

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510054411. X

[51] Int. Cl.

C07C 59/42 (2006.01)

C07C 59/58 (2006.01)

C07C 69/732 (2006.01)

C07C 233/09 (2006.01)

A61K 31/616 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 100357244C

[51] Int. Cl. (续)

A61K 31/215 (2006.01)

A61K 31/19 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

A61P 19/02 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

[22] 申请日 2001.2.16

[21] 申请号 200510054411. X

分案原申请号 01808128.2

[30] 优先权

[32] 2000. 2. 16 [33] US [31] 60/183,078

[32] 2000.10. 6 [33] US [31] 60/238,814

[73] 专利权人 布里格姆及妇女医院股份有限公司

地址 美国马塞诸塞州

[72] 发明人 C·N·瑟汉 C·B·克利希

[56] 参考文献

JP5 - 186342A 1993.7.27

US5709855A 1998.1.20

US5411988A 1995.5.20

production of hydroxy unsaturated fatty acids using crudelipoxygenase obtained from infected rice plants. KATO, T, ET AL. Bulletin of the chemical society of japan, Vol. 69 No. 6. 1996

审查员 马良晓

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 余颖

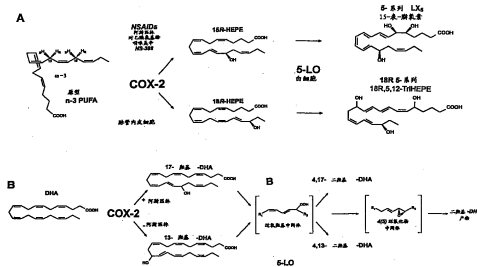
权利要求书 4 页 说明书 25 页 附图 26 页

[54] 发明名称

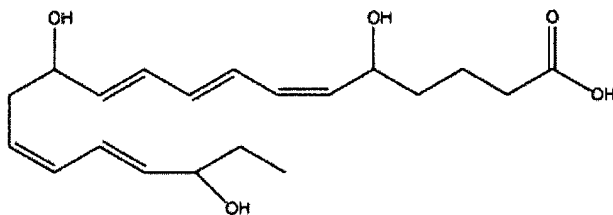
阿司匹林触发的脂质介体

[57] 摘要

本发明公开了阿司匹林触发的脂质介体 (ATLM)，它们可用于治疗或预防与包括缺血在内的多种疾病相关的炎症。



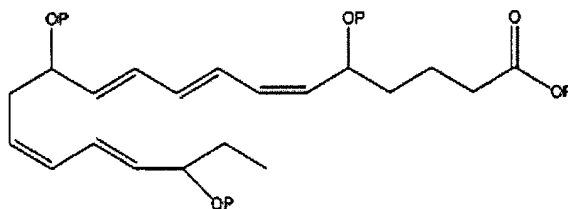
1. 一种纯化化合物，选自具有以下结构式的化合物：



或其酰胺、甲酯、乙酯、甘油酯或药用盐。

2. 根据权利要求1所述的纯化化合物，其中的碳5为S构型，碳12为R构型，碳18为R构型。

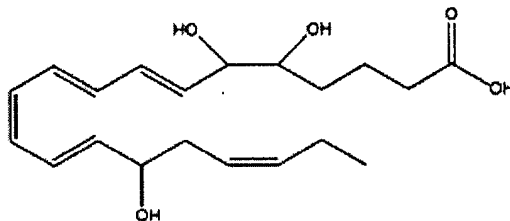
3. 一种化合物，选自具有以下结构式的化合物或R为H时所示化合物的药用盐：



其中，R是氢、甲基、乙基或甘油基；P各自为氢原子或保护基，所述保护基选自酯、醚、乙氧基化衍生物和硅烷化基团，而且至少一个P不是H。

4. 根据权利要求3所述的化合物，其中的碳5为S构型，碳12为R构型，碳18为R构型。

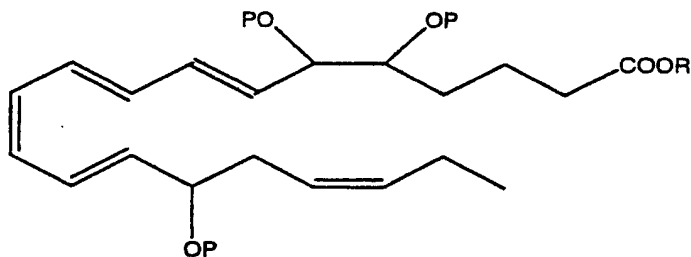
5. 一种纯化化合物，选自具有以下结构式的化合物：



或其酰胺、甲酯、乙酯、甘油酯或药用盐。

6. 根据权利要求5所述的纯化化合物，其中的碳5为S构型，碳6为R构型，碳15为R构型。

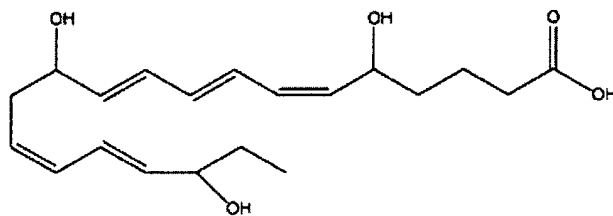
7. 一种化合物，选自具有以下结构式的化合物或R为H时所示化合物的药用盐：



其中，R 是氢、甲基、乙基或甘油基；P 是氢原子或保护基，所述保护基选自酯、醚、乙氧基化衍生物和硅烷化基团，而且至少一个 P 不是 H。

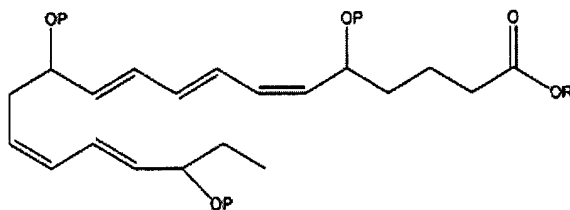
8. 根据权利要求 7 所述的化合物，其中的碳 5 为 S 构型，碳 6 为 R 构型，碳 15 为 R 构型。

9. 组合物，包含药用载体和具有以下结构式的化合物或其酰胺、甲酯、乙酯、甘油酯或药用盐：



10. 如权利要求 9 所述的组合物，所述化合物的碳 5 为 S 构型，碳 12 为 R 构型，碳 18 为 R 构型。

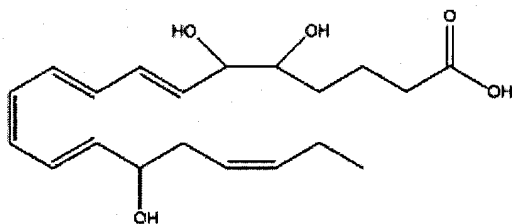
11. 组合物，包含药用载体和具有以下结构式的化合物或 R 为 H 时所示化合物的药用盐：



其中，R 是氢、甲基、乙基或甘油基；P 各自为氢原子或保护基，所述保护基选自酯、醚、乙氧基化衍生物和硅烷化基团，而且至少一个 P 不是 H。

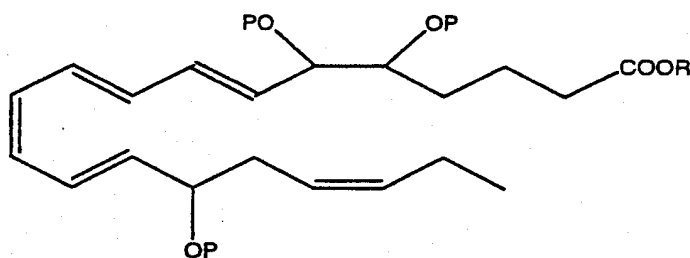
12. 如权利要求 11 所述的组合物，所述化合物的碳 5 为 S 构型，碳 12 为 R 构型，碳 18 为 R 构型。

13. 组合物，包含药用载体和具有以下结构式的化合物或其酰胺、甲酯、乙酯、甘油酯或药用盐：



14. 如权利要求 13 所述的组合物, 所述化合物的碳 5 为 S 构型, 碳 6 为 R 构型, 碳 15 为 R 构型。

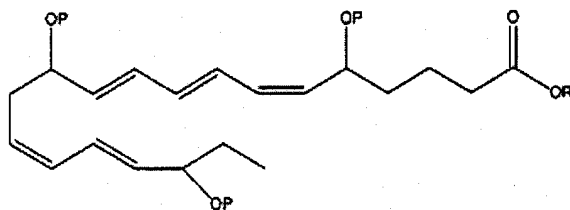
15. 组合物, 包含药用载体和具有以下结构式的化合物或 R 为 H 时所示化合物的药用盐:



其中, R 是氢、甲基、乙基或甘油基; P 各自为氢原子或保护基, 所述保护基选自酯、醚、乙氧基化衍生物和硅烷化基团, 而且至少一个 P 不是 H。

16. 如权利要求 15 所述的组合物, 所述化合物的碳 5 为 S 构型, 碳 6 为 R 构型, 碳 15 为 R 构型。

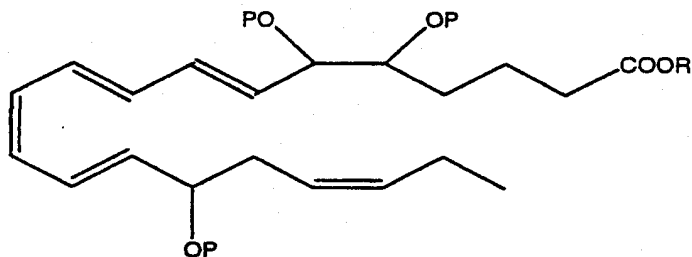
17. 具有以下结构式的化合物或 R 为 H 时所示化合物的药用盐用于制造治疗或预防哺乳动物炎症的药物的用途:



其中, R 是氢、甲基、乙基或甘油基; P 各自为氢原子或保护基, 所述保护基选自酯、醚、乙氧基化衍生物和硅烷化基团。

18. 根据权利要求 17 所述的用途, 其中的碳 5 为 S 构型, 碳 12 为 R 构型, 碳 18 为 R 构型。

19. 具有以下结构式的化合物或 R 为 H 时所示化合物的药用盐用于制造治疗或预防哺乳动物炎症的药物的用途:

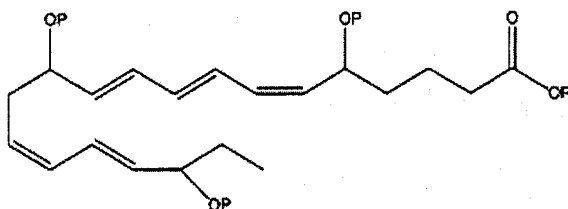


其中，R 是氢、甲基、乙基或甘油基；P 是氢原子或保护基，所述保护基选自酯、醚、乙氧基化衍生物和硅烷化基团。

20. 根据权利要求 19 所述的用途，其中的碳 5 为 S 构型，碳 6 为 R 构型，碳 15 为 R 构型。

21. 如权利要求 17-20 中任一项所述的用途，所述药物用于治疗或预防哺乳动物动脉炎或关节炎。

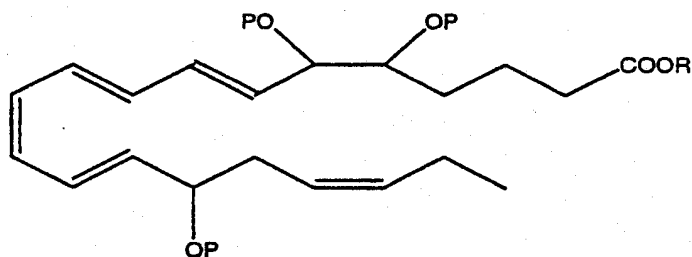
22. 具有以下结构式的化合物或 R 为 H 时所示化合物的药用盐用于制造治疗或预防哺乳动物心血管病的药物的用途：



其中，R 是氢、甲基、乙基或甘油基；P 各自为氢原子或保护基，所述保护基选自酯、醚、乙氧基化衍生物和硅烷化基团。

23. 根据权利要求 22 所述的用途，其中的碳 5 为 S 构型，碳 12 为 R 构型，碳 18 为 R 构型。

24. 具有以下结构式的化合物或 R 为 H 时所示化合物的药用盐用于制造治疗或预防哺乳动物心血管病的药物的用途：



其中，R 是氢、甲基、乙基或甘油基；P 是氢原子或保护基，所述保护基选自酯、醚、乙氧基化衍生物和硅烷化基团。

25. 根据权利要求 24 所述的用途，其中的碳 5 为 S 构型，碳 6 为 R 构型，碳 15 为 R 构型。

阿司匹林触发的脂质介体

本申请是中国专利申请CN01808128.2, “阿司匹林触发的脂质介体”的分案申请。

背景技术

过去的 25 年中, 各种报道称: 用亚麻籽、加拿大低酸油菜籽油或鱼油通过饮食补充 ω -3 聚不饱和脂肪酸(ω -3 PUFA)对患者和实验室动物有益(1. De Caterian, R., S.Endres, S.D.Kristensen 和 E.B.Schmidt 编的 1993 年的 *n*-3 脂肪酸和血管疾病, Springer-Verlag, London; 和 2. Lands, W.E.M.,编的 1987 年的有关聚不饱和脂肪酸和类花生酸的 AOCs 短期会议的记录汇编。American Oil Chemists' Society, Champaign, IL)。这些报道中对其潜在的抗血栓、免疫调节、和在动脉硬化、关节炎和哮喘中的抗炎反应, 以及抗肿瘤和抗转移等作用有生动的论述(Ref.1 和 Iigo,M.T.Nakagawa, C. Ishikawa, Y.Iwahori, M.Asamoto, K.Yazawa, E. Araki 和 H. Tsuda, 1997, 二十二碳六烯酸抑制结肠癌 26 向肺部转移的作用。英国癌症杂志, 75: 650—655)。最近发现, 主要的饮食 ω -3 PUFA, 二十碳五烯酸(C20:5 ω -3; EPA)和二十二碳六烯酸 (C22:6 ω -3; DHA)对于局部缺血引起的心室纤维性颤动具有显著效果, 而且对狗具有预防心脏病突发性死亡的作用, 他们对于心血管病的预防作用因而受到广泛关注(4. Billman, G.E.等, 1999, 纯 ω -3 聚不饱和脂肪酸预防狗心脏病突发性死亡的作用。循环, 99: 2452-2547)。由于发现补充 ω -3 PUFA 对于婴儿营养、心血管疾病和神经健康可能具有预防和/或治疗作用, 所以希望能由某国际专门小组制定出建议饮食摄入量(5. Simopoulos,A.P.等, 1999, 有关 ω -6 和 ω -3 脂肪酸的必要性及其建议饮食摄入量的研讨会记录, J. Am. Coll. Nutr., 18: 487-489)。此外, Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio(GISSI)Prevenzione 试验评价了补充 ω -3 PUFA—每日摄入~1g ω -3 PUFA—对>11,300 曾经心肌梗塞患者的作用, 同时推荐了包括阿司匹林的预防治疗, 并报道了对于降低心血管病死亡率的显著功效(6. Marchioloi,R., 1999, 心肌梗塞后饮食补充 *n*-3 聚不饱和脂肪酸和维生素 E: GISSI-Prevenzione 试验的结果。Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto Miocardio, 柳叶刀, 354: 447-455), 然而, 迄今为止, 包括对神经组织(Parkinson's 病和 Alzheimer's 病, 以及其他已知的脑部炎症)在内的所有研究中, 对于饮食 ω -3 保护作用的细胞和分子机制都未作出充分的解释。

据信, 鱼油中的主要脂质 C20:5 的作用是基于: (a) 阻止花生四烯酸(C20:4 ω -6; AA)转化为促炎性类花生酸(即前列腺素[PGs]和白三烯[LTS]); (b) 作为另一种底物, 生成较弱的 5-系列 LTS; 和/或(c) 由环氧合酶(COX)转化为 3-系列前列腺素类激素(即 PGI₃), 它们具有与其 4-系列 PG 相当的抗血栓作用(参考文献 1, 3 和 4)。包括以上所述的各种解释都没有被普遍接受, 因为没有体内分子证据, 而体外推定的“有益作用”需要高浓度的 ω -3 PUFA(参考文献 1—5)。

虽然普遍认同 LT 和 PG 具有促炎作用, 但有新证据表明: 衍生自花生四烯酸酯的其他类花生酸, 即脂氧素(LXs), 及其内源性类似物, 即阿司匹林触发的 15-差向异构体 LXs(ATLs)是 PMN-药物损伤和急性炎症的强反调节剂(counterregulator)(7. Weissmann, G., 1991, 阿司匹林, *Sci. Am.*, 264: 84-90; 8. Marcus, A.J., 1999, 血小板: 其在止血、血栓和炎症中的作用, *炎症: 基础原理和临床关联*, J.I. Gallin 和 R.Snyderman 编, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 77-9; 9. Claria, J.和 C.N.Serhan, 1995, 阿司匹林通过人内皮细胞—白细胞相互作用激发了从前描述过的生物活性类花生酸, *美国科学院院报*, 92: 9475-9479; 10. Serhan, C.N., J.F. Maddox, N.A. Petasis, I. Akritopoulou-Zanze, A.Papayianni, H.R. Brady, S.P. Colgan 和 J.L.Madara, 1995。可阻止人嗜中性粒细胞迁移和粘附的脂氧素 A₄ 稳定类似物, *生物化学*, 34: 14609-14615; 和 11. Chiang, N., K.Gronert, C.B. Clish, J.A.O'Brien, M.W. Freeman 和 C.N.Serhan, 1999, 用白三烯 B₄ 受体转基因小鼠新发现了脂氧素和阿司匹林激发的脂氧素在再灌注中的保护作用, *临床研究杂志*, 104: 309-316)。已发现, COX 的至少两种异构体, 非甾体类消炎药(NSAIDs)的典型作用位点在人体中似乎具有不同的生理和病理作用(12. Herschman, H.R., 1998, 前列腺素合成的细胞与分子生物学的最新进展, *心脏病医学动态*, 8: 145-150)。每个 COX 异构体各自具有双加氧酶和过氧合酶两种酶活性。抑制 COX-2 是当前许多制药公司的研发重点, 因为选择性地抑制 COX-2 而不抑制 COX-1 能够降低传统 NSAID 的不良副作用(13. Needleman, P.和 P.C.Isakson, 1997, COX-2 的发现及其功能, *类风湿学杂志*, 24(增刊 49): 6-8)。在这方面, 用传统 NSAID 阿司匹林(ASA)对 COX-2 乙酰化可阻止前列腺素类激素的形成, 但乙酰化后的该酶仍能由 C20:4 原位产生 15R-羟基二十碳四烯酸(15R-HETE), 由活化炎性细胞释放并转化为 15-差向异构体 LX(14. Chiang, N., T.Takano, C.B.Clish, N.A.Petasis, H.-H. Tai 和 C.N. Serhan, 1998, 阿司匹林触发的由人白细胞和鼠腹膜炎渗出物产生 15-表-脂氧素(15-epi-lipoxin)A₄(ATL): 一种特异性 15-表-LXA₄ ELISA, *药物实验治疗学杂志*, 287:

779-790 和 15. Xiao, G., A.-L. Tsai, G. Palmer, W.C. Boyar, P.J. Marshall 和 R.J. Kulmacz, 1997, 关于过氧合氢诱导的经阿司匹林处理过的人前列腺素 H 合成酶-2 的酪氨酰基和脂氧合酶活性, *生物化学*, 36: 1836-1845-1845)。这些天然局部介体的合成类似物具有更长的生物学半衰期, 表现出强抗炎性, 表明: 细胞-细胞相互作用能够通过调节对宿主防御机制具有重要意义的信号过程使 AA(和/或其他脂质和 PUFA, 见图 1)转化为抗炎性介体(参考文献 11 和 16, Clish, C.B., J.A. O'Brein, K. Gronert, G.L. Stahl, N.A. Petasis 和 C.N. Serhan, 1999, 稳定的阿司匹林触发的脂氧素的局部和全身性给药抑制体内嗜中性粒细胞的聚集, *美国科学院院报*, 96: 8347-8252)。

发明概述

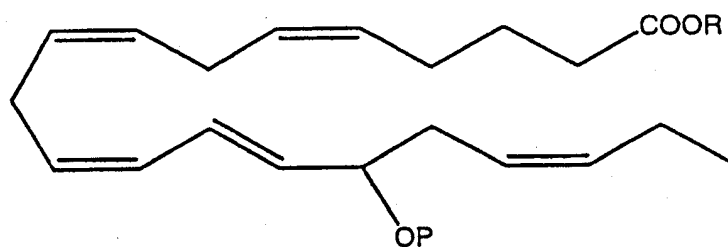
阿司匹林能抑制前列腺素的生物合成, 但不直接作用于脂氧合酶, 而是通过对环氧合酶 2(COX-2)乙酰化形成碳 15 位上差向异构的生物活性脂氧素(LX)(15-表-LX, 又称阿司匹林触发的 LX[ATL])。本发明发现, 经 ω -3 聚不饱和脂肪酸和阿司匹林(ASA)处理的小鼠的炎性渗出物可产生一系列新的生物活性脂质信号。ASA 处理 COX-2 上调的人内皮细胞可将 C20:5 ω -3 转化为 18R-羟基二十碳五烯酸(HEPE)和 15R-HEPE。两者都被多形核白细胞用来生成不同的三羟基类介体, 其中包括 5-系列的 15R-LX 和 5, 12, 18R-LX-triHEPE。已证明, 这些新的化合物在体内是人多形核白细胞经内皮迁移和浸润的强抑制剂(ATL 类似物>5, 12, 18R-LX-triHEPE>18R-HEPE)。对乙酰氨基酚和吲哚美辛也能由重组 COX-2 以及 ω -5 和 ω -9 形成 18R-HEPE 和 15 R-HEPE, 并能发生其他新的聚不饱和脂肪酸(例如 C18:3, C22:6)的氧合, 并作用于血管、脑、炎性细胞和血细胞。以上发现确立了产生生物活性脂质介体作用于微观炎性反应的新的跨细胞路径: COX-2-非甾体消炎药-依赖性氧合作用和细胞-细胞相互作用。这些介体及相关化合物的产生为饮食补充 ω -3 的医疗效用提供了新的机制, 这对于炎症、肿瘤和血管疾病具有重要意义。

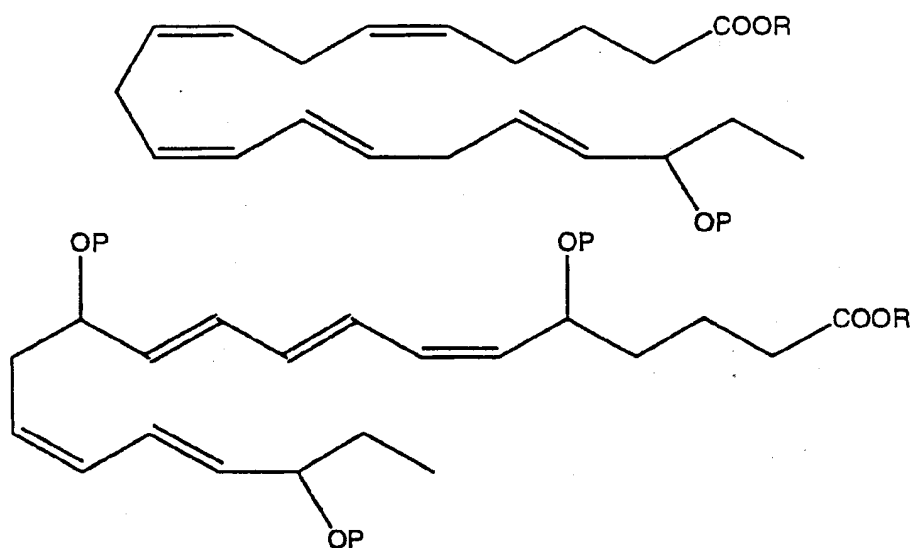
内皮细胞(EC)内 P450 对 C20:4 的氧合作用也会最终形成抑制 EC 活化的 11,12-环氧二十碳四烯酸, 同时, EPA 的非酶氧合则下调 EC 粘附分子(17. Node, K., Y. Huo, X. Ruan, B. Yang, M. Spiecker, K. Ley, D.C. Zeldin 和 J.K. Liao, 1999, 细胞色素 P450 环氧合酶衍生的类花生酸的抗炎特性, *科学*, 285: 1276-1279 和 18. Sethi, S., A.Y. Eastman 和 J.W. Eaton, 1996, 氧合脂肪酸对吞噬细胞-内皮细胞相互作用的抑制: 一种天然抗炎机制?, *实验室临床医学杂志*, 128: 27-38)。PMN-血管相互作用对聚集和 PNM-依赖性组织损伤至关重要, 所以, 参与它们“交叉

