1004(M^+ +H) (84),1003(M^+) (100),502(83);HPLC 保留时间:8.715 分钟,47.17% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):1004(M^+ +H) (71),1003(M^+) (100),986(62),和虾青素二琥珀酸酯(18.61%)。

[0382] 实施例 30:合成虾青素二琥珀酸酯的腺苷一酯(LXIII)。

[0383]

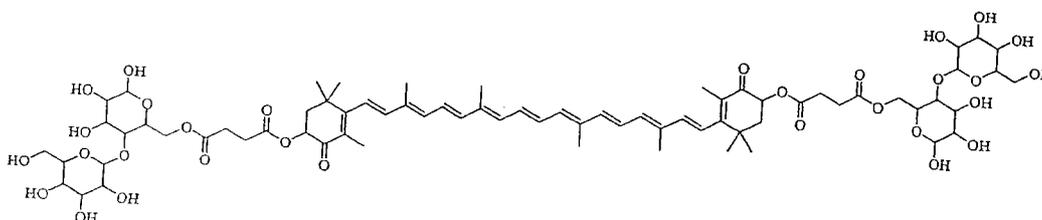


(LXIII)

[0384] 室温下往在 DCM/DMF (3mL/3mL) 中的虾青素二琥珀酸酯 (XV) (0.100g,0.125mmol) 的溶液加入 DIPEA(0.653mL,3.75mmol)、DMAP(0.3054g,2.50mmol)、HOBT-H₂O(0.1914g,1.25mmol) 和 (-)-腺苷 (0.3341g,1.25mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 48 小时,此时用 DCM 稀释反应物,用盐水/1M HCl (20mL/3mL) 终止反应,然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到腺苷一酯 (LXIII) (21.13%) HPLC 保留时间:9.005 分钟,2.43% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):1047(M^+ +H) (36),1046(M^+) (57),524(100);HPLC 保留时间:9.178 分钟,10.92% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):1047(M^+ +H) (80),1046(M^+) (100),829(56),524(94);HPLC 保留时间:9.930 分钟,7.78% (AUC);LRMS(ESI)(相对强度):1046(M^+) (100),524(34),和虾青素二琥珀酸酯 (58.54%)。

[0385] 实施例 31:合成虾青素二琥珀酸酯的麦芽糖二酯(LXIV)。

[0386]

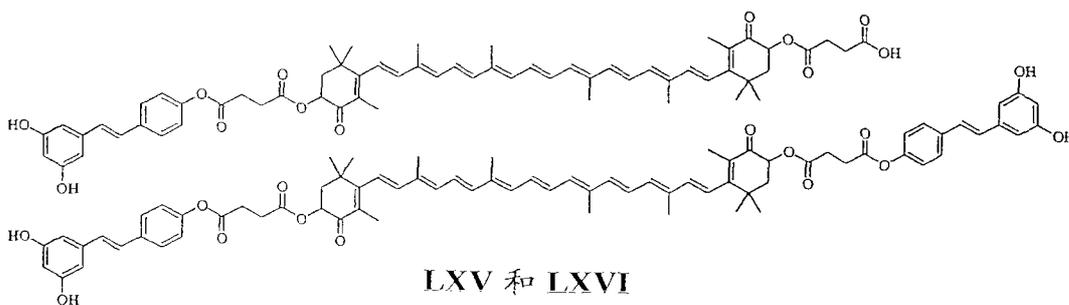


(LXIV)

[0387] 室温下往在 DCM/DMF (3mL/3mL) 中的虾青素二琥珀酸酯 (XV) (0.100g,0.125mmol) 的溶液加入 DIPEA(0.653mL,3.75mmol)、DMAP(0.3054g,2.50mmol)、HOBT-H₂O(0.2297g,1.50mmol)、DIC(0.235mL,1.50mmol) 和 (D)-麦芽糖-H₂O(0.4504g,1.25mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 36 小时,此时用 DCM 稀释反应物,用盐水/1M HCl (20mL/3mL) 终止反应,然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到麦芽糖二酯 (LXIV) (25.22%) HPLC 保留时间:7.411 分钟,12.53% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):1468(M^+ +Na) (18),1067(16),827(100);HPLC 保留时间:7.506 分钟,12.69% (AUC);LRMS(ESI)m/z(相对强度):1468(M^+ +Na) (52),827(76),745(100),和虾青素二琥珀酸酯 (22.58%)。

[0388] 实施例 32:合成虾青素二琥珀酸酯的自藜芦醇酯(LXV, LXVI)。

[0389]



[0390] 室温下往在 DCM/DMF (3mL/3mL) 中的虾青素二琥珀酸酯 (XV) (0.100g, 0.125mmol) 的溶液加入 DIPEA (0.653mL, 3.75mmol)、DMAP (0.3054g, 2.50mmol)、HOBT-H₂O (0.2297g, 1.50mmol)、DIC (0.235mL, 1.50mmol) 和白藜芦醇 (0.2853g, 1.25mmol)。将反应混合物在室温下搅拌 24 小时, 此时用 DCM 稀释反应物, 用盐水 / 1M HCl (20mL/3mL) 终止反应, 然后用 DCM 萃取。将合并的有机层浓缩得到白藜芦醇一酯 (LXV) (1.12%) HPLC 保留时间: 10.039 分钟, 1.12% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 1009 (M⁺+2H) (18), 1007 (M⁺) (21), 637 (100), 白藜芦醇二酯 (LXVI) (60.72%) HPLC 保留时间: 10.324 分钟, 15.68% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 1217 (M⁺) (28), 1007 (100), 609 (69), 504 (85); HPLC 保留时间: 10.487 分钟, 29.26% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 1218 (M⁺+H) (80), 1217 (M⁺) (100), 609 (60); HPLC 保留时间: 10.666 分钟, 15.78% (AUC); LRMS (ESI) m/z (相对强度): 1218 (M⁺+H) (84), 1217 (M⁺) (100), 609 (71), 且无可检测的虾青素二琥珀酸酯。

[0391] 精确测定二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (XVI) 的水溶性:

[0392] 将总共 30mg 的样品 (二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物, 为 1:2:1 比率的立体异构体 3S, 3' S、内消旋和 3R, 3' R 的全反式混合物) 加到在 15mL 玻璃离心管中的 2mL 无菌过滤的 (0.2 μm Millipore®) 去离子 (DI) 水。将管包在铝箔中, 并将混合物振荡 2 小时, 然后在 3500rpm 下离心 10 分钟。将水溶液通过 0.45 微米 PVDF 可弃型过滤器过滤。然后将 1ml 体积的滤液用 DI 水适宜地稀释, 并在 480nm 下测定溶液的浓度, 采用由新鲜样品制备的四点校正曲线。考虑稀释后, 二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物的饱和溶液的浓度为 8.64mg/mL。

[0393] 抑制和 / 或改善疾病的实验数据:

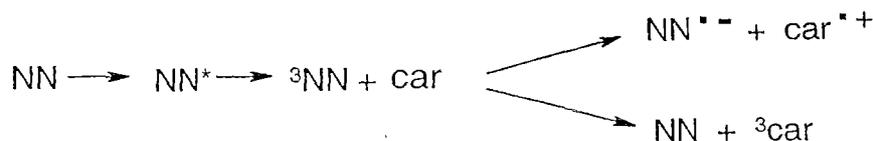
[0394] 比较自由基 - 阳离子形成能力: 非酯化的游离虾青素和二酸二琥珀酸酯虾青素, 使用闪光光解:

[0395] 图 27 和图 28 描述在获得关于非酯化的游离虾青素和二酸二琥珀酸酯虾青素衍生物的重态和类胡萝卜素阳离子自由基状态形成的闪光光解之后的光谱分析结果。类胡萝卜素阳离子自由基的形成是作为抗氧化剂的新衍生物的潜在生物物理行为的衡量指标。如果衍生物保持非酯化的游离虾青素的抗氧化行为, 则所有先前证实的 (即文献先例) 关于虾青素的治疗应用可以合理地设想用于新衍生物, 包括至少单线态氧猝灭、脂质过氧化链断裂和 / 或直接自由基清除。

[0396] 直接照射类胡萝卜素 (car) 不导致形成类胡萝卜素三重态 (³cars); 需要一种光敏剂。在此实验中, 将 nitronaftalin (NN) 用作光敏剂。照射后, 受激的光敏剂 (NN*) 形成光敏剂三重态 (³NN)。当 ³NN 遭遇类胡萝卜素时, 发生与 ³NN 的能量和电子转移反应。通过特征性吸收谱带来检测所得的相对稳定的 ³car 和类胡萝卜素阳离子自由基 (car⁺)。非极

性溶剂（例如己烷）有利于 ^3car 的形成，而更具极性的溶剂（醇、水）有利于 car^+ 的形成。光敏剂的阴离子自由基（ NN^- ）由于低吸收系数而不通常看到。

[0397]



[0398] A. 虾青素二琥珀酸 (astaC00H) 的光谱

[0399] 在乙腈 (MeCN) 中的 astaC00H 的瞬间吸收光谱, 敏化剂 NN.

[0400] 光谱中的负峰证明 NN 和 astaC00H 的基态消耗。550nm 处的正峰表明形成 astaC00H 三重态; 850nm 处的正峰表明形成 astaC00H 阳离子自由基。 ^3car 衰变相当迅速。15 μs 后, 一半的 ^3car 消失, 50 μs 后, 没有 ^3car 剩余。 car^+ 在此时间范围内是稳定的。

[0401] B. 参照化合物 [非酯化的游离虾青素 (asta)] 的光谱.

[0402] 在乙腈 (MeCN) 中的 asta 的瞬间吸收光谱, 敏化剂 NN.

[0403] asta 的光谱与 astaC00H 的光谱接近相同。50 μs 后, ^3car 已消失。在此时间范围内, car^+ 是稳定的。关于 astaC00H 和 asta 的吸收光谱中的负和正峰可重叠。

[0404] 闪光光解结果简要讨论:

[0405] 在闪光光解实验期间二酸二琥珀酸酯虾青素衍生物 (astaC00H) 和非酯化的游离虾青素 (asta) 之间似乎存在的差别很小。AstaC00H 在闪光光解实验中的表现类似 asta。因此, 用琥珀酸将游离虾青素酯化不改变光物理性能和阳离子自由基寿命。两种化合物在闪光光解实验期间都是光稳定的。二琥珀酸酯虾青素衍生物保持虾青素的有效抗氧化潜能, 并在酯化状态下具有活性。因此可以将它看作一种“软”药物 (作为经修饰的实体有活性), 而不是前药, 用于治疗应用, 赋予此衍生物有价值的双相自由基清除活性的性能 (即水相和脂相自由基清除)。

[0406] 诱导连接蛋白 43 蛋白表达:

[0407] Rogers 等人 (1990) 详细描述了关于细胞培养, Western 印迹法、定量光密度分析和总蛋白评价的方法, Bertram (1999) 提出了修改。简言之, 在 4mL 细胞培养系统中用以下制剂处理小鼠胚胎成纤维细胞 CH3/10T^{1/2} 细胞, 培养基包含 2% 小牛血清:

[0408] 1. TTPNB [p-(E)-2-(5,6,7,8-四氢-5,5,8,8-四甲基-2-萘基) 丙烯基苯甲酸] 10^{-8}M , 在丙酮中 [关于连接蛋白 43 上调的阳性对照 (4 μl 在 4mL 中)]

[0409] 2. 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 /H₂O, 浓度 10^{-5}M (40 μL 在 4mL 中)

[0410] 3. 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 /H₂O, 浓度 10^{-6}M (4 μL 在 4mL 中)

[0411] 4. 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 /H₂O, 浓度 10^{-7}M (1 : 10 稀释, 4 μL 在 4mL 中)

[0412] 5. 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 H₂O/乙醇 [EtOH] 配方, 浓度 10^{-5}M (40 μL 在 4mL 中)

[0413] 6. 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 H₂O/EtOH 配方, 浓度 10^{-6}M (4 μL 在 4mL 中)

[0414] 7. 无菌 H₂O 对照 (40 μL 在 4mL 中)

[0415] 8. 无菌 H₂O/EtOH 对照 (20 μL EtOH, 20 μL H₂O 在 4mL 中)

[0416] 9. 培养基对照 (4mL)

[0417] 在用受试化合物和对照溶液培养 96 小时之后收集细胞。所有培养基溶液的颜色

相同,但在用 10^{-5} 稀释的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物进行的两种处理之后颜色主观上变成橙红色。用光显微镜发现 TTNPB 处理的细胞呈条纹状,证明肌细胞分化,这是此细胞培养系统中的预期结果。在收获并沉淀细胞之后,包含两种 10^{-5} 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物溶液的管为亮红色;两种 10^{-6} 稀释管为粉红色。如先前关于其它有色类胡萝卜素所证实的,这是细胞摄入受试化合物的主观证据。

[0418] 然后溶解细胞,使 $50 \mu\text{g}$ 的各种蛋白在 10% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。然后将凝胶转移至硝酸纤维素滤器。用考马斯蓝染色测定总蛋白(图 29;泳道 6、7 和 9 于凝胶转移后变模糊,不包括在定量比较中[图 31])。用抗连接蛋白 43 抗体进行 Western 印迹法,然后在 Biorad 成像仪上进行 HRP 化学发光(图 30)。将原始凝胶剥离(stripped)一次,并重复 Western 印迹两次,然后观察。将结果相对于显示对照条件(无受试化合物)下连接蛋白 43 蛋白的背景组成型表达的泳道 8 对照(EtOH/H₂O)进行归一化。由阳性对照和受试化合物导致的相对连接蛋白 43 诱导的结果如图 31 所示。

[0419] Cx43 结果简要讨论。

[0420] 所有受试二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物制剂均诱导连接蛋白 43 表达超出在水和乙醇/水对照中组成表达的水平(图 31)。在不存在真实处理效果(无效假设对照 $\mu_1 =$ 处理平均 μ_2) 的情况下在 5 种分别单独的试验条件下检测出诱导连接蛋白 43 蛋白表达的可能性为 $1/2^5$ 或 $p = 0.03$ 。在水中配制的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物在各试验条件下均诱导连接蛋白 43 蛋白表达(从 10^{-5} 至 10^{-7}M)。测试的最低二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物/水组合的降低表明诱导的反应的剂量依赖性。

[0421] 在用在培养基中的最终乙醇浓度为 0.5% 进行评价的单一试验条件下相对诱导升高。这种发现高度提示此配方的生物利用度增加,因为已知乙醇减少水溶液中二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的聚集。在水中浓度大于 10^{-7} 和在乙醇/水组合中浓度为 10^{-5} 的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的溶液似乎具有比阳性 TTNPB 对照更高的诱导水平。TTNPB 是一种高效力的类维生素 A,它在 96 小时时间点以 10^{-8}M 有效地诱导连接蛋白 43 表达。

[0422] 二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物对小鼠成纤维细胞中细胞间间隙连接通讯(GJC)的诱导:

[0423] 进行一系列实验以评价二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物诱导鼠成纤维细胞的无限增殖细胞系中的间隙连接通讯(GJC)的能力。进行研究:

[0424] (1) 在功能水平,通过单层培养物中融合细胞之间的染料转移增加衡量细胞/细胞通讯;

[0425] (2) 在分子水平,通过这些化合物诱导连接蛋白 43(Cx43) 蛋白表达的能力来测定。Cx43 是允许 GJC 的这些成纤维细胞中细胞间通道的结构单元;

[0426] (3) 在细胞水平,由二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物增加与相邻细胞直接接触的质膜区域中的 Cx43 免疫反应性斑块的数量和大小的能力所示。

[0427] (1) 通讯分析。进行实验以评价二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物[作为全反式(全 E) 立体异构体、S, S'、内消旋和 R, R' 1:2:1 比率的统计混合物]增强小鼠胚胎成纤维细胞 C3H/10T^{1/2} 细胞之间的间隙连接细胞间通讯(GJC)的能力。这种能力先前与类胡萝卜素抑制致癌物诱导的肿瘤转化的能力高度相关(Zhang, 1992)。而且, Cx43 介导的心肌细胞之间的连接通讯负责保持同步收缩和防止心律失常的信号的转移(Peters, 1995)。

[0428] 基本如前述 (Zhang, 1994) 通过将荧光染料荧光黄 CH (Sigma, St. Louis, MO) 显微注射至个体融合细胞来分析连接通透性。简言之, 用以下试剂将 C3H/10T1/2 细胞的融合培养物处理 4 天: (1) 溶于 1 : 2 乙醇 / 水 (EtOH/H₂O) 配方的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 (1×10^{-5} M); (2) 溶于四氢呋喃的一种合成类维生素 A-TTNPB (1×10^{-8} M), 作为阳性对照; 或 (3) 1 : 2EtOH/H₂O 处理的细胞, 作为阴性对照。在相差镜头下鉴定各个培养皿中的单一细胞, 并使用装载作为 10% 溶液的荧光染料荧光黄的微注射针 (Eppendorf, Hamburg, Germany) 进行加压注射。通过遥控显微操作器来控制针, 并将细胞和显微镜置于气动抗振动台上。通过用导致荧光黄发黄色荧光的 UV 光筒短照明来证明成功注射荧光黄。这种染料足够小, 以通过间隙连接, 并且带电, 从而可以仅进入与注射细胞相邻的细胞, 如果它们处于连接通讯的话。在允许连接转移的 2 分钟后, 在 UV 照明下采取数字图象。与注射细胞相邻的荧光细胞的数目之后通过使用无偏密度阈值方法和 SigmaScan 软件程序 (Jandel Scientific) 进行数字图像分析来确定。将该通讯细胞的数目用作连接通讯的指标, 如前述 (Hossain, 1993)。

[0429] 此分析的结果表明, 溶于 1 : 2EtOH/H₂O 配方的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 (1×10^{-5} M) 有效增加连接通讯的程度, 超过在 1 : 2EtOH/H₂O 处理的对照组中所见的程度。在 22 个显微注射处理的细胞中, 有 15 个 (56%) 通过间隙连接而功能性偶联, 相比之下对照细胞仅有 11 分之 3 (27%)。这些差别是统计学上有差异的 ($p < 0.04$; 配对的 Student' s t 检验)。代表性显微照片如图 14 所示:

[0430] A 组: 用浓度为 1×10^{-5} M 的在 1 : 2EtOH/H₂O 中的二钠盐二琥珀酸酯虾青素的立体异构体的统计混合物处理;

[0431] C 组: 1 : 2EtOH/H₂O 溶剂阴性对照;

[0432] E 组: TTNPB, 浓度为 1×10^{-8} M, 在作为溶剂的四氢呋喃中, 阳性对照; 和

[0433] B、D、F 组: 分别数字分析显微照片 A、C、E, 显示在设置阈值以上的像素是荧光黄荧光阳性的。由于细胞核具有最大体积, 它们蓄积最多荧光黄, 并表现最大荧光。

[0434] (2) 分子研究。二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的混合物和纯化的对映异构体形式的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 (S, S'、内消旋和 R, R' 形式, 根据 HPLC 纯度 > 90%) 增加鼠成纤维细胞中的 Cx43 蛋白的表达, 它由基本如所述 (Zhang, 1992 和 1994) 的免疫 (Western) 印迹法评价。简言之, 在补充 5% 胎牛血清 (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA) 和 25 μ g/mL 硫酸庆大霉素 (Sigma, St. Louis, MO) 的含 Earle 盐 (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA) 的 Eagle 基本培养基中培养小鼠胚胎成纤维细胞 C3H/10T1/2 细胞, 并在 37°C 下在 5% CO₂ 中培养。在 100 毫米 (mm) 平皿中接种后第 7 天, 用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物将融合细胞处理 4 天, 然后如所述地收获细胞并分析 Cx43 蛋白诱导。根据制造商的指示用蛋白分析试剂盒 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 测定蛋白含量。通过 Western 印迹法, 使用 NuPage western 印迹试剂盒和仪器 (Invitrogen, Carlsbad, CA) 分析包含 100 μ g 蛋白的细胞溶解产物, 并用针对对应于小鼠、人和大鼠 Cx43 的 C 末端域的合成多肽产生的兔多克隆抗体 (Zymed, San Francisco, CA) 检测 Cx43 蛋白。使用结合有 HRP 的抗兔二抗 (Pierce Chemical Co., Rockford, IL) 通过化学发光来观察 Cx43 免疫反应性条带。用冷却的 CCD 相机获得数字图像, 然后进行定量光密度测定 (Bio-Rad, Richmond, CA)。通过用考马斯蓝蛋白染料染色和数字图像分析证

明泳道的蛋白载量相同。

[0435] 在此实验中,将二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物以 1 : 2 乙醇 /H₂O 配方、浓度为 1×10^{-5} M 加到细胞培养物。立体异构体的统计混合物和纯化的对映异构体形式表现出与单独用 1 : 2 乙醇 /H₂O 处理的细胞培养物相比 Cx43 的表达增加 (图 15A 和图 15B)。用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物处理在所有受试衍生物中引起最高 Cx43 诱导水平。这些诱导水平比用包括在内作为阳性对照的类维生素 A 四氢四甲基萘基丙烯酸苯甲酸 (TTNPB) (Hoffman-LaRoche, Nutley, NJ) 和乙酸视黄酯 (Sigma, St. Louis, MO) 所见的诱导水平小数倍 ;这种相对效力差别与先前的研究一致。

[0436] (3) 细胞研究。二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物在处理的鼠 10T1/2 细胞中在细胞 / 细胞接触区域增加 Cx43 的装配,与功能性间隙连接的形成一致。

[0437] 在此实验中,通过免疫荧光染色法评价 Cx43 的表达和装配成斑块。操作基本上如 Zhang (1992) 所述。简言之, C3H/10T1/2 细胞的融合培养物在 Permax 塑料 4 室玻片 (Nalge Nunc International, Naperville, IL) 上生长,并用以下试剂处理 4 天 : (1) 溶于 1 : 2EtOH/H₂O 配方的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 (立体异构体的统计混合物); (2) 在四氢呋喃中的浓度为 1×10^{-8} M 的类维生素 A TTNPB, 作为阳性对照 ; 或 (3) 1 : 2EtOH/H₂O, 作为溶剂对照。用 -20°C 甲醇将细胞固定过夜,用缓冲液洗涤,用在 PBS 中的 1% 牛血清白蛋白 (Sigma, St. Louis, MO) 封闭,如在以上 (2) 那样用兔多克隆抗 Cx43 抗体 (Zymed, San Francisco, CA) 培养,并用结合 Alexa568 的抗兔二抗 (MolecularProbes, Eugene, OR) 检测。用 568nm 光照射玻片,并在 600nm 波长下使用 Zeiss Axioscope 光学显微镜和 Roper Scientific 冷却的 CCD 相机获得图像。

[0438] 用 TTNPB 类维生素 A 对照和浓度为 1×10^{-5} M 的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物处理的玻片表现出免疫反应性 Cx43 在与相邻细胞直接接触的细胞膜区域装配成为斑块。这种装配与间隙连接的斑块的位置和形成一致,已知所述斑块是通过连接而关连的细胞群中多个单独间隙连接聚集形成的 (Perkins, 1997)。在用作为对照的溶剂处理的培养物中,这种免疫反应斑块是不常见的,并且比在用二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的立体异构体的统计混合物或作为阳性对照的 TTNPB 处理的细胞中检测到的斑块要小。这些斑块的频率及其大小与在第 1 部分和图 14 所述的荧光黄染料转移实验所检测到的间隙连接通透性的功能差异 (TTNPB > 二钠盐二琥珀酸酯虾青素的立体异构体的统计混合物 > 溶剂对照) 一致,并与在第 2 部分和图 15 所述的免疫印迹实验中所检测的 Cx43 诱导程度一致。代表性显微照片如图 16 所示。

[0439] 鼠成纤维细胞中非酯化的游离虾青素对致癌物诱导的肿瘤转化的抑制 :

[0440] 在口服酯化的虾青素之后在哺乳动物肠中产生非酯化的游离虾青素。仅游离虾青素在哺乳动物血浆和实体器官中发现。这在单一和多剂量口服药代动力学研究中再次得到证明 ; 结果如本文所述。血清白蛋白的固有酯酶活性以及血清和实体器官中混栖酯酶的作用在肠胃外施用二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (XVI) 之后快速地产生非酯化的游离虾青素。

[0441] 闪光光解实验也证明二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物和非酯化的游离虾青素在类胡萝卜素阳离子自由基形成方面具有相同的抗氧化行为。进行实验来评价非酯

化的游离虾青素（二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 (XVI) 的体内最终裂解产物，作为 1 : 2 : 1 比率的立体异构体 3S, 3S'、内消旋和 3R, 3' R 的全反式混合物测试）在已故的 Charles Heidelberg 的实验室中开发的 C3H10T1/2 细胞培养模型 (Reznikoff, 1973) 中抑制肿瘤转化的能力。这种细胞培养体系显示出有效地模拟在全动物肿瘤形成中的引发和转化事件 (Bertram, 1985)。在这些细胞中，致癌性多环烃 3-甲基胆蒎 (MCA) 处理在少部分处理的细胞中产生引发事件，在 5 周之后导致这些细胞发生形态转化，表现为存在转化的病灶。将这些转化的细胞注射至同系小鼠导致在注射部位形成肉瘤，表明转化的致癌性质 (Reznikoff, 1973)。此试验被改造为适于检测癌症预防剂 (Bertram, 1989)，而癌症预防性类维生素 A 和类胡萝卜素已证明可抑制此体系中的转化 (Bertram, 1991 ; Pung, 1988 ; 和 Merriman, 1979)。

[0442] 此实验根据先前确立的方案 (Bertram, 1991 和 Pung, 1988) 进行。简言之，将源自小鼠胚胎成纤维细胞的 10T 1/2 细胞以 10^3 细胞 / 60mm 平皿的密度接种在补充 4% 胎牛血清 (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA) 和 $25 \mu\text{g/mL}$ 硫酸庆大霉素 (Sigma, St. Louis, MO) 的 Eagle 基本培养基 (BME) (Atlanta Biologicals, Atlanta, GA) 中。24 小时后用在丙酮中的 $5.0 \mu\text{g/mL}$ MCA (Sigma, St. Louis, MO) 或作为对照的 0.5% 丙酮（最终浓度）处理细胞。在 MCA 处理后 24 小时更换培养基。7 天后用在 THF 中的虾青素或在丙酮中的乙酸视黄醇酯处理细胞，并每 7 天进行再处理，持续 4 周。用适宜的溶剂对照处理其它平皿。在实验开始 5 周后，用甲醇固定细胞，并用 10% 吉姆沙染色剂 (Sigma, St. Louis, MO) 染色，并给 II 型和 III 型病灶评分 (Reznikoff, 1973)。

[0443] 此分析的结果表明与用 MCA 和作为溶剂对照的 THF 处理的细胞相比用虾青素处理 4 周导致 MCA 诱导的转化病灶数量发生浓度依赖性减小（如图 34 所述）。图 34 描述非酯化的、游离虾青素（作为立体异构体的全反式混合物）对 MCA 诱导的肿瘤转化的作用。图代表总共 68 份用 $3 \times 10^{-6}\text{M}$ 、 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 和 $3 \times 10^{-7}\text{M}$ 的虾青素处理的培养物，它们分别在 0.3%、0.1% 和 0.03% 的 THF 载体中递送。对照如下：总共 16 平皿没有接受致癌物，并用 0.05% 乙醇溶剂处理；对照没有表现任何转化事件。总共 20 个平皿用 MCA 和 1% THF 溶剂处理，产生 0.92 病灶 / 平皿的转化率。与用 MCA- 处理的对照的各种处理的平均病灶 / 平皿比较来计算虾青素处理的平皿的转化降低百分率（% 降低）。用配对的 Student' s t 检验进行推理性统计，分别得到计算的 P 值为 0.00004、0.00001、和 0.00006。认为 $P < 0.05$ 是显著的。用 $3 \times 10^{-6}\text{M}$ 虾青素处理导致完全抑制转化的表型（图 35）。图 35 描述虾青素处理的平皿与对照平皿的比较。代表性平皿用以下试剂处理：A, 无 MCA, 溶剂对照；B, MCA $5.0 \mu\text{g/mL}$, 1% THF 作为溶剂对照；C, MCA, 在 THF 中的 $3 \times 10^{-6}\text{M}$ 虾青素（作为立体异构体的全反式混合物）。值得注意的是这种抑制水平远远超过先前关于使用相同方案 (Bertram, 1991) 测试的所有其它类胡萝卜素报道的水平。比较目前的数据与先前在受试浓度下肿瘤转化降低百分率所报道的数据表明，虾青素是比 β -胡萝卜素或角黄素有效得多的转化抑制剂（图 36）。图 36 描述虾青素（作为立体异构体的混合物）与先前测试的类胡萝卜素进行的比较。编辑数据，将用虾青素处理的培养物中 MCA- 诱导的肿瘤转化病灶 / 平皿的降低百分率与先前 Bertram 实验室报道的在用 β -胡萝卜素和角黄素 (Bertram, 1991) 采用相同的方案处理之后的数据得出的病灶 / 平皿的降低百分率进行比较。在此报道关于 β -胡萝卜素和角黄素在先前试验的最高浓度 ($1 \times 10^{-5}\text{M}$) 下的降低百分率；对虾青素没有采用这种更高

