[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C07C233/49
//A61K31/16

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95195864.X

[43] 授权公告日 2003 年 5 月 21 日

[11] 授权公告号 CN 1109016C

[22] 申请日 1995.10.25 [21] 申请号 95195864.X

[30] 优先权

[32] 1994.10.26 [33] AU [31] PM9065

[86] 国际申请 PCT/AU95/00717 1995.10.25

[87] 国际公布 WO96/13507 英 1996.5.9

[85] 进入国家阶段日期 1997.4.25

[71] 专利权人 肽技术有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

共同专利权人 阿德莱德妇幼医院

[72] 发明人 弗雷德·威德默 保罗·亚当·肖伯
玛丽琳·乔伊·斯莱
安东尼奥·费兰特
阿尔弗雷德·普洛斯
德博拉·安·拉特延

[56] 参考文献

US5216023A 1993.06.01 A61K31/24

审查员 刘桂明

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 刘国平

权利要求书 2 页 说明书 20 页 附图 4 页

[54] 发明名称 合成的多不饱和脂肪酸类似物

[57] 摘要

本发明提供了具有抗疟和/或刺激嗜中性白细胞活性或者抗炎活性的多不饱和脂肪酸化合物。所述的多不饱和脂肪酸含有一 16—26 个碳原子链，3—6 个双键并在羧酸基团与一氨基酸共价偶联。优选的是脂肪酸含有 18—22 个碳原子，氨基酸是甘氨酸或天冬氨酸。优选的化合物是 γ—亚麻酸—甘氨酸，α—亚麻酸—甘氨酸，花生四烯酸—甘氨酸，廿二碳六烯酸—甘氨酸，二十碳五烯酸甘氨酸，γ—亚麻酸—天冬氨酸，α—亚麻酸—天冬氨酸，花生四烯酸—天冬氨酸，二十碳五烯酸—天冬氨酸和廿二碳六烯酸—天冬氨酸。

ISSN1008-4274

1、多不饱和脂肪酸化合物在制备用于刺激嗜中性白细胞活性和/或治疗疟疾感染和/或治疗炎症的药物中的应用，其中所述多不饱和脂肪酸包含 16－26 个碳原子和 3－6 个双键，而且该多不饱和脂肪酸在羧酸基团处与一氨基酸共价偶联。

2、如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂肪酸包含 18－22 个碳原子。

3、如权利要求 1 所述的应用，其中所述氨基酸是甘氨酸或天冬氨酸。

4、如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂肪酸是 n-3 至 n-6 化合物。

5、如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂肪酸是 γ －亚麻酸。

6、如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂肪酸是 α －亚麻酸。

7、如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂肪酸是花生四烯酸。

8、如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂肪酸是二十碳五烯酸。

9、如权利要求 1 所述的应用，其中所述脂肪酸是廿二碳六烯酸。

10、一种具有嗜中性白细胞刺激活性和/或抗疟疾活性和/或抗炎活

性的药物组合物，其包含具有 16－26 个碳原子和 3－6 个双键的多不饱和脂肪酸化合物以及药物学上可接受的载体，而且该多不饱和脂肪酸在羧酸基团处与选自甘氨酸和天冬氨酸的氨基酸共价偶联。

11、如权利要求 10 所述的组合物，其中所述脂肪酸包含 18－22 个碳原子。

12、如权利要求 10 所述的组合物，其中所述脂肪酸是 n-3 至 n-6 化合物。

13、如权利要求 10 所述的组合物，其中所述脂肪酸是 γ －亚麻酸。

14、如权利要求 10 所述的组合物，其中所述脂肪酸是 α －亚麻酸。

15、如权利要求 10 所述的组合物，其中所述脂肪酸是花生四烯酸。

16、如权利要求 10 所述的组合物，其中所述脂肪酸是二十碳五烯酸。

17、如权利要求 10 所述的组合物，其中所述脂肪酸是廿二碳六烯酸。

合成的多不饱和脂肪酸类似物

本发明涉及具有抗疟活性和/或刺激嗜中性白细胞活性的新的多不饱和脂肪酸，另外，某些这类新的多不饱和脂肪酸抑制细胞因子活性。

世界上超过半数的人口处于疟疾的危险之中，每年记载约有5亿人患急性感染，约有一百万人死亡（热带病进展国际研究， 1987 - 1988，第九计划报告， UNDP/世界银行/WHO，日内瓦， 43 - 49； Stevenson MM 编辑的《疟疾：宿主对感染的反应》前言， CRC 出版公司）。使用抗疟药物伴有许多严重问题，因为对抗疟药物的抗性不断增加，并且抗疟药物有毒副作用。许多目前使用的抗疟药物不适用于儿童（大多数处于潜伏的致命脑疟疾的危险之中）、孕妇和老年人。