对话”的局部信号具有重要意义。本发明发现，被阿司匹林乙酰化的 COX-2 仍具有产生特异性 ATL 的体内活性，ATL 可以作为已知抗炎反应的效应剂，这些提供了 ASA 有益效果不仅缘于抑制前列腺素类激素的机制(参考文献 8, 12, 14)。ASA 及相关 NSAID 的新治疗用途仍在不断涌现。但是，它们一般都要求分子水平的定义以形成理论。这包括报道的：ASA 预防结肠直肠癌和降低二次心肌梗塞发生率的作用(19. Levy, G.N., 1997, 前列腺素 H 合成酶，非甾体类消炎药，和结肠癌，*FASEB J.*, 11: 234-247)。基于以上归于饮食 ω -3 PUFA 对人类疾病的相互交迭的有益作用(参考文献 1-6)，本发明是关于产生脂质信号的新路径，他们提供了以上有益作用的分子基础，也可作为其标记(marker)。

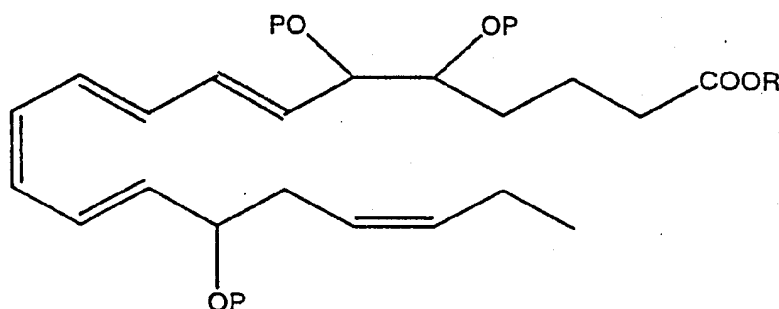
本发明涉及一种治疗或预防哺乳动物炎症的方法，即给予聚不饱和脂肪酸(PUFA)与阿司匹林的组合物，所述聚不饱和脂肪酸包括 C18:3, C20:4 和 C22:6。实施方式之一中， ω 脂肪酸，例如 C18:3 或 C22:6，和阿司匹林分两个不同时刻给予。本发明还涉及治疗哺乳动物动脉炎、关节炎、牛皮癣、荨麻疹、脉管炎、哮喘、眼科炎症，肺炎、肺纤维变性、脂溢性皮炎、脓疱性皮肤病，或心血管疾病的方法，即给予 ω -脂肪酸和阿司匹林的组合物。

另一实施方式中，本发明治疗或预防哺乳动物炎症的方法是给予以下结构式之一所示 ASA-触发的天然脂质(ω -3)介体及其立体异构体，例如其对映体、非对映体或外消旋混合物：





或



其中，R 是氢原子或构成它们的药用盐、酯、酰胺或前药，例如它们的药用类似物。优选的类似物。优选的类似物包括其甲酯、乙酯和甘油酯。P 是 H(羟基)或合适的保护基。所述羟基保护基包括：酯(乙酸酯，乙酸乙酯)，醚(甲醚，乙醚)，乙氧基化衍生物(乙二醇，丙二醇)和硅烷化基团(TMS 或 TIPPS)。

另一实施方式中，本发明涉及用于治疗或预防哺乳动物炎症的组合物和方法，所述方法即给予 ASA-触发的天然脂质(ω -2, ω -3 或 ω -4)介体类消炎药，即单羟基化的二十二碳六烯酸(DHA)(C22:6)，又即：13-羟基-DHA，14-羟基-DHA，16-羟基-DHA，17-羟基-DHA，19-羟基-DHA 或 20-羟基-DHA，其中的羧酸可以是氢原子形式，或官能化为药用盐、酯、酰胺或前药，例如它们的药用类似物。优选的类似物包括其甲酯、乙酯和甘油酯。也可以将单羟基化 DHA 化合物的羟基保护起来。合适的保护基包括：酯(乙酸酯，乙酸乙酯)，醚(甲醚，乙醚)，乙氧基化衍生物(乙二醇，丙二醇)和硅烷化基团(TMS 或 TIPPS)。

本发明内容之一中，本发明的化合物用已知方法基本纯化和分离。纯化产物的纯度一般至少约 90%，至少约 95%更好，至少 99%最好。

另一实施方式中，本发明涉及治疗哺乳动物动脉炎、关节炎或心血管疾病的

方法, 该方法包括给予该哺乳动物一种或多种上述化合物。

出人意料的是, 本发明发现: 阿司匹林、COX-II 与 ω -3 和 ω -6 脂肪酸之间的相互作用对组织具有消炎作用。而且, 以上组合产生了独特的前文所示化合物。这些化合物具有抗炎性, 并可用作消炎药治疗并发炎症的疾病或症状。

本发明化合物和方法的优点在于副作用极小。本发明化合物靶向于嗜中性粒细胞, 因而避免了 NSAID 的常见副作用。NSAID 具有广泛的生物学/生理学作用, 而本发明化合物则具有更强的嗜中性粒细胞选择性。由于这些化合物是嗜中性粒细胞导向性消炎药, 其副作用与常规 NSAID 相比显著降低。本发明化合物的诸如便秘、肾毒性和胃肠溃疡或出血等副作用极小。以上优点为患者缓解炎症提供了有效的选择, 从而不必忍受 NSAID 的副作用。

附图说明

根据后文的详细描述并结合附图, 可更好地理解本发明。

图 1: 脂质介体(LM)的跨细胞生物合成。

图 2A: 经环氧合酶 2(COX-2)作用, 由 ^{14}C -标记的花生四烯酸(AA, ω -6)生成的产物的薄层层析。

图 2B: 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用, 由 ^{14}C -标记的花生四烯酸(AA, ω -6)生成的产物的薄层层析。

图 2C: 经环氧合酶 II(COX-2)作用, 由 ^{14}C -标记的二十碳五烯酸(EPA, ω -3)生成的产物的薄层层析。

图 2D: 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用, 由 ^{14}C -标记的 EPA(ω -3)生成的产物的薄层层析。

图 3: 巨大芽孢杆菌(*B. Megaterium*)转化 EPA(ω -3)的 LC/MS 离子层析和质谱分析。

图 4A: 阿司匹林处理的小鼠背气囊(air-pouch)炎性渗出物中, 由 EPA 生成的单羟基产物的 LC/MS 离子层析。

图 4B: 阿司匹林处理的小鼠背气囊炎性渗出物中, 由 EPA 生成的 18-HEPE 的质谱分析。

图 4C: 阿司匹林处理的小鼠背气囊炎性渗出物中, 由 EPA 生成的 5S-HEPE 的质谱分析。

图 4D: 阿司匹林处理的小鼠背气囊炎性渗出物中, 由 EPA 生成的 5,12,18R-triHEPE 的质谱分析。

图 5: 经巨大芽孢杆菌作用, 由 5S,12R-二羟基-6Z,8E,14Z,17Z-二十碳五烯酸

(ω -3)生成的 5,12,18-triHEPE 异构体的 LC/MS 离子层析。

图 6: 用肿瘤坏死因子(TNF- α)和阿司匹林处理的小鼠背气囊。

图 7A: 用阿司匹林和 EPA 处理的 IL-1 β -刺激的人脐带内皮细胞(HUVEC)产生的 18R-HEPE 的 LC/MS 离子层析。

图 7B: 阿司匹林乙酰化 COX-2 和血清处理的酵母聚糖(STZ)刺激的人 PMN 由 EPA 产生的 triHEPE 的 LC/MS 离子层析。

图 7C: 图 7B 中 triHEPE 的产物 I: 5,12,18R-triHEPE 的质谱分析。

图 7D: 图 7B 中 triHEPE 的产物 II: 15-表-LXA₅ 的质谱分析。

图 8: 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用由 EPA 生成的单羟基产物的选定离子监测所得 LC/MS/MS 层析, 附带 18-HEPE, 15-HEPE 和 11-HEPE 的质谱分析。

图 9A: 18R-HEPE(空心圆), 5,12,18R-HEPE(实心圆)和一种阿司匹林触发的脂氧素(ATL)类似物(参照化合物)(实心方形)对 LTB₄ 激发的 PMN 经内皮细胞迁移的抑制作用。

图 9B: 18R-HEPE(空心圆), 5,12,18R-HEPE(实心圆), LTB₅(空心方形), 或同源配体(homoligand)LTB₄ (实心方形)之间与 HEK-293 细胞稳定表达的重组人 LTB₄ 受体的竞争性结合。

图 9C: 静脉注射 100ng 18R-HEPE, 5,12,18R-HEPE 或作为参照化合物的 ATL 类似物(用 15(*S*)-16(对氟)-苯氧基-LXA₄ 进行比较, N=4)后, TNF- α 诱导的白细胞向小鼠背气囊内浸润受到的抑制。

图 10A: 由二同- γ -亚油酸(C20:3, ω -3)与阿司匹林乙酰化 COX-2 所得单羟基产物的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 10B: 由亚麻酸(C18:3, ω -3)与阿司匹林乙酰化 COX-2 所得单羟基产物的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 10C: 由亚油酸(C18:2, ω -6)与阿司匹林乙酰化 COX-2 所得单羟基产物的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 11: 由 ω -3 PUFA 经跨细胞加工产生一系列功能性脂质信号过程的假设: 微炎症的内源性抑制剂。在 COX-2 上调并以 NSAID 处理的部位, 由 C20:4 形成前列腺素被抑制。全身性的 ω -3 PUFA 通过 COX-2-NSAID 脂氧合酶机制被转化为 15R-H(p)EPE 或 18R-H(p)EPE: (分图 A)由环氧化物在 EPA(C20: 5)的 C16 或 C13 位上立构特异性地夺取氢而引起分子氧的 *R* 型插入, 生成 15R-H(p)EPE 或 18R-H(p)EPE; 或者还原成醇; 或类似地在 DHA(C22:6)的 C13 或 C17 位插入分子氧而生成 13-羟基-DHA 或 17-羟基-DHA(分图 B)。三羟基化合物的完整立体化学特

征尚有待测定，所显示的是它们的可能性构型。这些化合物与局部微观环境中的细胞相互作用，抑制 PMN 的聚集。含有 1,4-顺式戊二烯单元的 ω -3 PUFA 会发生 COX-2-NSAID-依赖性夺氢和分子氧的插入。

图 12：产生新的脂质介体(同时也是阿司匹林处理的标记)的阿司匹林乙酰化 COX-2 依赖性路径。

图 13：由二十二碳六烯酸(DHA, C22:6, ω -3)与阿司匹林乙酰化 COX-2 产生的主产物和次产物的结构。

图 14A：由阿司匹林乙酰化 COX-2 触发的 DHA 产物曲线变化。左边的 LC/MS 离子层析显示：没有阿司匹林时，13-羟基-DHA 是主产物。右边的显示：COX-2 被阿司匹林乙酰化后，13-羟基-DHA 的产生被抑制，17-羟基-DHA 成为主产物。

图 14B：DHA 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用形成的 13-羟基-DHA 的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 14C：DHA 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用形成的 14-羟基-DHA 的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 14D：DHA 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用形成的 16-羟基-DHA 的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 14E：DHA 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用形成的 17-羟基-DHA 的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 14F：DHA 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用形成的 19-羟基-DHA 的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 14G：DHA 经阿司匹林乙酰化 COX-2 作用形成的 20-羟基-DHA 的 LC/MS/MS 离子层析和质谱分析。

图 15：阿司匹林乙酰化-COX-2 氧合反应在 ω -3 和 ω -6 PUFA 内的区域选择性。

本发明的详细说明

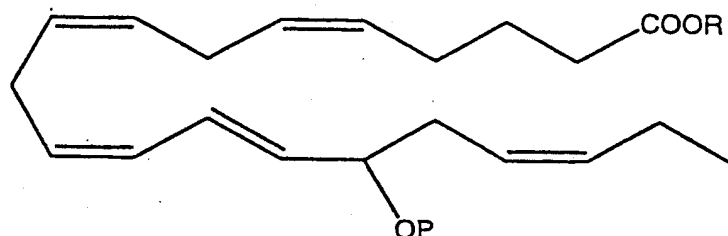
以下将更详细地说明本发明的特征及其他细节。必须认识到，具体实施方式仅是举例说明而非对本发明的限定。本发明的主要特征可运用于多种方式实施，这些都属于本发明范围之内。

简便起见，本文使用了以下缩略语：NSAID：非甾体类消炎药；PUFA，聚不饱和脂肪酸；ALXR，LXA₄受体；ASA，阿司匹林；ATL，阿司匹林触发的 15-表-LX，15R-LX；ATLM，阿司匹林触发的脂质介体；COX，环氧合酶 I，II(异构体)；EC，内皮细胞；HUVEC，人脐脉管内皮细胞；LC/MS/MS，液相层析串联质谱；LM，脂质衍生的介体；LO，脂氧合酶；LT，白三烯；LX，脂氧素；PG，

前列腺素；PMN，多形核白细胞；EPA，二十碳五烯酸；HEPE，羟基二十碳五烯酸；HETE：羟基二十碳四烯酸；LXA₄，5*S*, 6*R*, 15*S*-三羟基-7,9,13-反式-11-顺式-二十碳四烯酸；15-表-LXA₄，5*S*, 6*R*, 15*R*-三羟基-7,9,13-反式-11-顺式-二十碳四烯酸；C20:5(二十碳五烯酸，EPA， ω -3 脂肪酸)；C20:4(花生四烯酸，AA， ω -6 脂肪酸)；和 C22:6(二十二碳六烯酸，DHA， ω -3 脂肪酸)。

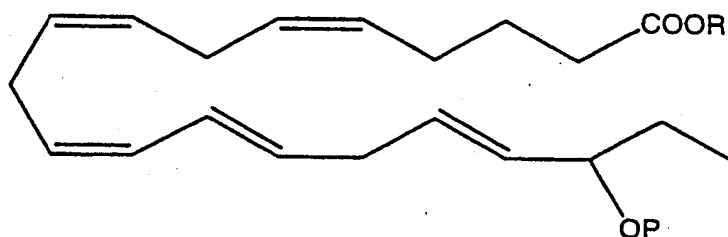
本发明涉及用 ω -3 脂肪酸与阿司匹林治疗或预防哺乳动物炎症的方法。实施方式之一中，EPA 或 DHA 之类 ω 脂肪酸与阿司匹林分别在两个不同时刻给予。本发明还涉及使用 EPA 或 DHA 之类 ω 脂肪酸与阿司匹林的组合物治疗哺乳动物动脉炎、关节炎或心血管疾病的方法。

另一实施方式中，本发明是用以下结构之一所示消炎药治疗或预防哺乳动物炎症的组合物和方法。化合物 1 的结构式为：



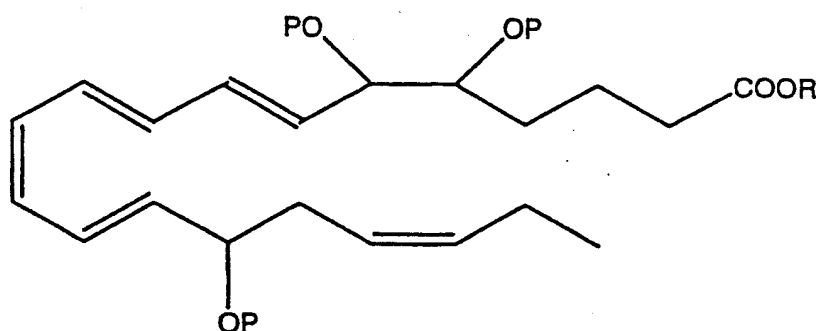
优选实施方式之一中，C15 位的羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，C15 位的羟基呈 *S* 构型。或者，C15 位上的羟基的 *R/S* 构型的外消旋混合物。

化合物 2 的结构为：



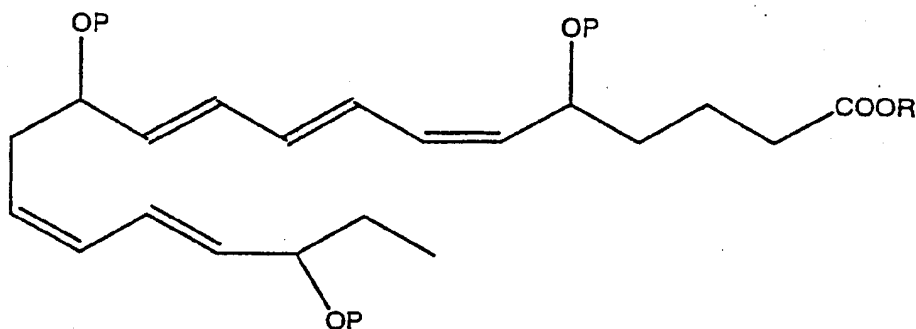
优选实施方式之一中，C18 位的羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，C18 位的羟基呈 *S* 构型。或者，C18 位上的羟基的 *R/S* 构型的外消旋混合物。

化合物 3 的结构为：



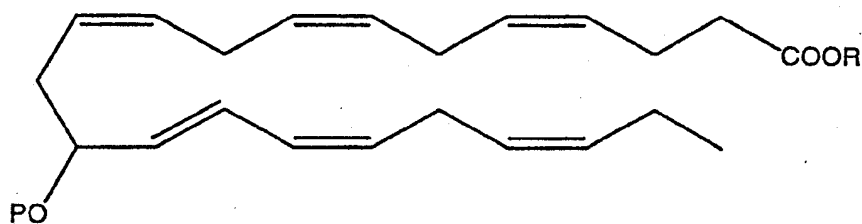
优选实施方式之一中，C5 位的羟基呈 *S* 构型，C6 位的羟基呈 *R* 构型，C15 位的羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，C5 位的羟基呈 *R/S* 构型，C6 位的羟基呈 *R/S* 构型，C15 位的羟基呈 *R/S* 构型。

化合物 4 的结构为：



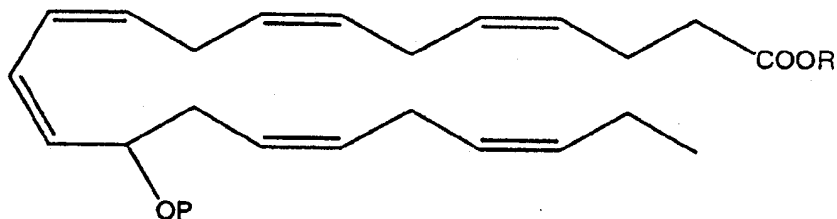
实施方式之一中，5-羟基呈 *S* 构型，12-羟基呈 *R* 构型，18-羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，5-羟基呈 *R/S* 构型，12-羟基呈 *R/S* 构型，18-羟基呈 *R/S* 构型。

化合物 5 的结构为：



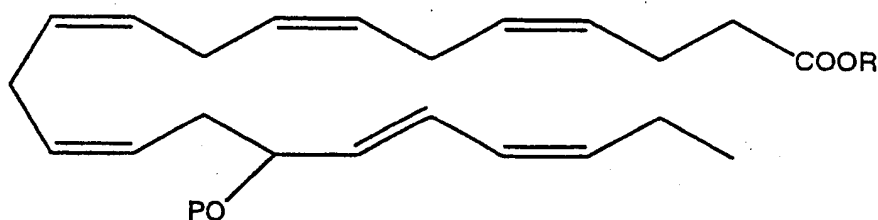
将其命名为 13-羟基-DHA，其中，P=H(羟基)。实施方式之一中，13-羟基呈 *S* 构型。另一实施方式中，13-羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，13-羟基是外消旋混合物，例如 *R/S* 构型。

化合物 6 的结构为：



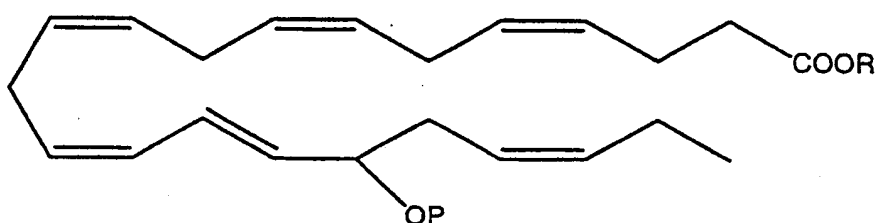
将其命名为 14-羟基-DHA，其中，P=H(羟基)。实施方式之一中，14-羟基呈 *S* 构型。另一实施方式中，14-羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，14-羟基是外消旋混合物，例如 *R/S* 构型。

化合物 7 的结构为：



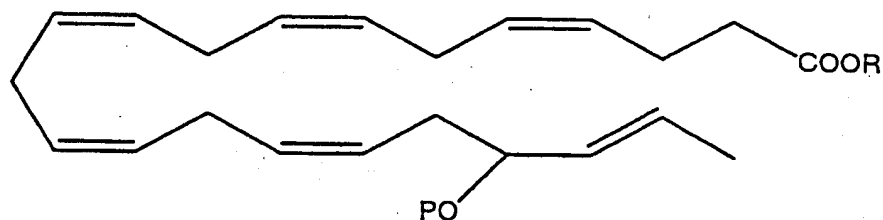
将其命名为 16-羟基-DHA，其中， $P=H$ 。实施方式之一中，16-羟基呈 *S* 构型。另一实施方式中，16-羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，16-羟基是外消旋混合物，例如 *R/S* 构型。

化合物 8 的结构为：



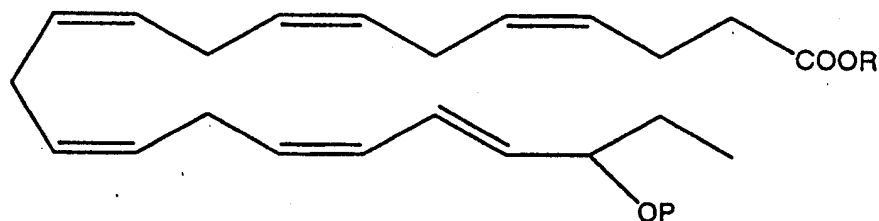
将其命名为 17-羟基-DHA，其中， $P=H$ 。实施方式之一中，17-羟基呈 *S* 构型。另一实施方式中，17-羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，17-羟基是外消旋混合物，例如 *R/S* 构型。

化合物 9 的结构为：



将其命名为 19-羟基-DHA，其中的 $P=H$ 。实施方式之一中，19-羟基呈 *S* 构型。另一实施方式中，19-羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，19-羟基是外消旋混合物，例如 *R/S* 构型。

化合物 10 的结构为：



将其命名为 20-羟基-DHA，其中， $P=H$ 。实施方式之一中，20-羟基呈 *S* 构型。另一实施方式中，20-羟基呈 *R* 构型。另一实施方式中，20-羟基是外消旋混合物，

例如 *R/S* 构型。

化合物 1 至 10 中，R 是氢原子或构成药用盐、酯(例如甲酯)、酰胺或前药。优选类似物包括甲酯、乙酯和甘油酯。

化合物 1 至 10 中，“羟基”的立体化学特征只是举例，它包括保护的羟基和游离羟基。

可用各种已知保护基来保护化合物 1 至 10 中的“羟基”，本领域技术人员不难确定用什么保护基来保护羟基。相关的标准方法是已知的，在文献中有详细的记载。例如，本领域技术人员可根据 Green 和 Wuts 在“有机合成中的保护基”，John Wiley and Sons，第 5 章和第 7 章(1991)所述选择合适的保护基。优选的保护基包括：甲酯和乙酯，TMS 或 TIPPS 基团，乙酸酯或丙酸酯基团，二醇醚，例如乙二醇和丙二醇衍生物。