浓度,因为虾青素在较低浓度下测定的活性较大。这些研究表明合成衍生物的裂解的虾青素部分在口服和肠胃外给药之后是高度有效的癌症化学预防剂的潜能。结合本文还报道的肝蓄积药代动力学数据(在单一和多剂量策略之后),此化合物的应用构成特别有用的实施方案。

[0444] 抑制活性氧种类:

[0445] 在实验中,以 Percoll 梯度从人志愿者全血中分离嗜中性白细胞。然后将分离的嗜中性白细胞重悬在磷酸盐缓冲盐水中,并用佛波醇酯作最大刺激以诱导呼吸爆发和产生超氧化物阴离子。往活化的人嗜中性白细胞的溶液中加入不同浓度的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物,然后测定超氧化物信号[如用电子顺磁共振(EPR)成像测定]。二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物(作为立体异构体的混合物)以依赖于剂量的方式减少测定的超氧化物阴离子信号(图2);在3mM浓度下实现近乎完全抑制超氧化物阴离子信号。图2表明在对照组中活化之后强烈的超氧化物信号,以及用100 μ M-3mM的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物滴定的结果。在100 μ M下测试的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物清除28%的总信号。在3mM下,几乎没有超氧化物信号剩余。这些结果表明对上述的其它抗嗜中性白细胞干预所证实的在局部缺血-再灌注损伤中的心脏保护作用也可以用本文所述的新类胡萝卜素衍生物实现。除了减少在局部缺血-再灌注损伤中重要的超氧化物阴离子信号之外,用所述的新类胡萝卜素衍生物还可能实现心肌抢救,因为超氧化物阴离子在心肌局部缺血延长期间在组织损伤和死亡中起主要作用。

[0446] 图3描述二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物/维生素C溶液对活性氧种类(超氧化物阴离子)的作用,这是用EPR成像监测的。溶液分别包括大约2比大约1的维生素C和二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物的混合物。二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物/维生素C溶液以依赖于剂量的方式降低测定的超氧化物阴离子信号(图3);在0.02 μ M浓度实现完全抑制超氧化物阴离子信号。图3证明在对照组中活化之后的强超氧化物信号,以及用0.01 μ M-0.02 μ M的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物/维生素C溶液滴定的结果。

[0447] 在第三个实验中,再次以Percoll梯度从第二人志愿者的全血中分离嗜中性白细胞。然后将分离的嗜中性白细胞重悬在磷酸盐缓冲盐水中,并用佛波醇酯作最大刺激以诱导呼吸爆发和产生超氧化物阴离子。往活化的人嗜中性白细胞的溶液加入4种浓度的盐酸盐二赖氨酸酯虾青素衍生物(XX),然后测定超氧化物信号(用EPR成像测定)。盐酸盐二赖氨酸酯虾青素衍生物也以依赖于剂量的方式减少测定的超氧化物阴离子信号(图21),从在1 μ M下减少大约5%至在3mM下减少98%。再次在3mM浓度下实现接近完全地抑制超氧化物阴离子信号。这种新的类胡萝卜素衍生物在低浓度(1 μ M)下表现出清除效力,以及增加浓度的该衍生物在此体外试验中接近完全地消除超氧化物阴离子信号的能力。

[0448] 这种新衍生物在体外作为水性清除剂的活性再次表明新衍生物(二钠二琥珀酸酯虾青素,盐酸盐二赖氨酸虾青素)在体内将充当软药物(即作为完整、未裂解的新衍生物有活性)而不是前药(不具有活性,直至裂解成游离虾青素)。此衍生物(XX)的水溶性大于50mg/mL,表明本发明方法可用于增加母体类胡萝卜素(在此情况下为虾青素)的水溶性,从接近零的固有水溶性增加至高mg/mL范围。

[0449] 二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物导致的直接超氧化物阴离子清除:通过电子顺磁共振成像法表明的各立体异构体相对于立体异构体的统计混合物的相对效力

[0450] 材料

[0451] 非酯化的全E虾青素 [立体异构体 3S,3' S、内消旋 (3S,3' R 和 3' S,3R) 和 3R,3' R 的 1 : 2 : 1 统计混合物] 购自 Buckton Scott (India), 并如提供的那样使用 (HPLC 表明 > 95% 纯度)。将虾青素溶于 HPLC 级二甲亚砜 (DMSO ;Sigma-Aldrich, St. Louis, MO)。以 9 种配方分别单独测试虾青素的二钠二琥珀酸酯衍生物 : 立体异构体的统计混合物 (关于虾青素, 上述, 全 E 的 1 : 2 : 1 混合物 ; 在所有的表和图中标记为“混合物”) ; 3S,3' S 和 3R,3' R (光学异构体或对映异构体) ; 和内消旋 (3S,3' R 和 3' S,3R 的混合物 ; 对映异构体对的非对映异构体)。所有二琥珀酸酯衍生物合成纯度根据 HPLC > 90%。首先在来自 10mM 储备溶液的在纯水溶液 (去离子水) 中适宜的最终浓度下测试二琥珀酸酯衍生物。然后由在乙醇的 1 : 2 混合物中以 10mM 制备的储备溶液 (储备溶液中 EtOH 的最终浓度 33¹/₃% ; 分离的嗜中性白细胞试验中的最终浓度 0.3% ; HPLC 级乙醇, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) 测试 4 种二琥珀酸酯衍生物中的每一种。还由 50% EtOH 浓度的储备溶液 (在分离的嗜中性白细胞试验中的最终浓度 0.5%) 测试 3S,3' S 衍生物。二琥珀酸酯衍生物的乙醇配方表现出完全解聚在纯水溶液中形成的超分子装配体, 提供衍生物的单体溶液, 然后立即引入试验。还进行单独乙醇的阴性对照 (在分离的嗜中性白细胞试验中为 0.3% 和 0.5% 最终 EtOH 浓度) 和超氧化物歧化酶模拟阳性对照 (10 μ M 最终浓度 ; Metaphore[®] Pharmaceuticals, Inc., St. Louis, MO)。

[0452] 合成类胡萝卜素衍生物 [琥珀酸一-(4-{18-[4-(3- 羧基 - 丙酰氧基)-2,6,6- 三甲基-3- 氧代 - 环己 -1- 烯基]-3,7,12,16- 四甲基 - 十八烷 -1,3,5,7,9,11,13,15,17- 壬烯基}-3,5,5- 三甲基 -2- 氧代 - 环己 -3- 烯基) 酯 ; 图 17] 及其立体异构形式, 虾青素的二钠二琥珀酸酯衍生物, 全反式 (全 -E) 形式。所述衍生物为在 3 和 3' 碳位置具有 2 个手性中心的对称手性分子, 包含 4 种立体异构体 : 3R,3' R 和 3S,3' S (光学异构体或对映异构体), 以及非对映异构体内消旋形式 (3R,3' S 和 3' R,3S)。由商业来源的虾青素合成的立体异构体的统计混合物包含 1 : 2 : 1 比率的 3R,3' R、内消旋 (3R,3' S 和 3' R,3S) 和 3S,3' S 立体异构形式。所有单独的立体异构体和统计混合物根据 HPLC 合成纯度 > 90%, 允许直接比较这些形式作为直接自由基清除剂的个体效力。用于此研究的全 -E 形式立体异构体是线性、刚性分子 (bolaamphiphiles), 因为在间隔物的多烯链中缺乏顺式 (或 Z) 构型。

[0453] 虾青素的二钠二琥珀酸二酯相对于母体化合物虾青素表现出水“分散性”增大。各立体异构体和统计混合物的水分散性都大于 8mg/mL (大约 10mM), 使它们可被引入不含助溶剂的缓冲水性试验体系。对于在本研究中测试的衍生物也观察到母体类胡萝卜素如虾青素 (Salares, 1977) 以及新类胡萝卜素衍生物 (例如辣椒红衍生物) (Zsila, 2001 和 Bikadi, 2002) 在水溶液中形成超分子装配体的趋势。

[0454] 超分子自我装配导致水溶液中相当大的聚集体, 并阻止聚集分子与自由基种类的最大直接相互作用。因此, 在纯水性配方和含有助溶剂乙醇的配方中比较新虾青素衍生物的直接清除表现。在储备溶液中, 1 : 2 浓度的 EtOH/ 水表现出完全解聚统计混合物、内消旋和 3R,3' R 衍生物 ; 需要 50% 乙醇储备溶液来完全解聚 3S,3' S 异构体。还相对于阴性 (即乙醇载体) 和阳性 [超氧化物歧化酶 (SOD) 模拟物, 游离外消旋虾青素, 在 DMSO 中] 对照测定化合物的清除能力。

[0455] 白细胞纯化和制备

[0456] 通过 Percoll 密度梯度离心从新鲜取样的单一志愿者的静脉血 (S.F.L.) 中分离人多形核白细胞 (PMNs), 产生 PMN 纯度为 > 95%。

[0457] 将各 10mL 全血与 0.8mL 0.1M EDTA 和 25mL 盐水混合。将稀释的血液铺于 1.080g/mL 特定密度的 9mL Percoll 上。在 400×g 和 20℃ 下离心 20 分钟后, 移出血浆、单核细胞和 Percoll 层。通过加入 18mL 冰冷的水 30 秒, 然后加入 2mL 10×PIPES 缓冲液 (25mM PIPES, 110mM NaCl 和 5mM KCl, 用 NaOH 滴定至 pH 7.4) 溶解红细胞。在 4℃ 下将细胞沉淀, 倾析上清液, 并重复此过程。在第二次低渗溶解之后, 用 PAG 缓冲液 (PIPES 缓冲液, 包含 0.003% 人血清白蛋白和 0.1% 葡萄糖) 洗涤细胞两次。然后, 通过在血细胞计数器上进行光学显微镜检查来计数 PMN。然后将最终的沉淀悬浮在 PAG-CM 缓冲液 (PAG 缓冲液, 含有 1mM CaCl₂ 和 1mM MgCl₂) 中。

[0458] EPR 测定

[0459] 所有 EPR 测定使用在 X- 谱带以 TM₁₁₀ 腔操作的 Bruker ER 300 EPR 光谱计进行。微波频率用 Model 575 微波计数器 (EIP Microwave, Inc., San Jose, CA) 测定。为测定佛波醇-酯 (PMA) 刺激的 PMN 产生 O₂⁻, 用 10mM 的 DEPMPPO (Oxis, Portland, OR) 进行 EPR 自旋-捕集研究。用 PMA (1ng/mL) 刺激 1×10⁶ PMNs, 并将其装填至毛细管以进行 EPR 测定。为测定在 DMSO 中的非酯化的游离“外消旋”虾青素和在 9 种配方之每种中的二钠盐二琥珀酸酯衍生物的自由基清除能力, 将 PMN 与化合物预温育 5 分钟, 然后如前述进行 PMA 刺激。用于自旋-捕集实验的仪器设置如下: 调节幅度, 0.32G; 时间常数, 0.16s; 扫描时间, 60s; 调节频率, 100kHz; 微波功率, 20 毫瓦; 和微波频率, 9.76GHz。将样品置于石英 EPR 扁平室中, 并记录光谱。如报道那样鉴定光谱中的组成信号并进行定量 (Lee, 2000)。

[0460] 统计分析

[0461] 用 NCSS 统计软件包 (NCSS 2001 和 PASS 2002, Kaysville, UT) 进行统计分析。所有统计学检验在 α = 0.05 下进行。

[0462] EPR 结果简述:

[0463] 在研究开始时将由 Metaphore, Inc. 生产的有效 SOD 模拟物用作阳性对照。如在 Zweier 实验室反复观察到的, 在仅仅水载体中的 10 μM 剂量近乎完全消除超氧化物阴离子信号, 如用 DEPMPPO 检测 (97% 抑制; 表 1)。还评价了单独乙醇的阴性对照 (最终浓度 0.3%), 因为乙醇在这些体系中表现出较小清除活性; 在此浓度下看到 5.7% 抑制作用。在表 1 的描述数据中, 没有从包含乙醇的配方中扣除该抑制量, 因为在此研究中评价给药载体本身 (在 EtOH 中的二钠二琥珀酸酯衍生物) 在直接清除中的效用。评价在 DMSO 中的非酯化的游离虾青素 (100 μM) 作为与此研究中合成的新衍生物进行直接比较的参照标准; 虾青素/DMSO 载体的平均抑制作用为 28% (表 1)。

[0464] 图 18 显示最终浓度为 100 μM 的在水中的 4 种立体异构体 (混合物和 3 种单独的立体异构体) 中每一种的相对清除能力。除了 3R, 3' R 对映异构体 (28.7% 抑制), 所有其它新衍生物配方表现出相对于虾青素/DMSO 配方降低的清除能力 (范围 -2.0% 至 19.3% 抑制; 表 1)。可以看出, 3S, 3' S 配方没有表现出任何平均清除活性。但是, 当在乙醇配方中引入到分离的嗜中性白细胞试验体系中时, 在每种情况下清除活性增大超过在水中配制的相同衍生物 (图 19; 范围 38.0% -42.5%)。重要的是注意到 3S, 3' S 衍生物在 50%

EtOH 中配制以进行这种比较。观察到在乙醇配方中的新衍生物清除能力增加超过在 DMSO 中的虾青素的趋势,但在扣除乙醇载体(在试验中的最终浓度为 0.3%)的平均清除能力之后,该趋势不明显(NS)。此外,在乙醇中的 4 种受试的新衍生物制剂之间没有观察到平均清除能力的显著差异(图 19)。

[0465] 图 20 表明增加浓度的在乙醇配方中的二钠二琥珀酸酯虾青素的立体异构体的混合物对超氧化物信号抑制的滴定结果。当浓度从 100 μ M 增至 3mM 时,观察到对超氧化物信号接近完全的抑制作用(在 3mM 剂量下为 95.0%抑制;表 1 和图 18)。剂量-反应曲线是非线性的。对抑制百分率和测试剂量进行调整,二钠二琥珀酸酯衍生物比在本研究中用作阳性对照的 SOD 模拟物的效力低 1 至 2 个数量级(表 1)。表 1 描述在本研究中测试的虾青素的二钠二琥珀酸酯衍生物的不同配方的描述统计。各个配方评价的样本大小为 3 或更大,除了在 50% EtOH 储备溶液中的 3S, 3' S(N = 2),和在研究开始时评价的 SOD 模拟物(阳性对照, N = 1)。

[0466] 表 1

[0467]

样品	溶剂	浓度	N	平均值 (%抑制)	S. D.	SEM	Min	Max	范围
虾青素	DMSO	0.1mM	4	28.0	7.6	3.8	20	35	15
混合物	水	0.1mM	3	19.3	0.6	0.3	19	20	1
混合物	EtOH	0.1mM	3	38.0	8.7	5.0	32	48	16
混合物	EtOH	0.5mM	3	60.1	7.2	4.2	56	69	13
混合物	EtOH	1.0mM	3	78.0	8.2	4.7	71	87	16
混合物	EtOH	3.0mM	3	95.0	4.9	2.8	89	98	9
内消旋	水	0.1mM	3	15.7	5.9	3.4	9	20	11
内消旋	EtOH	0.1mM	4	42.5	3.4	1.7	38	46	8
3R, 3'R	水	0.1mM	3	28.7	15.0	8.7	13	43	30
3R, 3'R	EtOH	0.1mM	5	40.8	7.5	3.3	30	50	20
3S, 3'S	水	0.1mM	3	-2.0	4.4	2.5	-7	1	8
3S, 3'S	EtOH	0.1mM	6	21.3	4.9	2.0	15	29	14
3S, 3'S	EtOH(50%)	0.1mM	2	38	1.4	1.0	37	39	2
对照	水	0.0mM	10	0.0	ND	ND	ND	ND	ND
对照	EtOH	0.3%	3	5.7	2.5	1.5	3	8	5
		最终							
SOD	水	10 μ M	1	97.0	ND	ND	ND	ND	ND
模拟物									

[0468] EPR 结果简述

[0469] 虾青素是一种有效的亲脂性抗氧化剂,它通常在富含脂质的细胞膜、脂蛋白和其它组织中发挥其抗氧化性能(Britton, 1995)。作为水分散性活性剂效用增大的虾青素的衍生物具有直接清除由在呼吸爆发刺激之后分离的人嗜中性白细胞产生的水相超氧化物阴

离子的能力。

[0470] 新衍生物的纯水性配方在直接清除能力方面的效力小于乙醇配方。在某些溶剂（例如水）中水溶性类胡萝卜素衍生物的超分子装配可以解释它们在这些溶剂中效力的缺乏。所述聚集是螺旋状、“card-pack”类型，在纯水性溶液中形成大小超过 240nm 的聚集体。增加缓冲液的离子强度可以增加这些聚集体的大小和稳定性。这些聚集体的自由基清除能力与相同化合物的单体溶液相比减小；实际上，对于溶于水的 3S, 3' S 立体异构体没有见到清除能力（表 1, 图 18）。必须小心地制备用于体外和体内试验的配方，因为超分子装配限制可与自由基种类相互作用的分子的数量。聚集体的大小也必须考虑，已经描述了包含多至 10^6 个分子和尺寸达到 300nm 或更大的聚集体 (Bakadi, 2002)。

[0471] 滴定二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物剂量至 3mM（作为在 1 : 2EtOH/ 水中的立体异构体的混合物）表现出接近完全抑制超氧化物阴离子信号（95% 抑制），如用 DEPMPO 自旋阱测定（图 20）。剂量 - 反应曲线是非线性的，要求增加剂量以接近完全抑制自由基信号（图 20）。在最低测试浓度（100 μ M）下抑制近 40% 的信号。此剂量下二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物的效力可以直接与用作本研究中的阳性对照的超氧化物歧化酶（SOD）模拟物（在 10 μ M 为 97% 抑制）进行比较。这些结果表明，作为水相自由基清除剂，二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物比 SOD 模拟物的效力小 1 至 2 个数量级。但是，在体内这些衍生物衰变成游离虾青素，其在富含脂质的细胞膜 [包括线粒体膜和核膜 (Goto, 2001)] 中变得具有活性，因而提供双重保护作用（水相和脂相自由基清除），这是用水溶性蛋白和酶模拟物不能实现的。非酯化的游离虾青素（当以 0.02% 食物 wt/wt 作为饮食补充物提供时）具有抗 ROS 介导的对骨骼肌和心肌的艰苦运动损害的的心脏保护作用 (Aoi 等人 2003)。因此，这种特征（即双相自由基清除）应该使此类化合物可额外地用作自由基和活性氧种类预防是重要的适应症中的临床治疗剂 (Cross, 1987)。

[0472] 此研究第一次证明由 EPR 光谱学检测到的一类新的类胡萝卜素衍生物对超氧化物阴离子的直接清除。发现所述化合物在纯水溶液中形成超分子装配体。相对于相同化合物的单体溶液，超分子装配体的形成可能限制它们的清除效力。在所述新化合物的 4 种潜在的立体异构体中没有看到清除能力的显著差异。剂量 - 范围研究表明衍生物的浓度可以增加至接近完全抑制诱导的超氧化物阴离子信号。作为潜在的体内治疗剂，这类化合物可以用作水相和脂相清除剂，从而可以广泛地用于有效的自由基清除剂对其具有经证实的效力的急性和慢性疾病。二钠二琥珀酸酯二维生素 C 虾青素衍生物导致的直接超氧化物阴离子清除：

[0473] 在电子顺磁共振 (EPR) 成像实验中，以 Percoll 梯度从人志愿者全血中分离嗜中性白细胞。然后将分离的嗜中性白细胞重悬在磷酸盐缓冲盐水中，并用佛波醇酯作最大刺激以诱导呼吸爆发和产生超氧化物阴离子。往活化的人嗜中性白细胞的溶液加入不同浓度的二钠二琥珀酸酯二维生素 C 虾青素衍生物 (XXIII)（半系统命名琥珀酸 4-[18-(4-{3-[2-(3,4-二羟基-5-氧代-2,5-二氢呋喃-2-基)-2-羟基-乙氧基羰基]-丙酰氧基}-2,6,6-三甲基-2-氧代-环己-1-烯基)-3,7,12,16-四甲基-十八烷-1,3,5,7,9,11,13,15,17-壬烯基]-3,5,5-三甲基-2-氧代-环己-3-烯基酯 2-(3,4-二羟基-5-氧代-2,5-二氢呋喃-2-基)-2-羟基-乙基酯)，然后测定超氧化物信号（如用 EPR 成像测定）。二钠二琥珀酸酯二维生素 C 虾青素衍生物 (XXIII) 以依赖于剂量的方式减少测定的

超氧化物阴离子信号 (图 33); 在 $60 \mu\text{M}$ 浓度下实现完全抑制超氧化物阴离子信号。这代表效力比同样合成用于本系列实验的二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (XVI) 增加 50 倍。测试的衍生物的纯度为 88% (通过 HPLC 曲线下面积或 AUC 确定)。该新的类胡萝卜素衍生物 - 通过对各维生素 C 的 6-OH 位置进行酯化而设计成“软药物” - 保持单独维生素 C 分子的抗氧化功能。衍生物 (XXIII) 的效力接近 1 : 2 摩尔比的二钠二琥珀酸酯虾青素 (XVI) 和游离维生素 C 的配方的效力 (其以 $20 \mu\text{M}/40 \mu\text{M}$ 二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (XVI) / 游离维生素 C 配方完全抑制超氧化物阴离子信号)。每摩尔的衍生物在体内产生 2 摩尔游离维生素 C 和 1 摩尔非酯化的游离虾青素的衍生物 (XXIII) 特别优选用于某些临床适应症。衍生物 (XXIII) 还可能在这些临床情况下表现效力增加; 其中水相清除 (通过完整母体衍生物以及游离维生素 C) 和脂相清除 (通过非酯化的游离虾青素) 对于可归因于 ROS 和其它自由基种类损伤的病理情况的减少是重要的。

[0474] 雄性 Sprague-Dawley 大鼠中的梗塞大小减小:

[0475] 图 4、图 25 和图 26 描述雄性 Sprague-Dawley 大鼠中梗塞大小的减小。用于水溶液中的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物 (作为立体异构体的混合物) 预处理雄性 Sprague-Dawley 大鼠, 然后进行闭塞并诱导心肌梗塞。用 $100\text{mg}/\text{kg}$ 仲丁硫巴比妥麻醉雄性 Sprague-Dawley 大鼠 (175-200 克 s), 进行器械操作, 并暴露心脏。环绕左冠状动脉周围放置缝线, 并进行 30 分钟的总冠状动脉闭塞, 然后进行 2 小时再灌注, 此时从动物上切离心脏测定梗塞大小。用缓冲液洗涤心脏, 并用保持在 37°C 下的在 pH 7.40 的磷酸盐缓冲液中的三苯基四唑翁氯化物 (TTC) 染色溶液培养。梗塞大小 (IS) 表示为占危险面积的 % (IS/AAR, %)。在整个实验过程中监测系统血压、心率、血气和体温, 并将体温和血气严格控制在正常生理水平。通过为期 4 天每天尾静脉注射 I.V. 给药 25、50 或 $75\text{mg}/\text{kg}$ 的二钠盐二琥珀酸酯虾青素衍生物或无菌盐水载体, 然后进行梗塞实验和测定梗塞大小。

[0476] 抢救结果简述.

[0477] 梗塞大小减小和相应的心肌抢救随剂量呈线性和明显地增加 ($P = 0.001^{**}$)。在最大受试剂量 $75\text{mg}/\text{kg}$ 下, 平均心肌抢救为 56%, 它接近用局部缺血预处理策略可获得的抢救率。在测试更高剂量前对在此大鼠中进行单一剂量 I.V. 注射有体积限制; 但是非酯化的游离血浆水平的虾青素和 IS/AAR% 之间的显著的线性相关性 ($P < 0.001^{**}$; $r^2 = 0.67$) 表明在大约 $120\text{--}125\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量下可实现 100% 抢救。这第一次证明新类胡萝卜素衍生物的心脏保护作用。

[0478] 口服二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物的药代动力学、增加的生物利用度和增加的靶组织分布:

[0479] 血浆药代动力学

[0480] 在雄性 C57BL/6 小鼠上测定二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物单一剂量口服药代动力学参数 (包括 C_{max} 、 T_{max} 、 $AUC_{(0-72)}$ 、 V_d 和清除率)。以在先前研究中显示出可有效预防 Sprague-Dawley 大鼠中 CCl_4 给药之后继发的损伤 (在这些研究中为 $100\text{mg}/\text{kg}$ 体重) 的单一最大剂量 ($500\text{mg}/\text{kg}$) 给动物口服衍生物。在以下时间点, 从每个时间点至少 3 只动物获得用于 HPLC 分析血浆和肝中游离虾青素水平的样品:

[0481] 时间 0 [在受试化合物给药之前即时进行]、摄入后 2、4、6、8、12、16、24、48 和 72 小时.