嗜中性白细胞/巨噬细胞刺激剂可以用于治疗其它感染，包括假丝酵母感染、锥虫感染、病毒如肝炎病毒和新培斯病毒感染、军团菌感染、李斯特氏菌病感染、肺囊虫感染、假单胞菌感染。它们也可用于遭受免疫损害的个体包括癌症化疗病人、移植受体和烧伤病人的辅助治疗。另外，也可治疗其它所谓正常的个体，例如老年人、 2 周岁以下儿童、饮酒过度的人，已知这些人的吞噬细胞活性较差。

炎症可能由细菌、病毒和/或其它感染原、机会性感染（其可能由免疫力降低状态引起，例如由癌症或治疗特别是胞毒性药物治疗或放疗所致）、自身免疫性或其它原因引起。脓毒休克是是与系统性炎症相关的疾病的一个例子，通过将 LPS 给予动物可以在动物中重现革兰氏阴性脓毒休克的许多临床特征，其可以促发严重的代谢和生理变化，从而导致死亡。与 LPS 感染相关的是促炎细胞因子如肿瘤坏死因子α （ TNFα ）的过度产生。将 TNF 长期给予小鼠、大鼠和/或人会导致厌食、体重下降并在 7 - 10 天内耗竭体内脂类和蛋白质（ Cerami 等人， 1985，免疫学通信 11， 173； Fong 等人， 1989，实验医学杂志 170， 1627； Moldawer 等人，美国生理学杂志 254 G450 - G456，1988； Fong 等人，美国生理学杂志 256， R659 - R665 （ 1989 ）； McCarthy 等人，美国临床自然杂志， 42， 1179 - 1182 ）。在伴有极度瘦弱的癌症病人和慢性病人中的 TNF 水平已经被测量。

TNFα 已被牵涉在除毒性休克和癌症相关的极度瘦弱以外的其它伴有慢性炎症的疾病的病理中。已在患有类风湿病和反应性关节炎的病人的滑液以及患有类风湿性关节炎的病人的血清中检测到 TNF （ Saxne 等人， 1988，关节炎和类风湿病， 31， 1041 ）。在肾移植病人的急性排斥期检测到升高水平的 TNF （ Maury and Teppo， 1987，实验医学杂志， 166， 1132 ）。在动物中，已证明 TNF 牵涉在异源骨髓移植后在皮肤和肠道的移植物对宿主疾病的病理中。

给予兔抗小鼠 TNF 抗体已证明能防止与移植物对宿主疾病相关的组织学变化并降低死亡率（ Piquet 等人， 1987，实验医学杂志， 166， 1220 ）。也已证明 TNF 与疟疾病理也显著相关（ Clark 等人， 1987，美国病理学杂志， 129， 192 - 199 ）。另外，在疟疾病人中报道了升高的 TNF 血清水平（ Scuderi 等人， 1986，柳叶刀， 2， 1364 - 1365 ）。

已进一步发现升高的促炎细胞因子水平在类风湿性关节炎、多发性硬化症（ MS ）和 Crohns 氏症中引起病理和组织遭受破坏。实验发现中和细胞因子产生细胞活性的抗体（例如抗 CD4+ T 细胞的抗体或抗 CD3 的抗体）或者中和细胞因子本身活性的抗体（例如抗 TNF 抗体）是有益的。已知高水平的干扰素γ与 MS 的病势加重有关。

PUFA's 具有一系列的有用生物学活性（例见国际专利申请 WO93/00084 和 WO95/00607 及其引述的参考文献）。不幸的是由于其在体内的稳定性有限，因此 PUFA's 还不能广泛用作治疗剂。本发明人开发了一种将氨基酸偶联到 PUFAs 的方法，使得 PUFAs 在保持生物学活性的同时具有增加的稳定性和溶解性。这些新的聚不饱和脂肪酸（ PUFA ）化合物具有直接的抗疟疾活性，除了其直接的抗疟疾活性外，某些新的 PUFA 能活化人嗜中性白细胞释放颗粒成分，并在生产超氧化物中与 TNF 显示有协同效应。PUFA 对人嗜中性白细胞的活化导致这些细胞具有增强的杀死血红细胞中的疟疾寄生虫（恶性疟原虫， P.falciparum ）以及细菌金黄色葡萄球菌的活性。