例如，可用温和的碱例如三乙基胺在酰氯或硅烷氯存在下处理一个或多个羟基，促进羟基离子与卤化物间的反应。或者，卤代烷基可与羟基离子(由二异丙基酰胺锂之类碱产生)反应，促进醚形成。

必须明白，对化合物 3 和 4 而言，并非所有的羟基都需要保护，可以仅保护 1、2 或 3 个，这可以通过按照化学计量使用羟基保护剂来实现。可用已知方法来分离单保护、二保护或三保护羟基化合物，例如 HPLC，LC，快速层析，凝胶渗透层析，结晶，过滤等。

必须明白，以上所述化合物具有一个或多个手性中心，本发明包括各化合物的所有立体化学形式，例如对映体、非对映体和外消旋混合物。

“药用盐、酯、酰胺和前药”在此指本发明化合物的如下羧酸盐、氨基酸加成盐、酯、酰胺和前药：医学界已确认可与患者组织接触，没有过度毒性、刺激、过敏反应等副作用，具有合理的效险比，并具有目标效用，还可能包括本发明化合物的两性离子形式。“盐”指本发明化合物的相对无毒的有机酸和无机酸加成盐。这些盐可在最后分离和纯化所述化合物时就地生成，也可以由纯化后的化合物以游离碱的形式另外与合适的有机酸或无机酸反应生成，然后分离纯化。所述盐包括碱金属和碱土金属阳离子盐，例如钠、锂、钾、钙、镁等，还包括无毒的铵、季铵和胺离子盐，所述胺离子包括但不限于铵，四甲基铵，四乙基铵，甲基铵，二乙基铵，三甲基铵，三乙基铵，乙基铵等。(可参考例如 Berge S.M.等的“药用盐”，药物学杂志，1977；66：1-19)。

“前药”指在体内可迅速转化，例如在血液中通过水解，成为结构式所示亲本药的化合物。相关全面论述可参考 T. Higuchi 和 V.Stella 的“前药，一种新的

给药系统”，A.C.S.论丛 Vol.14，和“药物设计中的生物可逆载体”，Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987。本发明中，作为前药的化合物使用后，在体内经代谢或其他途径转化为该化合物的生物学、药学或治疗学活性形式。为了形成前药，对药学活性化合物进行修饰，使其可经代谢过程而恢复活性。前药可用于改变药物的代谢稳定性或转运特征，掩蔽药物的副作用或毒性，改善药物的口感，以及其他特征。基于对药物动力学以及药物体内代谢的认识，一旦确定了一种药学活性药物，制药技术人员就能够设计出该化合物的前药(参考例如 Nogrady(1985)，药物化学，一种生物化学方法，Oxford University Press, New York, P.388-392)。选择和制备合适的前药衍生物的常规方法可参考例如“前药的设计”，H.Bundgaard, Elsevier, 1985。前药的合适例子包括：适当酸的甲酯、乙酯和甘油酯。此外，只要能经代谢成为亲本化合物即恢复原羟基官能的羟基保护基都适合。

如本文所述，本发明化合物可配制成药物组合物。优选实施方式之一中，所述化合物可以缓释组合物的形式延长给药时间。缓释组合物是已知技术，本领域技术人员可根据常用参数配制出合适的组合物。最优实施方式中，可用本发明所述的甘油酯缓释组合物(例如透皮药贴)来治疗炎症。制备透皮药贴的合适方法可参考美国专利 5,814,599，5,846,974 或 4,201,211。更具体地说，可用 Ciba-Geigy Corporation 和 Alza Corporation 的贴类技术进行所述化合物的透皮给药。本发明药物组合物的给药可以是间歇，渐进，连续，以恒定或有控速度给予温血动物，例如人。此外，给药天数和每日给药次数是可调整的。较好的给药可使药物制剂中的活性成分对炎症产生作用。

另一实施方式中，本发明是治疗哺乳动物动脉炎、关节炎或心血管疾病的方法，该方法包括给与所述哺乳动物一种或多种所述化合物。

“对象”在此指各种受激发发生了炎性反应的活生物，包括但不限于：人、非人灵长类动物，例如猩猩及其他猿类和猴类；畜类，例如牛、绵羊、猪、山羊和马；宠物，例如狗和猫；实验动物(包括啮齿类)，例如小鼠、大鼠和豚鼠等。对于“对象”的年龄和性别没有限制，因此包括了成年和新生的对象，以及胚胎，不论雄性还是雌性。

“哺乳动物”在此指能对抗原产生免疫反应的活生物，这包括但不限于非人灵长类动物，例如猩猩及其他猿类和猴类；绵羊、猪、山羊、马、狗、猫、小鼠、大鼠和豚鼠等。

本发明的药物组合物包含“治疗有效量”或“预防有效量”的本发明消炎药。

“治疗有效量”指该量以一定的剂型在必要的时间内足以获得所需的治疗效果，例如消除或预防与各种疾病或情况相关的炎症。消炎药的治疗有效量取决于多种因素，例如疾病情况，年龄，性别，患者体重，该消炎药在各患者体内激发所需反应的能力。而且，在治疗有效量，抗体或抗体部分的所有毒性或不良作用都可被有益的治疗效果所抵消。“预防有效量”指该量以一定的剂型在必要的时间内足以获得所需的预防效果。通常，由于预防是在疾病发生之前或在其早期阶段，预防有效量低于治疗有效量。

可通过调整给药分案来获取最佳反应(例如治疗性或预防性反应)。例如，可根据治疗的迫切程度，一次性药团给药，一段时间内分次给药，或者成比例地减量或增量。特别好的是剂型单元形式的非肠胃给药组合物，所述剂型单元形式便于给药和保持剂型的一致性。剂型单元在此指适合哺乳动物患者一次使用的物理上独立的单元；各单元包含算得的可产生所需疗效的一定量的活性化合物和必需的药用载体。本发明所述的剂型单元直接取决于：(a) 活性化合物的特性和具体的治疗效果和预防效果；和(b) 制备活性化合物用于治疗患者过敏的故有限制。

本发明消炎药的治疗或预防有效量例如但不限于 0.1-20mg/kg，以 1-10mg/kg 为佳。需要指出的是，剂量可因病情的严重程度而进行调整。而且，对任何一个具体对象而言，在整个疗程中都需要根据个体的特殊需要和医生的判断调整剂量，以上所述的剂量只是举例，而非限定。

本发明所述的消炎药，如化合物 1-10 可配制成合适的药物组合物来给药。所述药物组合物一般包含本发明的消炎药和药用载体。本文中的“药用载体”包括各种生理相容性的溶剂，分散介质，包衣剂，抗细菌和真菌剂，等渗调节剂和吸收阻滞剂等，例如：水、生理盐水，磷酸缓冲液，葡萄糖，甘油，乙醇等，以及它们的混合物。很多情况下，组合物中最好包括等渗调节剂，例如糖，甘露醇、山梨醇等多元醇，或氯化钠。药用载体还可以包括少量助剂，例如润湿剂，乳化剂，防腐剂或缓冲剂，这些能延长消炎药的保存期，增强其效力。

可将本发明的消炎药配制成非肠胃给药的药物组合物。其他合适的缓冲盐包括但不限于：琥珀酸钠，柠檬酸钠，磷酸钠和磷酸钾。可用 0-300mM(对于液体剂型最合适的是 150mM)氯化钠来降低溶液的毒性。冻干制剂中可包含防冻剂，一般为 0-10%(0.5-1.0%更好)蔗糖，还包括海藻糖和乳糖。冻干剂中还可以包含填充剂，一般为 1-10%甘露醇(2-4%更好)。液剂和冻干剂中都可以加入稳定剂，一般为 1-50mM(5-10mM 更好)L-甲硫氨酸。合适的填充剂还包括甘油、精氨酸，例如 0-0.05%(0.005-0.01%更好)多乙氧基醚-80。表面活性剂还包括但不限于多乙氧

基醚-20 和 BRIJ 表面活性剂。

本发明组合物可以呈液体、半固体和固体剂型等各种形式，例如：液体溶液(注射和输注溶液)，分散剂或悬浮剂，片剂，颗粒剂，粉末剂，脂质体和栓剂。优选剂型取决于给药方式和治疗目的。典型的优选组合物形式是注射或输注溶液，例如类似于被动免疫时所用的组合物。优选的给药方式是肠胃外给药(例如静脉、皮下、腹膜内、肌内给药)。优选实施方式之一通过静脉输液或注射给予所述消炎药。另一优选实施方式通过肌内或皮下注射给予所述消炎药。最好的是口服给予所述消炎药。

治疗用组合物必须无菌并在制造和保存条件下保持稳定。可将组合物配制成溶液、微乳液、分散剂、脂质体或其他规则结构以配合药物的高浓度。无菌注射溶液的制备可以是：将所需量的活性化合物(例如抗原，抗体或抗体片段)与所需的一种或多种上述成分一同加入合适的溶剂，然后过滤除菌。

分散系一般是将活性化合物加入无菌载体中制备而成，所述载体包含主要的分散介质和所需的其他成分，例如前文所述。如果是无菌注射溶液的无菌冻干粉末，优选的制备方法是：将活性成分与所需的附加成分制备成溶液，除菌过滤后，通过真空干燥和喷雾干燥得到粉剂。保持溶液适当的流动性可以采用卵磷脂包衣，保持分散剂中颗粒大小适当，以及采用表面活性剂。延迟注射组合物的吸收可以通过在组合物中加入吸收阻滞剂，例如单硬脂酸盐和明胶。

本发明的消炎药可以本领域已知的多种方式给药。本领域技术人员知道，给药方式或途径取决于所需的效果。某些实施方式中，可将活性化合物包含在载体内，该载体可保护该化合物不至于立即释放，例如植入体、透皮药贴和微胶囊给药系统等缓释剂型。可以采用可生物降解的、生物相容性聚合物，例如乙烯乙酸乙烯酯，聚酐，聚乙醇酸，胶原，聚原酸酯和聚乳酸。许多制备此类制剂的方法是专利技术或本领域的已知技术。例如，缓释和控释给药系统，J.R.Robinson 编，Marcel Dekker, Inc., New York, 1978。

某些实施方式中，本发明的消炎药可与惰性稀释剂或可吸收的可食载体一同口服。也可以将所述化合物(以及需要的其他成分)装入硬胶囊或软胶囊，或压成片剂，或直接加入食物。就口服治疗而言，所述化合物可与赋形剂混合，以吞咽片剂、含片、锭剂、胶囊、酏剂、悬浮剂、糖浆、薄片剂等形式使用。为了通过非肠胃给药之外的方式使用本发明的化合物，可能有必要对所述化合物进行包衣，或同时给予其他物质，以防其失活。

如前所述，本发明的化合物 1—10 及其药用类似物可用于预防或治疗与致炎

性 COX 酶相关的临床症状。例如，本发明的化合物能与 COX 酶相互作用，从而可预防和治疗与痉挛、变应反应、血小板凝集以及普通炎症等相关的炎性病症。

致痉性病症包括平滑肌痉挛，尤其是气道平滑肌收缩和动脉平滑肌收缩，前者例如哮喘(包括原发性支气管哮喘)，支气管炎，后者例如冠状动脉痉挛(包括与心肌梗塞相关的冠状动脉痉挛，这可能但不一定引起左心室衰竭，继而导致心源性哮喘)，缺血性心肌损伤和脑痉挛或中风(可能导致中枢神经病变)。还包括结肠肌异常收缩引起的肠道疾病，例如肠炎、结肠痉挛和粘液性结肠炎。

变应性病症的例子包括外源性哮喘，局部或全身性皮肤过敏(例如湿疹)，过敏性肠病(包括腹腔疾病)，过敏性眼病，例如枯草热(可能影响上呼吸道)，过敏性鼻炎和过敏性结膜炎。

血小板凝集相关性病症的例子包括血栓引起的病症，例如全身性或局部血栓引起的中风，冠状动脉血栓，静脉炎和静脉血栓形成(后两种情况也可能与炎症有关)。

炎性病症的例子包括肺、关节、眼、肠、皮肤和心脏等器官的炎症；尤其是与白细胞浸润进入发炎组织相关的炎症。肺部炎性病症包括哮喘，成人呼吸窘迫综合征，支气管炎和囊性纤维变性(这还可能影响到肠或其他组织)。炎性关节疾病包括类风湿关节炎，类风湿脊椎炎，骨关节炎，痛风性关节炎和其他关节炎类病症。炎性眼病包括葡萄膜炎(包括虹膜炎)和结膜炎。炎性肠病包括 Crohn's 病，溃疡性结肠炎和末端直肠炎。

炎性皮肤病包括与细胞增殖相关的皮肤病，例如牛皮癣，湿疹，皮炎，包括湿疹性皮炎，例如特应性皮炎和脂溢性皮炎，过敏性或刺激性接触性皮炎，干性湿疹，光敏性皮炎，光毒性皮炎，植物性光毒性皮炎，放射性皮炎和停滞性皮炎。炎性皮肤病还包括但不限于：创伤、烧伤、大疱性疾病或皮肤或粘膜缺血引起的溃疡和糜烂；多种形式的鱼鳞癣；大疱性表皮松解；肥厚性瘢痕和瘢痕瘤；内源性老化和光老化引起的皮肤变化；机械摩擦引起的水疱；局部使用皮质类固醇引起的皮肤萎缩。此外，炎性皮肤病还包括粘膜炎症，例如唇炎，唇皸裂，鼻刺激和外阴阴道炎。

炎性心脏疾病的例子包括冠状动脉梗死性损伤。其他炎性疾病包括慢性炎症中的组织坏死，内毒性休克，平滑肌增生性疾病(例如血管再造术后的再狭窄)和移植手术后的组织排斥。

此外，还包括其他炎性疾病。所有表现出炎症状态或本发明所述各种症状的疾病都包括在本发明所述“治疗炎症”的概念之中。此外，以上列举的炎性疾病

只是举例而非限定。本领域技术人员可以看出还有其他炎性病症也符合减轻炎症的概念,其中,因损伤或刺激,对象的局部 PMN 和/或白细胞水平高于正常状态。

因此,本发明提供了一种预防或治疗痉挛、变应反应、血小板凝集或炎症相关性临床病症的方法。所述治疗方法包括给予治疗有效量的一种或多种本发明化合物 1-10 或其药用类似物。本发明还提供了一种预防或治疗 HIV 感染相关性神经变性或痴呆的方法,包括给予治疗有效量的一种或多种本发明化合物 1-10 或其药用类似物。

实施方式之一,可将本发明的消炎药加入用于清洁头皮和/或身体的香波或身体清洁产品(例如肥皂)。这可以用于治疗牛皮癣,脂溢性皮炎,脓疱性皮肤病和头屑。此外,还可以将本发明的消炎药如化合物 1-10 加入局部用的洗液,用于治疗上述疾病和晒伤、毒漆藤皮炎,和用于延缓迁移性癌症的发展。或者,可用本发明化合物治疗 Alzheimer 病,因为已知消炎作用有助于降低长期成斑效应。另一实施方式中,可以气溶胶或喷雾剂的形式用本发明化合物治疗气道炎症,例如支气管炎,哮喘,肺炎,肺气肿或上呼吸道疾病。

可在组合物中加入增效性活性化合物。某些实施方式中,本发明的消炎药与一种或多种治疗炎症损伤性疾病的其他治疗剂制成合剂和/或一同给药。例如,可将本发明消炎药与一种或多种结合其他目标如受体的其他消炎化合物制成合剂和/或一同给药。此外,可将本发明的一种或多种消炎药与两种或更多所述治疗剂联用。这样的联合治疗可更好地利用所给药物剂量较低来避免各种药物单用疗法中可能发生的毒性或并发症。

出人意料的是,本发明发现阿司匹林、COX-II 和 ω -3 脂肪酸之间的相互作用对组织具有消炎作用。而且,这样的联合产生了独特的前文结构式所示化合物。这些化合物具有消炎作用,可用作消炎药来治疗炎症相关性病症。

两类花生酸,即 LT 和 PG,可介导与人类疾病相关的重要效应。虽然已知 LT 和 PG 具有促炎作用(见图 1),本发明的新证据表明:新发现的 LM 及其稳定类似物在 PMN 性组织损伤和急性炎症中具有强效反调节作用。在这方面,已知花生四烯酸在内皮细胞(EC)内可经 p450 作用氧合形成 11,12-EET,它具有消炎作用,能抑制白细胞粘附分子,EPA 非酶氧合也能产生下调 EC 的产物,但尚未鉴定。

目前发现:宿主的总体反应,即已知人类疾病例如动脉炎、关节炎、心血管病、老年性炎性疾病、刺激性肠(结肠)病、丹毒、湿疹、牛皮癣、荨麻疹、脉管炎、AIDS 相关性炎症、眼睛炎症、哮喘、肺炎、肺纤维变性,一定程度上反映

了炎症信号利弊之间的总体平衡。此类信号中, LM 的作用尚未确定, 可能是因为它们通过跨细胞生物合成产生的速度快, 寿命短, 而且限于局部作用。因此, 由花生四烯酸及其代谢稳定性类似物形成的脂氧素(LX)和最近阐明的阿司匹林触发的 LX(ATL)已开始受到关注, 因为它们较长的生物半衰期增强了它们在体内的有益作用。

鉴于 ASA 可触发形成天然生物活性类花生酸的差向异构体(参考文献 9), 所以对 NSAID 能否促进由 ω -3 PUFA 形成新的介体进行了试验。给小鼠囊内注射 TNF- α 与 ω -3 和 ASA(2h), 小鼠气囊内的炎症渗出物包含了产生的几种新化合物(图 4)。给这些小鼠喂以含 0.26% ω -3 PUFA 的标准鼠食。对由渗出物所得物质的 LC/MS/MS 分析显示, 在 m/z 317 响应的选定离子层析(图 4A)中显示为单羟基酸, 即 18-羟基-EPA(18-HEPE)和 5-HEPE, 它们与合成的 5*S*-HEPE 和由 C20:5 形成的新的三羟基化合物共洗脱。LC 停留时间和 MS/MS 质谱(图 4B 和 4C)显示的产物离子与所示结构相符, 即 m/z 317=(M-H)~H₂O-CO₂。与 18-HEPE 相符的诊断离子出现于 m/z 259(图 4B)显示, 与 5-HEPE 相符的出现于 m/z 115(图 4C)。以下一律用这些标准进行鉴定。用手性层析柱确定由渗出物所得 18-HEPE 内 C18 上羟基的立体化学特征, 同时, 由巨大芽孢杆菌生物合成 18*R*-HEPE 作为参照物(见图 5, 材料与方法)。该微生物能使脂肪酸一氧合, (例如)可将 C20:4 转化为 18*R*-HETE(22. Capdevila, J.H., S.Wei, C.Helvig, J.R. Falck, Y.Belosludtsev, G. Truan, S.E. Graham-Lorence 和 J.A. Peterson. 1996. 细胞色素 P450BM-3 对聚不饱和脂肪酸的高度立体选择性氧合, *生物化学杂志*, 271: 22663-22671; 和 23. Ruettinger, R.T., 和 A.J. Fulco, 1981, 巨大芽孢杆菌的可溶性细胞色素 P-450 依赖性系统的不饱和脂肪酸一氧合作用, *生物活性*, 256: 5728-5734)。第 18 位上羟基的构型被证明为 >98%*R*。以上结果表明, 鼠炎症渗出物体外接触 C20:5, ω -3 和 ASA 可产生 5-脂氧合酶路径 5-系列 5*S*-HEPE, 用人 PMN 也可鉴定到该化合物, 还产生一种新的 18*R*-HEPE, 对其形成途径进行了测定(见后文)(24. Lee, T.H., J.M. Menica-Huerta, C. Shih, E.J. Corey, R.A.Lewis 和 K.F.Austen, 1984. 二十碳五烯酸的 5,12-二羟基衍生物, 包括白三烯 B5 和双脂氧合酶产物的鉴定和生物特性。 *生物化学杂志*, 259: 2383-2389)。以上经 ASA 和 EPA 处理的小鼠的气囊炎性渗出物细胞中主要是 PMN(见图 4), 比单用 TNF- α 处理所得渗出物中少 25-50%($n=3$, 图 6)。此外, 当这些渗出物以离子载体 A₂₃₁₈₇(4 μ M)激活时, 产生基本等量的 18*R*-HEPE(10.2 $\pm$ 4.3ng/10⁴ 细胞)和 5*S*-HEPE(10.9 $\pm$ 2.9ng/10⁴ 细胞)。图 4A-D 为 LC/MS/MS, 显示经阿司匹林处理后鼠背气囊炎性渗出物产生了新的化合物; 第 6

小时收集 FVB 小鼠接受 ASA(第 3.5 小时, 500 μ g/个气囊)和 EPA(第 4 小时, 300 μ g/个气囊)后的 TNF- α 诱导的白细胞渗出物, 结果每个气囊含 $2.3 \pm 0.5 \times 10^6$ 白细胞(见“方法”部分);

这些炎性渗出物还证明产生了新的三羟基化合物(图 4D)。MS/MS 中显示的离子与一种由 20:5 所得的三羟基化合物一致, 即, m/z 亲本离子出现于 349 = (M-H)-, 具有明显结构特征的产物离子出现于 m/z 291 和 195, 这符合对所插入结构式的分解(图 4D)。此外, 可观察到一个共轭三烯特征性的 270nm 处最大 UV 吸收, 连同 m/z 291 时的响应(剪切位置在 C17-C18)和 20 碳的结构, 表明 18R-HEPE 和 triHEPE 在生物合成上是相互关联的。

确定人细胞是否也能产生这些新的化合物以及它们是否具有生物活性十分重要。为此, 用 EPA 脉冲处理并用 ASA 处理人 EC, 已知该细胞可因 IL-1 β 或缺氧而诱导 COX-2, 然后对渗出物进行 LC/MS/MS 分析(图 7A)。 m/z 259 的选定离子监测显示: ASA 处理的 HUVEC 将 EPA 转化为 18R-HEPE(图 7A)。此外, ASA 和 EPA 处理的 HUVEC 产生 18-HEPE(10.6ng/10⁴ 细胞)和 15-HEPE(6.0ng/10⁶ 细胞)($n=2, 4$ 次测定, 数据未显示)。以上结果提示 COX-2 参与了以上化合物的产生, 并用重组人 COX-2 接触 ASA 和 ω -3 PUFA 得到了印证(图 8 和表 1), 以上发现具有重要的临床意义。

如表 1 所示, 亚油酸(C18:2)可转化成 13-羟基-9Z, 11E-十八二烯酸(13-HODE; n-5 氧合)和 9-HODE(ω -9), ASA 可显著减少但非完全抑制它们的产生。AA 可转化成 15R-HETE(n-5)和 11R-HETE(n-9), 这与先前的发现相符。ASA 通过乙酰化 COX-2(参考文献 9, 14, 15)触发其脂氧合酶活性, 从而转向 15R-HETE 生产, 但似乎不影响 11R-HETE 的形成(表 1 和图 8)。11R-HEPE 是 EPA 与 COX-2 反应的主产物, 15R-HEPE(n-5)和 18R-HEPE(n-2)则较少。用 1-¹⁴C 标记的 EPA 确认前体-产物关系($n=3$, 见图 2 和“方法”)。COX-2 的 ASA 乙酰化(图 8: 各种新反应产物的质谱鉴定)使 18R-HEPE(n-2)产量提高了约 2 倍, 11R-HEPE 则减少了 85% 以上(C20:5 内的位置性氧合之比为 1:1:0.3, 即 18R~15R>11R)。因此, 综合以上结果表明: EC 内 COX-2 的乙酰化是产生 18R-HEPE 和 15R-HEPE 的主要原因。