[0482] 以其它间隔 (10、14 和 36 小时 ;表 2 和 3) 取 $N < 3$ 的附加的样品。在此研究中当类胡萝卜素酯在哺乳动物肠中完全裂解成游离类胡萝卜素,其被动移动通过肠细胞时测定非酯化的游离虾青素水平。

[0483] 实验方法简述 :血浆药代动力学

[0484] 将雄性 C57BL/6 小鼠,大约 25g,关养在笼中 (3 只小鼠 / 笼),并自由进食标准小鼠食物 (Purina Mouse Chow, Ralston Purina, St. Louis) 和水,持续至少 5 天,然后开始实验。将二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物与以下组分混合以制备适于经口管饲的乳液 :

[0485] ● 无菌过滤 (0.2 微米 Millipore®) 水 ;

[0486] ● 橄榄油 (Bertolli USA, Inc., Secaucus, NJ) ;

[0487] ● 大豆卵磷脂, IV-S 型 (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO ;目录号 P3644)。

[0488] 二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物在纯水性配方中表现出大约 8.64mg/mL 的水溶性。在上述乳液中,溶解度增至大约 50mg/mL,允许在这些动物中通过管饲法服药多达 500mg/kg。这种在给药载体中溶解度显著增加 6 倍大大利于这些小鼠的管饲法研究。

[0489] 用于制备乳液的方法如下 :

[0490] (1) 将 80mg 大豆卵磷脂 (Sigma catalog P3644) 加到 5.0mL 水。在 15mL 离心管中间歇地涡旋混合大约 30 分钟直至悬浮液均一 ;

[0491] (2) 室温下加入 2.5mL 橄榄油并涡旋混合。这产生均一、稠厚、浑浊的黄色悬浮液。这种乳液物质可以在室温或 4°C 冰箱中储存。如果储存的话,在第 3 步 (以下) 加入二钠二琥珀酸酯衍生物之前即刻涡旋混合 ;

[0492] (3) 将 50mg/mL 的二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物直接加到乳液。此浓度下该化合物容易地进入均一悬浮液。涡旋混合后立即进行管饲以确保均一悬浮液 ;和

[0493] (4) 所述物质具有堵塞小鼠管饲针的可能性。在每 2 次管饲之后冲洗管饲针。

[0494] 通过经口管饲法以 500mg/kg 体重单一剂量施用乳液。在实验之前的晚上从所有笼中撤出食物。在施用乳液后 1 小时,对所有动物恢复食物和水。

[0495] 用于全血和组织取样、样品提取和 HPLC 分析的方法已作了详述 (Osterlie, 2000)。简言之,将全血收集在包含 EDTA 的 Vacutainer® 管中,然后通过 4°C, 1500×g 下离心 20 分钟来制备血浆。随后将血浆样品等分试样化,并在液氮中快速冷冻,然后转运并进行 HPLC 分析。

[0496] 组织蓄积

[0497] 还在与血浆样品相同的时间点测定肝中的游离虾青素浓度。处死后从药代动力学研究的各只动物中取出肝脏,并在液氮中快速冷冻。如所述 (Jewell, 1999) 制备用于 HPLC 分析的肝组织。因此,在与血浆分析相同的时间点同时检查游离虾青素的肝蓄积。

[0498] 实验方法简述 :游离虾青素的肝蓄积

[0499] 在液氮中快速冷冻来自各只动物的至多 300mg 肝。用氯仿 / 甲醇 / 水的混合物,根据 Jewell 的方法 (1999) 进行组织匀浆和提取。然后如以上关于血浆样品所述通过 HPLC 法评价肝中非酯化的游离虾青素蓄积。

[0500] 药代动力学结果简述

[0501] 在适宜的取样间隔时间的游离虾青素的血浆和肝水平的总结表如表 2 和 3 所示。血浆和肝非酯化的游离虾青素曲线下面积 vs. 时间 (AUC' s) 也包括在表 2 和 3 中。这些

结果表明,对于各取样间隔,肝中游离虾青素水平相同或大于在血浆中的水平。这一改善的组织特异性递送至肝在文献中是没有先例的;实际上游离虾青素的肝水平通常低于在给药后相同时间点血浆中的相应水平 (Kurihara, 2002)。因此,在上述乳液中的二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物是用于在口服之后递送治疗浓度的游离类胡萝卜素至感兴趣组织的优异载体。

[0502] 表 2:非酯化的游离虾青素的血浆水平

[0503]

时间	样品	asta nM	asta mg/kg	平均 mg/kg	S. D.
0	PK01	0.00	0.00		
	PK03	0.00	0.00		
	PK06	0.00	0.00		
	PK15	0.00	0.00		
	PK16	0.00	0.00		
	PK20			0.00	0
2	PK10	38.04	0.02		
	PK12	0.00	0.00		
	PK21	0	0		
	PK22	0	0		
	PK27	0	0		
	PK34	0	0		
	PK42	311.73	0.19		
	PK43	74.08	0.04		
	PK48	48.41	0.03		
	PK59	318.83	0.19	0.05	0.077
4	PK07	46.18	0.03		
	PK11	115.63	0.07		
	PK14	20.97	0.01		
	PK17	40.57	0.02		
	PK23	214.95	0.13		

[0504]

	PK24	179.33	0.11		
	PK28				
	PK44	80.48	0.05		
	PK45	67.16	0.04		
	PK57	119.02	0.07		
	PK58	147.85	0.09	0.062	0.039
6	PK13	40.57	0.02		
	PK18	605.01	0.36		
	PK25	262.73	0.16		
	PK26	377.14	0.22		
	PK32				
	PK46	739.91	0.44		
	PK60	167.39	0.1		
	PK61	131.74	0.08	0.197	0.154
8	PK36				
	PK47	435.17	0.26		
	PK49	371.11	0.22		
	PK62	148.98	0.09		
	PK68	405	0.24		
	PK69	306.86	0.18		
	PK70	29.98	0.02	0.168	0.094
10	PK31				
12	PK37				
	PK63	37.19	0.02		
	PK64	10.93	0.01		
	PK67	8.12	0		
	PK71	53.19	0.03		
	PK72	7.66	0		
	PK73	8.46	0.01	0.012	0.012
14	PK51	0	0		
	PK52	3.14	0	0	0
16	PK65	8.4	0.01		
	PK66	10.47	0.01		
	PK75	28.24	0.02		
	PK76	4.51	0	0.010	0.008

[0505]

24	PK29	0	0		
	PK35	18.03	0.01		
	PK39	13.93	0.01		
	PK50	1.51	0		
	PK53	0	0	0.004	0.005
36	PK38	21.37	0.01	0.01	
48	PK30	0	0		
	PK33	0	0		
	PK54	22.71	0.01		
	PK55	0	0	0.003	0.005
72	PK40	1.7	0		
	PK41				
	PK56	0	0		
	PK74	1.92	0	0	0

[0506] 表3:非酯化的游离虾青素的肝水平

[0507]

时间	样品	asta nM	asta mg/kg	平均 mg/kg	S. D.
0	PK01	0.00	0.00		
	PK03	0.00	0.00		
	PK06	0.00	0.00		
	PK15	0.00	0.00		
	PK16	7.67	0.00		
	PK20	8.18	0.00	0.00	0
2	PK10	139.37	0.08		
	PK12	30.66	0.02		
	PK21	414.34	0.25		
	PK22	725.87	0.43		
	PK27	294.07	0.18		
	PK34	165.32	0.1		
	PK42	689.36	0.41		
	PK43	129.66	0.08		
	PK48	244.5	0.15		
	PK59	564.28	0.34	0.20	0.146
4	PK07	103.07	0.06		
	PK11	243.4	0.15		

[0508]

	PK14	89.18	0.05		
	PK17	1565.15	0.93		
	PK19	1373.34	0.82		
	PK23	2558.63	1.52		
	PK24	4701.95	2.8		
	PK28	1023.78	0.61		
	PK44	359.73	0.21		
	PK45	211.35	0.13		
	PK57	322.06	0.19		
	PK58	500.82	0.3	0.648	0.812
6	PK13	374.28	0.22		
	PK18	2970.44	1.77		
	PK25	3515.52	2.1		
	PK26	2087.8	1.24		
	PK32	687.99	0.41		
	PK46	1070.13	0.64		
	PK60	974.69	0.58		
	PK61	841.37	0.5	0.933	0.690
8	PK36	1290.15	0.77		
	PK47	230.88	0.14		
	PK49	1115.86	0.67		
	PK62	1247	0.74		
	PK68	1263.31	0.75		
	PK69	1036.29	0.62		
	PK70	1518.27	0.9	0.637	0.244
10	PK31	1303.06	0.78	0.780	
12	PK37	3225.35	1.92		
	PK63	921.74	0.55		
	PK64	713.97	0.43		
	PK67	410.93	0.24		
	PK71	1382.45	0.82		
	PK72	567.95	0.34		
	PK73	716.89	0.43	0.468	0.579
14	PK51	141.9	0.08		
	PK52	179.51	0.09	0.085	0.007

[0509]

16	PK65	240.6	0.14		
	PK66	340.38	0.2		
	PK75	788.66	0.47		
	PK76	499.84	0.3	0.278	0.144
24	PK29	440.72	0.26		
	PK35	321.14	0.19		
	PK39	155.42	0.09		
	PK50	156.61	0.09		
	PK53	89.18	0.05	0.136	0.086
36	PK38	658.41	0.39	0.39	
48	PK30	106.07	0.06		
	PK33	116.79	0.07		
	PK54	17.81	0.01		
	PK55	28.79	0.02	0.04	0.029
72	PK40	33.52	0.02		
	PK41	11.66	0.01		
	PK56	9.21	0.01		
	PK74	19.31	0.01	0.013	0.005

[0510] 当在口服载体或食物中提供类胡萝卜素如虾青素时通常需要进行预处理（15 天至 6 周）以在肝损伤研究中实现有效水平（Kang, 2001 ;Kim, 1997 ;Aoi 等人 1993）。在此情况下，用单一剂量实现治疗水平（200nm 或以上）。

[0511] 0.9mg/L 的 C_{max} （表 4）在啮齿动物中也是空前的，这些动物仅吸收小百分比的口服剂量的类胡萝卜素。游离类胡萝卜素的这些血浆和肝水平是在仅仅服用在乳液载体中的单一剂量化合物之后就获得的，这一点是有意义的。在人中，Osterlie 等人（2000）已描述在单一剂量 100mg（大约 1.1mg/kg 口服剂量）在橄榄油载体中的非酯化的游离虾青素之后的 C_{max} 血浆水平为 1.3mg/L。当在脂肪载体中提供时人通常吸收 40-50% 口服剂量的类胡萝卜素，相比之下啮齿动物只有少数几个百分点。因此，本研究证明，用为啮齿动物研制的乳液载体达到了人中 C_{max} 的近 70%，从而大大增加此衍生物用于肝保护研究的有用性。

[0512] 表 4 :pK 参数

[0513]

参数	肝	血浆
*C _{max} (mg/L)	0.9	0.2
**T _{max} (hr)	6	6
消除半衰期 (hr)	11.655	3.938
消除速率 (1/hr)	0.059	0.176
***AUC(0-72) (mg hr/L)	15.8	1.2
***AUC _∞ (mg hr/L)	15.9	1.2
口服清除率 (L/hr)	15.856	216.822
分布体积 (L/kg)	263.9	1232.1

[0514] * 最大浓度

[0515] ** 最大浓度的时间

[0516] *** 曲线下面积

[0517] 肠胃外施用 Cardax™ (二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物) 之后兔中实验性梗塞大小和 C- 反应蛋白的循环水平的降低 :

[0518] 用 Barrett 等人 (2002) 等人的方法并进行细微修改来研究肠胃外施用二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (XVI) 对兔中诱导的梗塞大小减小和诱导的循环 C- 反应蛋白 (CRP) 水平的影响。本研究的目的在于调查二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (XVI) 减轻炎症的能力, 这是在兔心脏中在实验性心肌局部缺血 / 再灌注损伤情境下通过 CRP 测定的。已提出常用作急性炎症 (“急性期”) 反应的标志的 CRP 可能实际上具有通过活化补体级联而介导的促炎效果。伴随氧自由基 (ROS) 形成增加的心肌局部缺血 / 再灌注损伤已表现出可活化补体系统。在该体系中已证明 (1) 继发于远端炎症病损的血浆 CRP 的内源性增加与继发于区域局部缺血和再灌注的心肌组织损伤的增加有关 ; (2) 这种损伤的增加 (表现为梗塞大小增加) 是由补体活性介导的 ; 和 (3) CRP 是一种 “效应物, 而不仅是系统性炎症的间接度量。因此, 循环 CRP 水平降低, 和先前用 Cardax™ 在啮齿动物中所见的梗塞大小减小一起, 形成急性冠脉综合征情境中的有力抗炎治疗疗法。

[0519] 简言之, 将雄性新西兰白兔 (2.25-2.5kg) 用于此研究。通过皮下注射 4 个等分试样 (各 0.5mL) 在玉米油中的 1% 巴豆油来诱导急性期炎症反应, 所述注射开始于用 Cardax™ 进行预处理的第二天。每天施用一次在水或等体积的无菌盐水中的 Cardax™ (50mg/kg IV, 通过耳静脉注射), 持续 4 天, 然后在第 5 天完成实验性梗塞形成。如前述 (Barret 等人 2002), 使用基于 ELISA 的方法, 用抗兔 CRP 抗体得到循环 CRP 水平增加的时间进程。在实验的最后一天 (第 5 天 : 在最后一次药物灌注之后大约 24 小时), 使用甲苯噻嗪 (3mg/kg) 和氯胺酮 (35mg/kg) 的混合物, 然后肌内使用戊巴比妥 (90mg/kg) 麻醉兔。需要时再施用戊巴比妥以保持麻醉。在气管切开术之后, 用室内空气给兔子通气, 并通过左开胸术暴露心脏。然后将心脏支承在心包支架中, 并将 3-0 丝结扎线放置在冠状动脉左前降支周围。通过往对结扎线加牵引力而将动脉闭塞 30 分钟, 然后再灌注 180 分钟。在完成此方案之前刻即获得静脉血样以测定血浆 CRP。

[0520] 在该方案的再灌注期完成时, 取出心脏, 并在 Langendorff 灌注仪器上通过主动

脉插入导管。然后用改良的 Krebs-Henseleit 缓冲液再灌注心脏 10-15 分钟 (20-25mL/分)。在此段时间结束时,用 80mL 0.4% 2,3,5-三苯基四唑翁氯化物 (TTC) 在 37°C 下灌注心脏以确定危险区域 (AAR)。然后在与外科制备 / 实验梗塞形成期间相同的区域结扎冠状动脉左回旋支。此时,停止灌注泵,并通过与主动脉套管连接的侧口将 3.0mL Evan 蓝染料缓慢注射入心脏。使所述溶液分布至整个心脏大约 30 秒。然后与垂直轴成直角将心脏切成六个横向部分。弃去右心室、心尖和心房组织。由紫色 / 蓝色划界的组织代表由非梗塞相关的冠状动脉分布灌注的区域。将各个横切部分的两个表面印至干净的乙酸酯片上,对其进行扫描,然后数字化以计算梗塞面积。总危险面积表示为左心室的百分数。然后将梗塞大小表示为占危险面积的百分数。

[0521] 对照动物和 Cardax™ 处理的动物的平均梗塞大小如图 37 所示。对照动物和 Cardax™ 处理的动物的循环 CRP 水平 (表示为基线水间和再灌注时诱导的水平之间的平均差异) 如图 38 所示。在 Cardax™ 处理的兔子中看到梗塞大小减小约 55.4%; 两组的局部缺血危险区域类似。类似地,对照中超出基线的循环 CRP 水平的平均增加 (+23.5%) 在 Cardax™ 处理的动物中完全消除,至低于在基线观察到的平均水平 (-15.7%)。由于 CRP 既是急性冠脉综合征中的效应物 - 在这种急性期反应物水平升高的情况下导致梗塞大小增加 - 又是初级与二级预防心脏病患者中心血管风险的强烈独立性预测物 - 这种循环蛋白水平的降低形成强有力的治疗疗法。

[0522] 口服二钠二琥珀酸酯虾青素降低小鼠中脂多糖 (LPS) 导致的丙氨酸氨基转移酶 (ALT) 升高:

[0523] 以下研究评价口服二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物在 LPS 诱导的小鼠肝损伤模型中的肝保护作用的效用。

[0524] 实验方法简述:

[0525] 用 LPS 和半乳糖胺处理三月龄的雄性 ICR 小鼠以诱导肝损伤 (Leist, 1995)。首先对小鼠经口管饲橄榄油 / 水 / 卵磷脂乳液 (10mL/kg 或对于 30 克小鼠而言 0.3mL) 或包含二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (50mg/mL) 的相同乳液,最终二钠二琥珀酸酯虾青素剂量为 500mg/kg。2 小时后对小鼠腹膜内 (IP) 注射盐水 (10mL/kg) 或大肠杆菌 LPS (3mg/kg, Sigma 目录号 L-3755) 和 D-半乳糖胺 (700mg/kg) 的溶液。IP 注射后 5 小时用二氧化碳 (CO₂) 窒息法处死动物,然后收集血浆用于 ALT 测定。

[0526] LPS 诱导的损伤结果的简述。

[0527] 这些初步结果证明二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物对盐水注射 (肝损伤假处理对照) 动物的血浆 ALT 没有作用。在仅用乳液 (不含衍生物) 管饲的对照动物中,ALT 增加大于 3 倍。在接受含 500mg/kg 二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物的乳液的动物中,ALT 升高大大减小 (N = 3 只动物 / 组),证明化合物降低作为这些动物中肝细胞坏死的血清标志的 ALT 的效力。由于 LPS 诱导的肝损伤是由 ROS (包括自由基氧化氮 NO.) 介导的,且在 LPS 侵害后发生显著的系统炎症 (非酯化的游离虾青素对此有保护作用 (Ohgami 等人 2003)), 该新衍生物用于在其中这种炎症得到促进的临床适应症的效用代表一个特别有用的实施方案。

[0528] 黑小鼠多剂量口服之后游离虾青素在血浆和肝中的蓄积:

[0529] 在该药代动力学研究中,用本文所述的方法,给黑小鼠经口管饲在乳液载体中的十一 (11) 个单独日口服剂量的二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (500mg/kg),并在可能的 C_{max}

和 T_{max} (6 小时) 在 3 只动物中测定游离虾青素在血浆和肝中的蓄积。可能的 C_{max} 和 T_{max} (6 小时) 是由前面单一剂量口服药代动力学研究中的血浆和肝样品推导出来的。评价在单一乳液剂量之后非酯化的游离虾青素在血浆和肝中的蓄积。所有受试动物的平均血浆浓度为 381nM。所有受试动物的平均肝浓度为 1735nM。在单一剂量研究中, 平均起来, 在血浆和肝中均获得保护水平 (对非酯化的游离虾青素设在抗氧化 ED_{50} 为 200nM); 所获得的平均肝浓度差不多为保护水平的 9 倍。

[0530] 在多剂量研究中, 峰和谷水平均取 (给药之后 6 小时在可能的 C_{max} 取峰水平; 在 C_{max} 后 6 小时或给药后 12 小时获得谷水平)。在峰和谷血浆中的平均峰水平分别为 485nM 和 231nM; 在峰和谷肝的平均峰水平分别为 1760nM 和 519nM。同样, 在各种情况下获得保护水平, 并保持至多剂量给药后 11 天; 在肝的情况下, 获得差不多为保护水平 9 倍的水平。同样, 在多次给药后的各个时间点肝中的蓄积大于血浆中观察到的蓄积, 表明这种给药载体用于靶向至该实体器官的效用增加 (图 32)。由此数据组还明显看出长期施用二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物将在肝保护方面有效。

[0531] 黑小鼠单一剂量口服之后游离虾青素在心肌 (心脏) 和脑中的蓄积:

[0532] 通过口服管饲法将在乳液载体中的单一最大剂量的二钠二琥珀酸酯虾青素衍生物 (500mg/kg) 施用于黑小鼠, 并在 4 只动物中在可能的 C_{max} 和 T_{max} (6 小时) 测定非酯化的游离虾青素的蓄积, C_{max} 和 T_{max} 根据前面研究中的血浆和肝样品来推导。在单一剂量后非酯化的游离虾青素在心脏中的蓄积是优异的 (4 只动物的平均值 \pm SEM = 693.25 \pm 272nM), 并与非酯化的游离虾青素在肝中的蓄积结果平行。同样, 在各个时间点, 心脏中的蓄积大于血浆中观察到的蓄积, 表明这种给药载体用于靶向至实体器官的效用增加。非酯化的游离虾青素在 CNS (脑) 中的蓄积较不明显 (4 只动物的平均值 \pm SEM = 3.6 \pm 1.7nM), 表明穿透血-脑屏障 (BBB) 是可能的, 但长期、多剂量给药可能是获得对于 CNS 应用 (阿尔茨海默氏病、中风等) 的保护水平所必需的。内消旋虾青素的二钠盐二琥珀酸酯衍生物与人血清白蛋白 (HSA) 的相互作用:

[0533] 大部分胡萝卜素类胡萝卜素和绝大部分叶黄素的差水溶性限制了它们作为水相单线态氧猝灭剂和自由基清除剂的应用。已将增加类胡萝卜素的表观溶解度和 / 或分散性的化学修饰应用于基础科学和临床研究。但是, 母体类胡萝卜素和新衍生物在水溶液中形成超分子装配体的趋势使得先综合全面评价这种行为然后才转向这些化合物的效力的体外和体内试验有正当理由。

[0534] 图 5 描述类胡萝卜素衍生物, 全反式 (全 -E) 形式的合成内消旋虾青素 (3R, 3' S-二羟基- β , β -胡萝卜素-4,4'-二酮) 的二钠盐二琥珀酸酯衍生物 (dAST)。用于产生新衍生物的对称 C_{40} -叶黄素在 3 和 3' 位具有两个手性中心。在水溶液中, C_{40} -叶黄素不表现出旋光活性, 因为这些立体中心具有相反的绝对构型, 并且在内部彼此补偿。具有羧酸官能团的天然类胡萝卜素分子优先与人血清白蛋白 (HSA)-血液中最丰富的蛋白结合。由于白蛋白结合强烈影响给定化合物的潜在体内生物化学活性, 因而将圆二色性 (CD)、紫外-可见 (UV/Vis) 和荧光光谱用于表征这种新类胡萝卜素衍生物与不含脂肪酸的 HSA 的相互作用。研究该对称类胡萝卜素的蛋白结合和聚集特性, 其通过将含有羧酸末端基团的部分直接酯化而连接, 形成刚性、长链、高度不饱和二阴离子 bolamphiphile。证明在不存在蛋白的缓冲溶液中, 内消旋类胡萝卜素形成不表现 CD 卡滕效应 (CE) 的紧密包装的 H 型

card-pack 聚集体。但是在低配体 / 蛋白 (L/P) 摩尔比下, 内消旋类胡萝卜素立即并优先以单体方式与 HSA 缔合, 表明允许在水溶液中发生超分子装配的二级化学相互作用 (范德华力, 氢键键合) 在生物相关环境中被克服。超过 1 : 1 配体 / 蛋白摩尔比, 内消旋类胡萝卜素分子再次开始聚集; 在这些比率下观察到的聚集是手性的, 产生表现出强烈激子型 CD 活性的超分子结构。

[0535] 实验方法简述

[0536] 由结晶虾青素 [3R, 3' R, 3R, 3' S, 3S, 3' S(25 : 50 : 25)], 一种商购的立体异构体的统计混合物 (Buckton Scott, India) 合成新的衍生物 dAST。通过高压液相色谱法 (HPLC) 分离虾青素立体异构体, 导致合成用于本研究中测试的纯化的内消旋二钠盐二琥珀酸酯衍生物。所用的内消旋立体异构体的全反式 (全 -E) 形式由于在间隔物的多烯链中缺乏顺式 (或 Z) 构型因而是一种线性、刚性分子 (图 5)。成功地合成了根据 HPLC 纯度 > 99% 的合成内消旋虾青素的二钠盐二琥珀酸酯衍生物。

[0537] 材料

[0538] 基本上不含脂肪酸的人血清白蛋白 (catalog No. A-1887, lot No. 14H9319) 购自 Sigma, 并如提供地使用。使用双蒸水和光谱级二甲亚砜 (DMSO, Scharlau Chemie S. A., Barcelona, Spain) 和乙醇 (Chemolab, Budapest, Hungary)。所有其它化学物质为分析级。

[0539] 制备 dAST 的储备溶液

[0540] 在将内消旋类胡萝卜素溶于 DMSO 之后, 将 100 μ l DMSO 溶液加到在光程长度为 1cm 的矩形比色杯中的 2mL 乙醇中。在 260-650nm 下记录吸收光谱。由在 λ_{\max} 下的光吸收值计算浓度 ($\epsilon_{478\text{nm}} = 116, 570\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)。

[0541] 制备 HSA 溶液

[0542] 对于光谱样品制备, 将 HSA 溶于 pH 7.4 Ringer 或 0.1M pH 7.4 磷酸盐缓冲液。计算白蛋白浓度, $E_{1\text{cm}}^{1\%} = 5.31$, 使用实验得到的 279nm 下的吸光度数据。HSA 的分子量定义为 66500Da。

[0543] 圆二色性和 UV/Vis 吸收光谱

[0544] 用 Jasco J-715 分光偏振计, 在 25 ± 0.2 和 37 ± 0.2 °C 下, 在光程长度为 1cm 的矩形比色杯中记录 CD 和 UV 光谱。通过配备磁力搅拌的 Peltier 恒温器提供温度控制。以 1.0nm 带宽和 0.5nm 分辨率且扫描速率为 100nm/分, 使所有的光谱聚集三次。诱导的 CD 定义为 dAST-HSA 混合物的 CD 减去相同波长下单独 HSA 的 CD, 并表示为毫度的椭圆率 (mdeg)。

[0545] 37°C 下用在 pH 7.4 Ringer 和 0.1M 磷酸盐缓冲液中的 dAST 对 HSA 进行 CD/UV/Vis 滴定

[0546] 将 Ringer 缓冲液, L/P 值为 0.007-0.10 : 2mL 1.6×10^{-4} M HSA 溶液置于光程长度为 1cm 的比色杯中, 并以 10 μ l 等分试样用自动移液管加入少量配体储备溶液 ($c = 2.2 \times 10^{-4}$)。将 Ringer 缓冲液, L/P 值为 0.82-13.13 : 2ml 的 2.3×10^{-6} M HSA 溶液置于光程长度为 1cm 的比色杯中, 并用自动移液管加入 μ l 体积的配体储备溶液 ($c = 3.9 \times 10^{-4}$)。将磷酸盐缓冲液, L/P 值为 0.82-13.10 : 2mL 2.2×10^{-6} M HSA 溶液置于光程长度为 1cm 的比色杯中, 并用自动移液管加入 μ l 体积的配体储备溶液 ($c = 3.6 \times 10^{-4}$)。

[0547] 测定 dAST 存在下 HAS 的固有荧光

[0548] 在 1cm 矩形室中在 0.1M pH 7.4 磷酸盐缓冲液中制备 2mL 的 4.2×10^{-6} M HSA 溶液。

连续地将 1.3×10^{-4} 和 3.3×10^{-4} M 内消旋类胡萝卜素 DMSO 溶液以 μL 体积加入在 Jasco J-715 分光偏振计的样品室内的比色杯中。在 240 和 360nm 之间以 0.5nm 波长增量激发所得的样品溶液。用安装在光源右角的 Hamamatsu H5784- 型光电倍增探测器收集在各个波长下的总荧光强度。在样品溶液中, HSA 和 dAST 的最初和最终浓度分别为 4.2×10^{-6} M- 4.0×10^{-6} M 和 1.3×10^{-7} M- 1.4×10^{-5} M。内消旋类胡萝卜素 /HSA 摩尔比在 0.03 和 3.53 之间变化。在荧光测定期间, 最终的 DMSO 浓度不超过 5V/V%。还进行对照实验, 其中测定将 20、50 和 100 μL DMSO 加到溶液期间 HSA 的荧光。

[0549] UV/Vis 和 CD 光谱结果简述

[0550] 在乙醇和水性缓冲液中的 dAST 的 UV/Vis 和 CD 光谱特性

[0551] 由于其延伸的 π 系统, dAST 在可见光谱中表现出强烈光吸收 (图 6)。主要的钟形吸收谱带集中在 481.5nm 处是由于允许的最低能量电子偶极, 沿多烯链长轴极化的 $\pi \rightarrow \pi^*$ 跃迁。室温下, 对于包含一个或多个共轭羰基的类胡萝卜素, 缺乏细微结构是典型的。但是, 振动次能带实际存在于该曲线下, 如由光谱的次级衍生揭示 (图 6)。此外, 在近 UV 区存在进一步的跃迁。根据在多烯模型上进行的理论计算, 在 300nm 附近的适当强度的谱带的电子跃迁矩 (μ) 平行于 dAST 分子的长轴极化。同时, 371nm 处的谱带 μ 取向沿着共轭体系的双重 C_2 对称轴。羰基的弱 $n \rightarrow \pi^*$ 跃迁由于其它谱带而变得模糊。如预期的, 内消旋类胡萝卜素化合物在乙醇中不显示任何 CD 谱带, 因为两个相反的手性中心 (3R 3' S) 的作用彼此取消 (数据未显示)。

[0552] 在 Ringer 缓冲液中, dAST 主要吸收谱带改变, 表现大的蓝色位移 (2541.6cm^{-1}) 和频宽缩窄 (图 7)。这些光谱变化表明形成所谓的“card-pack”聚集体, 其中的分子通过来自水性环境的排阻和 H 键合相互作用而紧密结合在一起 (在数埃范围内)。结果是, 多烯链的激态波功能在分子间发生离域, 允许在相邻分子之间发生激子共振相互作用。这种相互作用导致 UV/Vis 光谱中的高能量激子峰。由于在庞大的末端基团中出现不利的空间相互作用, 不允许多烯链的平行排列; 单独分子的长轴取而代之封闭确定的分子间覆盖角度。在这些情况下, 由手性单体构建的类胡萝卜素聚集体还由于由不对称中心决定的手性分子间排列而表现出诱导的卡滕效应 (CE)。相比之下, 内消旋类胡萝卜素化合物在聚集状态下在溶液中不表现旋光活性 (数据未显示), 原因是缺乏净分子偏手性。

[0553] 在低配体 / 蛋白摩尔比的人血清白蛋白存在下 dAST 的光学特性

[0554] 在往往在 pH 7.4 Ringer 缓冲液中制备的 HSA 溶液中加入 dAST 时, 两个明确的、相反符号的诱导的 CD 谱带出现在 300 和 450nm 之间, 且零交叉点在 367nm (图 8)。附图插入显示诱导的卡滕效应的强度和在不同 L/P 比率下的主要吸收谱带 ($\Delta \epsilon$ 和 ϵ 值相对于总内消旋类胡萝卜素浓度计算)。CEs 的大小随配体浓度增加而增加, 但是它们的形状和波长位置保持不变。如上述, 在 450nm 以下存在两个跃迁, 其可能负责观察到的旋光活性。300nm 附近的吸收谱带具有跃迁对称 B, 而对应的电和磁跃迁矩与沿多烯链的双重对称轴垂直。将 372.5nm 处的谱带的电和磁跃迁矩与 C_2 轴平行极化, 它的跃迁对称 A。可合理地推断在蛋白结合时, 这些谱带由于多烯链周围微环境的改变而位移至更长的波长。已很好地证明类胡萝卜素的 CD 光谱 (发色团部分属于 C_2 点基团) 符合 C_2 - 规则: 如果总共轭体系获得右手手性 (即键 6-7 和 6' -7' 周围的双面夹角是负的), 则对称 A 的跃迁导致负 CE, 而对称 B 的跃迁导致正 CE (图 8)。因此, 内消旋类胡萝卜素以这样的方式与 HSA 结合: 蛋白环境固