有趣的是, 不同于分离的 COX-2 产物情况, 11R-HEPE(自 C20:5 产生)和 11R-HETE(自 C20:4 产生)都不是脉管 EC 的主产物(见表 1 和图 7)。用选择性 COX-2 抑制剂 NS398 抑制以上两种氧合反应, 结果似乎只有自 EPA 形成 18R-HEPE 未被抑制(表 1)。以上结果提示: 联用 ASA 和 ω -3 PUFA(即 EPA, C20:5, ω -3)处理炎症(例如胞嘧啶引起的急性炎症)部位(图 4, 图 6)可由 COX-2 将 EPA

转化为 18R-HEPE 和 15R-HEPE。

因为人 PMN 可将 ASA 触发的、COX-2 产生的 15R-HETE 转化为 15-表-LXA₄(参考文献 9), 而且人白细胞和鲑鱼巨噬细胞(26. Hill, D.J., D.H. Griffiths 和 A.F. Rowley, 1999, 鲑鱼血小板具有 12 脂氧合酶活性但没有 15 脂氧合酶活性, *生物活性和生物物理学学报*, 1437: 63-70)可将 EPA 转化为 5-系列 LX(25. Serhan, C.N., P.Y.Wong 和 B.Samuelsson, 1987. 自花生四烯酸和二十碳五烯酸形成的脂氧素及其相关化合物的命名。 *前列腺素*, 34: 201-204), 所以, 对参与吞噬乙酰化 COX-2 产生的 C20:5、 ω -3 产物 18R-HEPE 和 15R-HEPE 的活化人 PMN 进行了评价。根据 m/z349.5(M-H)-的选定离子监测分析所示化合物的基峰分子离子, 血清处理的酵母聚糖(STZ), 一种巨噬细胞刺激剂, 显示乙酰化 COX-2 产生的 C20:5 产物被转化两类三羟基 EPE(图 7B)。图 7C 显示, 其中之一的 MS/MS 与鼠细胞产物的(图 4D)相同, 并符合于 m/z305, 233, 195 和 291 处显示诊断离子(图 4D)的 5,12,18R-triHEPE 的结构(图 7C)。

该产物是一个带有 18R-羟基的“LTB₅-样”结构(见图 7D, 插图)。事实上, 当用分离的 18R-HEPE 培养活化 PMN 时, 它被转化为包括该产物在内的数种化合物。此外, 与巨大芽孢杆菌和 NADPH 在 pH8 下(促进羟基化, 参考文献 23)一同培养的合成 LTB₅被转化为一种三羟基产物(n=3), 具有 m/z 291 处的特征性 18R 羟基(图 5), 和用人 PMN 所得的结果相同(图 7C)。以上彼此独立的证据表明: PMN 吸收 18R-HEPE, 后者被其 5-脂氧合酶转化, 插入分子氧, 然后转化为 5-过氧羟基-18R-DiH(p)EPE, 再由 5(6)环氧化物形成 5,12,18R-triHEPE(一种 18R 型 LTB₅ 样产物), 该产物可能具有 LTB₅ 的立体化学特征, 并保留了前体的 18R 手性特征。

在一种类似的生物合成模式中, PMN 通过 5-脂氧合将 15R-HEPE 转化成一种 5-系列 LXA₅ 类似物(图 7D), 也保留了此类物质的 C15 构型。其 MS/MS 谱显示主离子出现于 m/z305, 233 和 251, 该物质是 15-表-LXA₅, 与鲑鱼巨噬细胞内内源性 EPA 源的 15S 型 LX₅ 结构(5-系列)一致。此处, 人 PMN 保留了前体的 15R 手性特征以形成 15-表-LXA₅(图 7D), 这是 15-表-LXA₄ 的一种 5-系列 ω -3 类似物。与 LX 的生物合成一样, 活化 PMN 对 18R-和 15R-HEPE 的 5-脂氧合转化都伴随着 LTB₄ 形成的减少(未显示)。综合以上结果显示, 分离的人 EC 和 PMN 可由炎症渗出物产生新的化合物(图 1-4, 表 1 和 2)。

经内皮迁移是 PMN 聚集和炎症中的关键, 而且是公认的传统消炎治疗的作用目标(27. Cronstein, B.N., S.C. Kimmel, R.I. Levin, F.Martiniuk 和 G. Weissmann, 1992, 皮质类固醇消炎作用的机制: 糖皮质激素受体调节白细胞与内皮细胞的粘附

和内皮-白细胞粘附分子 1 与细胞内粘附分子 1 的表达, *美国科学院院报*, 89: 9991-9995)。能够调节上述细胞-细胞相互作用的内源性脂质介体意义重大。因此, 对 5,12,18R-triHEPE 及其前体 18R-HEPE 对于人 PMN 迁移的作用进行了评价。这两种化合物都抑制 LTB₄ 激发的 PMN 经内皮迁移(图 9A), 5,12,18R-triHEPE 的表观 IC₅₀ 是 5-50nM, 18R-HEPE 的 IC₅₀>1.0μM。因此, 新的 5-系列化合物 18R 三羟基 HEPE 和 18R-HEPE 与 15-表-LXA₄ 及其衍生物和类似物(为进行直接比较而进行了平行实验)一样抑制 PMN 迁移(图 10A, 表 1 和 2)。它们的效力排序为: 15-表-LXA₄ 稳定类似物>5,12,18R-triHEPE>18R-HEPE。

已鉴定到了 LTB₄ 的 G 蛋白偶联受体(28. Yokomizo, T., T.Izumi, K.Chang, T.Takuwa 和 T.Shimizu, 1997, 一种介导趋化性的白三烯 B₄ 的 G 蛋白偶联受体, *自然*, 387: 620-624)。为了确定 18R 型产物是否与人 LTB₄ 受体作用而抑制 PMN, 根据已知序列克隆并在 HEK293 细胞内稳定表达该受体(参考文献 11), 用其进行竞争性结合实验(图 18B)。同源配体 LTB₄ 有竞争性, IC₅₀ 约为 2.5nM, 18R-HEPE 没有竞争性, LTB₅ 和 5,12,18R-triHEPE 有竞争性, IC₅₀ 约为 0.5μM, 趋势为: LTB₅>5,12,18R-triHEPE。

虽然 5,12,18R-triHEPE 及其相关结构(即 LTB₅)的效力远低于 4-系列 LTB₄, 这与 LTB₅ 降低 PMN 活性相符(参考文献 24), 但它们取代 [³H]LTB₄ 的能力与当前已有的 LTB₄ 受体合成拮抗剂相当(数据未显示)。以上发现提示: 如果能产量充足, 5,12,18R-triHEPE 可作为体内 LT 介导性反应的抑制剂, 并可作为新受体拮抗剂合成的生物模板。

在以低剂量(100ng)尾静脉给药时, 5,12,18R-triHEPE 是 PMN 向鼠背气囊浸润的强抑制剂(图 10C), 相当于等剂量的 15-表-LX 稳定类似物(用于直接比较)。18R-HEPE 还具有体内活性(<5,12,18R-triHEPE), 但其对于分离的人 PMN 经内皮迁移的作用小得多, 而且在上述浓度时与重组 LTB₄ 没有相互作用。

如表 1 所示, 另用其他常用 NSAID(即对乙酰氨基酚和吲哚美辛)与重组 COX-2 和 C20:5 组合进行试验(表 2), 确定它们是否改变向 HEPE 的转化。它们都抑制 11-HEPE 的形成, 抑制率>95%。有趣的是, 浓度高达 2mM 的对乙酰氨基酚或吲哚美辛存在下, 仍有 18R-HEPE 和 15R-HEPE 的形成(约 1:1), 虽然它们的水平比没有抑制剂时下降了 3-8 倍(n=3)。以上结果表明: 并非只有 ASA 处理和花生四烯酸会发生 ω-3 脂肪酸氧合成 R-单过氧羟基产物。事实上, C18:2, C18:3 和 C22:6 也会被 NSAID-COX-2 复合物转化为新的产物(见图 11A, B 和 C)。因此, 这些常用 NSAID 和选择性 COX-2 抑制剂(表 1 和表 2)仍允许通过活化 EC 与

NSAID 接触发生 PUFA 的氧合,其中,COX-2 与所述药物的作用程度可产生 PUFA 新的氧合形式。

除了关于 ω -3 PUFA(即 C20:5)可能对人类有益的报道(参考文献 1-6)之外,迄今还没有关于人体内或分离细胞内 COX-2 氧合产生新生物活性化合物的论述。在鱼体内, C20:5 和 C20:4 在巨噬细胞和血小板内代谢产生 5-系列和 4-系列的类花生酸,包括 PG、LT 和 LX,丰度基本相同(参考文献 26)。本发明认为:经 ASA 和 EPA 处理的小鼠的炎性渗出物产生了新的化合物(图 4),这些化合物也可由人 EC,重组 COX-2 和 PMN 产生(图 5)。基于以毫克至克计的饮食补充 ω -3 PUFA(参考文献 1-6)和可携带上调 COX-2 的微脉管系统的大面积,以上实验(图 4-8)表现出的 EC 及相邻细胞的 EPA 转化实际代表了该转化在局部微环境中的大量发生。当 NSAID 发挥治疗作用,即在微炎症中,发炎或病患组织中的这种 COX-2-NSAID 依赖性 ω -3 PUFA 转化很可能被增强,此时,COX-2 被上调,成为影响脂肪酸代谢的决定因素。

与 15-表-LX 的生物合成类似,EPA 与 COX-2 产生的 15R-HEPE 在白细胞内经 5-脂氧合反应形成 5(6)-环氧化物,继而转化成 15-表-LX₅ 系列化合物(图 11)。15-表-LX₄ 的这些稳定类似物在其 15-20 位上被大基团修饰,可耐受灭活性酶的作用,且体内效力更强,可抑制 PMN 的迁移和主要促炎性细胞因子的产生和作用(参考文献 10 和 16)。因此,5-系列 15-表-LX 的作用方式应彼此类似,因为它们都具有 ∇ 17-18 双键,因而具有 ω -3 产生的 15-表-LX 类似物的作用。

因为 COX-2-NSAID 依赖性氧合(例如 18R 和 15R)在体内产生了可抑制 PMN 经内皮迁移和浸润的生物活性化合物,这些为新的 NSAID 作用机制以及 ω -3 饮食补充提供了支持,即产生内源性功能性脂质信号物系列(表 1 和图 4,图 7),这些系列能够通过抑制微炎症中的关键反应而介导 ω -3 对人治疗实验中的有益作用。在这方面,COX-2 还产生了下调血小板-EC 相互作用的脂氧合酶产物 13-HODE(表 1 和 2)(29. Buchanan, M.R., P. Horsewood 和 S.J. Brister, 1998, 12-和 15-脂氧合酶单羟基化合物,12-和 15-HETE 和 13-HODE 对内皮细胞和血小板受体-配体结合反应的调节, *前列腺素与白细胞与必需脂肪酸*, 58: 339-346),该产物和 DHA(C22:6)(图 10)一样包括在该路径系列和介体类别中(图 12)。DHA 还可被转化为新的反应产物(图 13)。此外,ASA 处理 COX-2 产生了不同的 C17 产物与 C13 产物之比(图 14B-G)。这些新的 COX-2 产物可能在 COX-2 和 DHA 水平升高的脑血管系统中发挥作用。因此,这些化合物可用于治疗神经组织炎症(例如 Parkinson's 病, Alzheimer's 病等)。因此,本发明出人意料地发现,COX-2 与 NSAIDS

的相互作用引起了大量脂质前体新的氧合作用，从而产生具有治疗用途的生物活性化合物(图 15)。

目前认为，不良炎症反应会造成心血管疾病(Ridker, P.M., M. Cushman, M.J.Stampfer, R.P. Tracy 和 C.H.Hennekens, 1997, 炎症、阿司匹林与看似健康的人的心血管疾病, 新英格兰医学杂志, 336: 973-979)和 PMN 介导的组织损伤为主的临床综合征(参考文献 11), 这些细胞-细胞相互作用激发的新 ω -3 PUFA 加工路径以及 NSAID 新作用的发现为采用补充 ω -3 PUFA 来提供临床保护和形成控制微炎症的强效内源性介导机制开辟了新路(图 4-1)。而且, 本发明还为避免当前消炎治疗的不良副作用, 以及制订有效食物补充 ω -3 的生化指数和/或指标提供了基础。

表 1: PUFA 和重组人 COX-2 与 ASA 或选择性 COX-2 抑制剂产生的羟基化合物

PUFA	NSAID	羟基化合物(ng/培养)		
		ω -2	ω -5	ω -9
			<u>13-HODE</u>	<u>9-HODE</u>
C18:2	ASA	-	2.9±0.6	25.2±17.8
C18:2	仅载体	-	55.0±18.7	243.0±68.6
			<u>15R-HETE</u>	<u>11R-HETE</u>
C20:4	ASA	-	234.0±112.5	1.4±1.6
C20:4	仅载体	-	11.5±8.2	1.8±1.0
C20:4	选择性抑制剂	-	5.5±0.8	0.9±0.1
		<u>18R-HEPE</u>	<u>15R-HEPE</u>	<u>11R-HEPE</u>
C20:5	ASA	16.2±3.3	16.8±5.8	5.4±3.3
C20:5	仅载体	7.0±3.3	17.9±5.2	40.7±10.3
C20:5	选择性抑制剂	5.8±2.6	0.0±0.6	0.0±0.3
以上结果为平均值±SEM 选择性 COX-2 抑制剂 NS398 的用量为 100μM 抽提所有产物, 并用内标和 LC/MS/MS 进行了鉴定和定量 重要化合物以粗体表示				

表 2: NSAID-人重组 COX-2(n -3 C20:5 的转化)

NSAID	18R-HEPE	15R-HEPE	11R-HEPE
ASA	12.2±4.6	8.0±5.6	5.5±2.3
吲哚美辛	3.0±1.4	2.6±1.4	3.3±1.8
对乙酰氨基酚	5.5±2.4	4.6±1.2	6.7±3.0
仅 COX-2	18.3±11.2	42.0±23.8	90±43.0

以上数值为平均值(ng)±SEM, $n=3$

实验

材料和方法

酵母聚糖, 羟高铁血红素, NADPH 和 ASA 购自 Sigma-Aldrich。用于鉴定的 EPA(Cayman Chemical)和其他合成标准物, 羟基脂肪酸和中间体购自 Cascade Biochem Ltd.。巨大芽孢杆菌获自美国典型培养物保藏中心。用于液相层析随机质谱(LC/MS/MS)的材料由文献记载中的供应者提供(20. Gronert, K., C.B. Clish, M.Romano 和 C.N.Serhan, 1999, 类花生酸生物合成的跨细胞调节, 类花生酸学会, E.A. Lianos 编, Humman Press, Totowa, NJ 119-144)。

人 PMN 用 Ficoll 梯度法新鲜分离自健康志愿者(不包括此前 2 周内服用过药物的人; Brigham and Women's Hospital 的方法 No.88-02642)的静脉血, 并进行计数。为了研究经内皮迁移(参考文献 10), 培养人脐静脉或微血管的 EC(分别为 HUVEC 或 HMVEC), 在聚碳酸酯透性载体上先涂以 0.1%明胶, 然后接种 HMVEC 单层(传代 1 次, 2 次或 3 次), 密度约 2×10^5 细胞/cm², 用于与 NSAID 和 PUFA 共培养。

在 6-8 周龄的雄性 FVB 小鼠(喂以含 0.26% ω -3 脂肪酸的标准鼠食)囊内(6d 背气囊)注射 TNF- α (R&D System)(参考文献 16)以引发炎症渗出物, 然后在第 3.5 小时注射 ASA(500 μ g), 第 4 小时注射 C20:5(300 μ g/囊)。第 6 小时, 进行囊内灌注(3ml 生理盐水), 计点渗出细胞数, 并用 94 μ M A₂₃₁₈₇ 激活(37 $^{\circ}$ C, 20min)。尾静脉注射 18R-羟基二十碳五烯酸(HEPE), 5,12,18R-HEPE 或 15-表-LXA, 在第 4 小时进行囊内灌注, 测定 TNF- α 激发的(100ng/囊, FVB 小鼠)PMN 浸润的受抑制情况。

用人 LTB₄ 受体稳定转染的人胎肾(HEK)293 细胞进行 [³H]LTB₄(NEN Life Science Product)比结合(Chiang, N., K. Groner, C.B. Clish, J.A.O'Brien, M.W. Freeman 和 C.N. Serban, 1999, 白三烯 B₄ 受体转基因小鼠揭示了 Lipoxins 和阿司匹林触发的脂氧素在再灌注中新的保护作用, *临床研究杂志*, 104: 309-316)。将昆虫细胞(美国典型培养物保藏中心)培养物微粒体(约 8 μ l)悬浮于 Tris(100mM, pH8.0), 5/9 的细胞过量表达人重组 COX-2(Dr. R.A.Copeland 提供, DuPont Merck, Wilmington, DE)(参考文献 21. George, H.J., D.E. Van Dyk, R.A.Straney, J.M. Trzaskos 和 R.A. Copeland, 1996, 杆状病毒感染的昆虫细胞的重组人诱导型前列腺素 G/H 合成酶的表达、纯化和鉴定, *蛋白质表达与纯化*, 7: 19-26)。在 37 $^{\circ}$ C 加入 NSAID(即约 1mM 的 ASA), 培养 30 分钟后加入 PUFA(20 μ M), 用 1-¹⁴C-标记的 C20:4(图 2A 和 2B)或 C20:5(NEN Life Science Product)(图 2C 和 2D)监测转化情况。

30°C, 在 Bacto 营养培养液(Fisher Scientific)中振荡培养巨大芽孢杆菌, 生物合成中间体和参照化合物。用生物合成法制备 18*R*-HEPE 的标准物, 即巨大芽孢杆菌超声裂解物与 NADPH(2mM)和 C20:5(EPA)(330μM)在 2M Tris 缓冲盐(pH8.1)中共培养。用同样的条件将 LTB₅(15μM)转化为新的化合物; 见结果。萃取培养物, 以氘标记的内标(15-HETE 和 C20:4)进行 LC/MS/MS 分析, 用的是配制有 LUNA C18-2 柱(150×2mm, 5μM)和快速 UV/Vis 波谱扫描检测仪的 Finnigan LCQ。用 Chiralcel CB-H 柱(J.T. Baker), 恒溶剂洗脱法(己烷/异丙醇=96:4(vol/vol)), 测定单羟基-PUFA 的羟基是 *R* 还是 *S* 构型。有关脂质介体分离、纯化和结构鉴定的详细方法可参考最近的文献报道, 本发明即据此阐明本发明新的产物。

羟基-HAD 化合物的制备:

分别用阿司匹林乙酰化和非乙酰化的重组 COX-II 体外制备羟基-DHA 化合物。简而言之, 采用重组人 COX-II 制备培养混合物, 纯化后作为 SF9 细胞表达的 COX-II 的一种膜制备物。将该酶悬浮于 400μl 1M 的 Tris 缓冲盐(pH8.0), 其中含 5mM 苯酚。COX-II 的阿司匹林乙酰化为: 向混合物中加入阿司匹林(2mM), 37°C 培养 5 分钟。加入 400μl 冷甲醇终止反应。然后用固相萃取柱(SepPak C18)萃取产物。

新的 DHA 化合物: 13-羟基-DHA, 14-羟基-DHA, 16-羟基-DHA, 17-羟基-DHA, 19-羟基-DHA 或 20-羟基-DHA 的效力与前述 EPA 所得产物相当, 即, 类似于图 9A 和 9C 所示结果。

本领域技术人员只需通过常规实验即可发现还有其他实施方式可获得与以上所述相似的技术效果, 因此, 这些都应包含在本发明的权利要求中。本发明全面参考了包括“发明背景”部分所提及的所有出版物和参考文献。