定良好确定的手性构象的末端环,从而导致观察到负和正诱导的 CD 谱带。

[0555] 手性 3 和 3' 中心的绝对构型不决定分子的手性光学特性;相反,白蛋白分子的不对称蛋白环境(通过非共价化学相互作用)决定观察到的活性。与上述在水溶液中的聚集行为相比,dAST 分子在这些 L/P 比率的 HSA 溶液中不聚集,这通过钟形和轻微红色位移的可见吸收谱带的保持来证明(图 8)。这样 UV/Vis 吸收和 CD 光谱均表明内消旋类胡萝卜素分子与 HSA 的结合以单体形式发生。

[0556] 超过 1 : 1L/P 比率的 HSA 存在下 dAST 的光学特性

[0557] 将增加量的 dAST 加到用 pH 7.4 Ringer 或 0.1M pH 7.4 磷酸盐缓冲液制备的 HSA 溶液以实现 L/P 比率高于 1。CD 和 UV/Vis 吸收光谱在加入配体期间均表现出显著变化(图 9 和图 10)。除了蓝色位移的可见吸收谱带以外,一个新的正-负 CD 谱带对分别出现在 480 和 420nm 附近。这些 CE' s 不表现出振动的精细结构,且它们的振幅随配体浓度的增加而增长。但是,在 Ringer 和磷酸盐缓冲液中获得的光谱之间存在某些显著的差别:

[0558] a) 在 Ringer 缓冲液中主要吸收谱带迁移至较低的波长(434.5nm)。磷酸盐缓冲液中的相应值为 451.5nm。

[0559] b) Ringer (441.6cm^{-1}) 中来自最大吸收谱带的 CEs 的零交叉点的偏差比磷酸盐缓冲液 (148.4cm^{-1}) 大 3 倍。

[0560] c) L/P 值为 8 以上,Ringer 溶液中的 CD 谱带的强度不再增加。相比之下,CD 谱带的振幅继续随磷酸盐缓冲液中 L/P 比率增加而增加,甚至在 L/P 值为 13 的时候。

[0561] d) 在相同的 L/P 比率下,在磷酸盐缓冲液中测定更强烈的 CD 谱带(图 9 和图 10)。

[0562] 这些相反符号的 CD 谱带仅在超过 1 : 1L/P 比率时出现的事实强烈地表明它们源自相邻内消旋类胡萝卜素分子之间的手性分子间相互作用。当两个电子跃迁偶极矩能量类似,在空间上彼此靠近,并形成手性排列时,它们的相互作用表现为手性激子耦合;CD 光谱表明 bisignate couplet,与对应的吸收谱带的光谱位置相匹配,所述吸收谱带的信号由两个偶极之间的扭曲的绝对意义确定。根据激子手性规则,正扭曲对应于正长波长 CE 和较短波长处的负 CE,反之亦然。在我们的情况下,跃迁偶极矩的方向是已知的;它沿多烯链的长轴极化。因此,相邻内消旋类胡萝卜素分子以使它们的长轴形成正(顺时针)分子间覆盖角度的方式排列。图 11 所示的两个共轭链的手性排列满足前者条件;在这些情况下,长波长正和短波长负谱带将出现在 CD 光谱中。但是,吸收谱带的光谱学表现有助于区别这些空间排列。由于在 a 和 b 的情况下相邻内消旋类胡萝卜素分子的跃迁偶极矩之间存在不利的库仑相互作用(图 11),吸收最大值位移至较高的能量;如果 c 形式存在,则吸收谱带变宽且它的最大值位移至较低的能量。因此,dAST 分子形成右手手性排列,其中内消旋类胡萝卜素单体的长轴形成正锐角(图 11, a 和 b)。

[0563] 提出有关配体分子的手性排序起源的以下设想。白蛋白似乎是诱导光学活性所必需的,首先有兴趣的是推断在 HSA 上存在能够容纳两个内消旋类胡萝卜素分子的大的结合位点。在低 L/P 值下白蛋白将仅结合单一配体;在较高 L/P 浓度下,将复合第二内消旋类胡萝卜素单体。但是如上述,CEs 的大小在相当高的 L/P 值下持续增加(图 10),在这种情况下单一结合位点应已被饱和。这个问题的一个解决方案推断 HSA 是一种不对称模板,在其上开始手性自装配。最早的一些内消旋类胡萝卜素分子以右手性排列方式与 HSA 结合,而随后的内消旋类胡萝卜素单体建立在此手性结构之上。在此设想中,HSA 提供第一基本步

骤,手性引发(“手性接种”);此后自装配自动地继续。但是非常重要是注意到,在没有其手性末端基团的情况下,仅少数 dAST 分子在 HSA 的结合位点处保持右手性排列。3 和 3' 手性中心在允许聚集体在 HSA 分子上形成手性自装配体方面起决定作用。在不存在蛋白的情况下,内消旋类胡萝卜素分子由于缺乏手性区别而形成右手和左手性装配体的程度相等。

[0564] 如上述,在磷酸盐缓冲液和 Ringer 溶液中测定的 CD 曲线之间的光谱差异表明盐浓度对聚集体稳定性的影响(图 9 和图 10)。Ringer 缓冲液的克分渗透压浓度和离子强度高于磷酸盐缓冲液。琥珀酸部分在 pH 7.4 下在两种缓冲液中都发生离子化,在聚集体内部和聚集体之间均形成静电排斥。带正电的盐离子能够减少这种排斥,因而有助于在存在这些阳离子的情况下增加聚集体的稳定性和大小。在用超过 1 : 1L/P 比率的 dAST 滴定 HSA 期间,同时形成手性和非手性聚集体;但是仅手性聚集体与 HSA 缔合,而非手性聚集体则没有。在 Ringer 缓冲溶液中获得的 CD 光谱(图 9)表明非手性聚集体由于盐离子的掩蔽效果而在这种较高克分渗透压浓度缓冲液中得以更好稳定。加入的配体分子优先与存在的聚集体缔合,从而导致 CD 谱带的振幅达到平台,并变得恒定,与磷酸盐缓冲液形成对照。

[0565] 加入 dAST 后 HSA 的荧光猝灭

[0566] 位于亚结构域 IIA 深处的单一色氨酸残基(Trp214)在很大程度上负责 HSA 的固有荧光。HSA 的荧光发射谱与内消旋类胡萝卜素的吸收光谱重叠。因此,在将在 DMSO 中的 dAST 增量加入到 HSA 的溶液之后获得荧光光谱学测定。结果清楚地表明内消旋-类胡萝卜素分子能够有效地猝灭 HSA 的固有荧光(图 12)。用于制备 dAST 的储备溶液的 DMSO 对固有 HAS 荧光的影响可以忽略(图 12)。在 0.7 的 L/P 比率下,基线荧光强度减小 50%。所观察到的现象表明内消旋类胡萝卜素分子结合在 Trp214 的附近,其在 HSA 的两个主要结合腔中的一个中形成壁的一部分(位点 I,亚结构域 IIA;图 13)。但是,位点 I 和位点 II(亚结构域 IIIA)-都为疏水脂肪酸结合通道-都不能够容纳长的、刚性 dAST 分子(图 13)。基于结构类似性,第二种可能性是 dAST 与 HSA 的其它长链(C18、C20)脂肪酸结合位点结合,所述位点已用高分辨率 X-射线结晶学进行充分地表征。在不具有庞大的末端基团的较短开放链类胡萝卜素的情况下,这种可能性是可能的。但是,内消旋类胡萝卜素衍生物本身的多烯链测量为 28\AA (在 3 和 3' 手性碳原子之间)。尽管它们的构象可动性,琥珀酸部分需要额外的空间,将分子的有效长度增加至 48\AA 。仔细地检查 HSA 的晶体结构表明,结构域 I 和 III 之间的长、窄裂隙可能适于结合内消旋类胡萝卜素分子(图 13)。域间裂隙是宽的,且它的窄端靠近色氨酸(Trp214;* 在图 13 上)残基,这为在内消旋类胡萝卜素分子与 HSA 的域间裂隙结合时观察到的荧光猝灭提供结构解释。而且,可以推断,附加的 dAST 分子与域间裂隙中的单一个分子的缔合诱导 HSA 显著的构象变化,导致中央裂缝变宽。这可能是荧光猝灭不停止于 L/P = 1 比率,而随 CEs 增加继续强化的原因(图 13)。

[0567] 讨论 UV/Vis 和 CD 光谱学结果

[0568] 作为从水性环境被排斥和分子间氢键键合的结果,合成的非手性内消旋虾青素的二钠盐二琥珀酸酯衍生物在水性缓冲液中形成无旋光活性的 card-pack 类型的聚集体,这通过相对于在乙醇溶液中观察到的谱带来说主要可见吸收谱带的大蓝色位移来表明。在存在过量的不含脂肪酸的 HSA 的情况下,内消旋类胡萝卜素似乎优先以单体方式与 HSA 缔合。这些结果表明,允许在水溶液中发生超分子装配的弱范德华力和氢键键合在生物相关环境

中将被迅速克服。在体内人血中的白蛋白浓度为大约 0.6mM,表明在多至 500mg 的剂量下,内消旋类胡萝卜素(分子量 841Da)将以单体方式与白蛋白缔合(排除与循环血细胞和脂蛋白的额外的潜在非特异性结合,这会增加潜在非聚集剂量)。结合的内消旋类胡萝卜素分子表现出诱导的 CD 谱带,这种谱带用共轭体系的右手性螺旋构象充分解释。在增加浓度的 dAST 存在下 HSA 的分级荧光猝灭强化了这样的观点:类胡萝卜素-白蛋白复合体的形成负责这种猝灭,并表明结合的配体和 HSA 的色氨酸 214 残基之间的空间邻近。

[0569] 基于光谱数据、dAST 分子的分子长度和充分表征的 HSA 的晶体结构,结合位点暂定地指定于位于结构域 I 和 III 之间的域间裂隙。

[0570] 在高于 1 : 1L/P 比率的内消旋类胡萝卜素和 HSA 的 CD 光谱中似乎存在正-负谱带对。这种发现归因于以右手性装配排列的内消旋类胡萝卜素多烯链之间的分子间手性激子偶合。实验数据表明 HSA 用作一种手性模板,在该模板上自装配开始,然后继续,受内消旋类胡萝卜素分子的末端基团的手性来支配。在 pH 7.4 磷酸盐缓冲液和 Ringer 溶液中得到的 bisignate CD 光谱之间的差异表明,自装配受溶液的克分渗透压浓度和离子强度影响。随着克分渗透压浓度增加,聚集体的稳定性提高,推测起来是由于盐阳离子对带负电的琥珀酸羧酸官能团的静电屏蔽。

[0571] 本发明的不同方面的进一步修改和可替代选择的实施方案考虑本说明书对本领域技术人员来说是显而易见的。因此,应将本说明书理解为仅是例示性的,其目的是教导本领域技术人员实施本发明的一般方式。应该理解,应将本文所示和所述的本发明的形式理解为目的优选的实施方案。可以替代本文例示和描述的元素和材料,部分和过程可以颠倒,且本发明的某些特征可以独立地利用,所有这些对已从本发明的描述中获益的本领域技术人员来说是显而易见的。可以在不背离以下权利要求所述的本发明的实质和范围的情况下改变本文所述的要素。

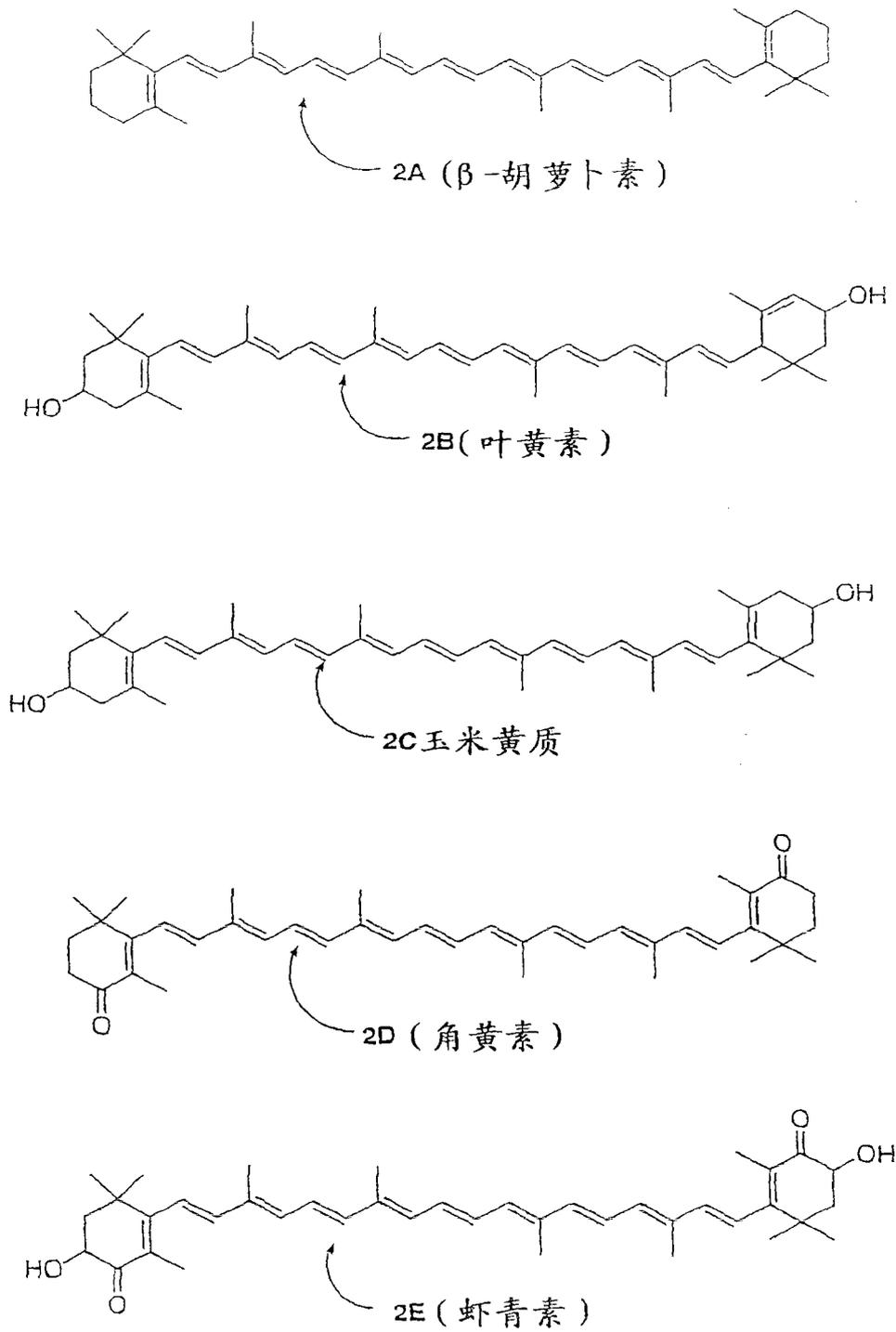


图 1

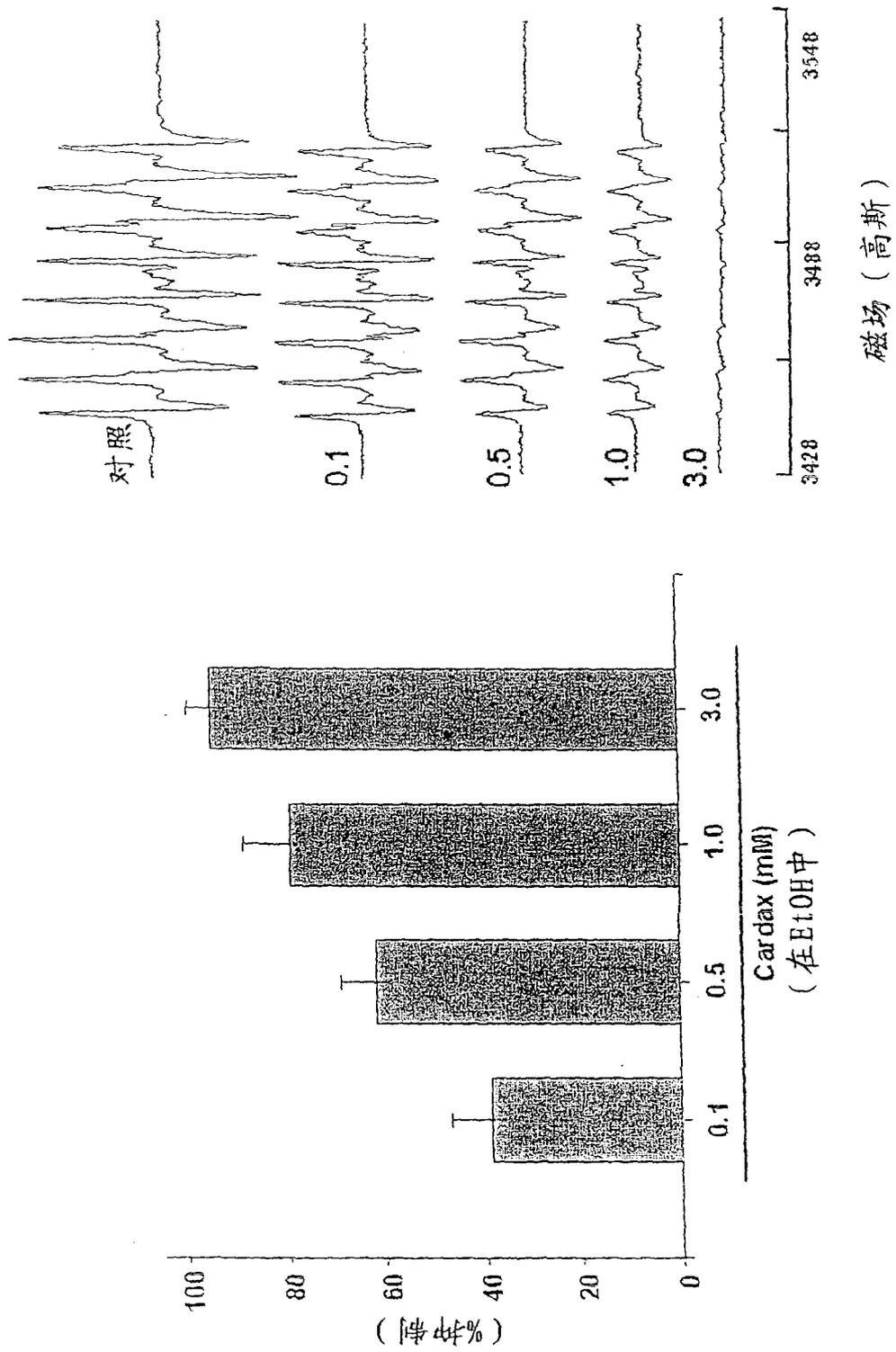


图 2

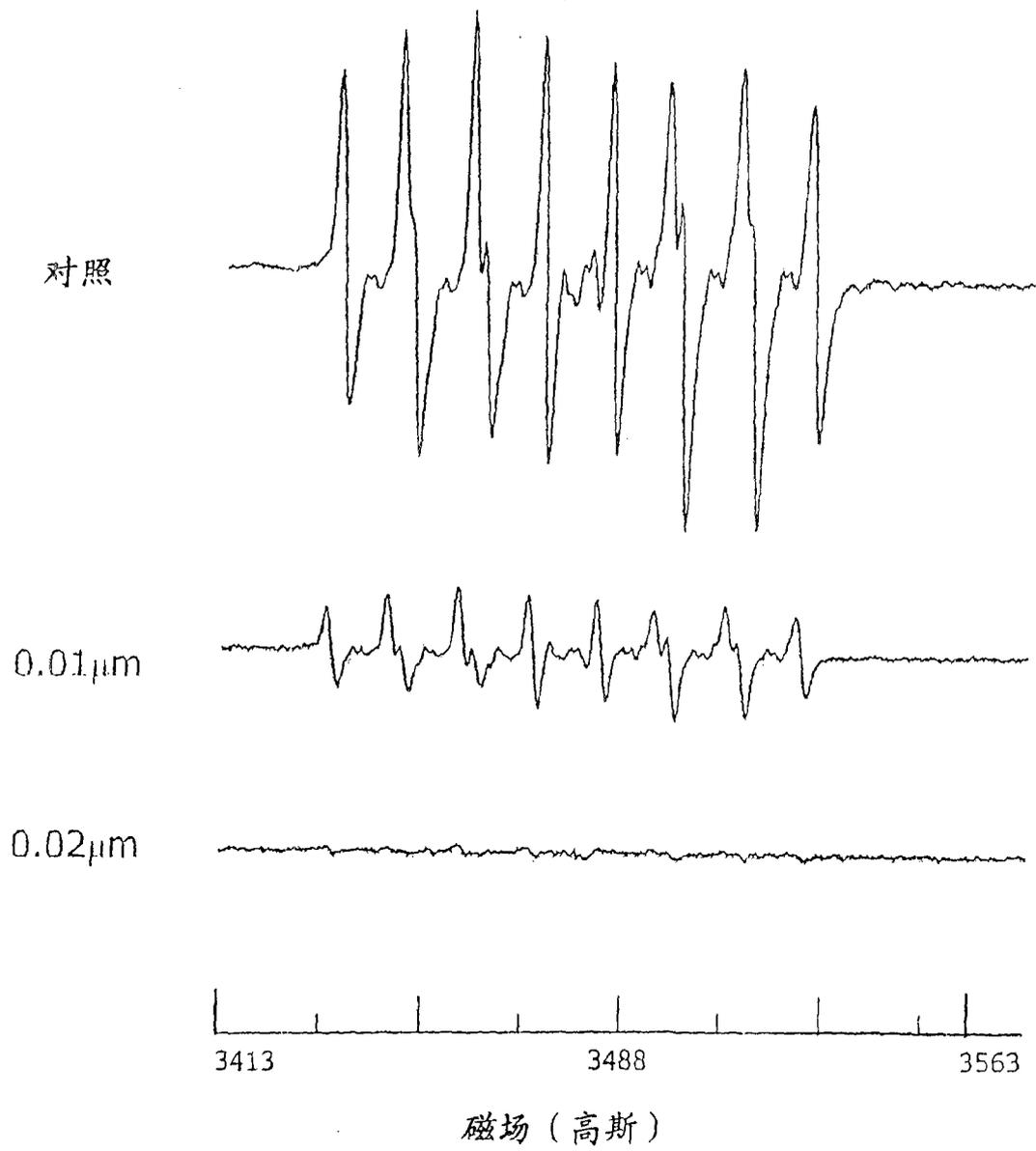
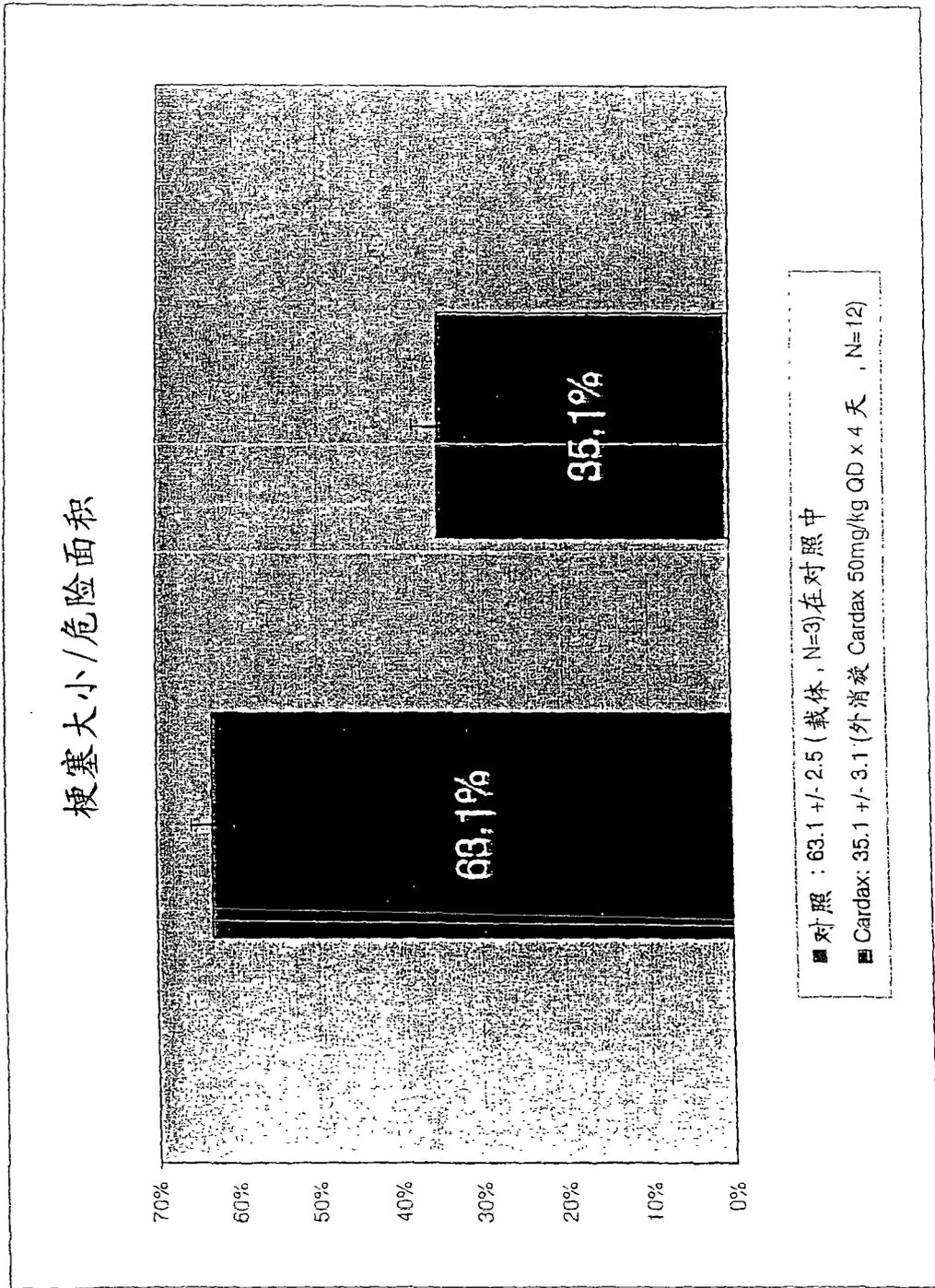


图 3



梗塞大小的平均减小 = 44% ($P^* = 0.01$, 未配对 t 检验).

图 4

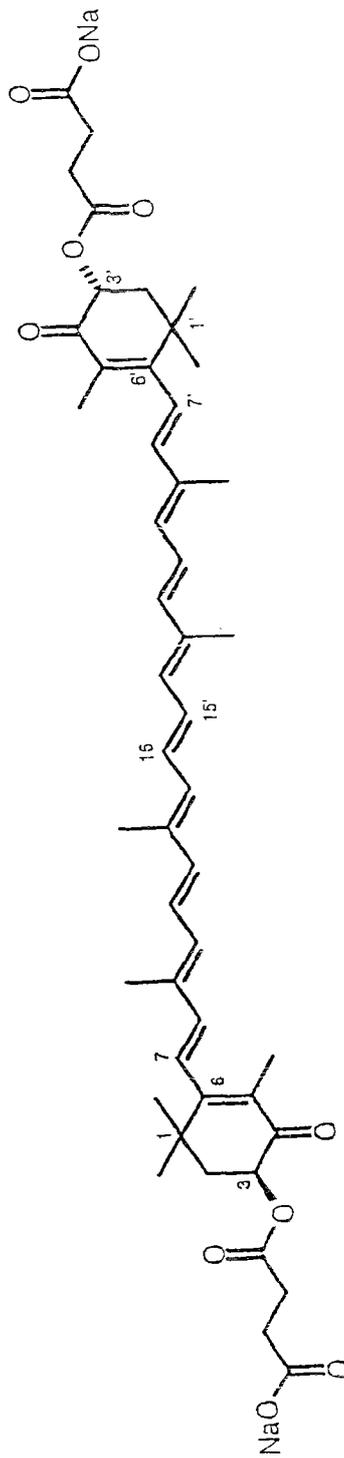


图 5

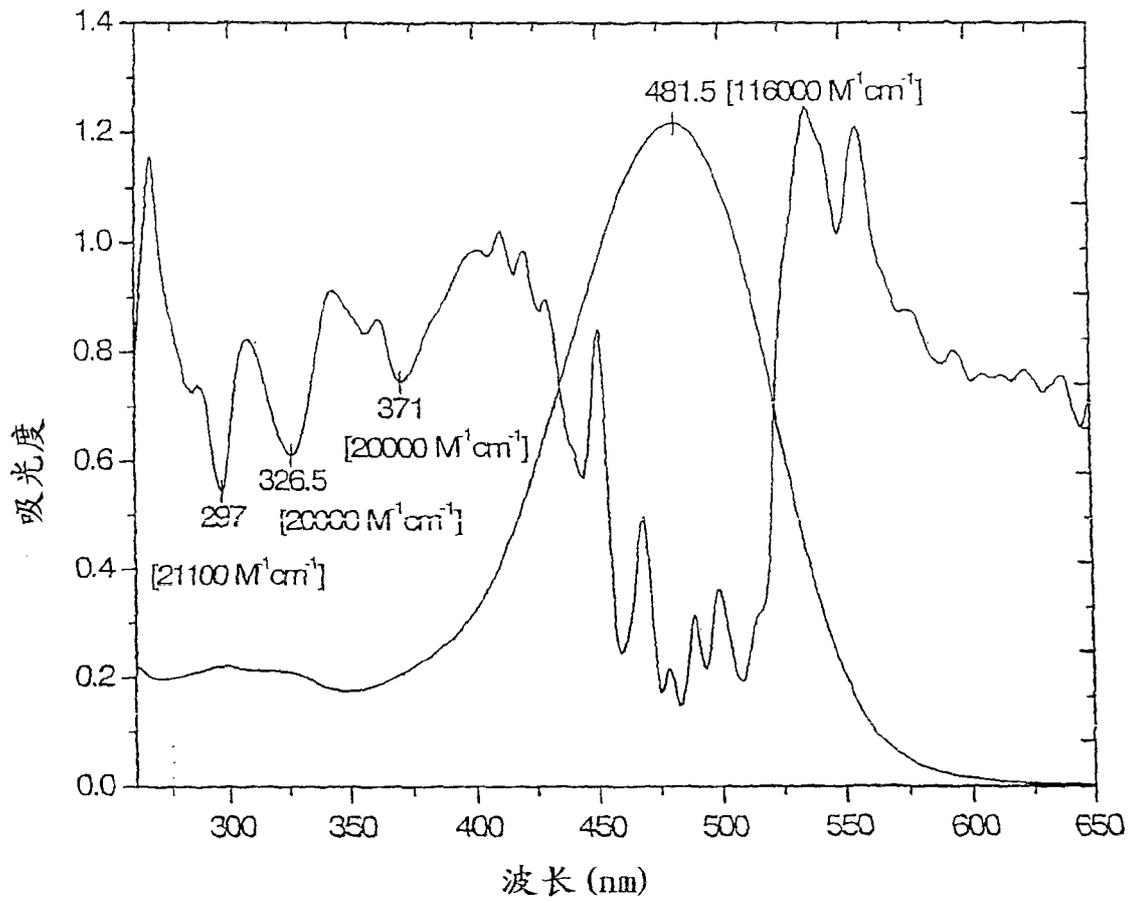


图 6

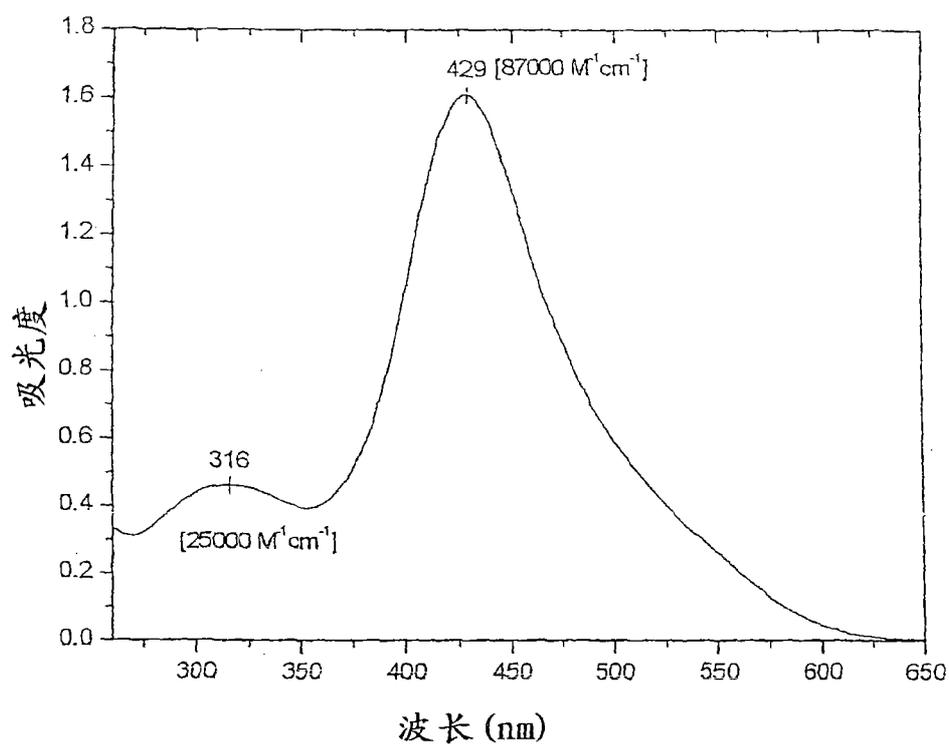


图 7

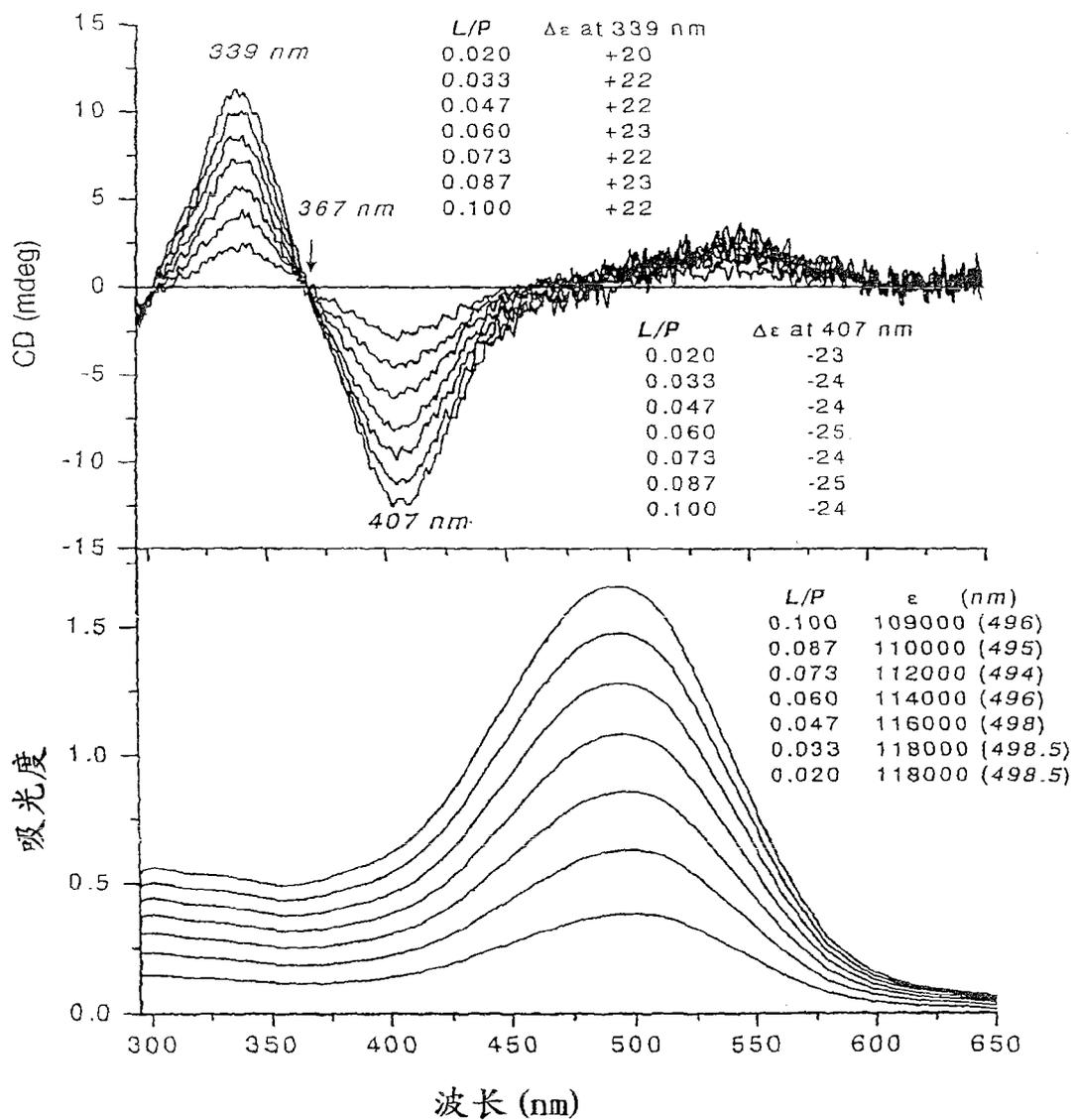


图 8

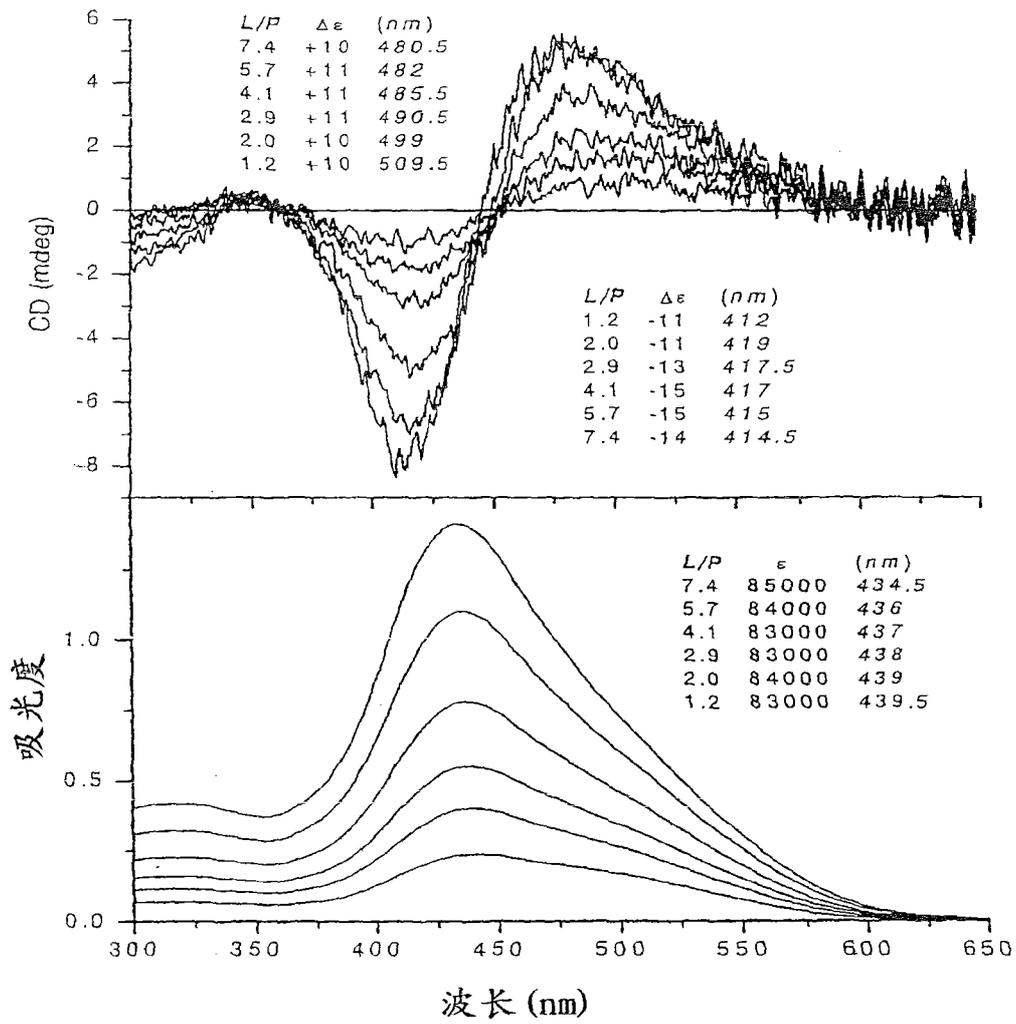


图9

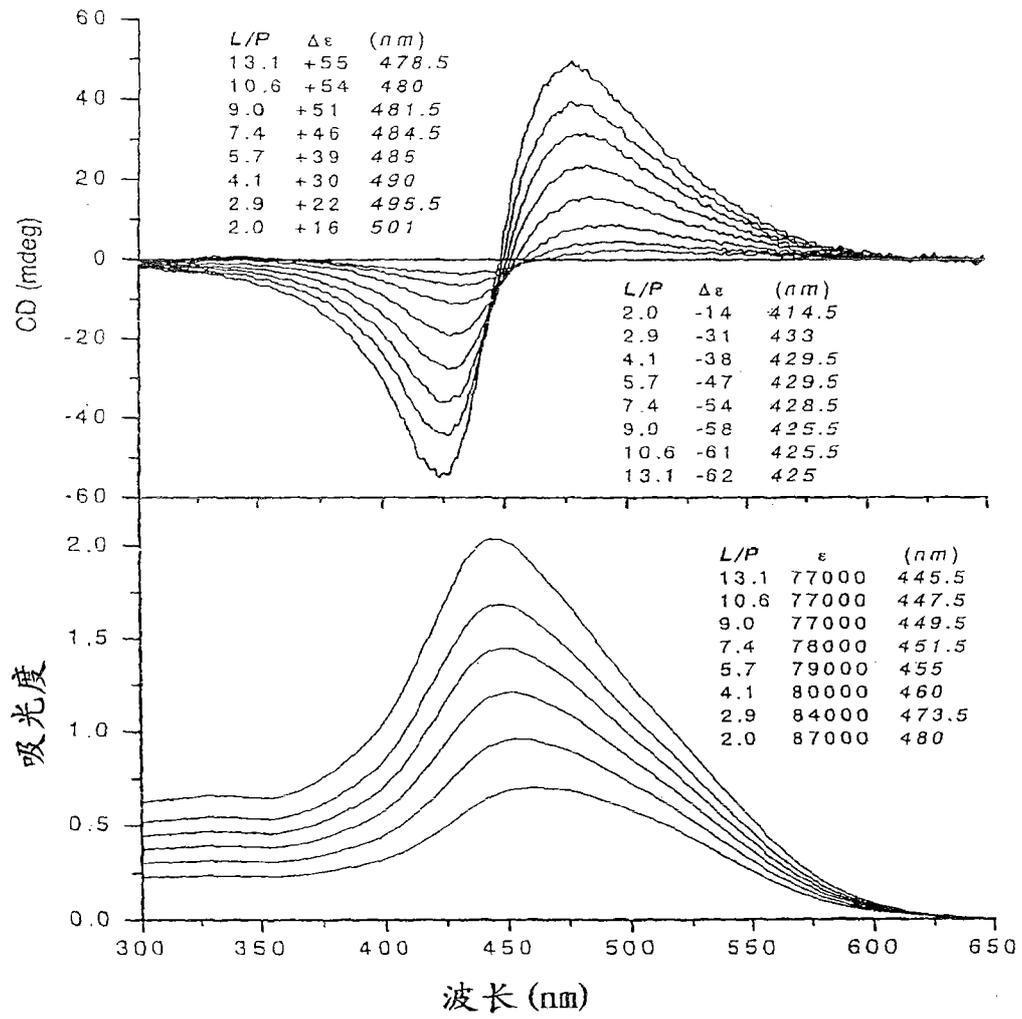


图 10

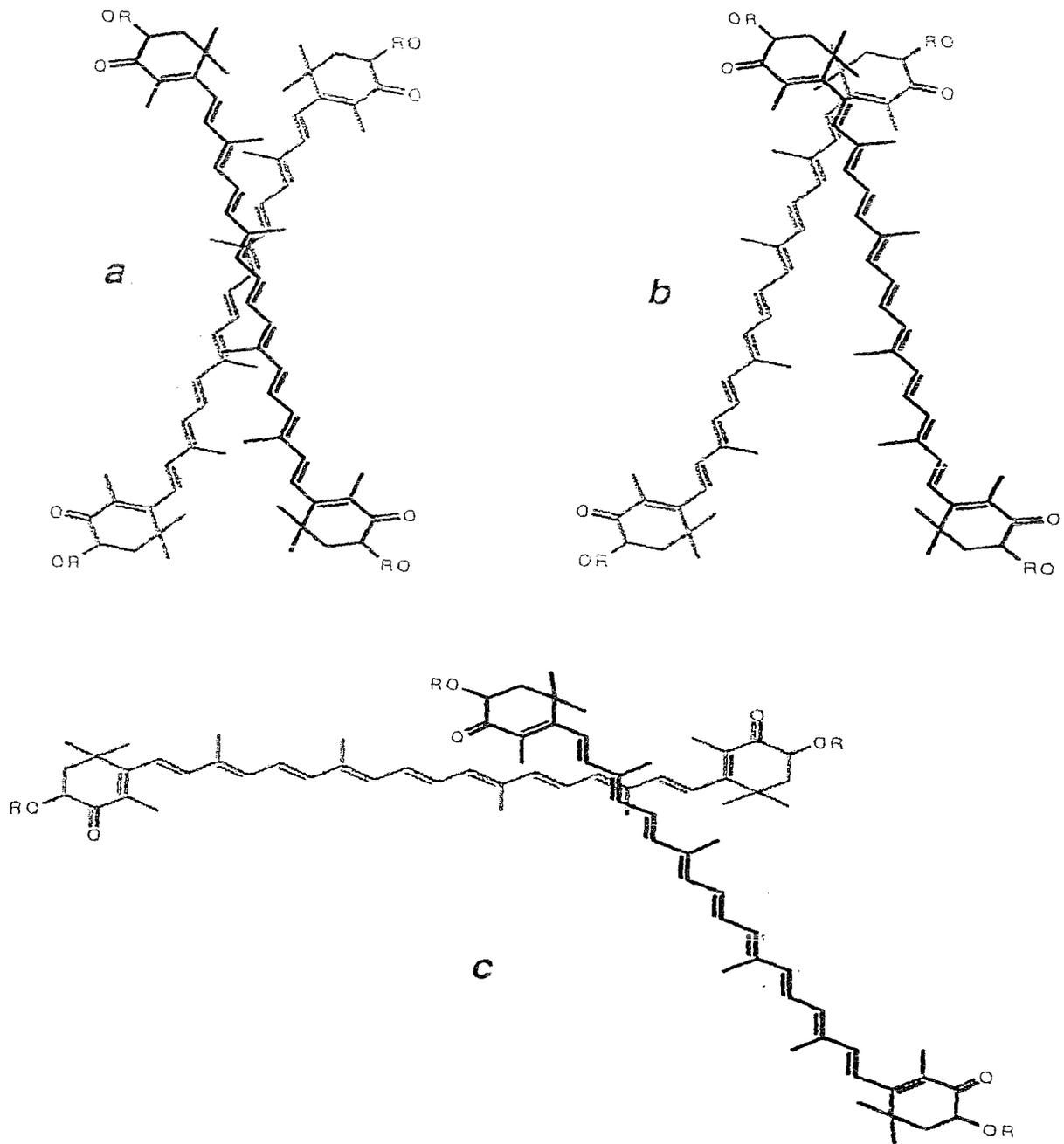


图 11

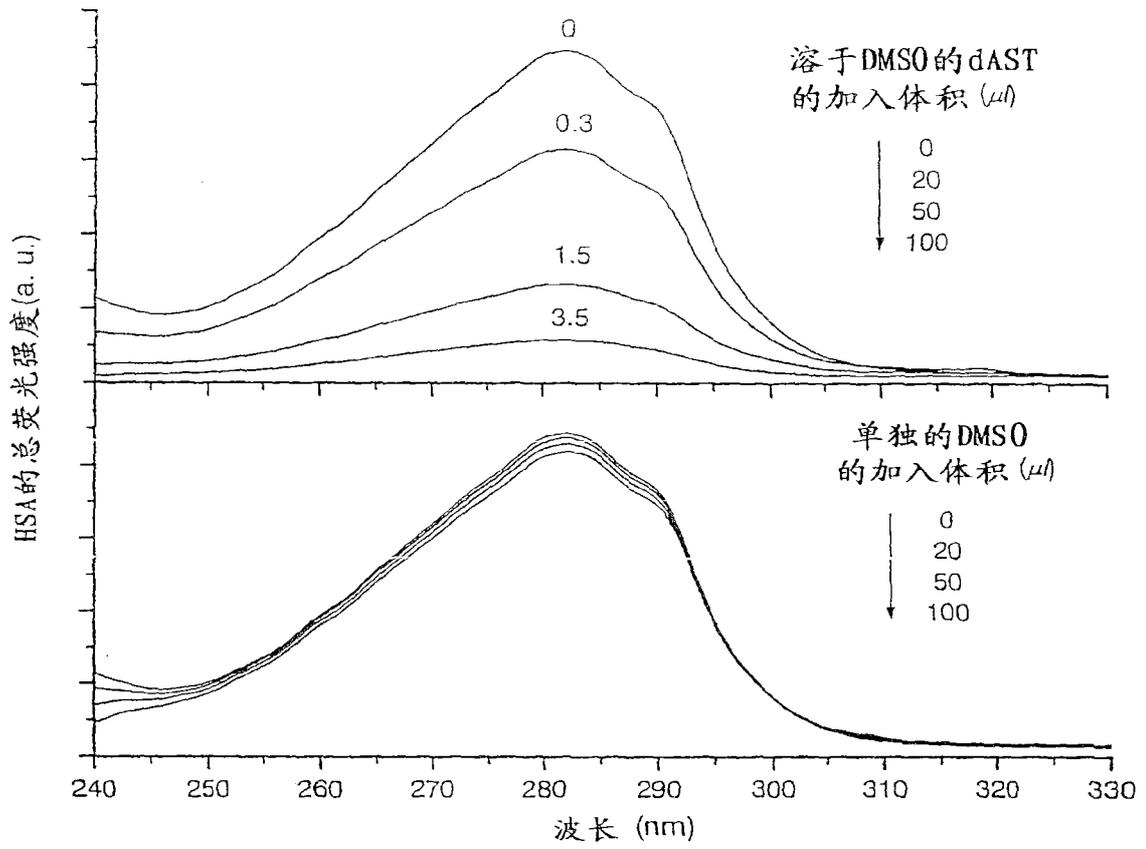


图 12

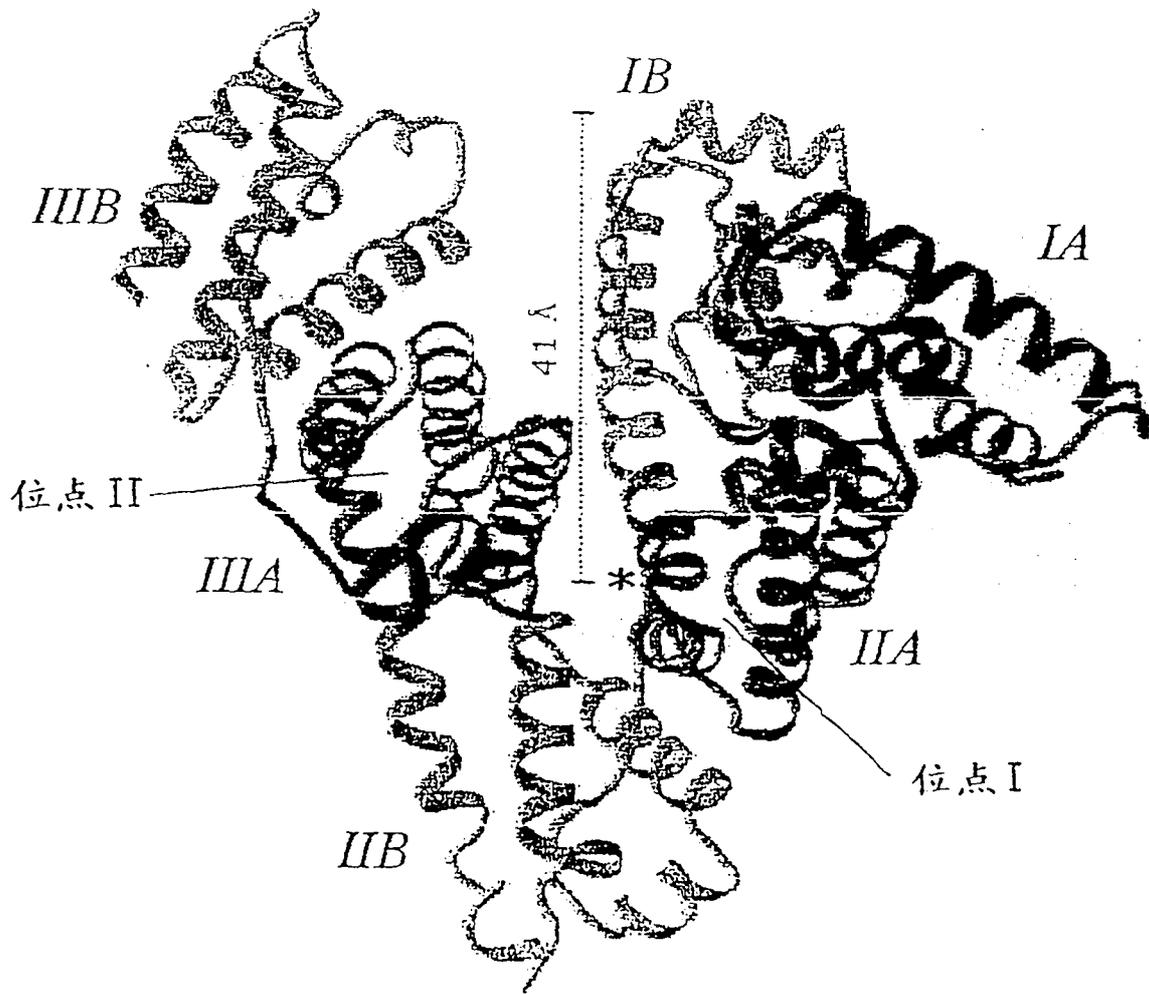