LM的跨细胞生物合成

细胞-细胞相互作用

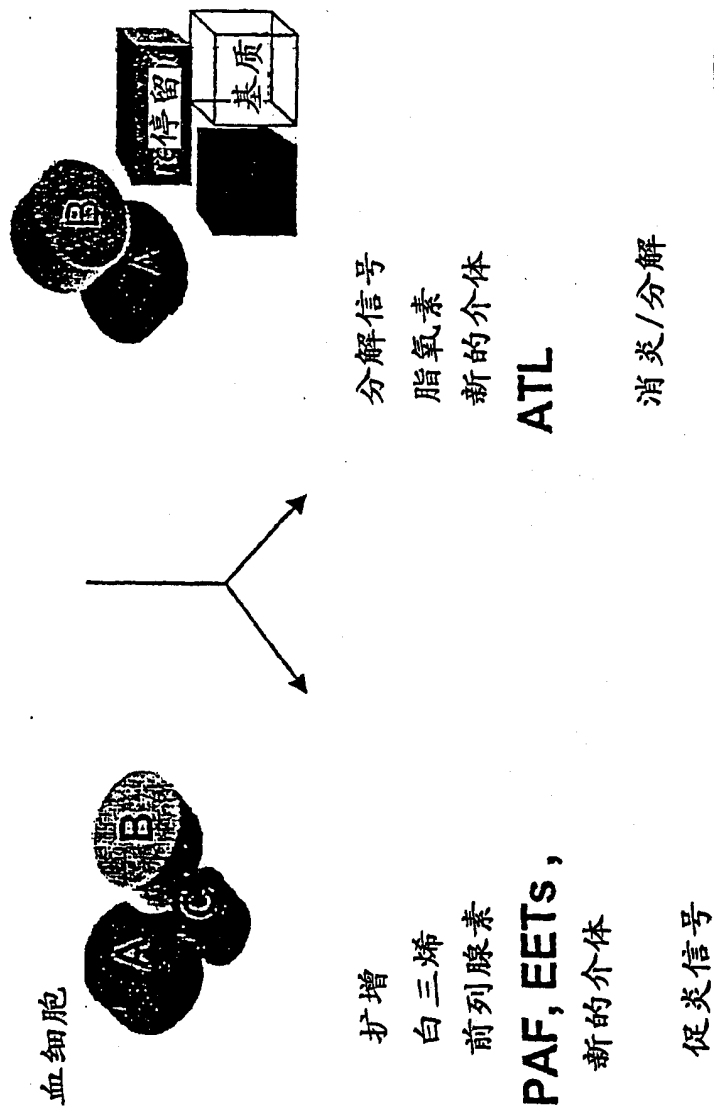


图 1

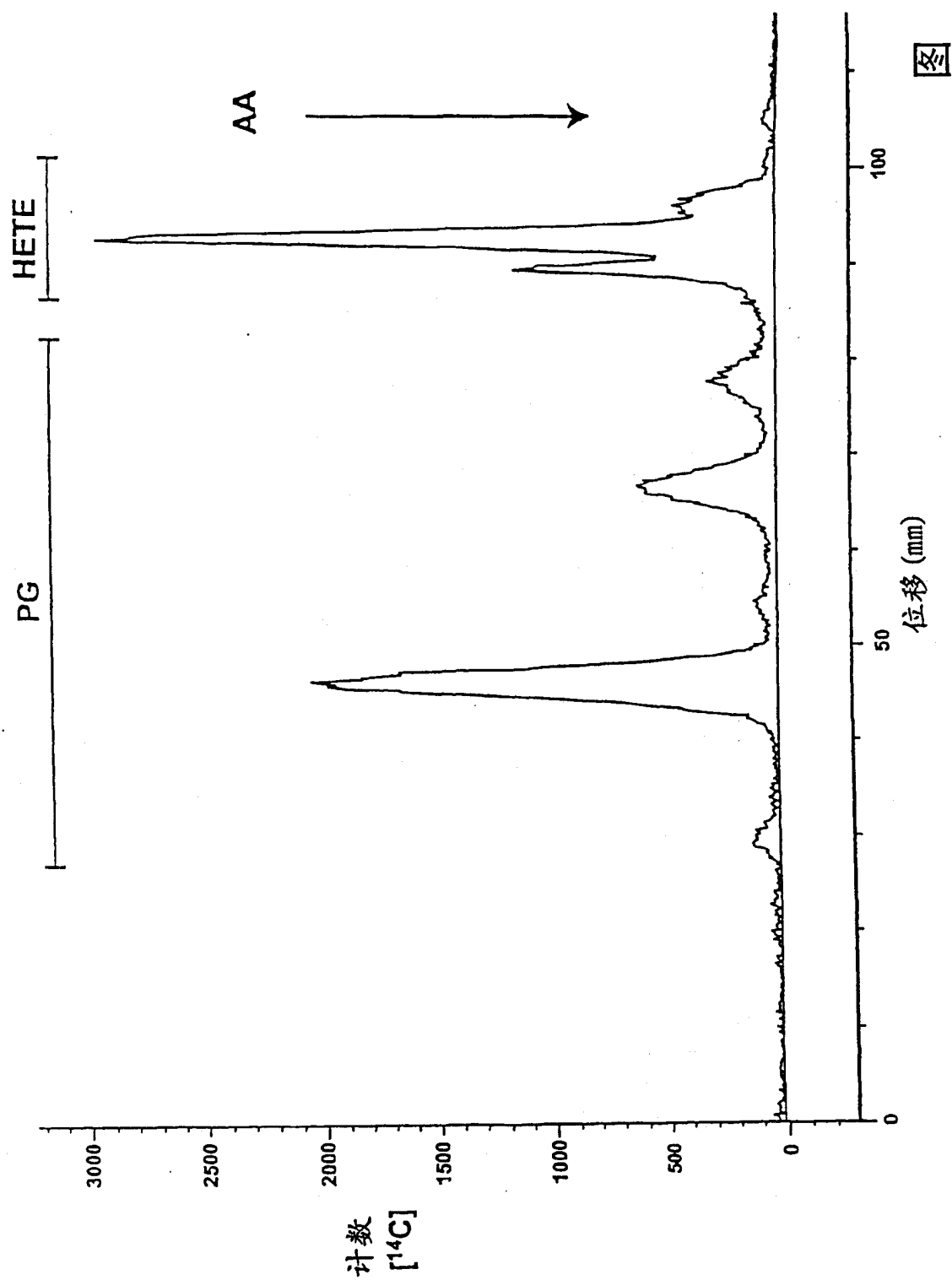


图 2A

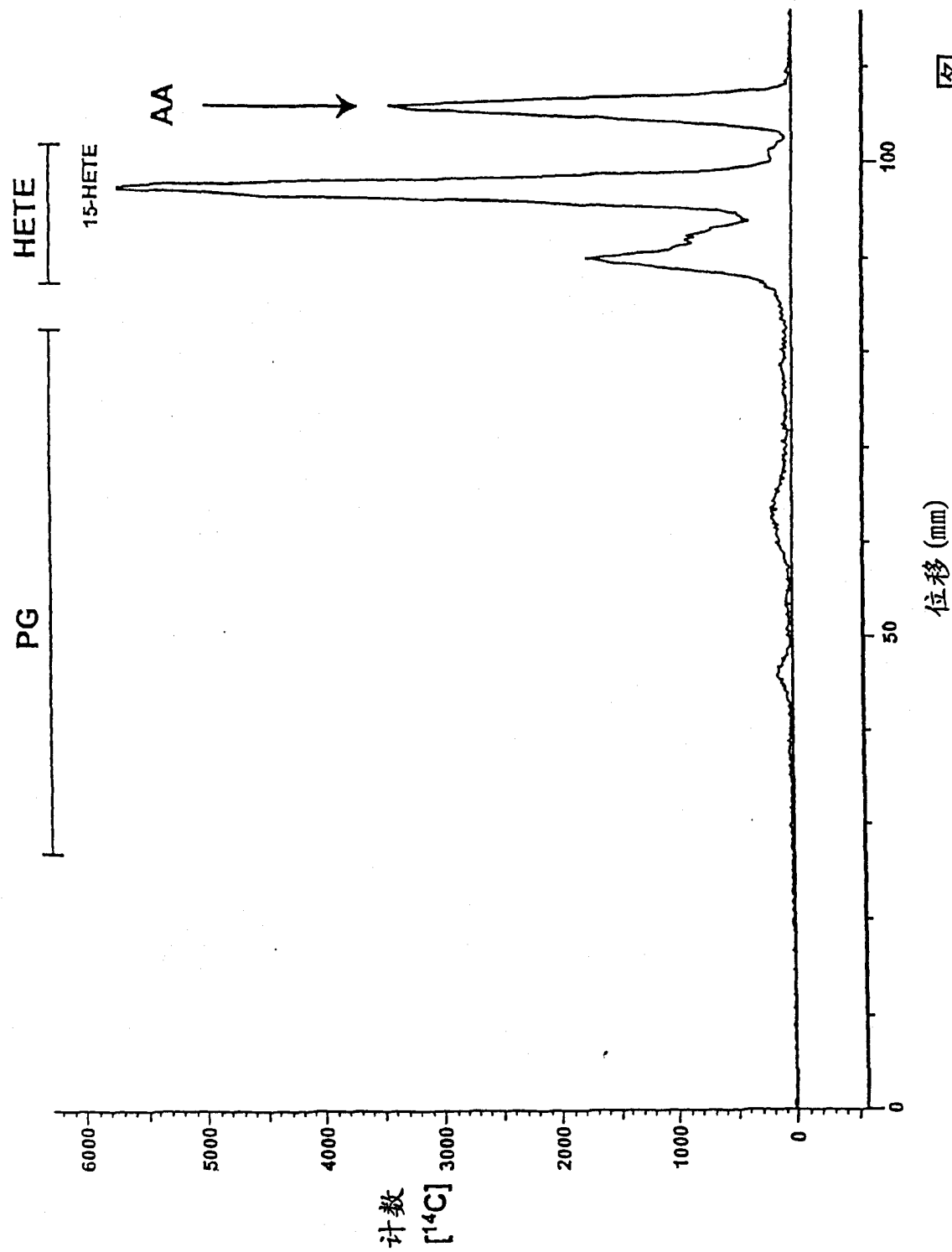


图 2B

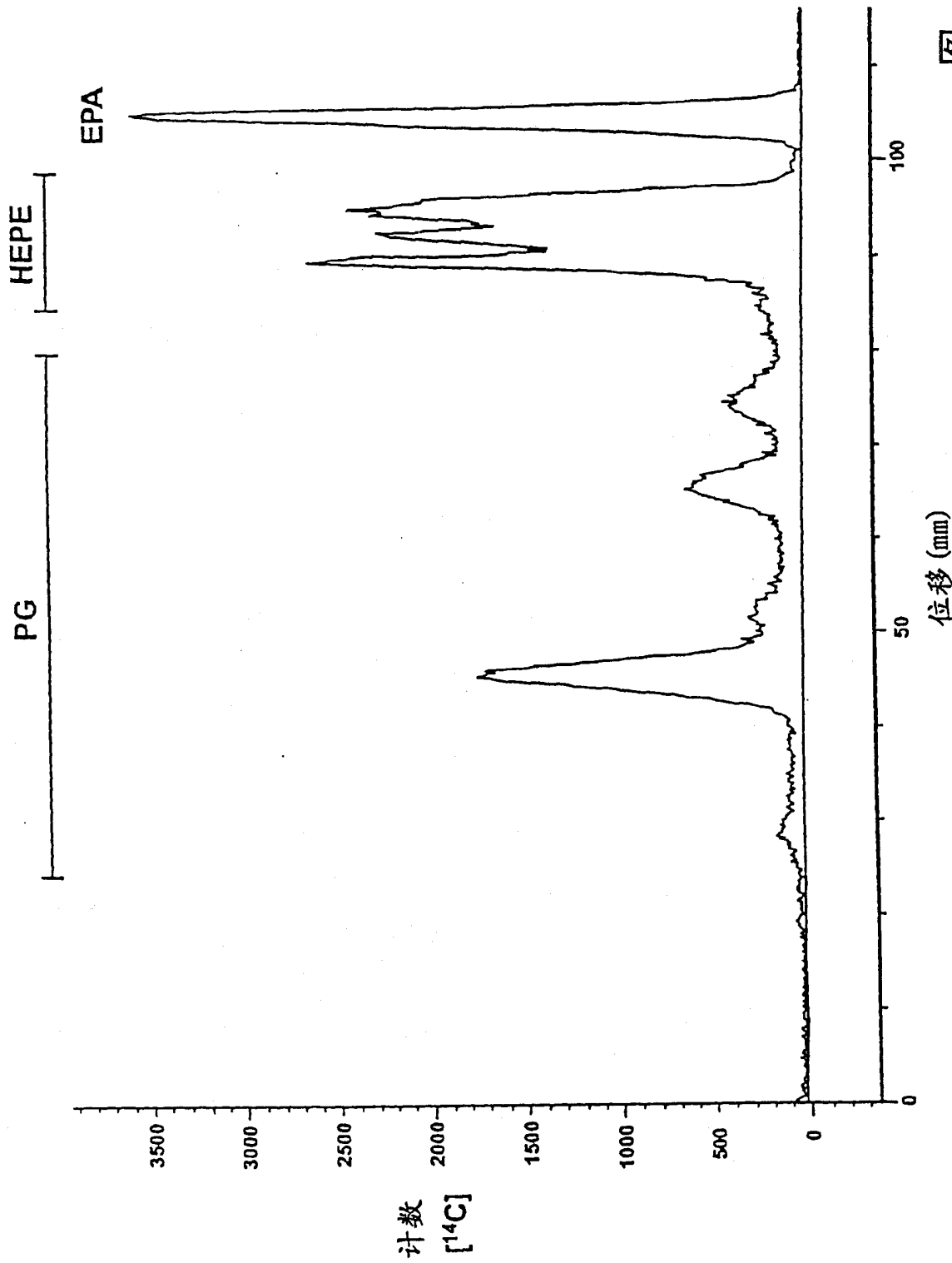


图 20

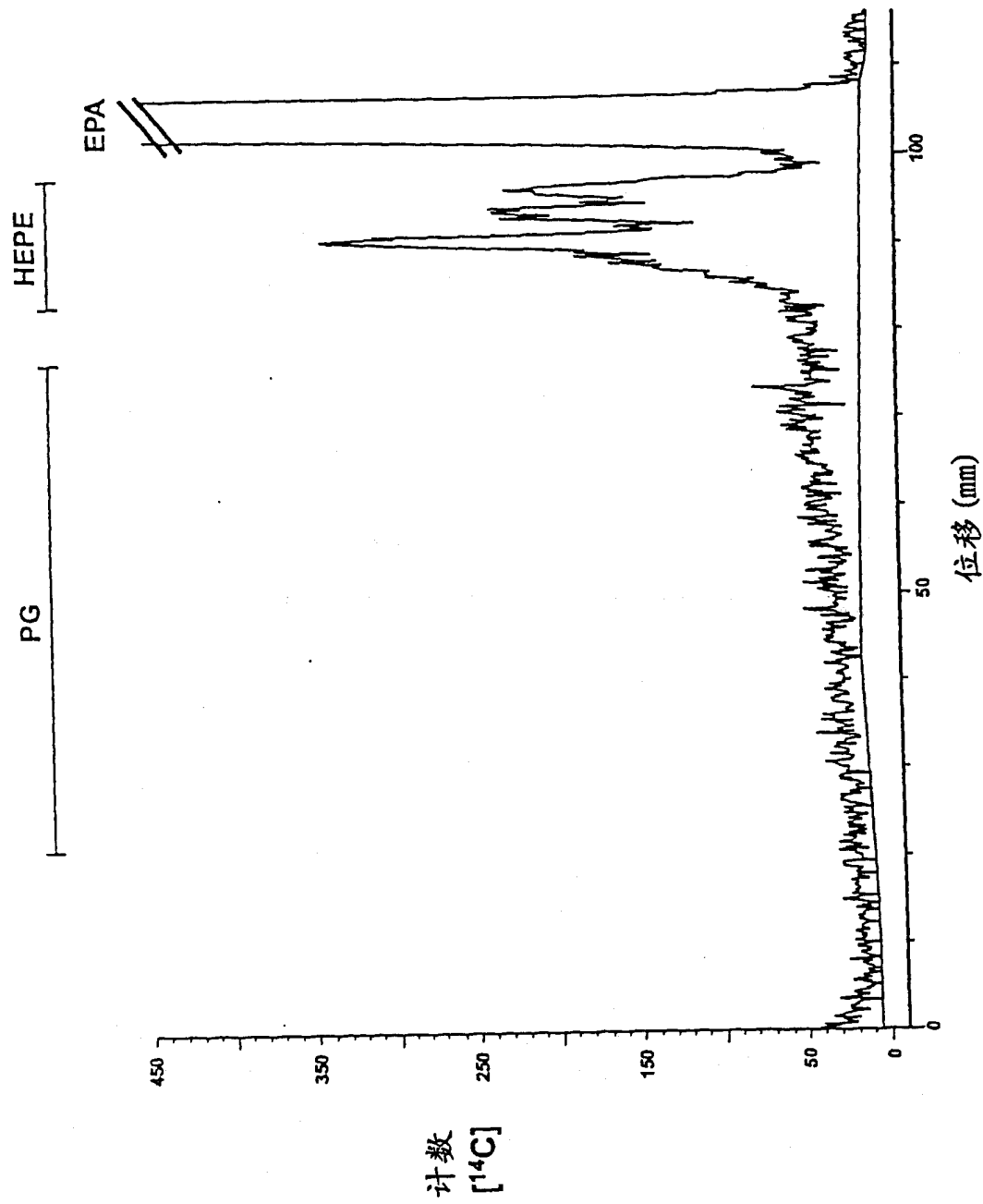
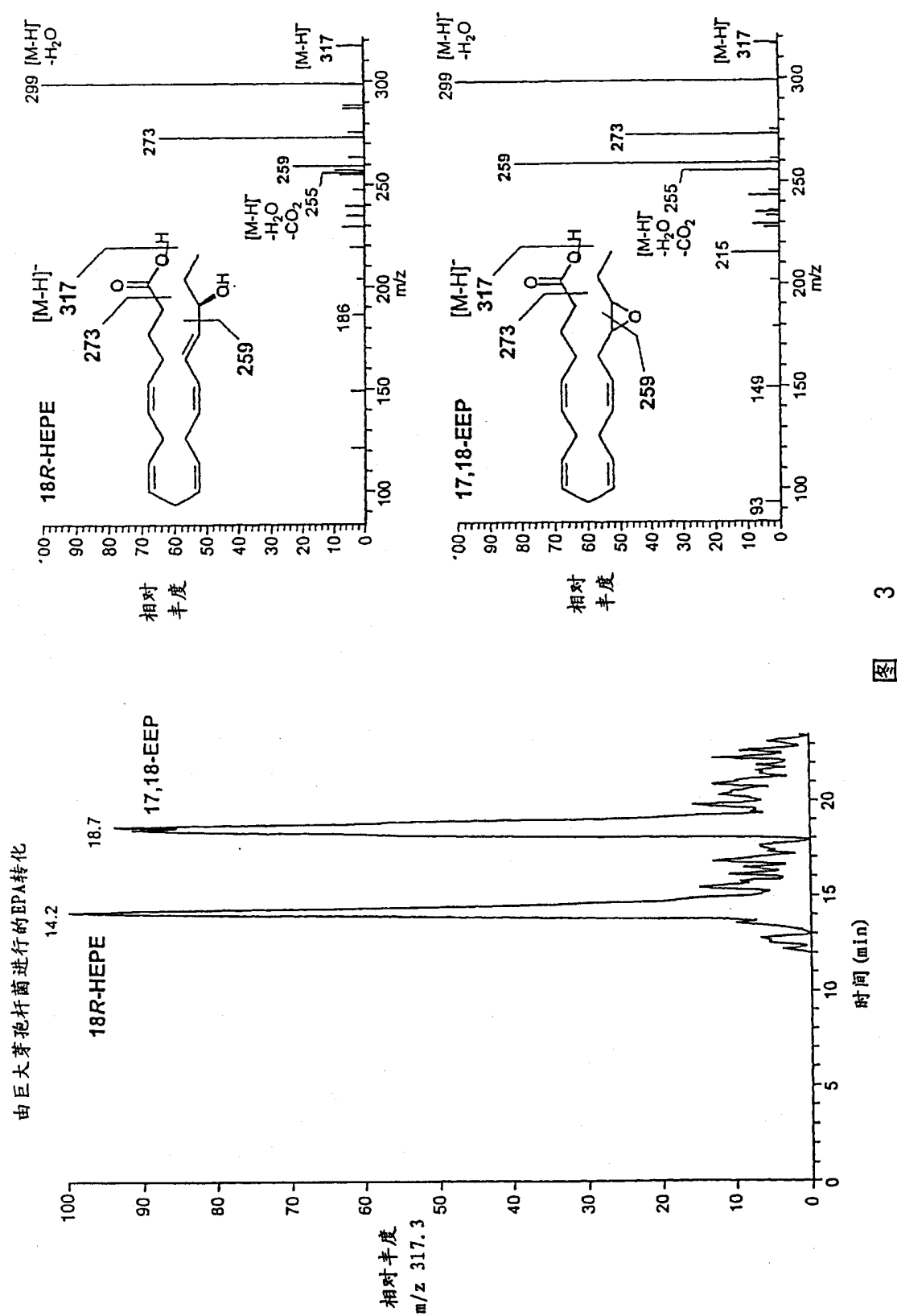


图 2D



3

图

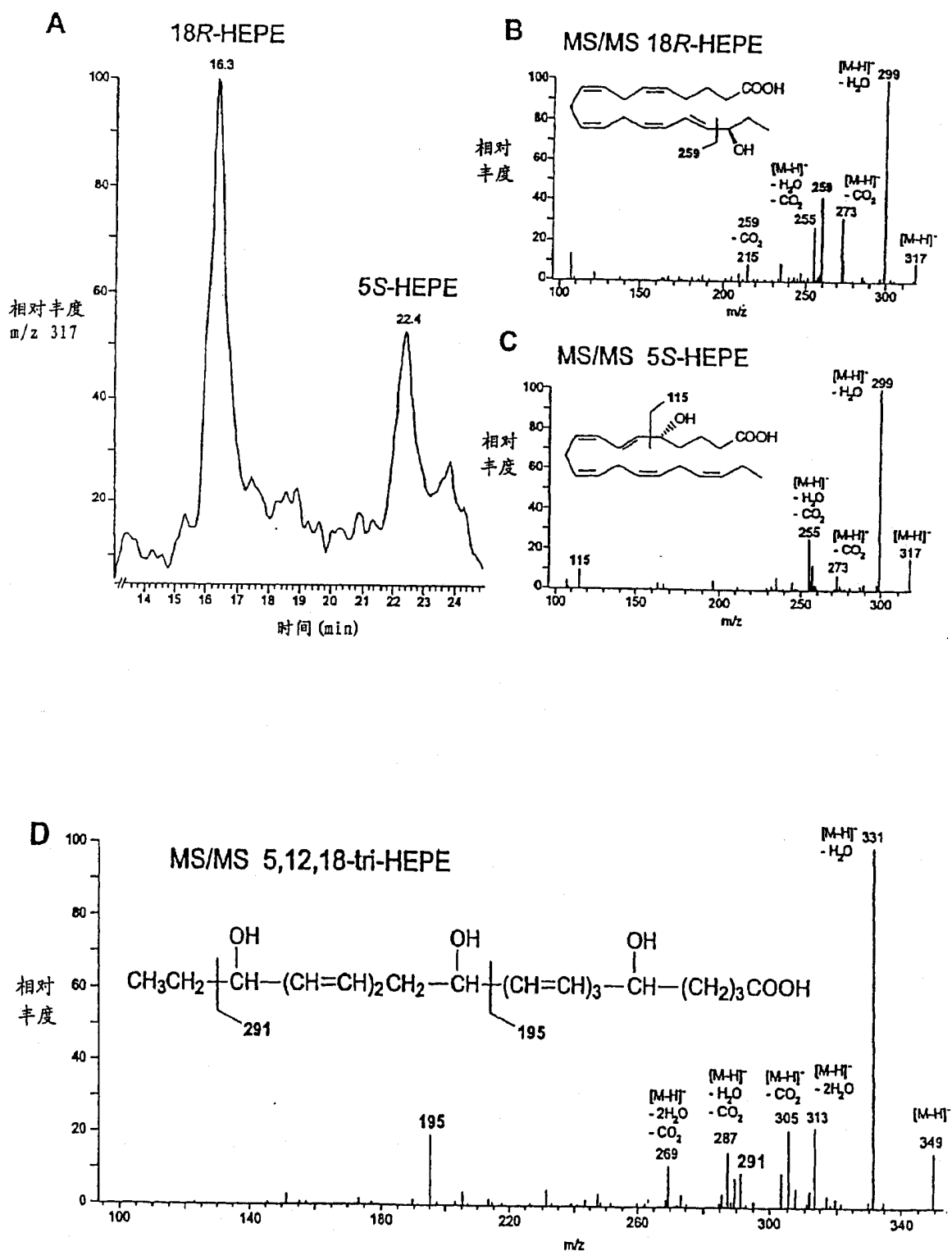
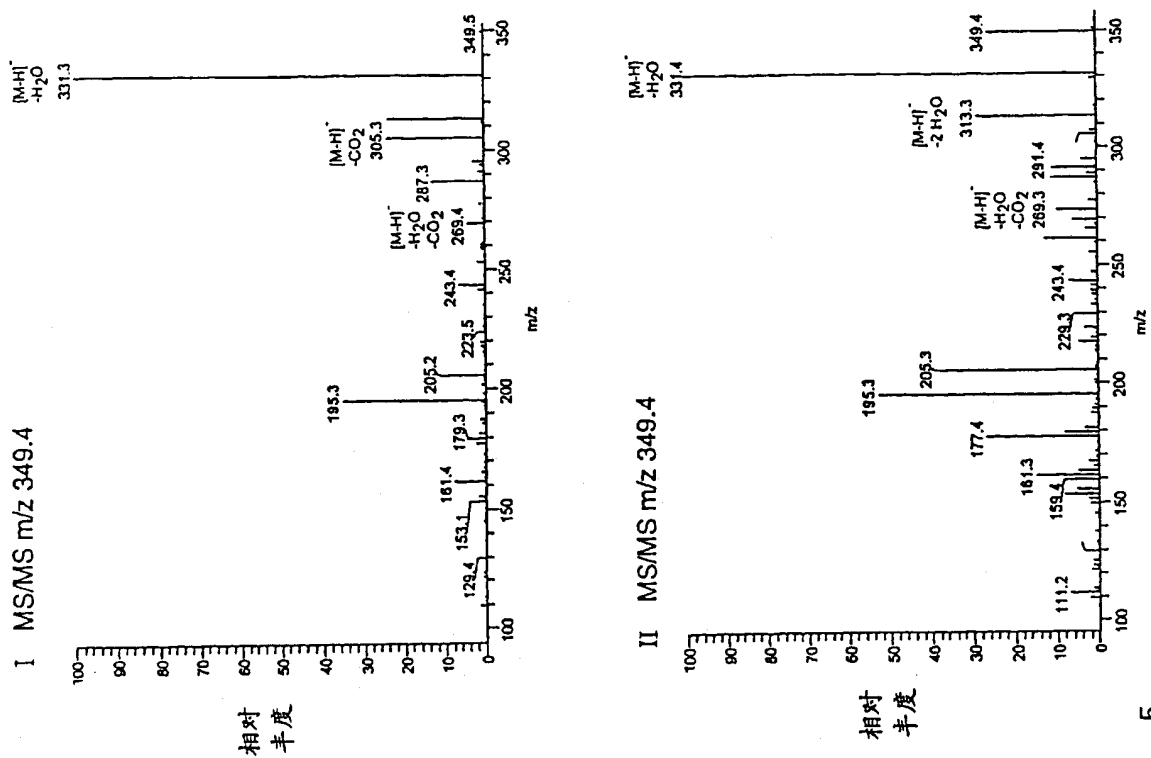


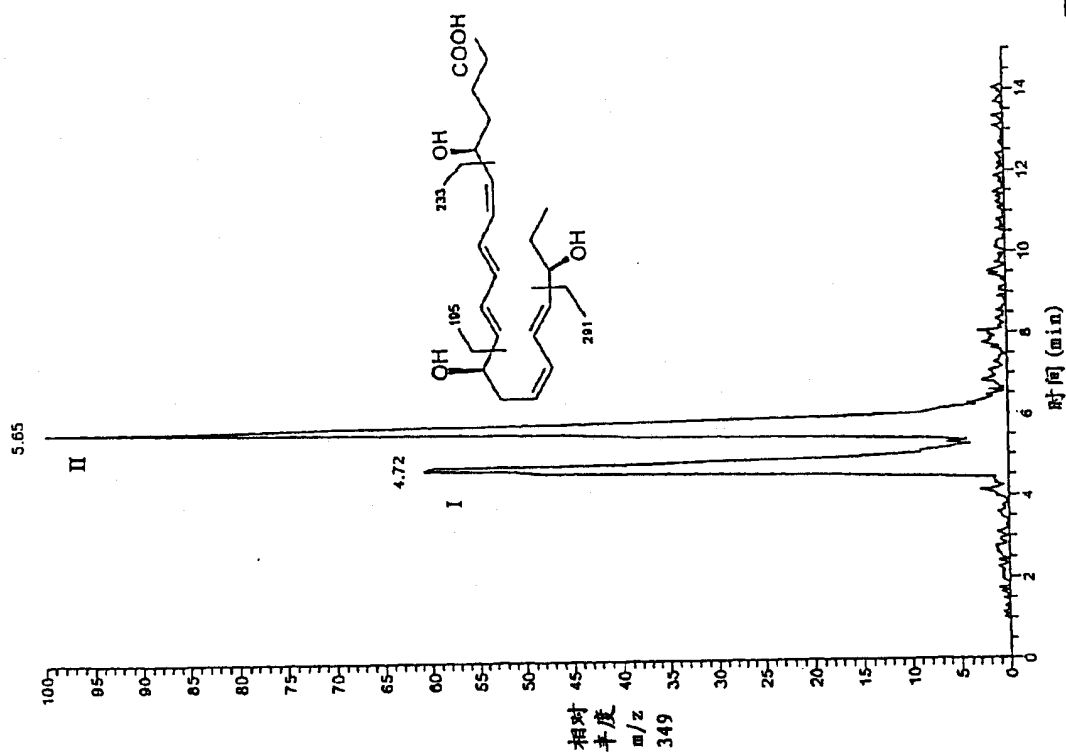
图 4



5

图

巨大芽孢杆菌产生的 5,12,18-三-HEPE 的 MS



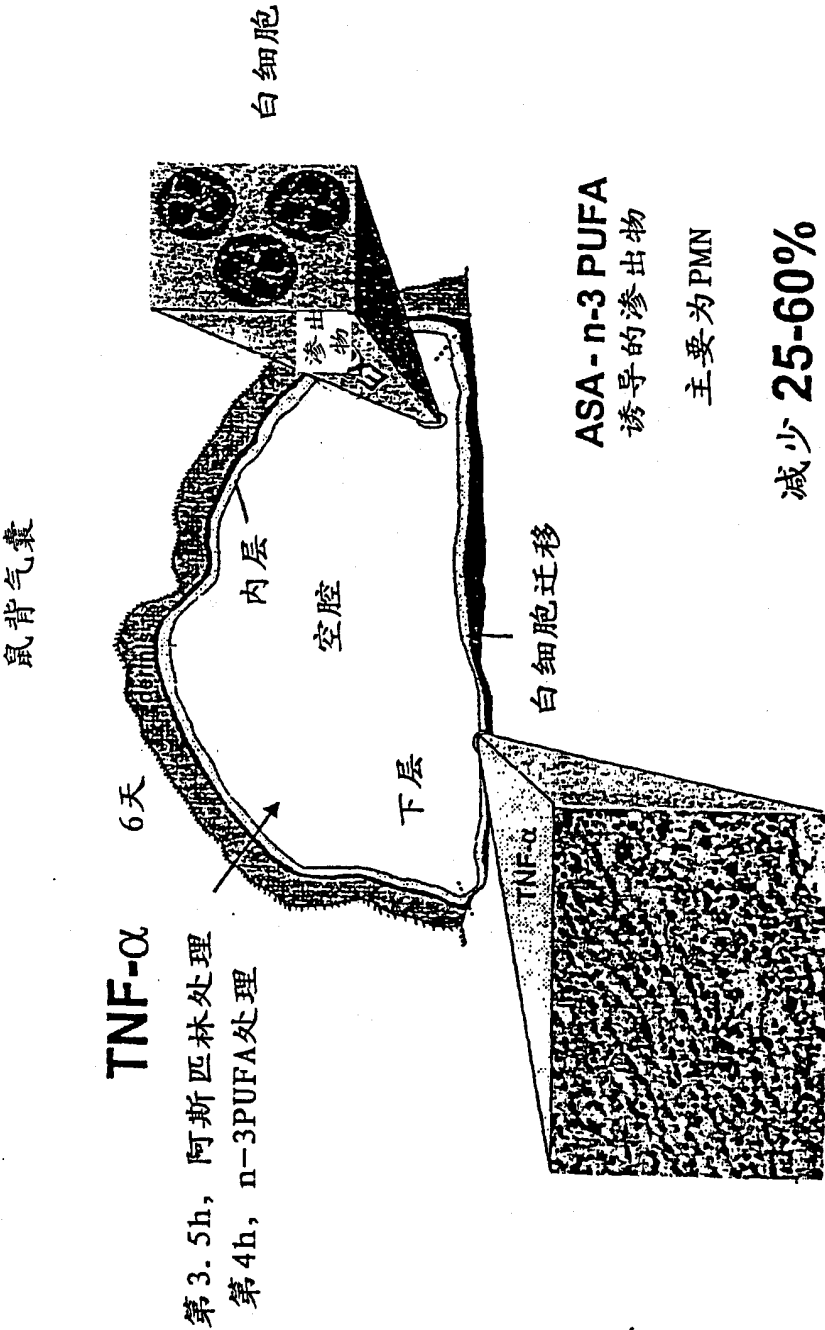


图 6

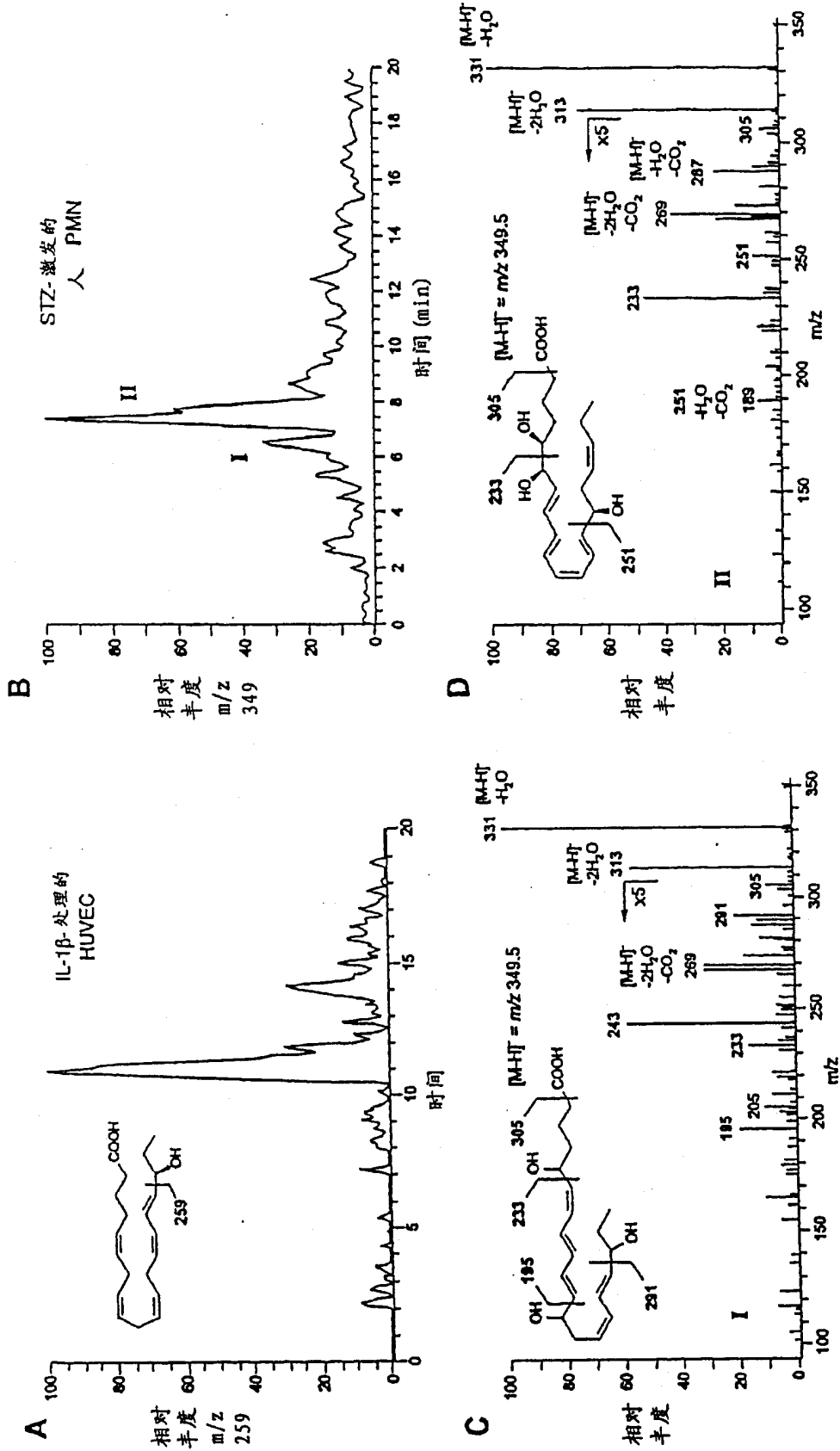
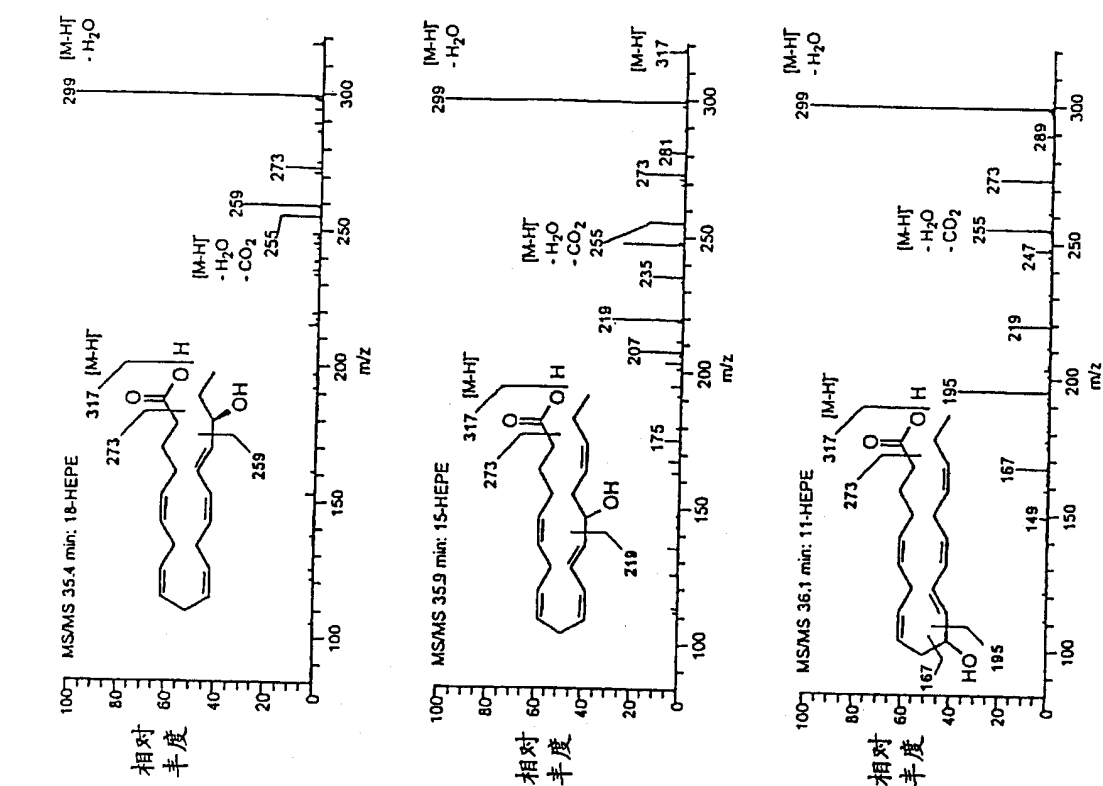
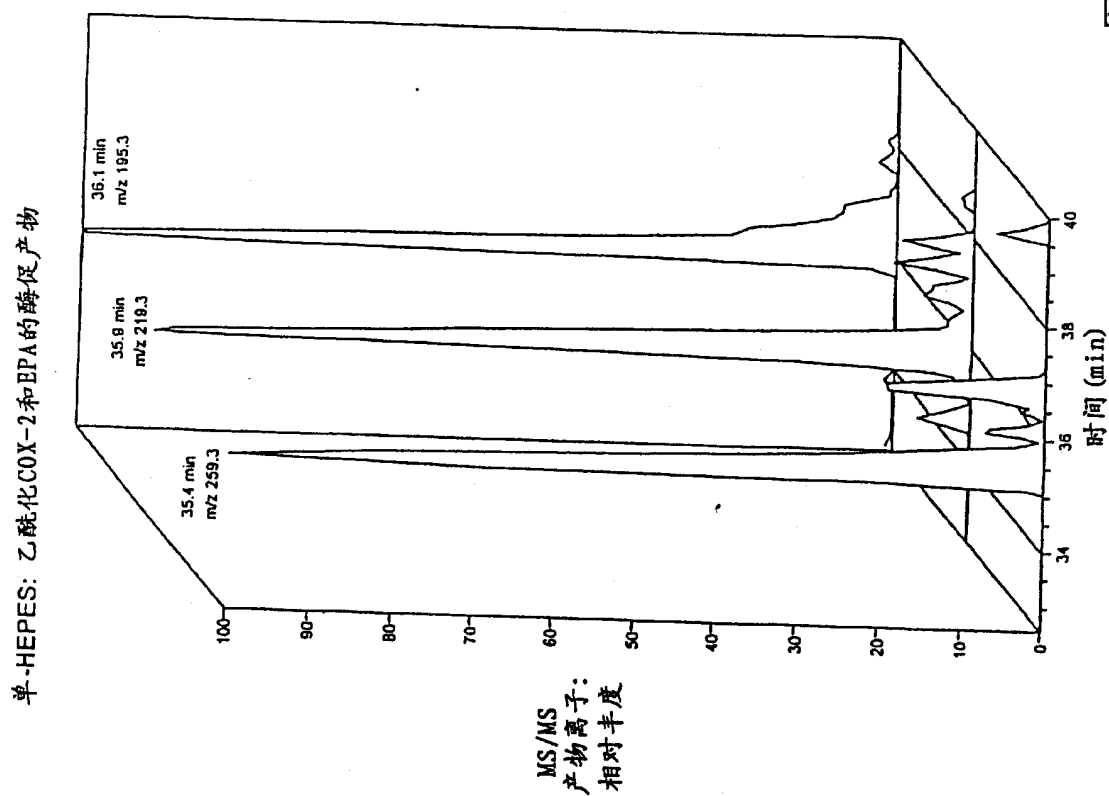


图 7



8



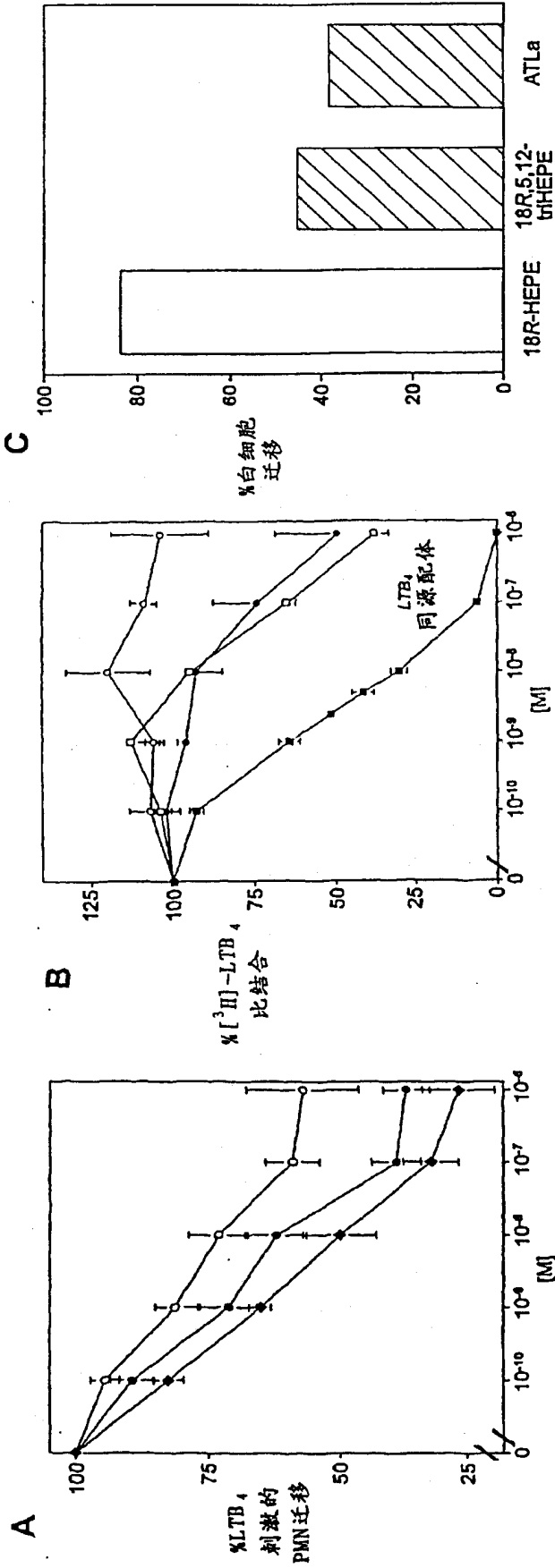
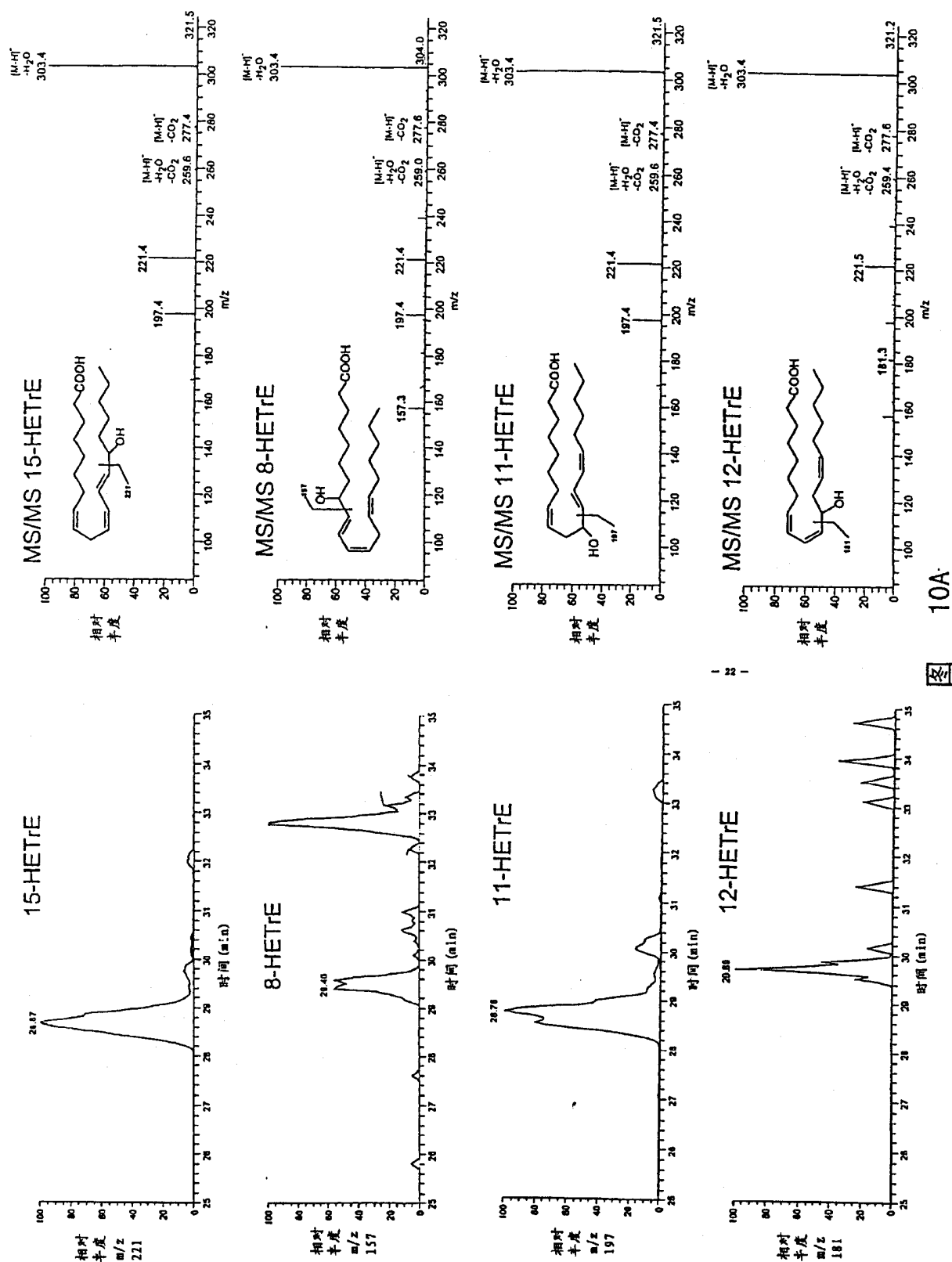