图 13

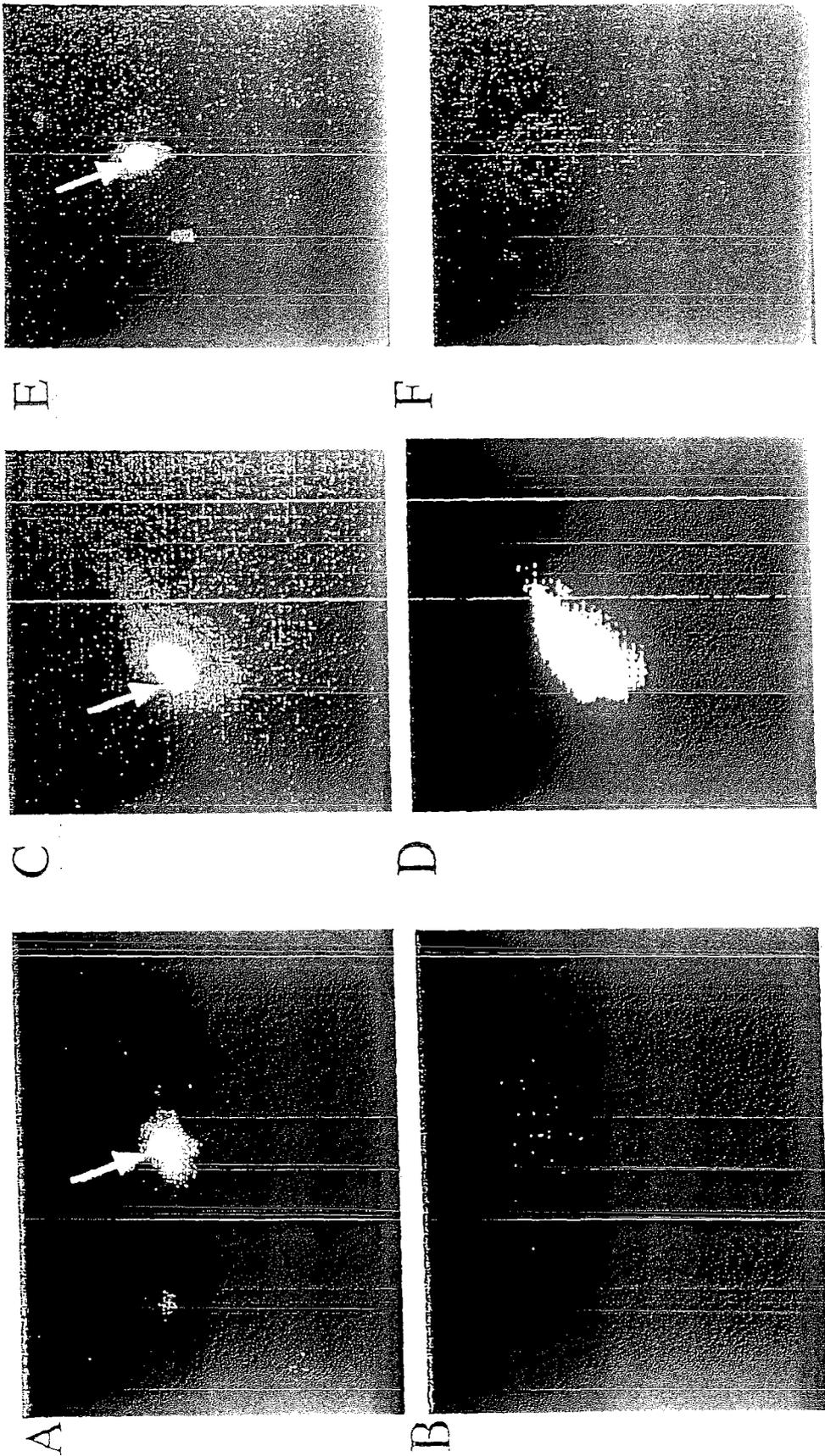


图 14

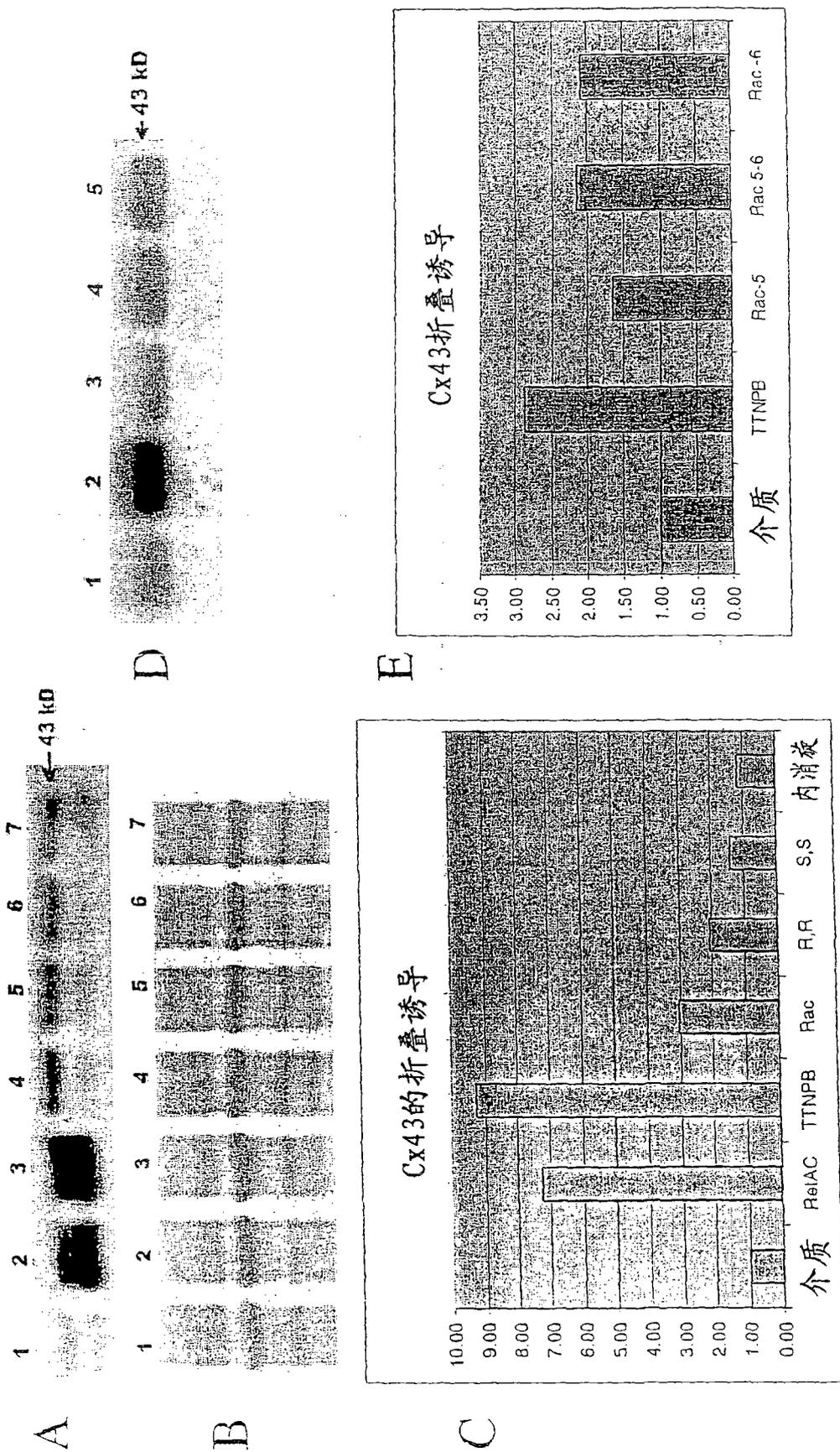


图 15

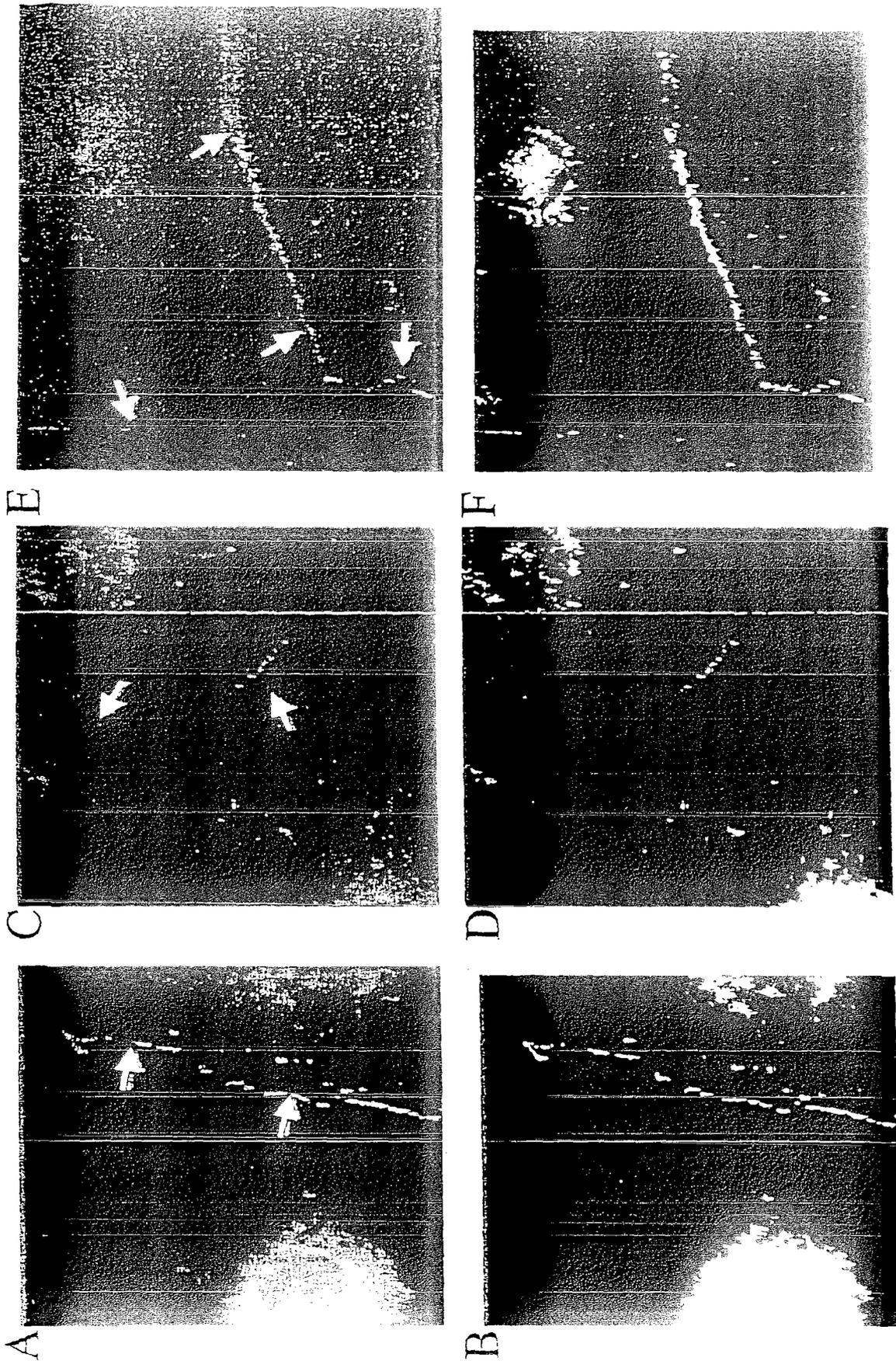


图 16

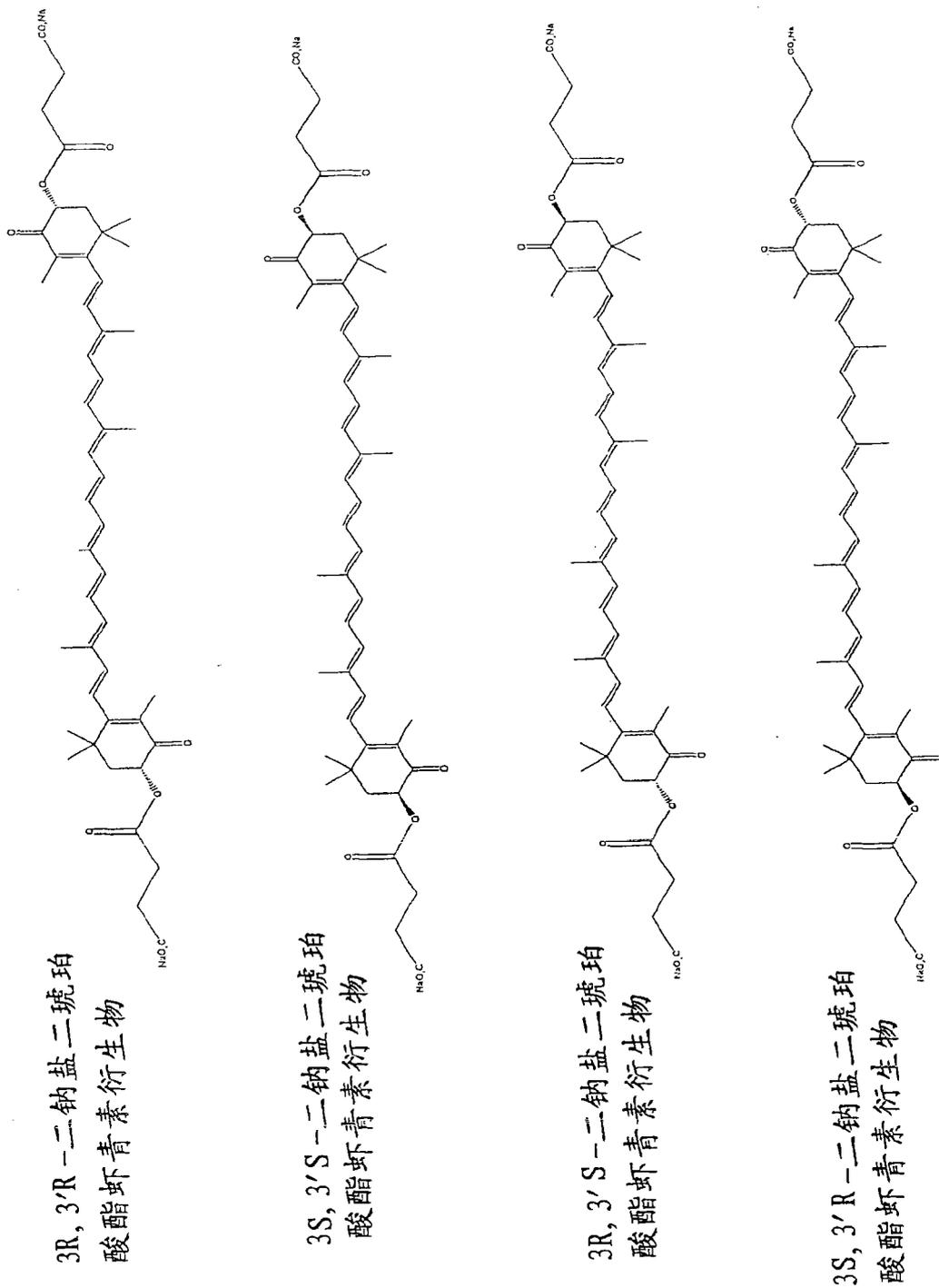


图 17

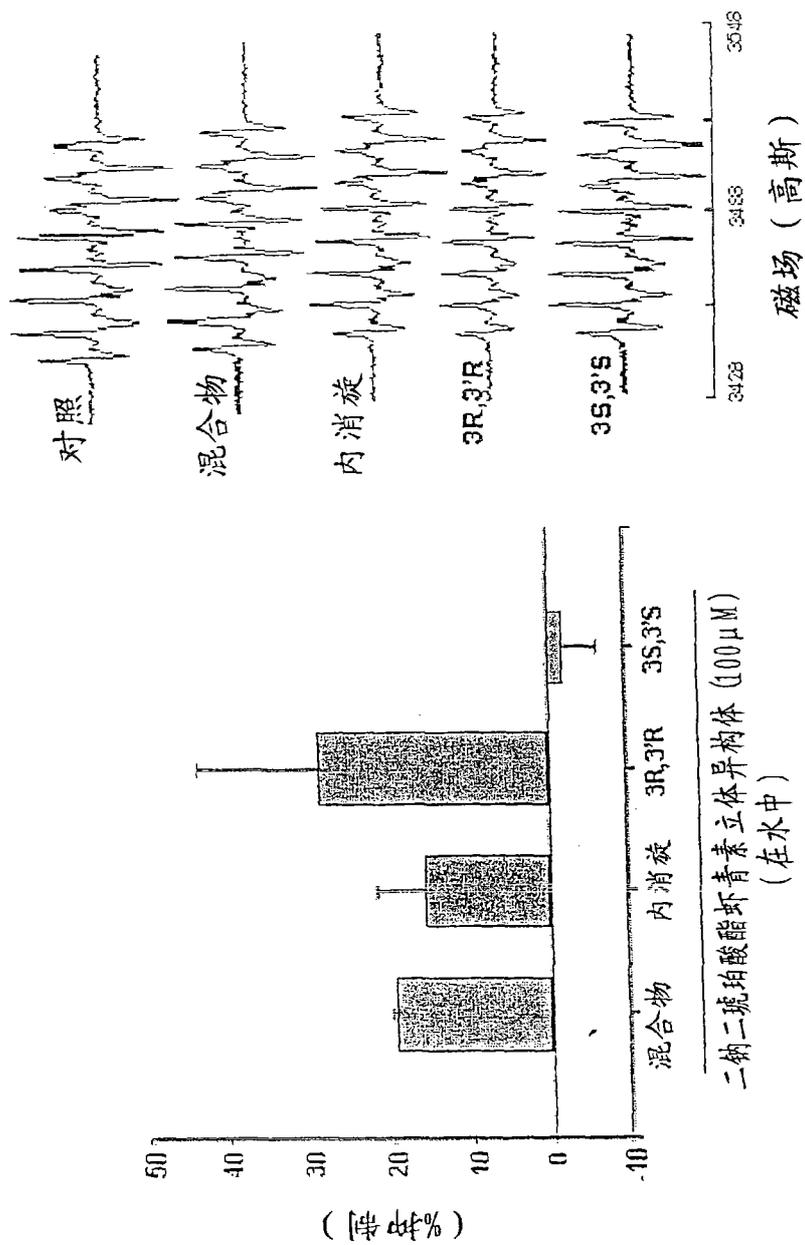


图 18

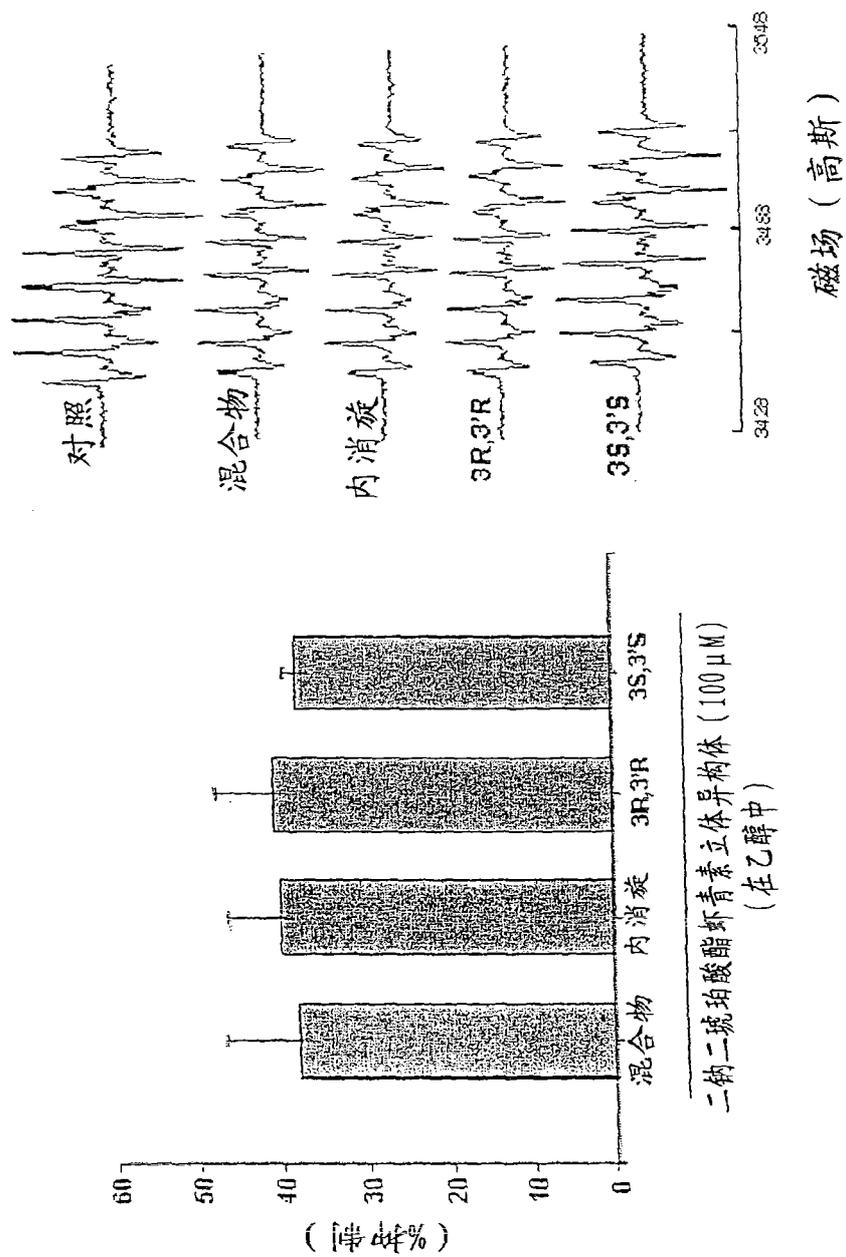


图 19

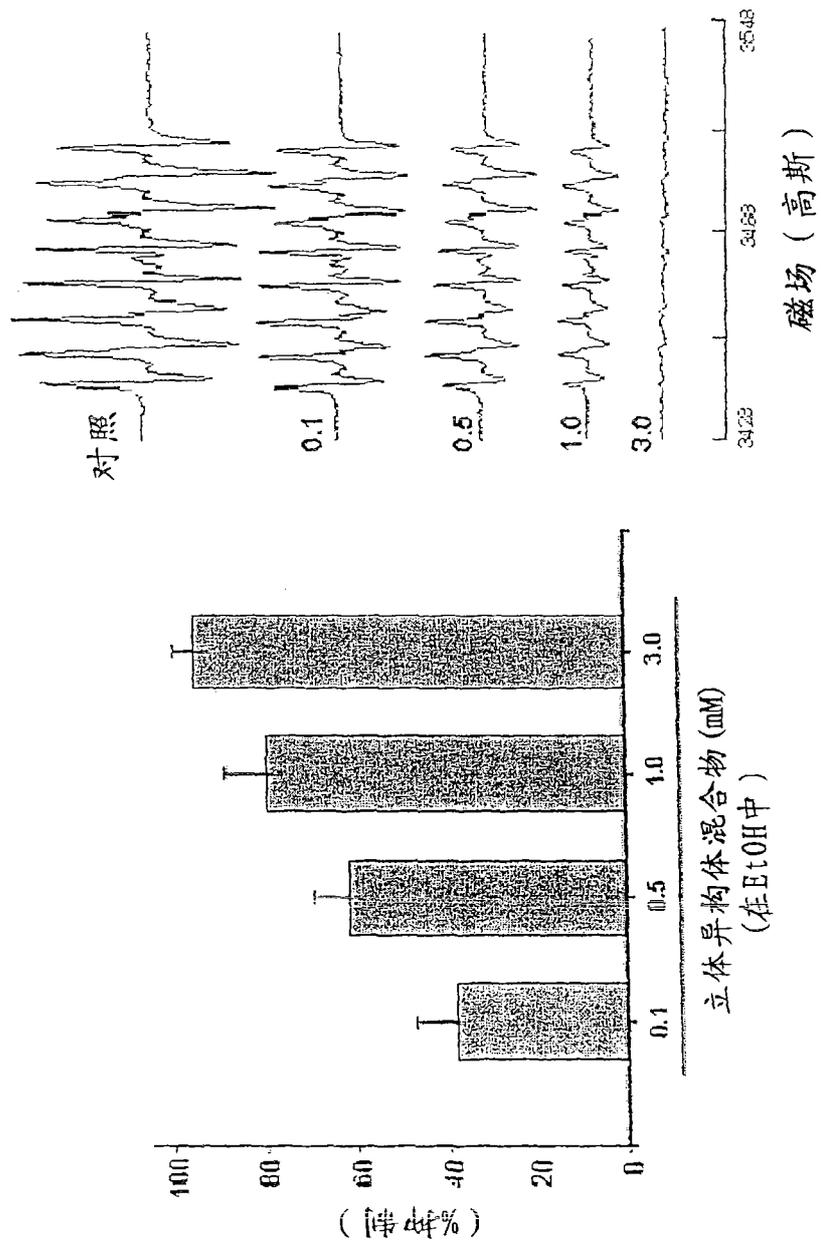


图 20

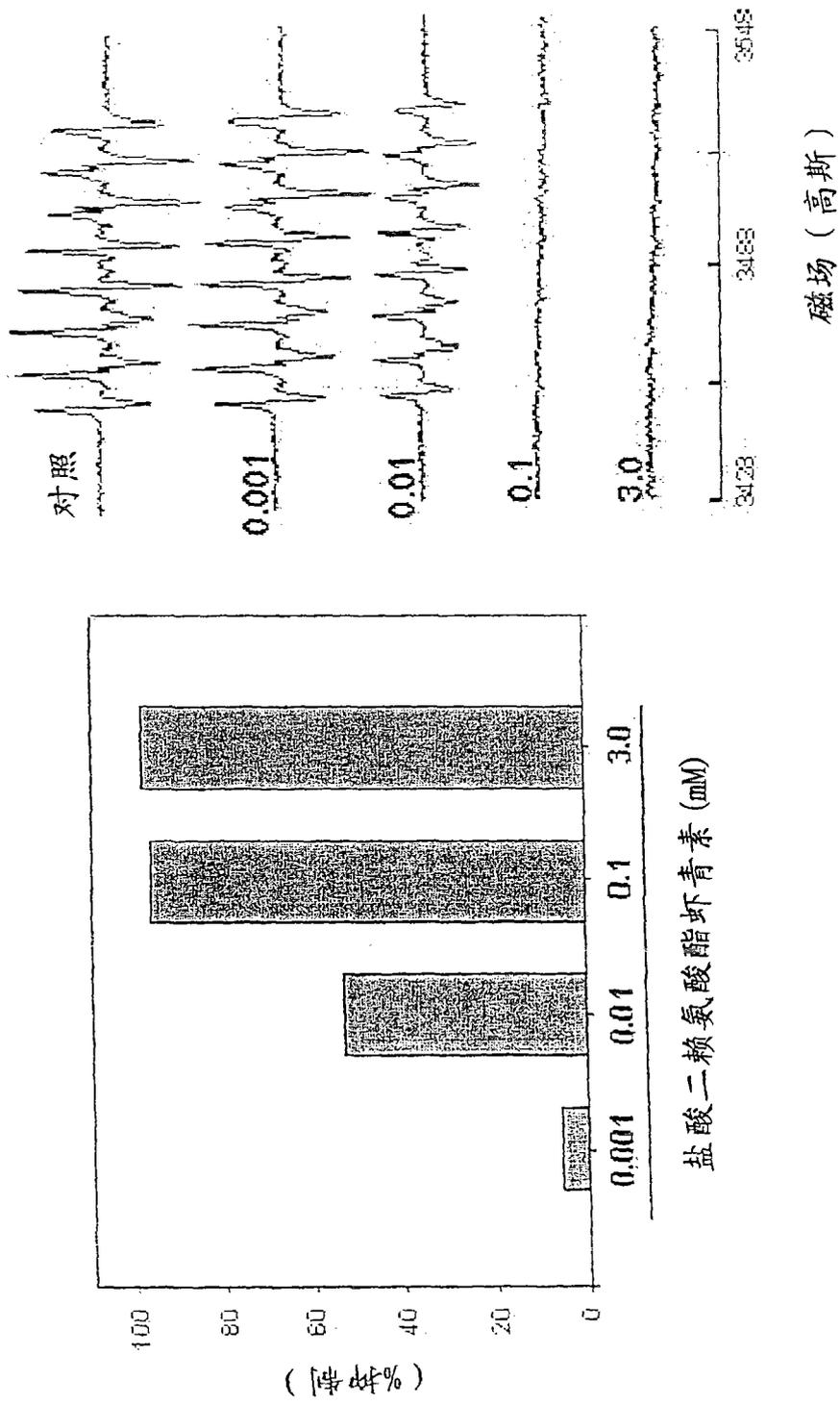


图 21

标准图
浓度-时间曲线