图 9



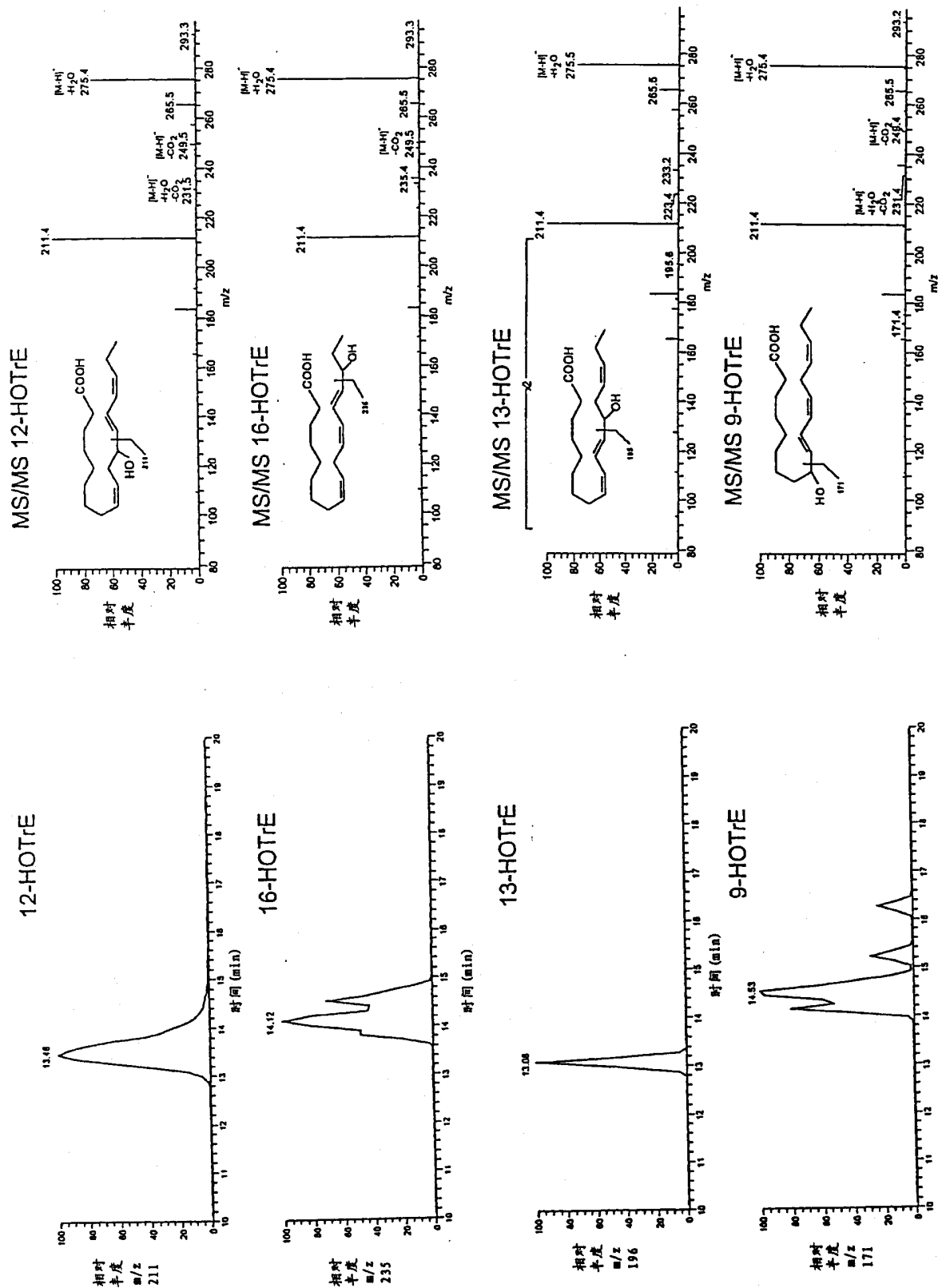
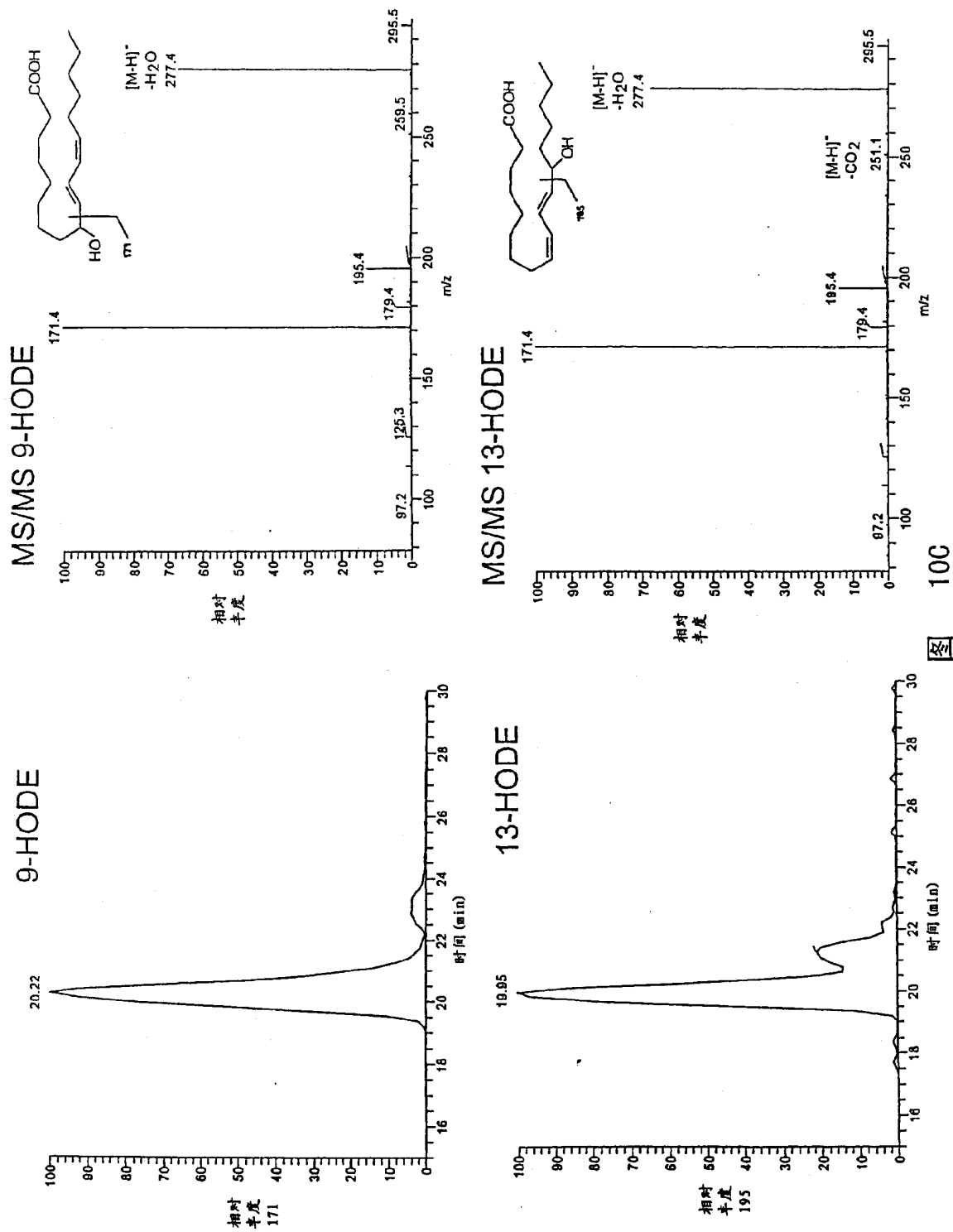


图 10B



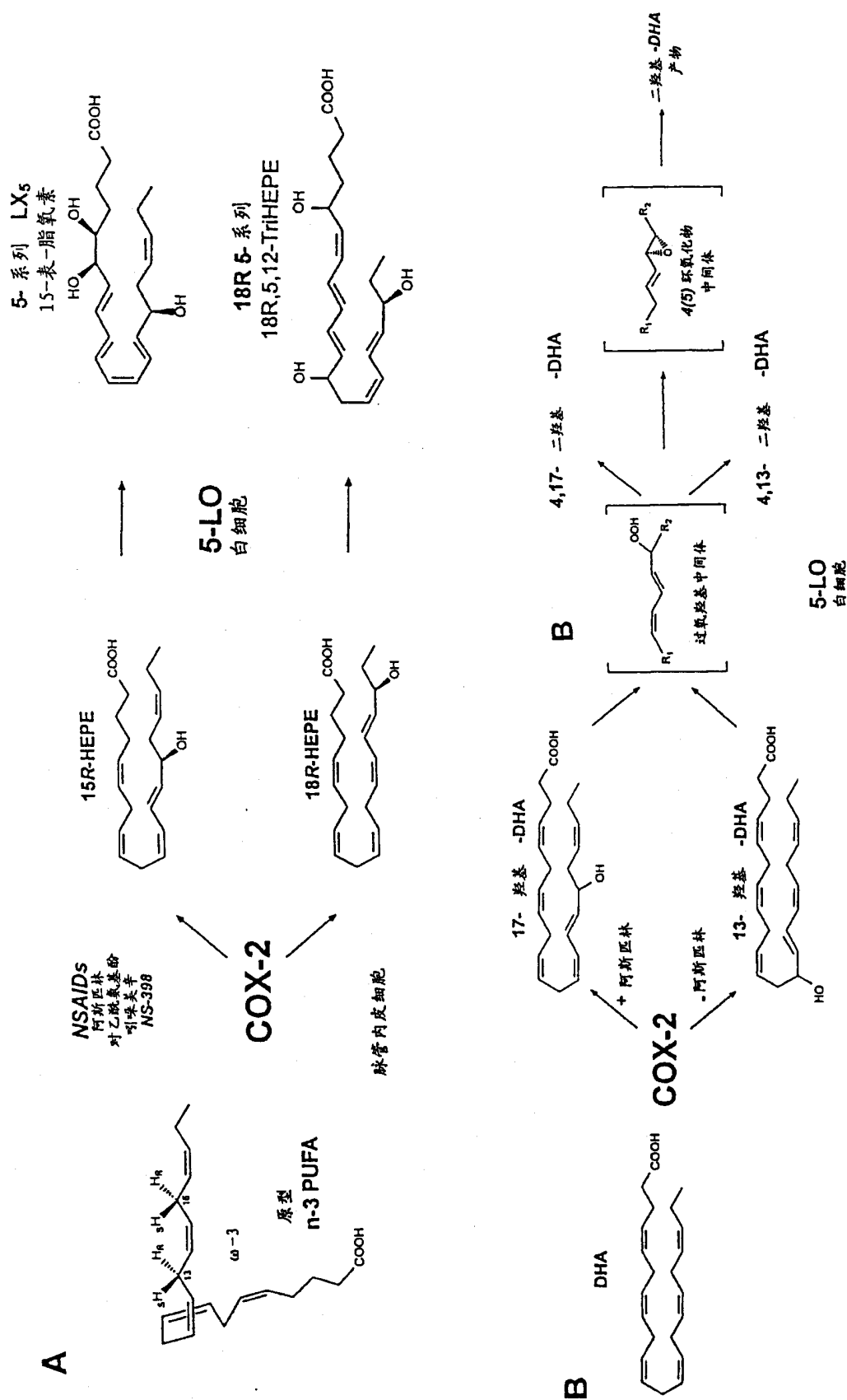


图 11

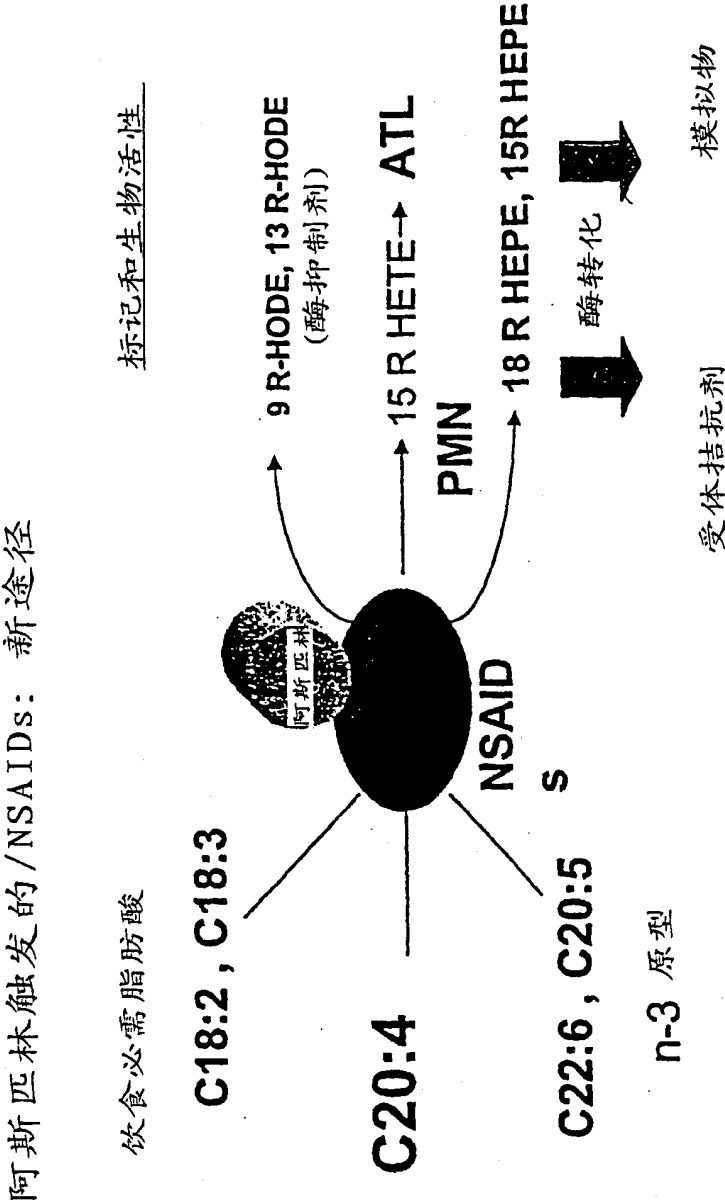
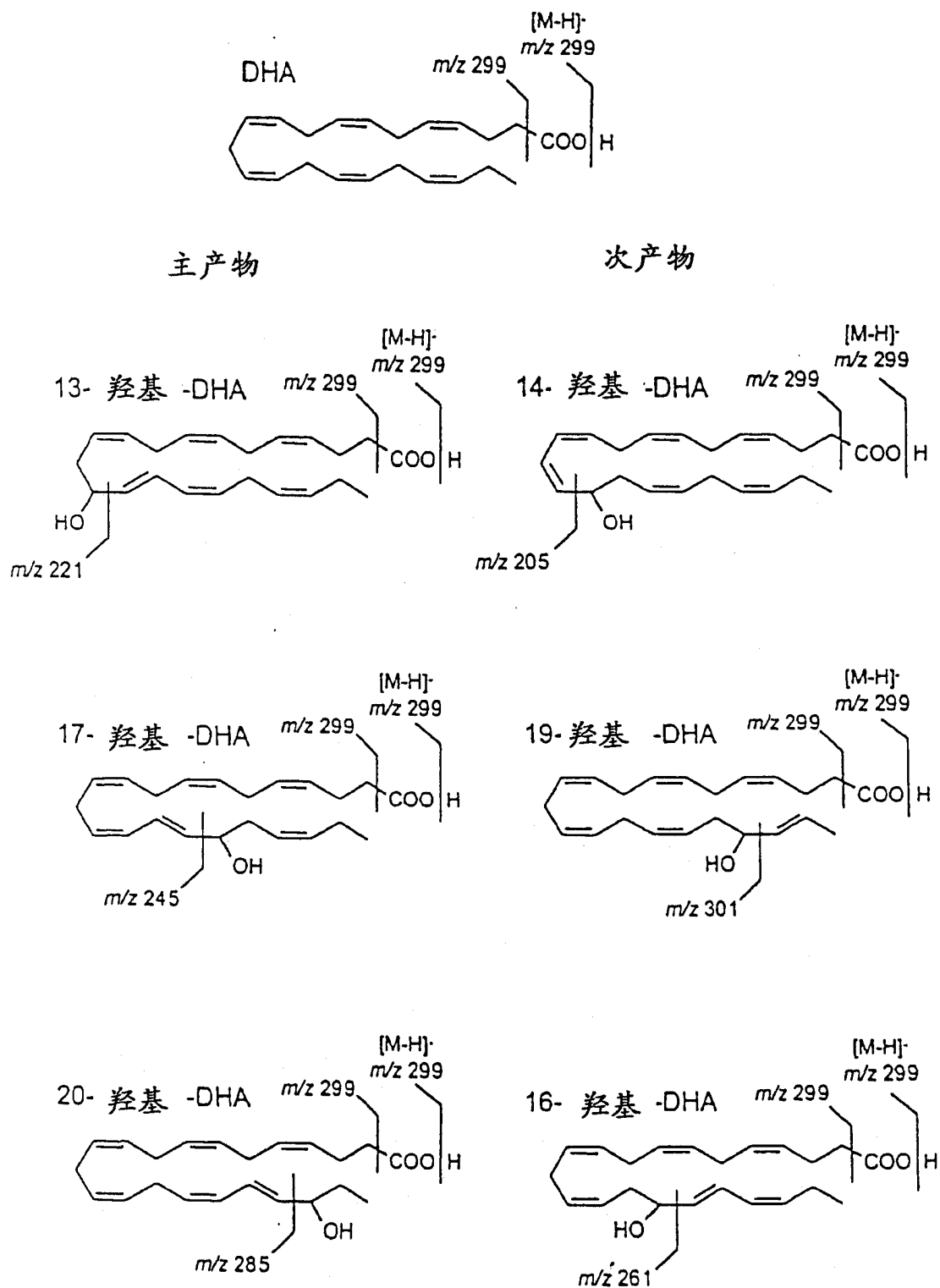


图 12



图

13

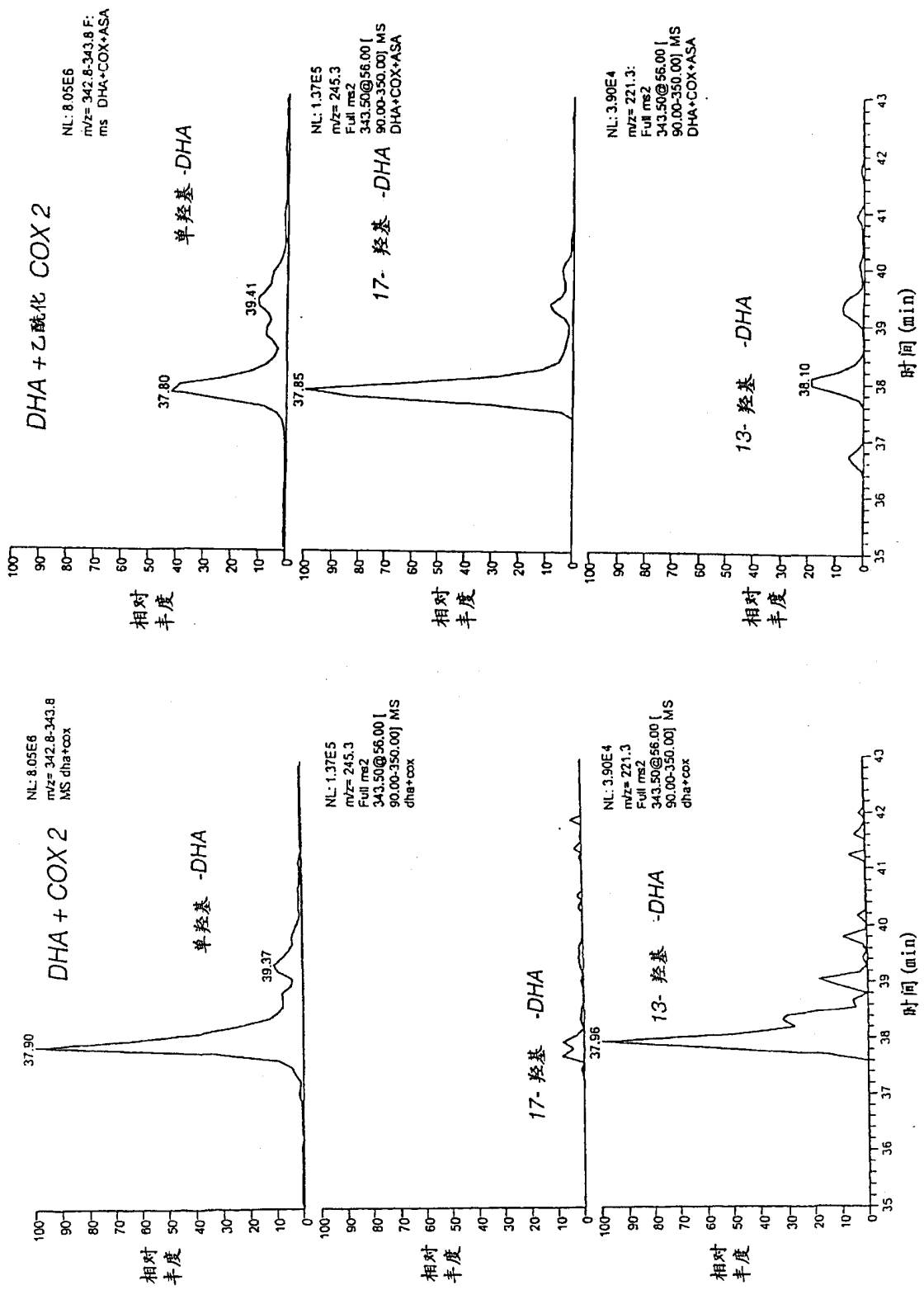


图 14A

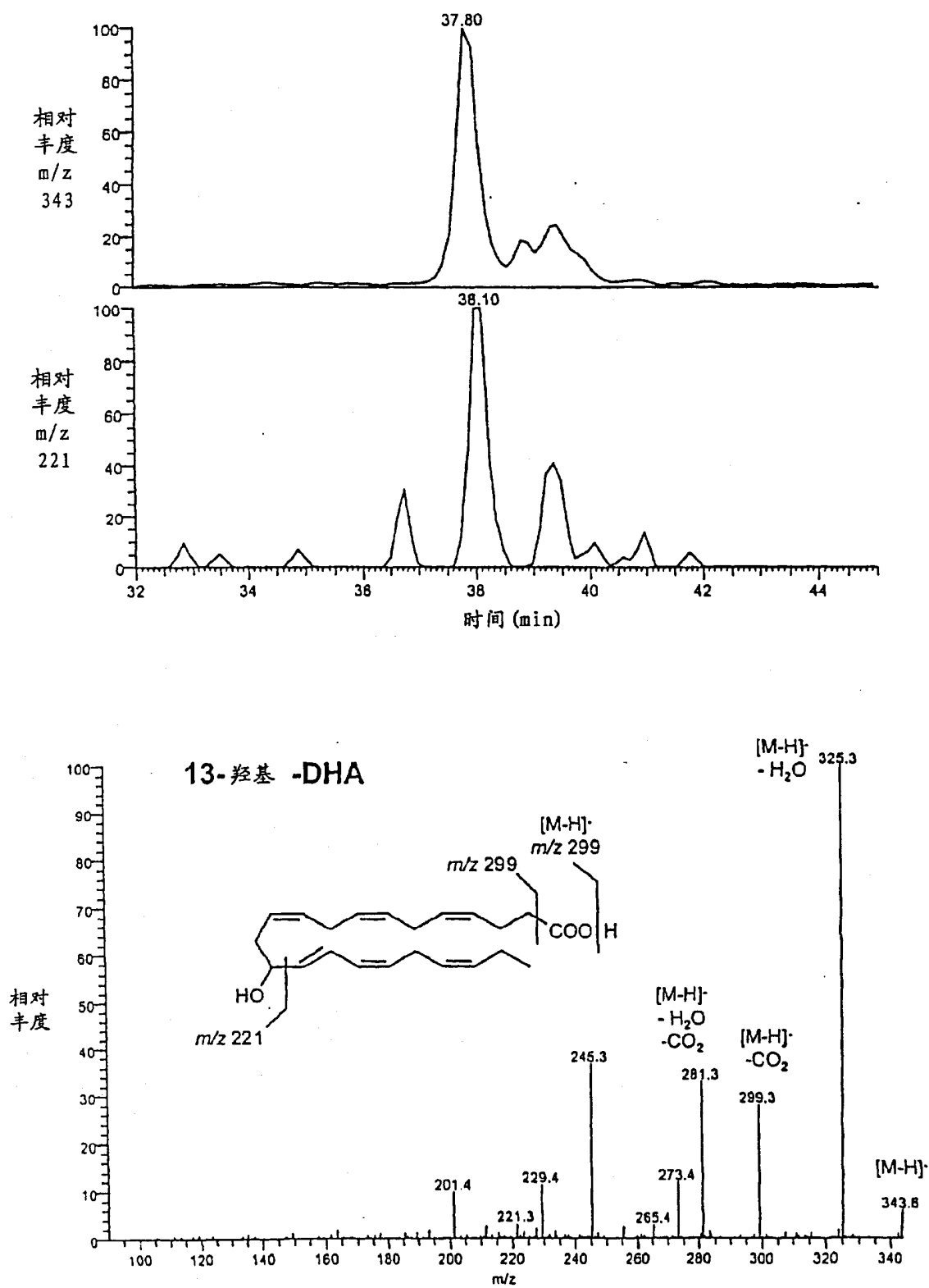


图 14B

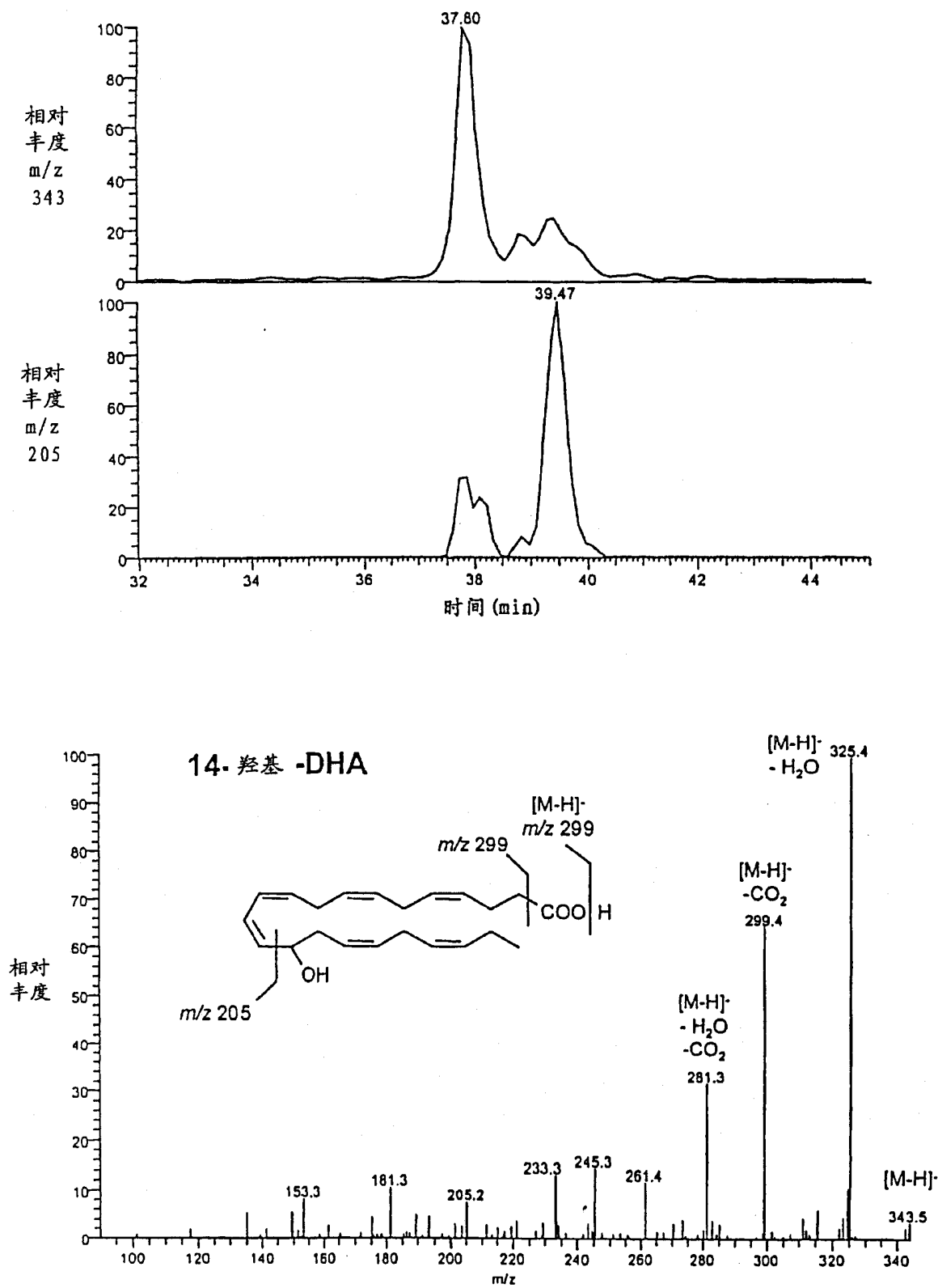


图 14C

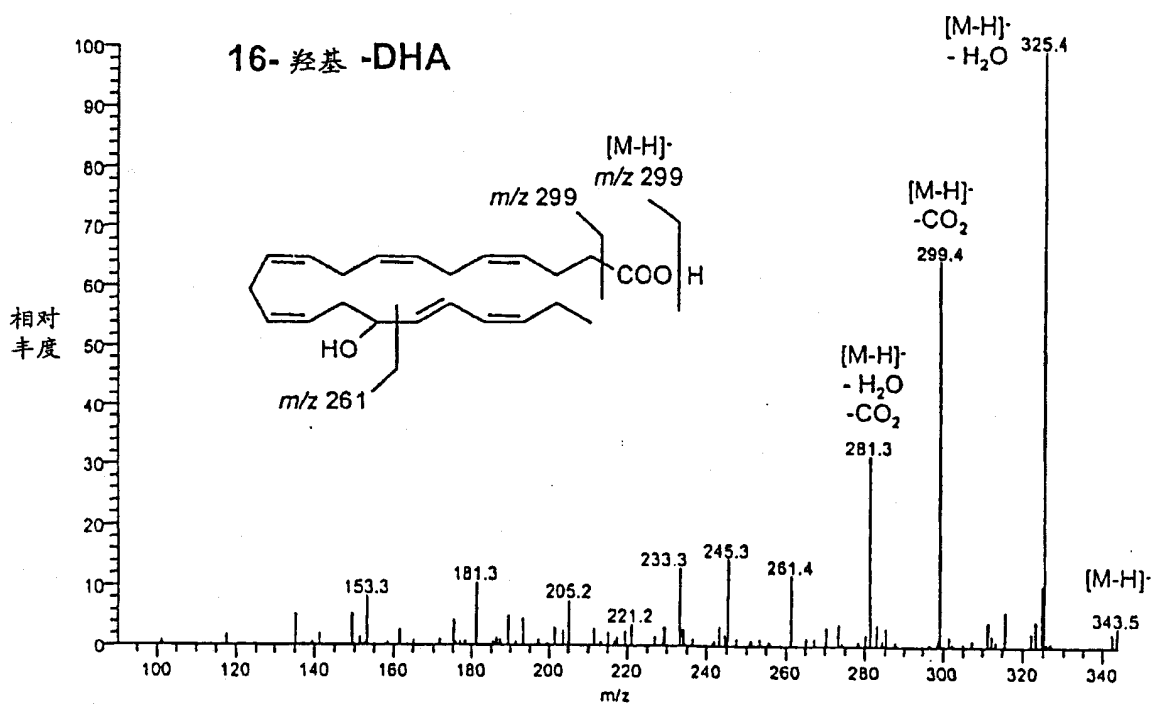
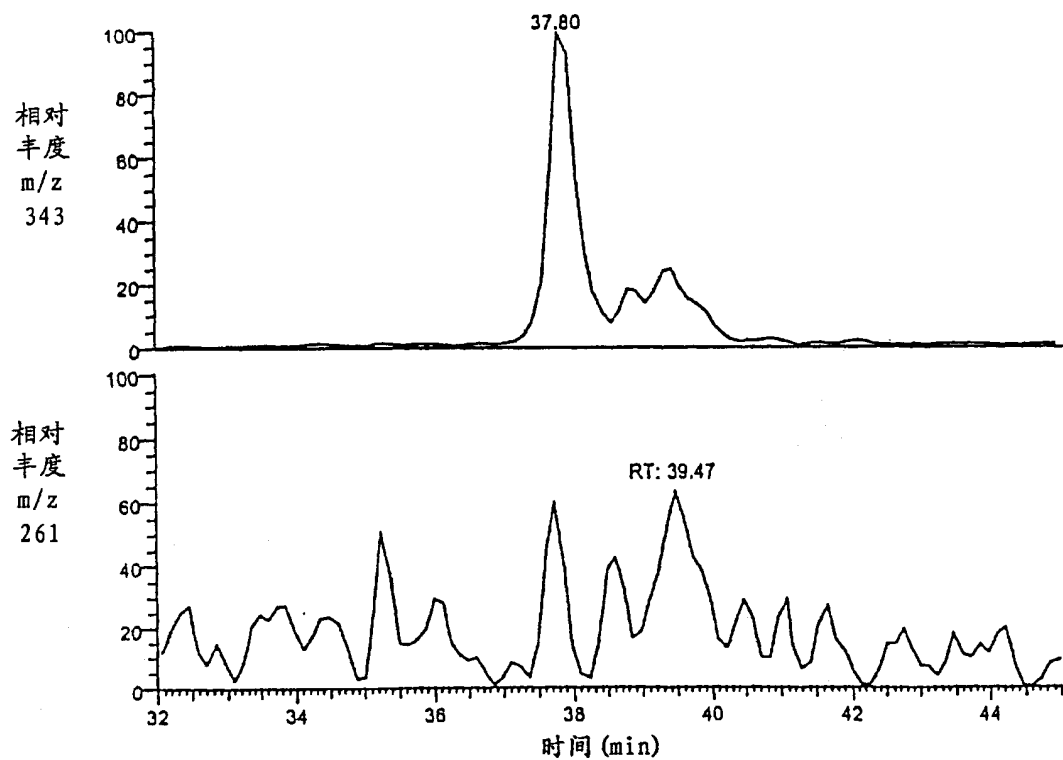


图 14D

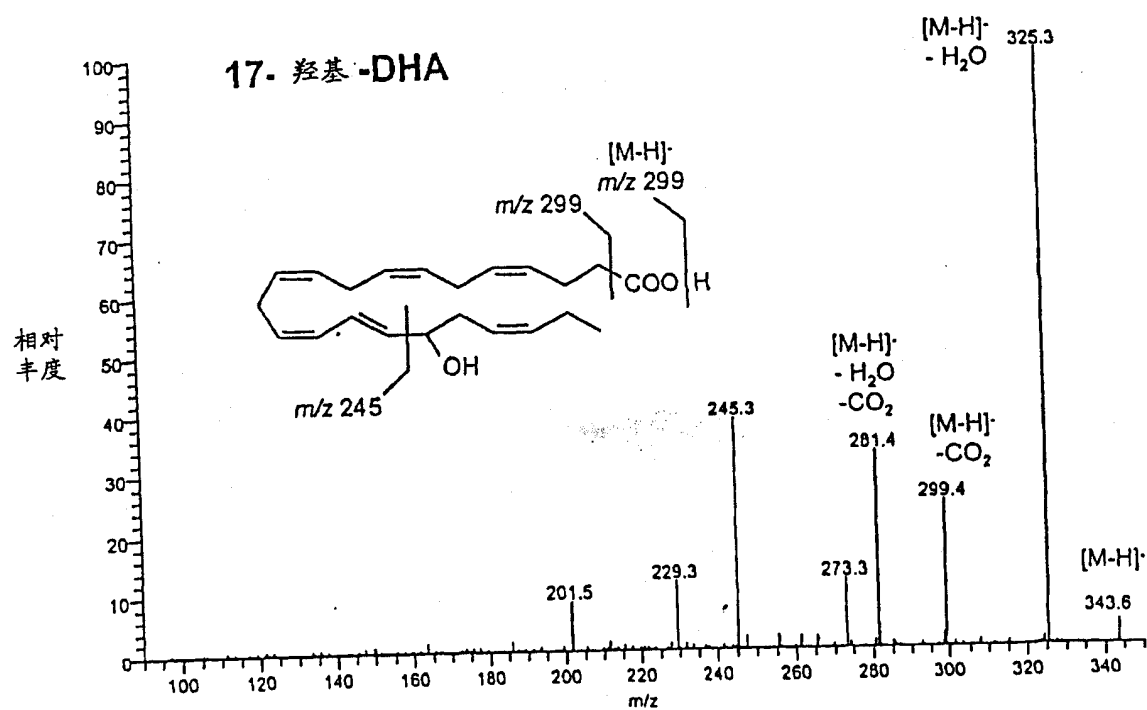
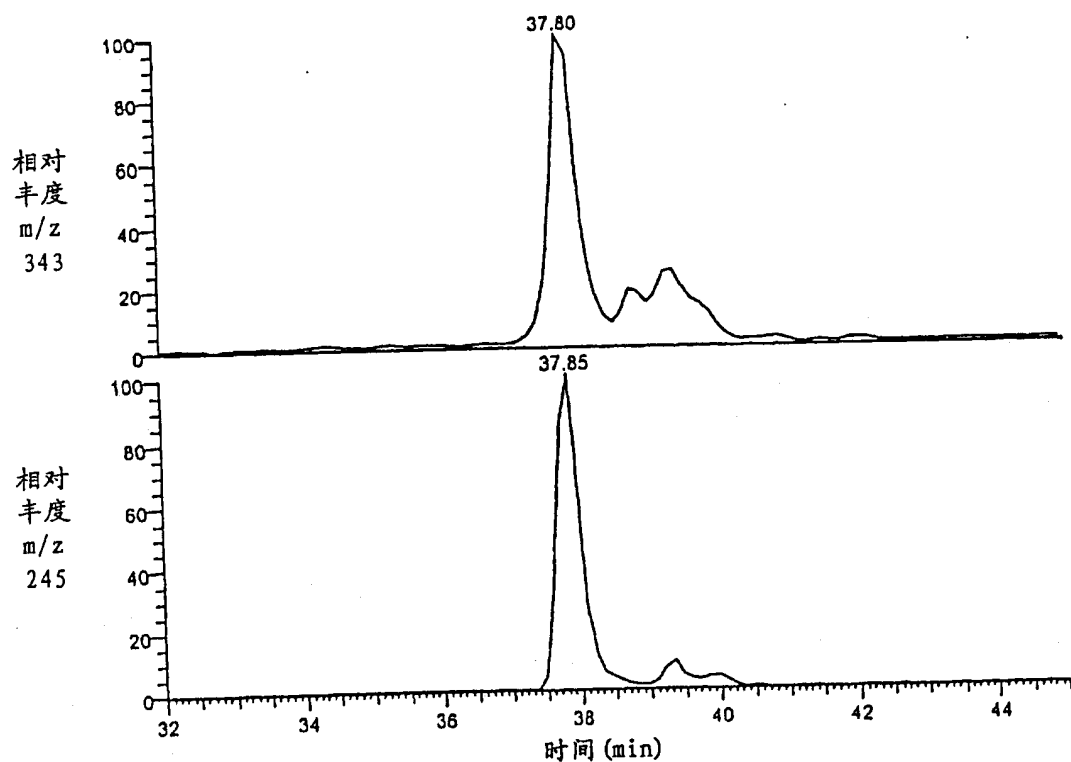


图 14E

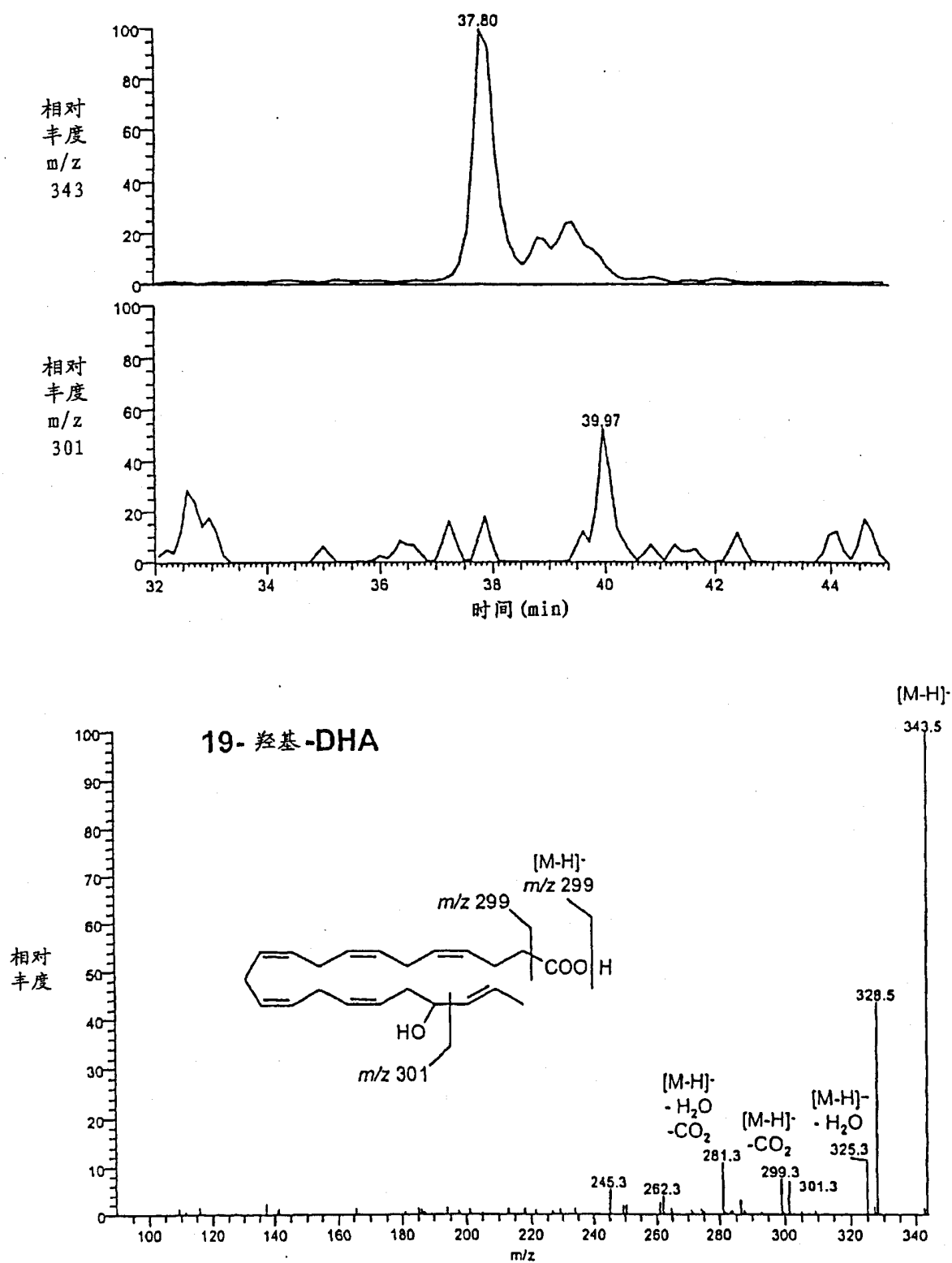


图 14F

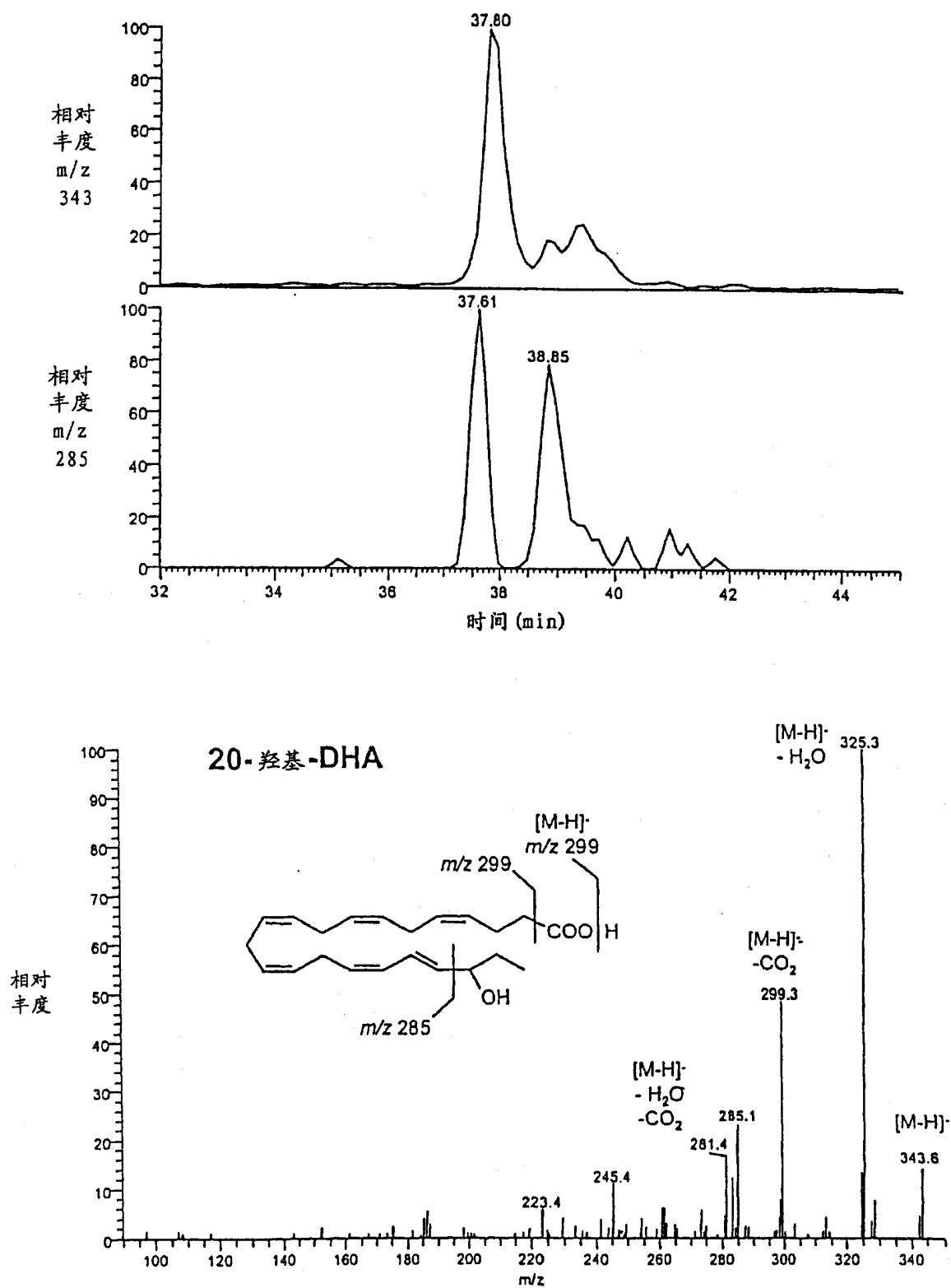
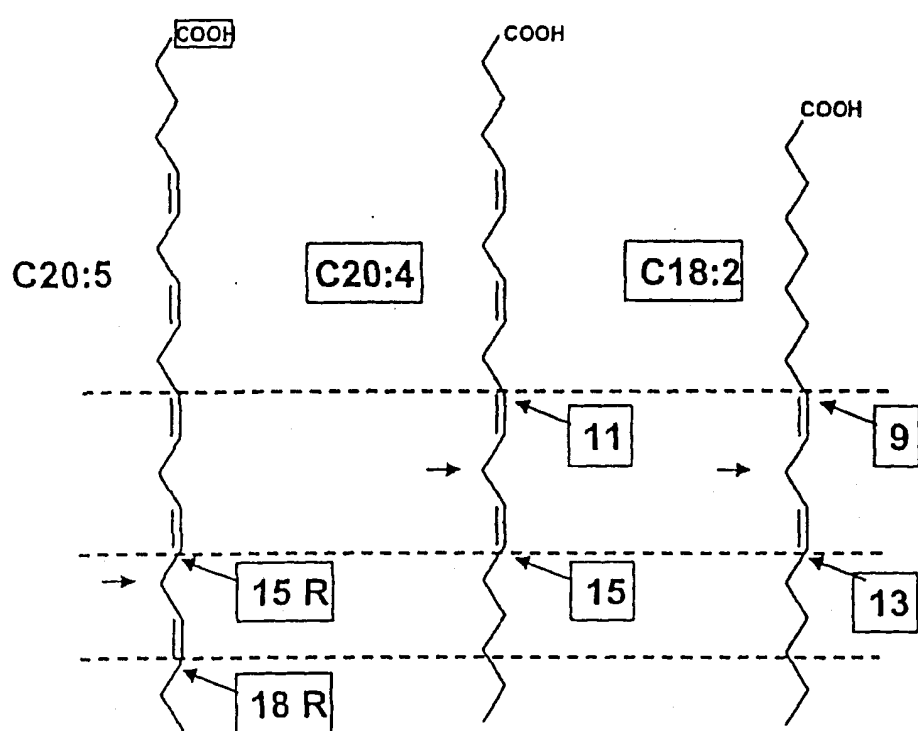


图 14G

PUFA & ASA-COX-2



区域选择性

图 15