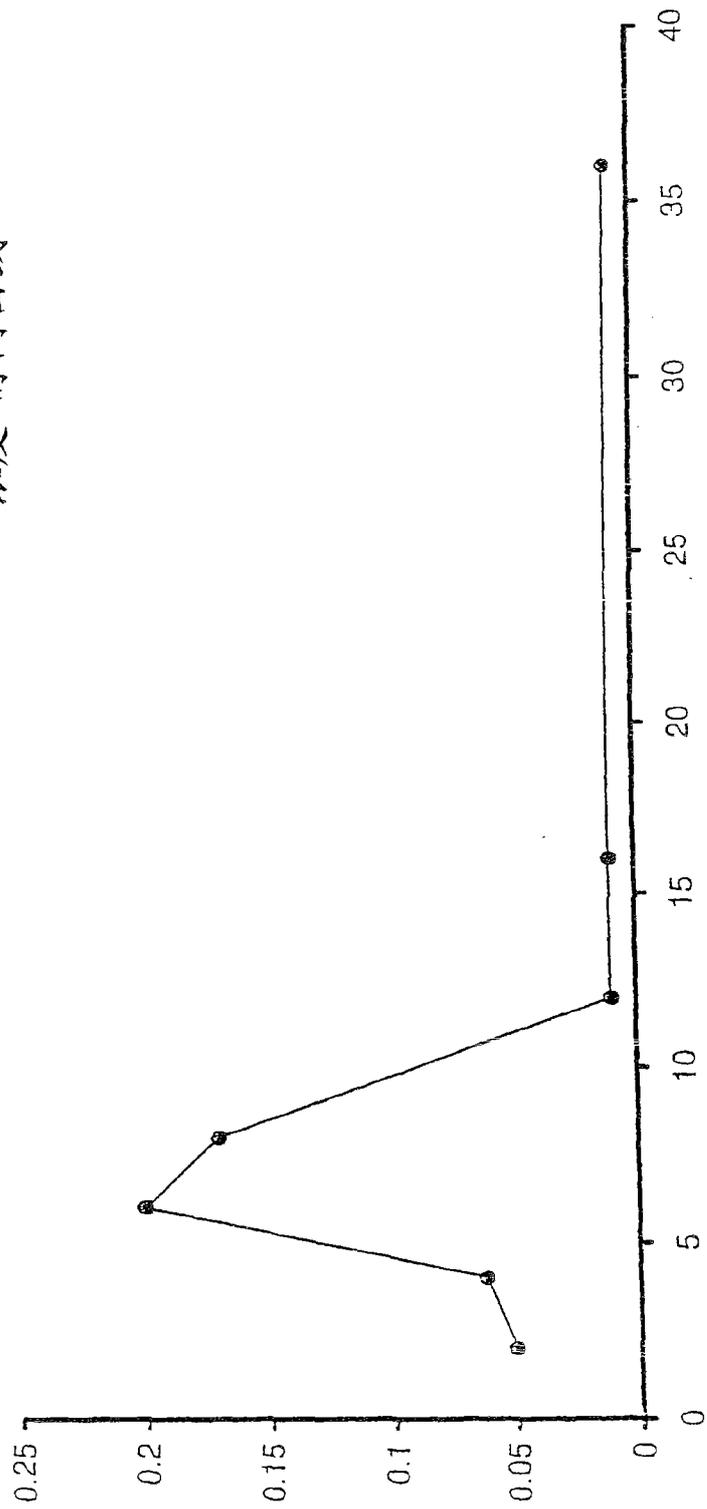


图 22

标准图
浓度-时间曲线

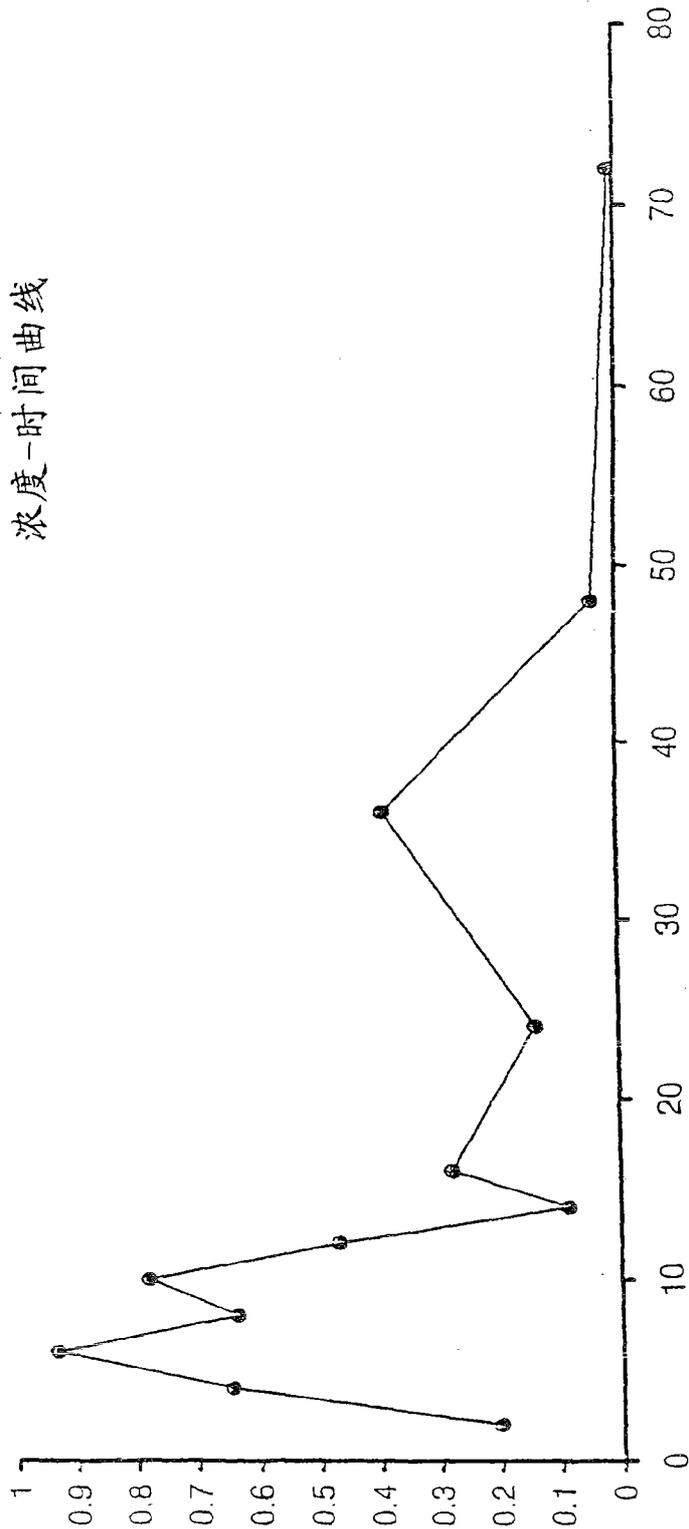


图 23

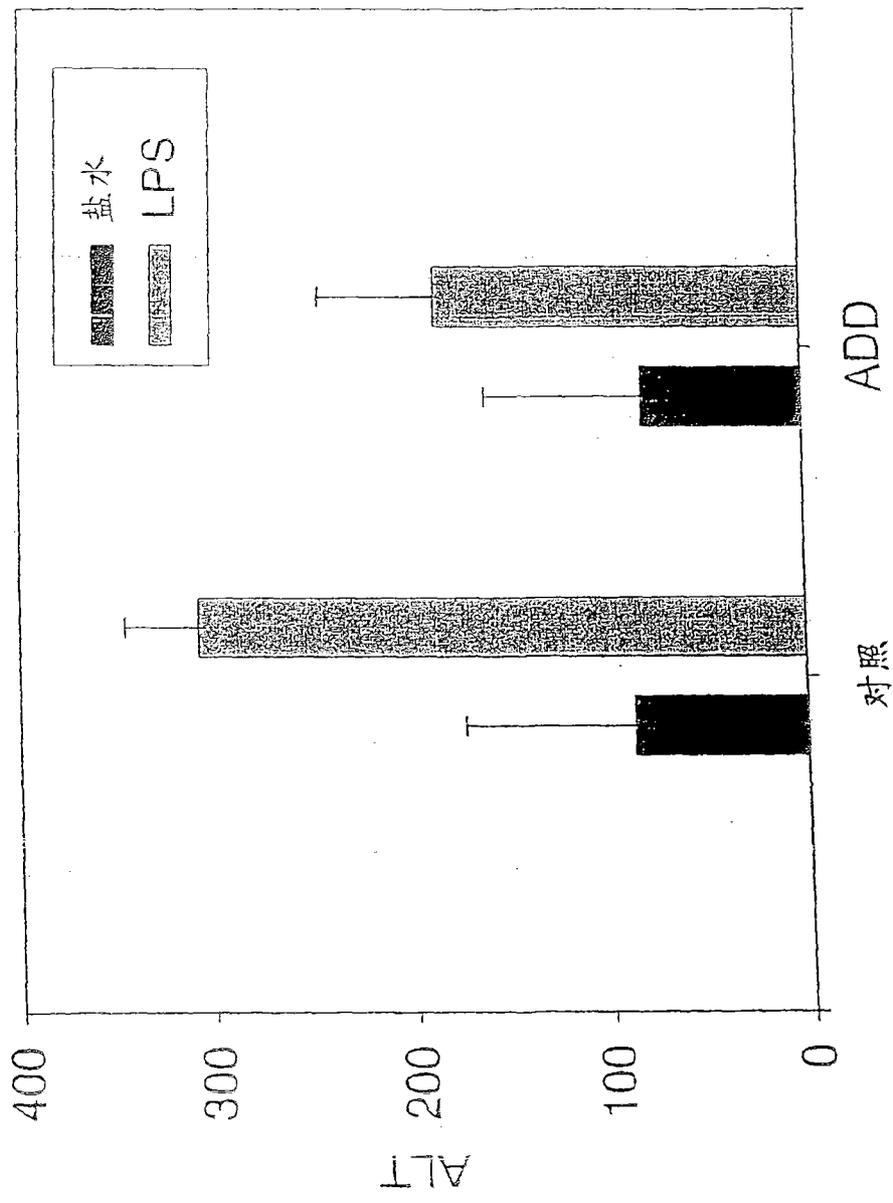


图 2 4

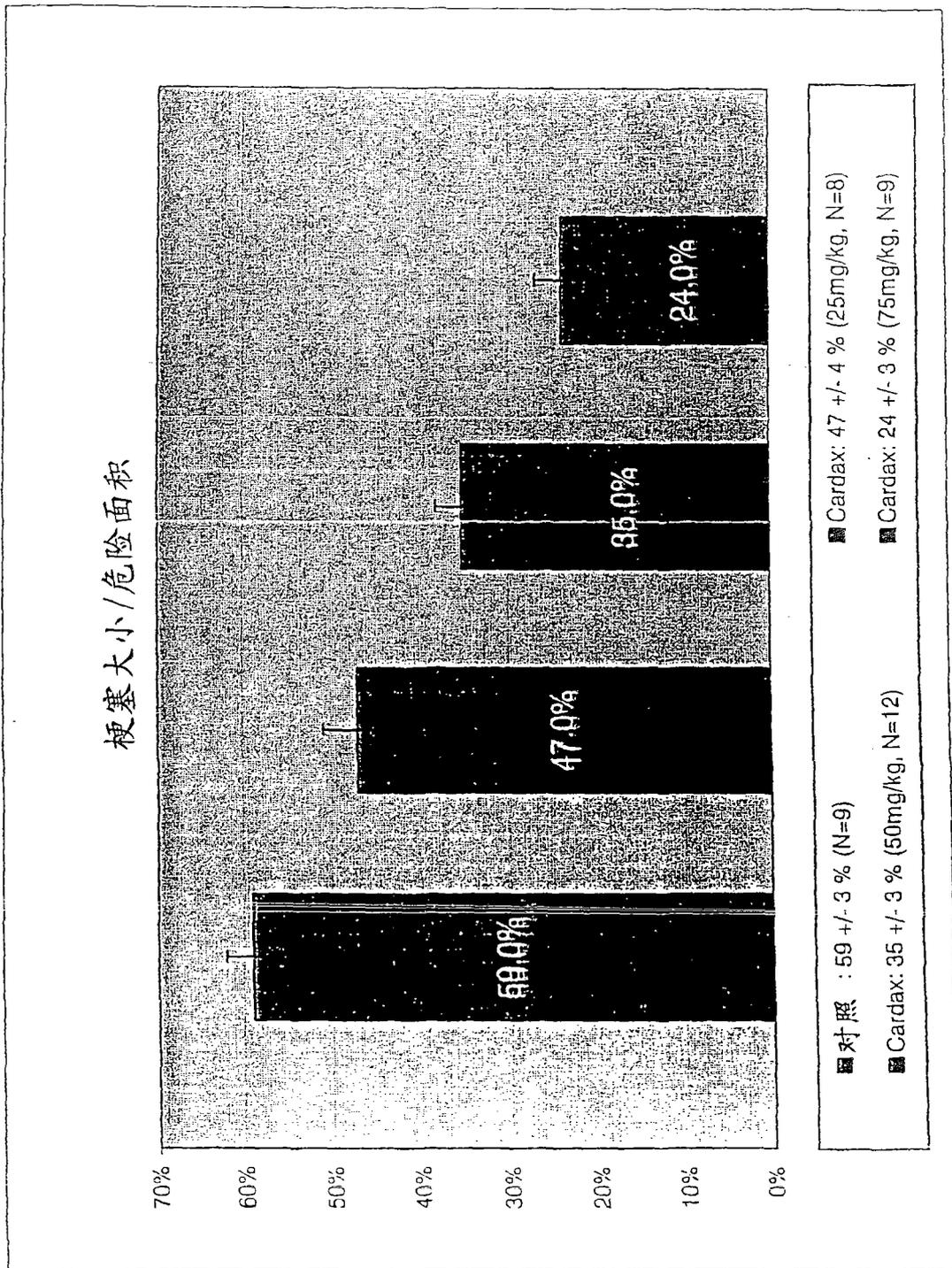


图 25

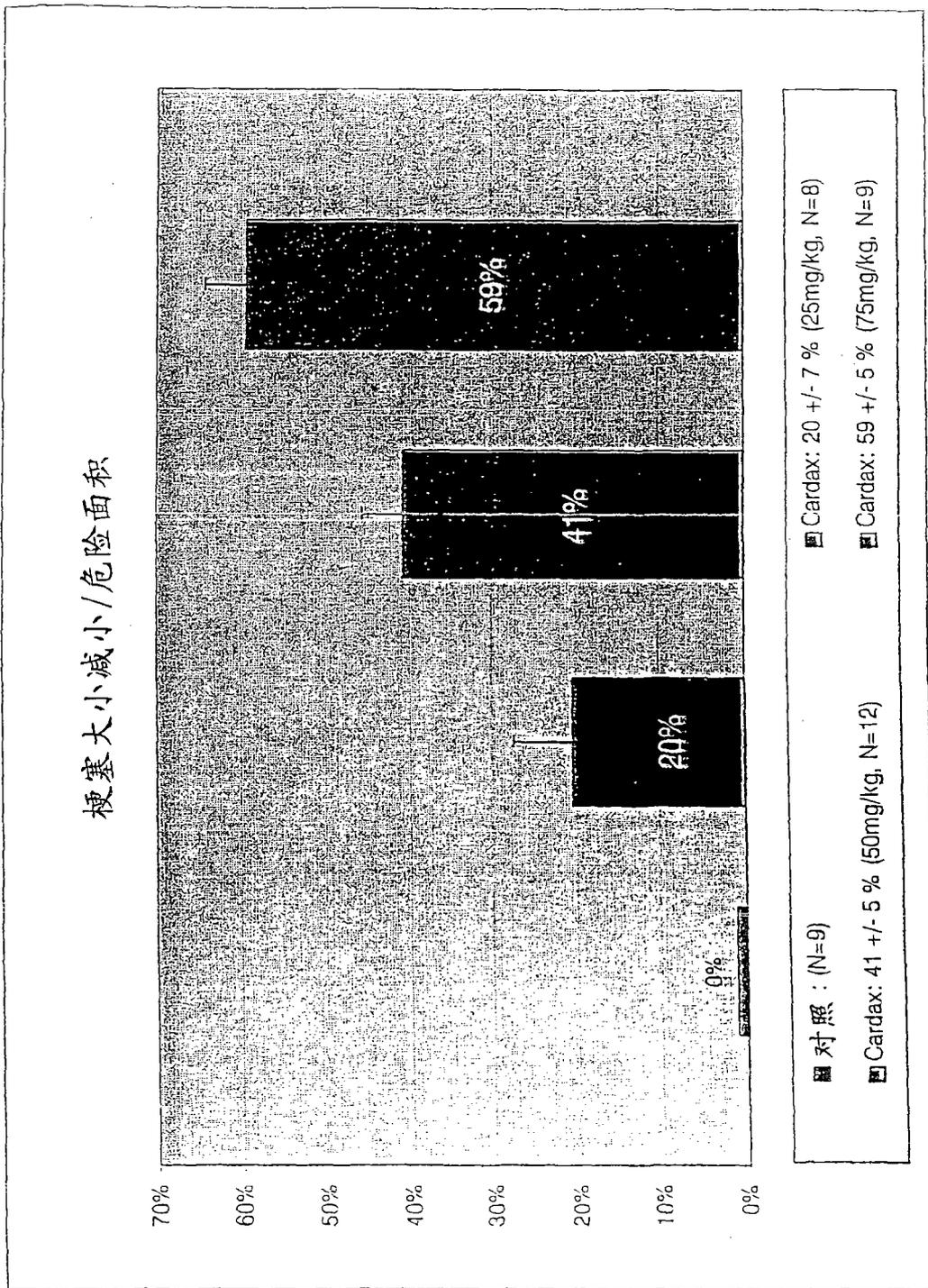


图 26

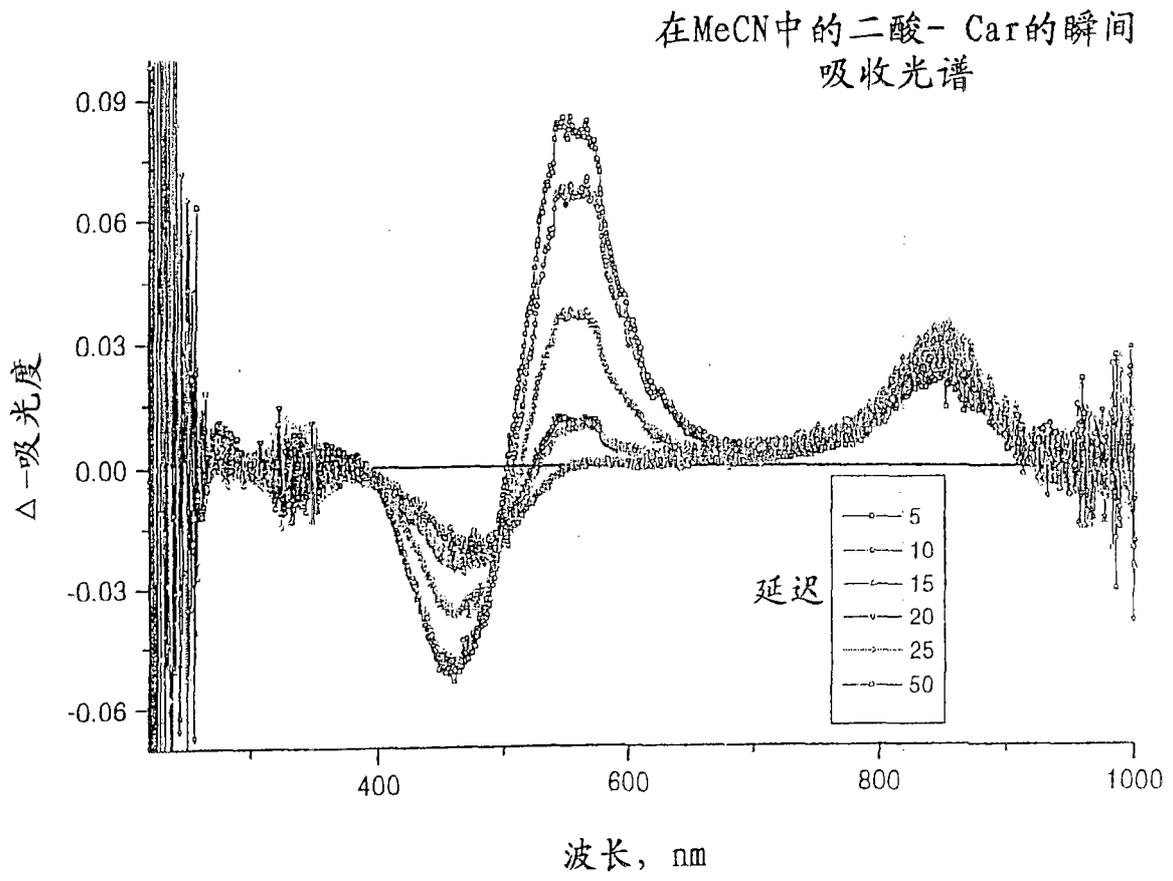


图 27

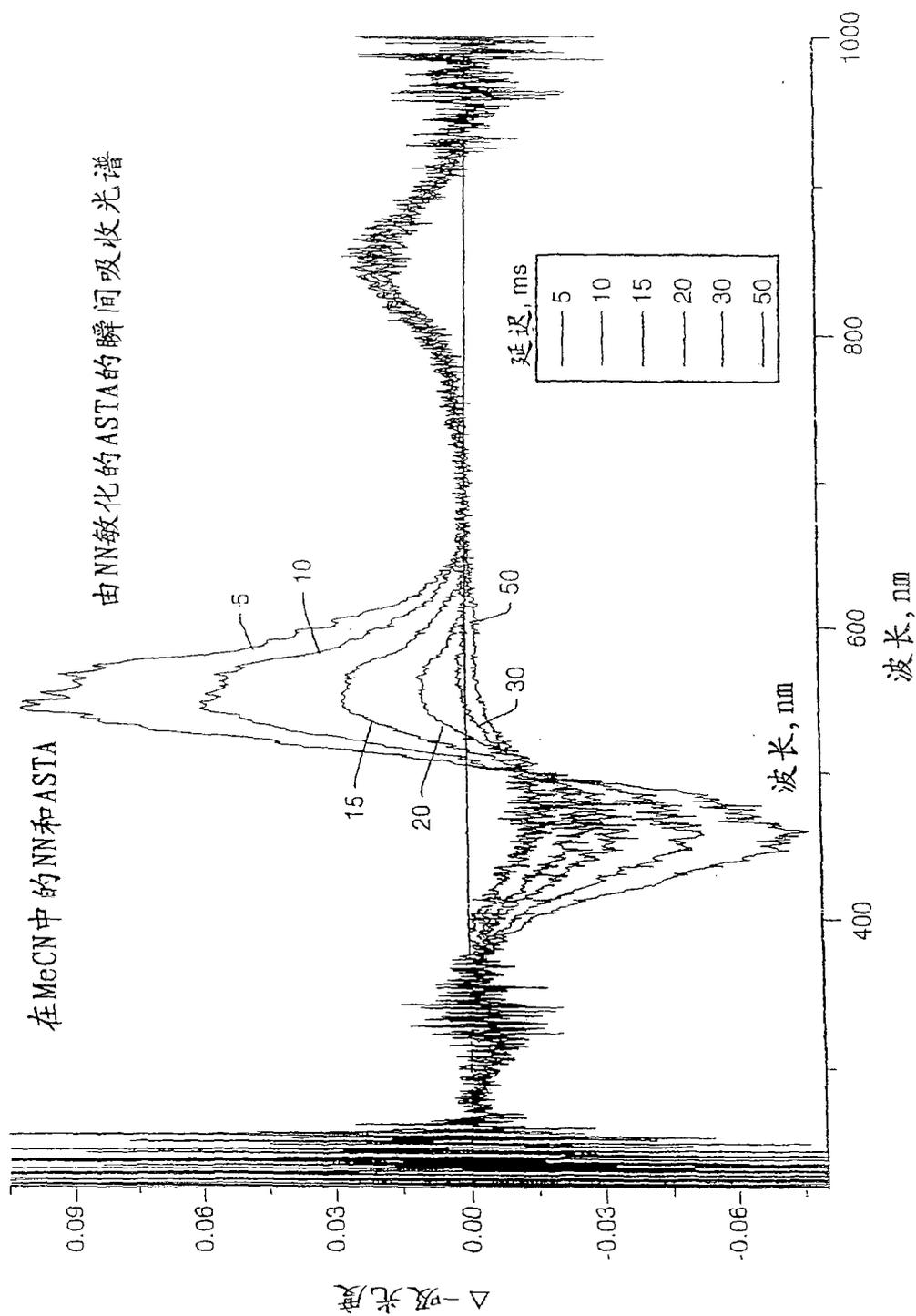


图 28

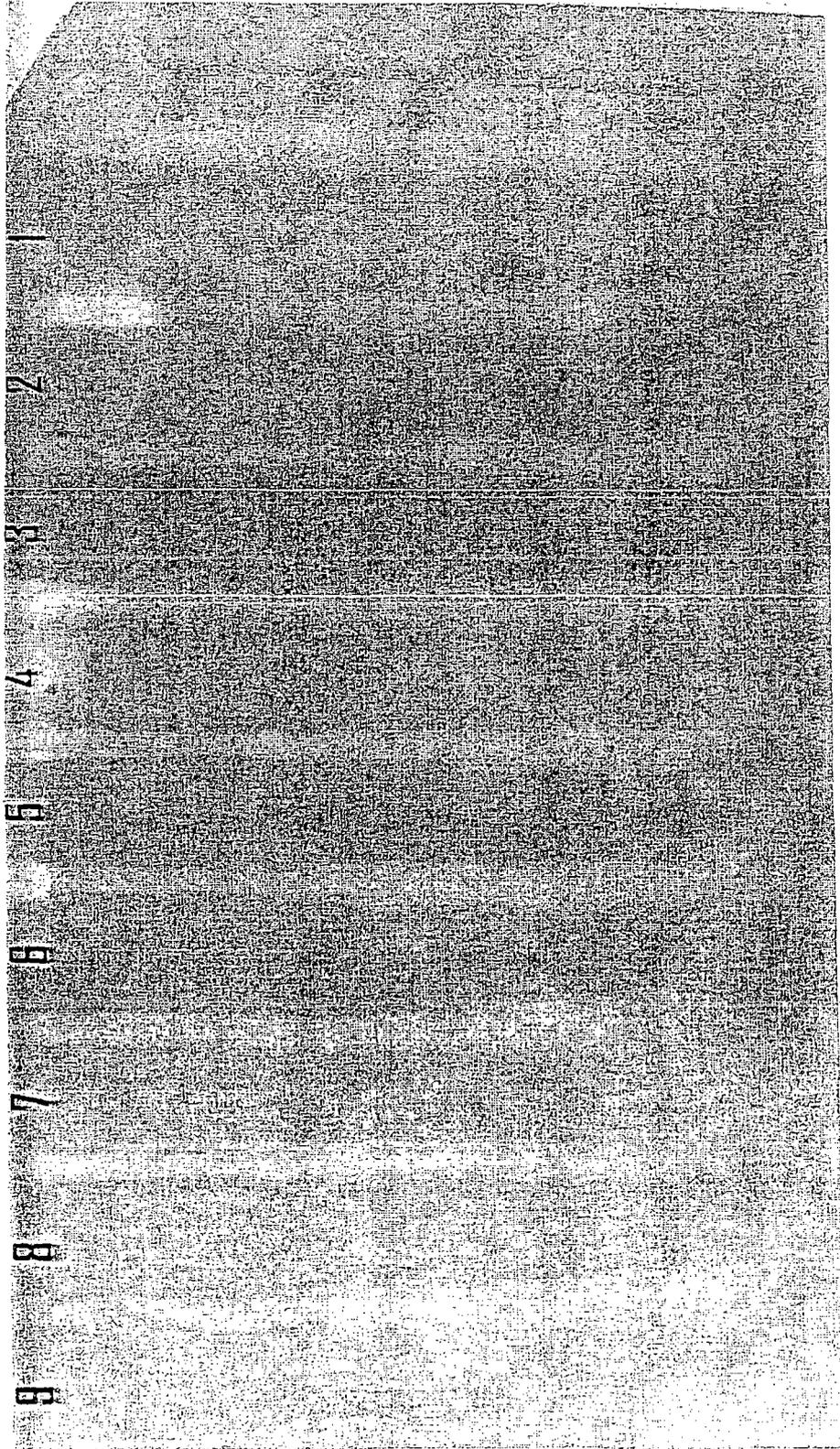


图 29

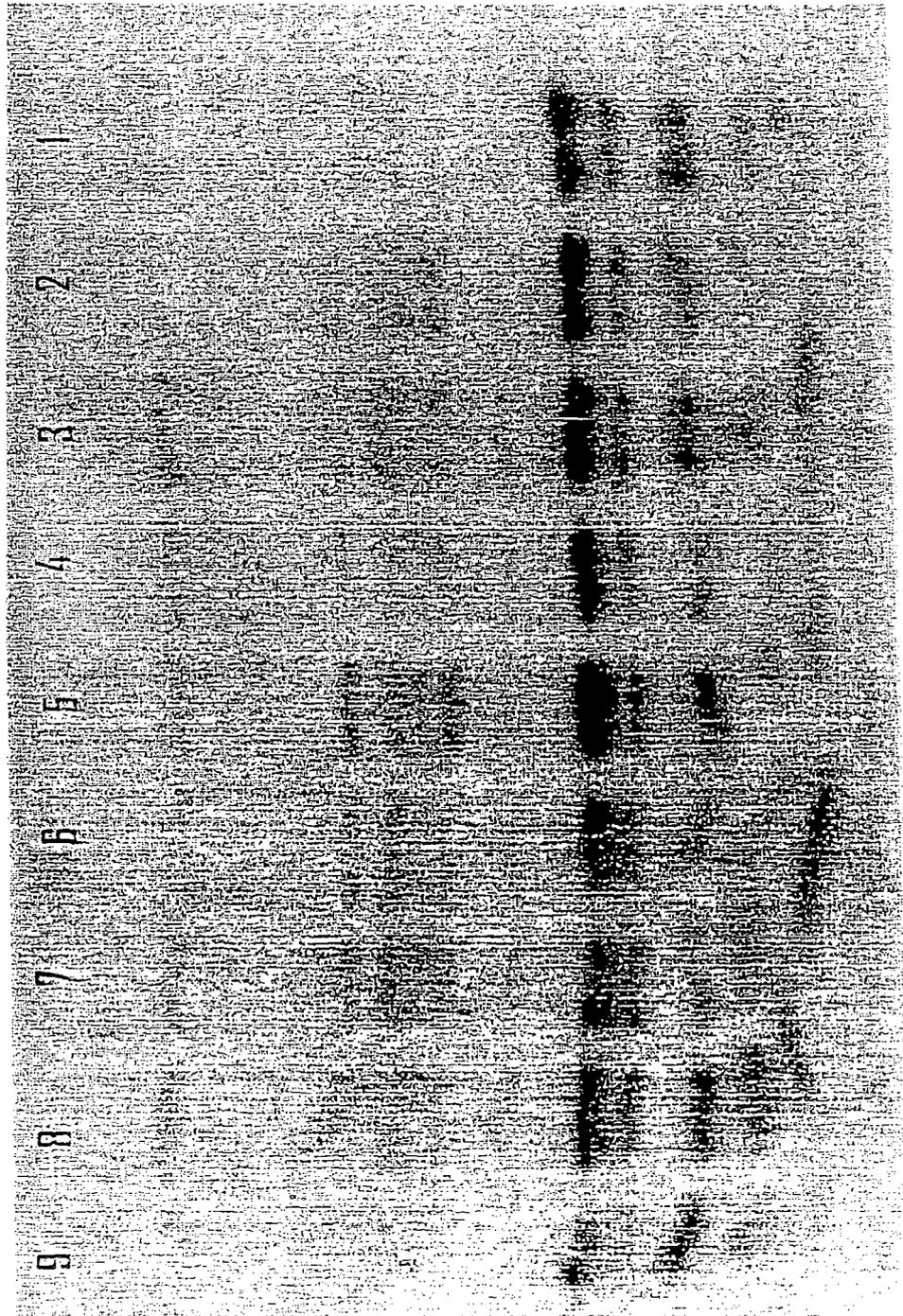


图 30

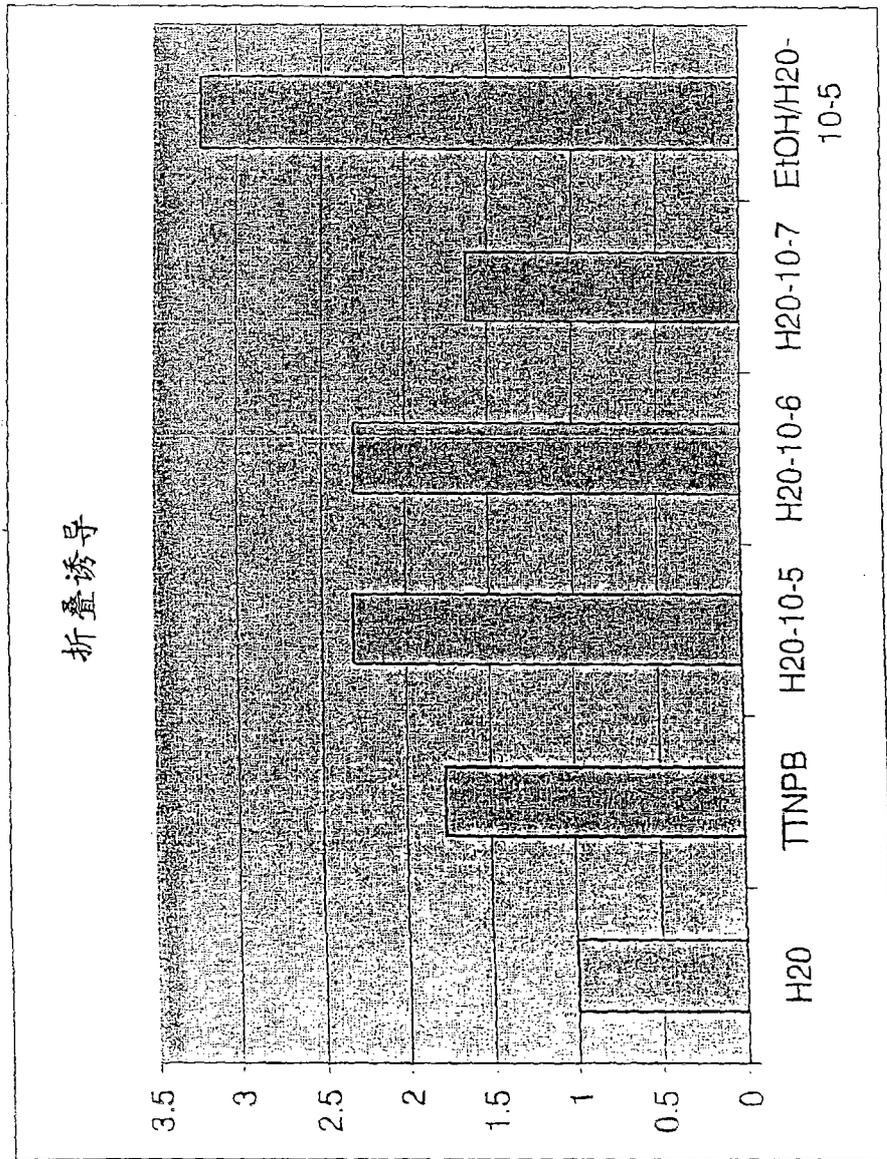


图 31

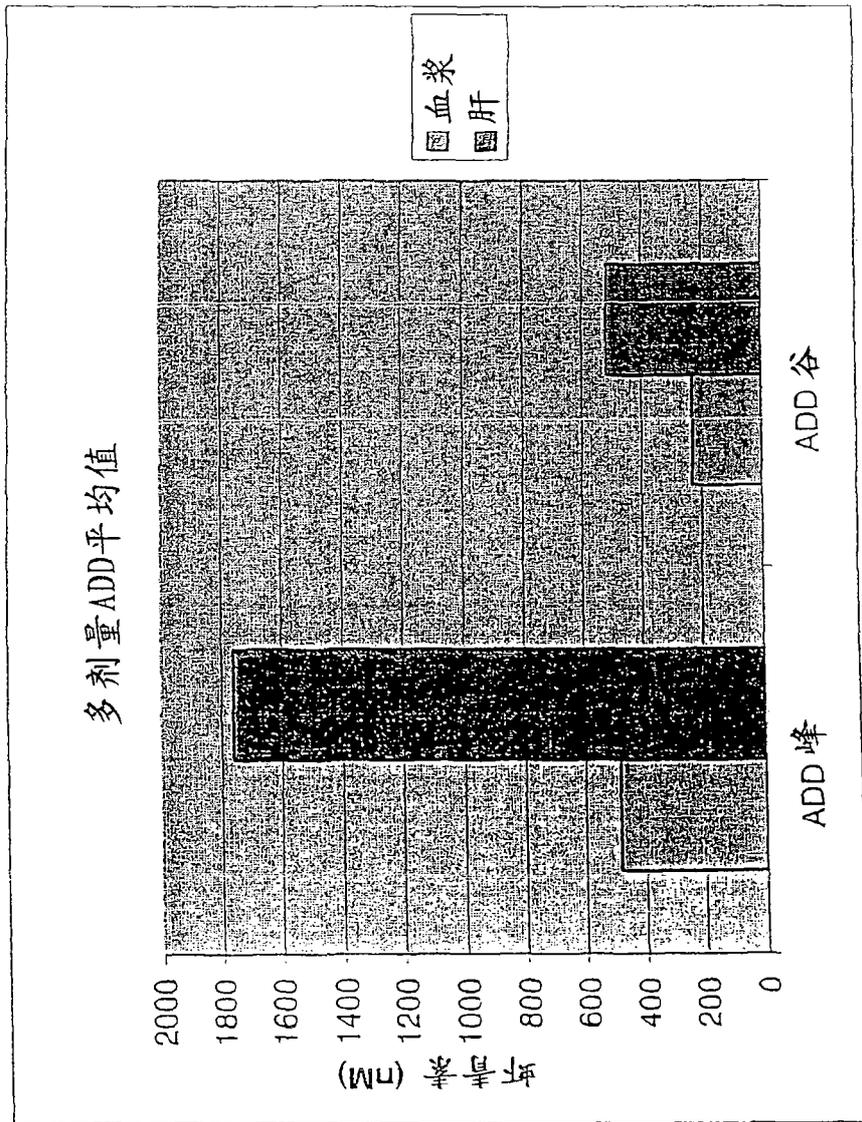


图 32

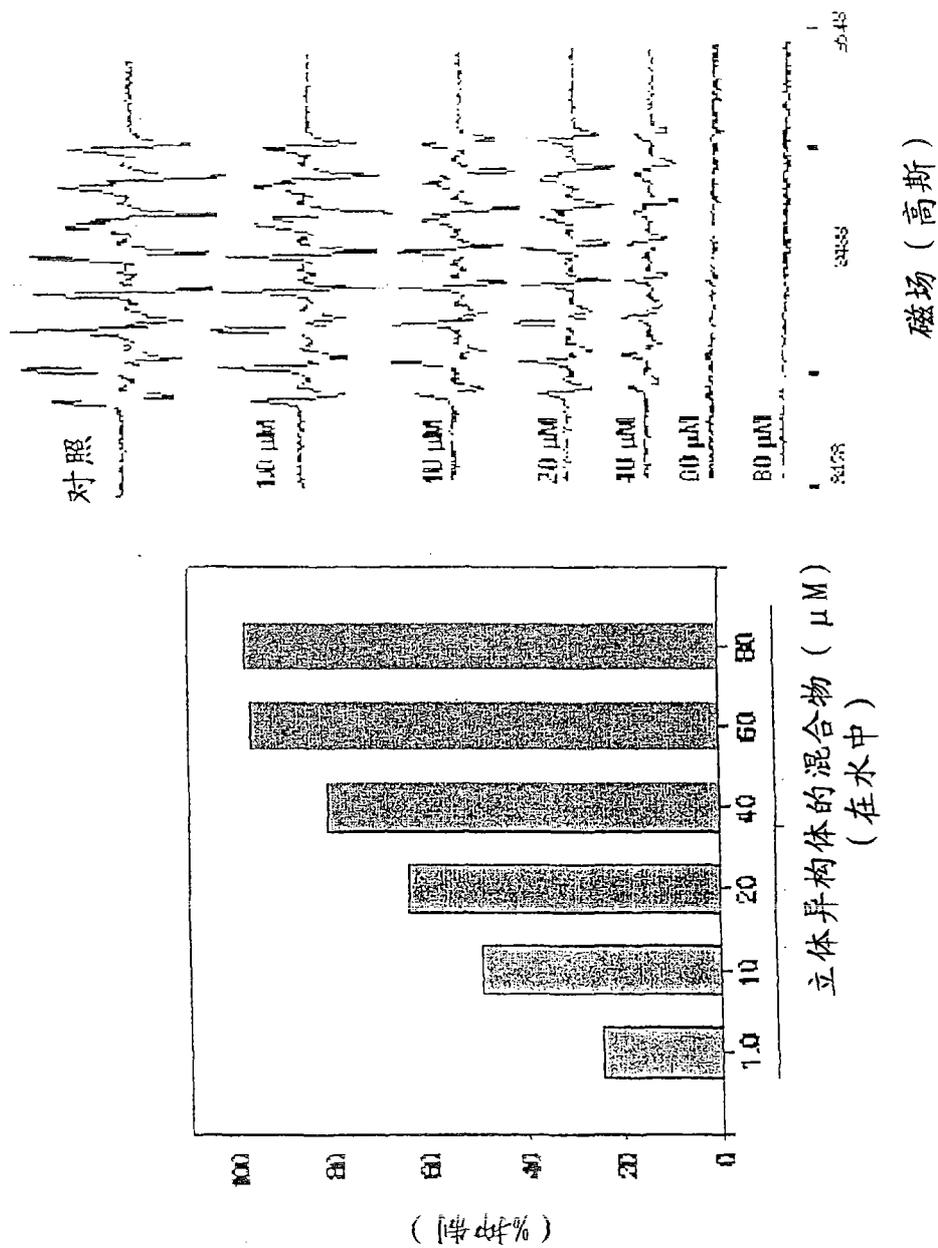


图 33

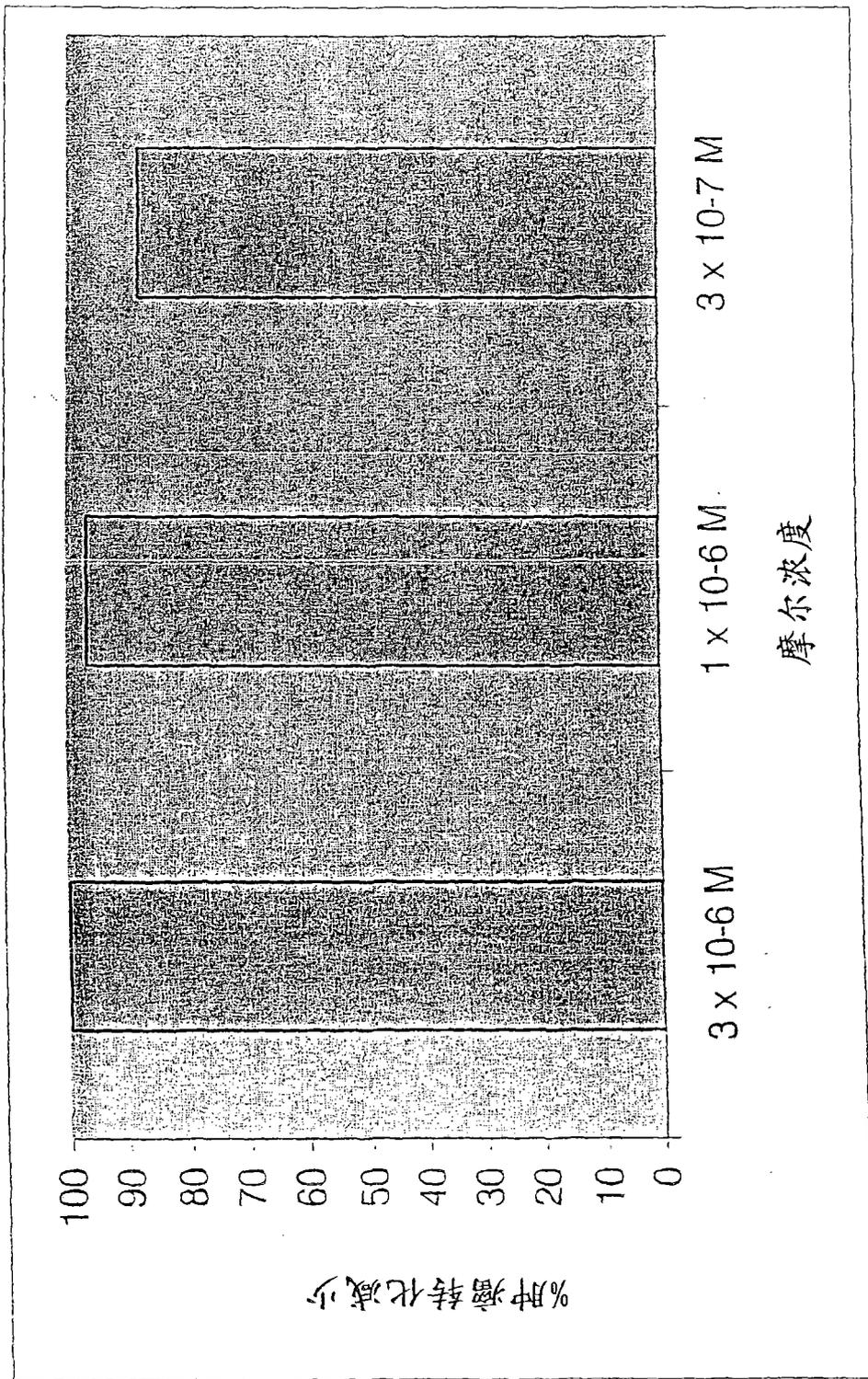


图 34

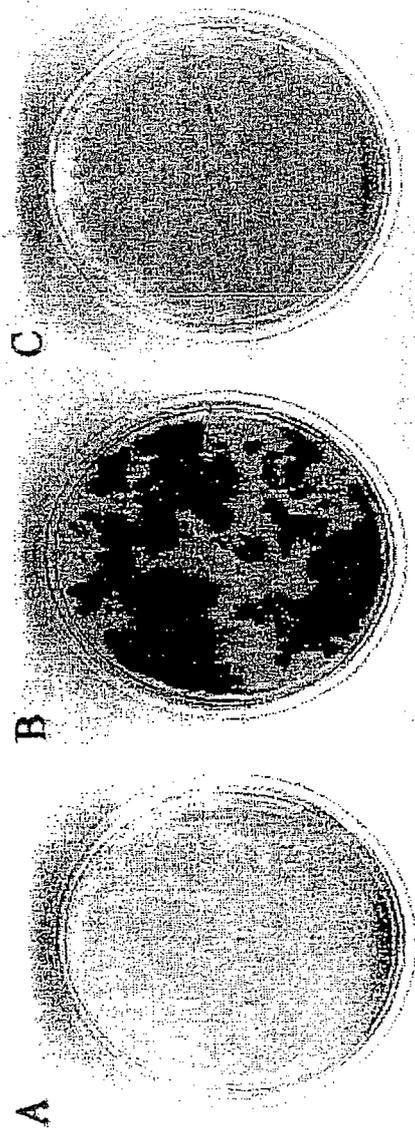


图 35

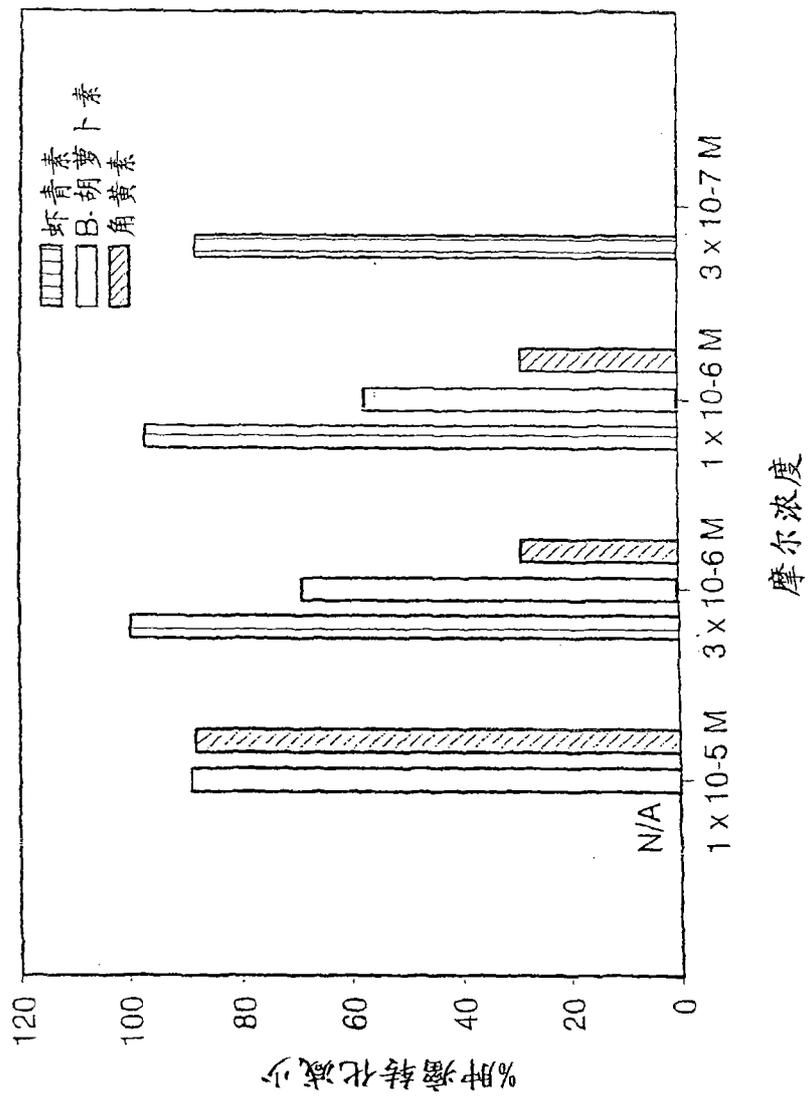


图 36

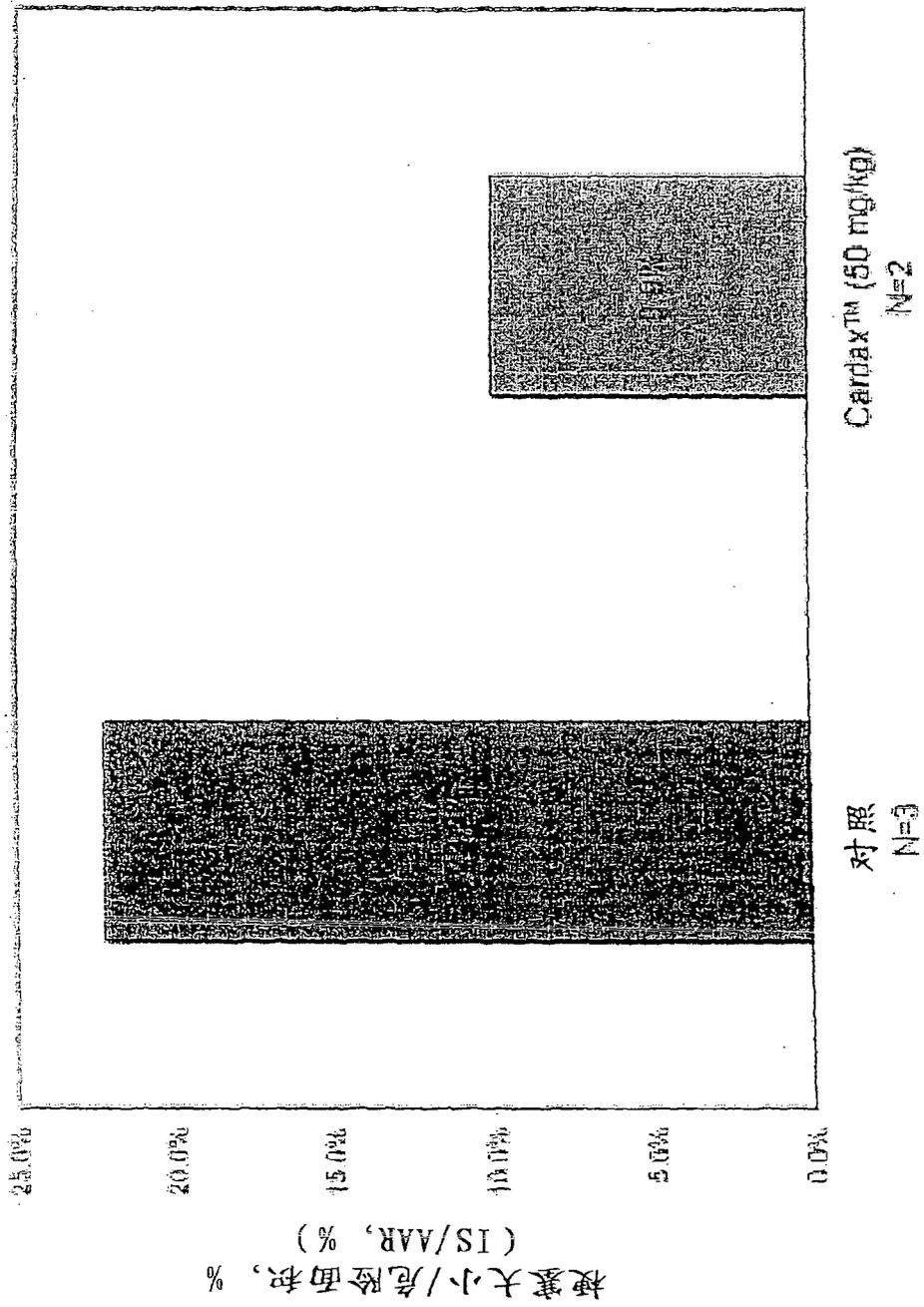


图 37

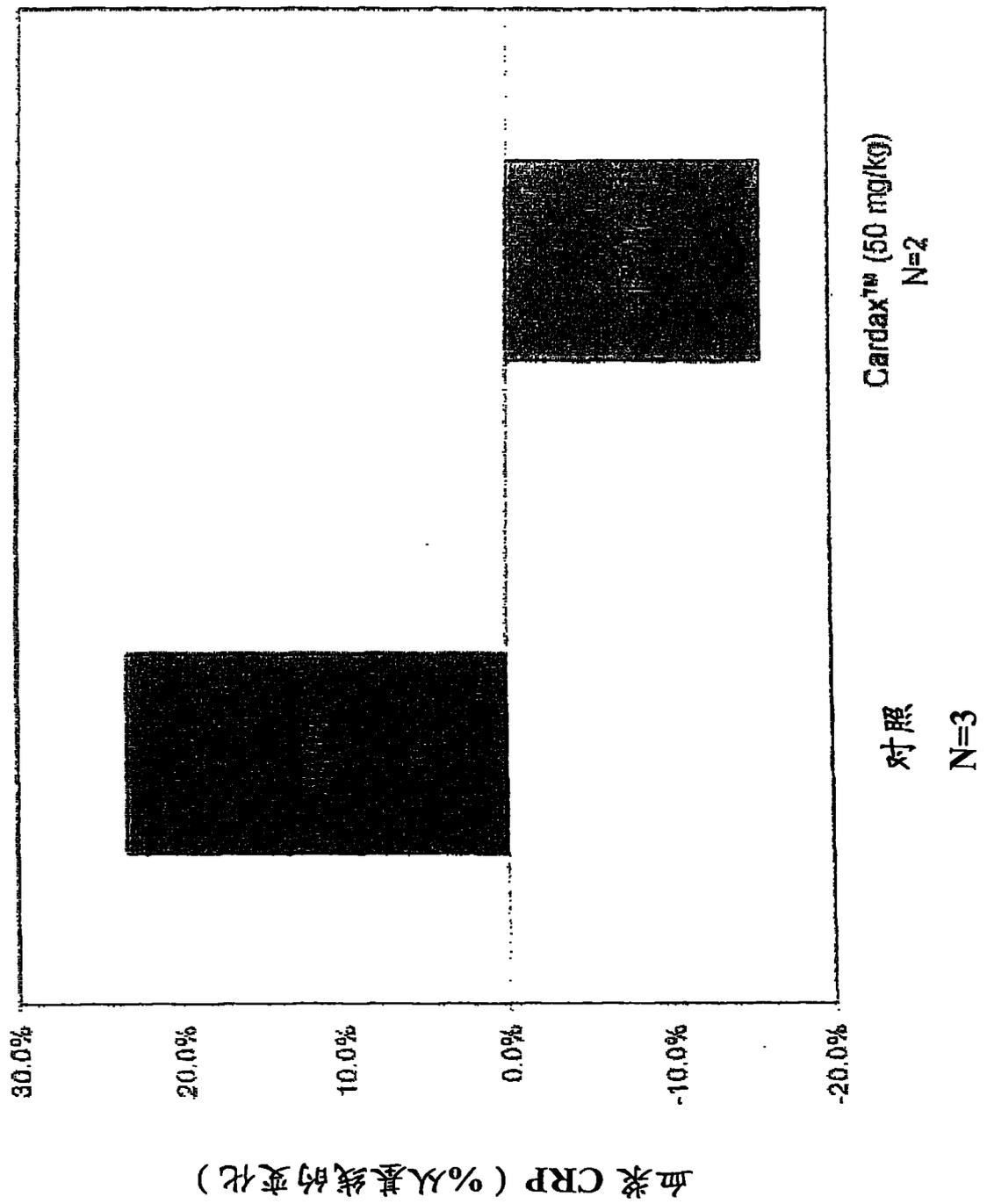


图 38