另外，本发明人还发现某些氨基酸偶联的 PUFA 是抗炎的，它们在不能活化嗜中性白细胞的同时降低了促炎细胞因子的产生。

因此，本发明涉及具有抗疟疾和/或嗜中性白细胞刺激活性或者抗炎活性的不饱和脂

肪酸化合物，所述的不饱和脂肪酸含有一 16 - 26 个碳原子链， 3 - 6 个双键，其中该不饱和脂肪酸在羧基端与一氨基酸共价偶联。

在本发明的一个优选实施方案中，脂肪酸含有 18 - 22 个碳原子。

在本发明的另一个优选实施方案中，氨基酸是甘氨酸或天冬氨酸。

在本发明的又一个优选实施方案中，脂肪酸是一种 n-3 至 n-6 化合物。

在本发明的再一个优选实施方案中，该化合物是γ - 亚麻酸 - 甘氨酸，α - 亚麻酸 - 甘氨酸，花生四烯酸 - 甘氨酸，廿二碳六烯酸 - 甘氨酸，二十碳五烯酸甘氨酸，γ - 亚麻酸 - 天冬氨酸，α - 亚麻酸 - 天冬氨酸，花生四烯酸 - 天冬氨酸，二十碳五烯酸 - 天冬氨酸，廿二碳六烯酸 - 天冬氨酸。

为更清楚地了解本发明的实质，参照下列实施例和附图描述本发明的优选形式:

图 1 和 2 示出 PUFAs 对释放嗜苯胺蓝颗粒的作用;

图 3 示出用 PUFAs 处理后嗜中性白细胞特异性颗粒成分的释放; 以及

图 4 示出 PUFA 对嗜中性白细胞介导的金黄色葡萄球菌的杀灭的作用。

在这些附图中使用了如下缩写:

20:4	花生四烯酸
20:5	二十碳五烯酸
22:6	廿二碳六烯酸
gly	甘氨酸
asp	天冬氨酸

表 1 示出氨基酸偶联的 PUFAs 的直接抗疟疾活性。

表 2 示出氨基酸偶联的 PUFAs 抑制 PHA 刺激的外周血单核细胞产生 TNFα 和干扰素 γ 的活性。

表 3 示出氨基酸偶联的 PUFAs 抑制外周血单核细胞的经 PHA 刺激增殖（主要是 T 细胞增殖）的活性。

方法

嗜中性白细胞的制备

来自正常健康个体的肝素化血在 Ficoll-Hypaque 培养基上培养至密度为 1.114，然后于室温在 600g 离心 30 - 40 分钟，细胞在 Hanks 平衡盐溶液（ HBSS ）中洗三次。所得制剂对于白血细胞为 96 - 99 %纯，根据其排除台盼蓝的能力鉴定其>99 %存活。血红细胞的污染总是低于 1 %嗜中性白细胞，血小板的污染通常不存在。

脂肪酸微胶粒的制备及嗜中性白细胞的预处理

为解决脂肪酸在水溶液中的不溶性，通过超声波处理在 HBSS 中制备混合的二棕榈酰磷酯酰胆碱（ DPC， 400μg ）：脂肪酸（ 100μg ）微胶粒。嗜中性白细胞在 37 ℃预处理 30 分钟。在一些实验中，将 PUFA 溶于乙醇。

嗜中性白细胞化学发光的测量

向 100μl 在 HBSS 中的嗜中性白细胞（ 1×10^6 ）中加入 100μl 脂肪酸微胶粒或者 DPC 以及另外 300μlHBSS，随后立即加入 500μl 光泽精（ 0.25mg/ml 于 PBS 中），在发光计中测量一段时间的光输出（ mV ）。用来自不同个体的细胞进行三份重复实验，所得值代表反应的峰值。

脱粒的测量

通过测量维生素 B12 结合蛋白（如 Gottlieb 等人， 1965，血液， 25： 875 - 883 所述）和β - 葡糖醛酸酶释放（如 Kloldeney and Mumford， 1976，临床化学年鉴， 70： 247 - 257 ）测定脱粒。

杀菌检测

根据 Ferrante and Abell， 1986，感染免疫学， 51： 607 所述程序测定嗜中性白细胞对金黄色葡萄球菌的杀菌活性。

单核细胞增殖检测

如 Ferrante and Thong （ 1978...）所述从正常人供体的外周血分离单核细胞，将单核细胞重悬于含 20 %人 AB 血清的 RPMI - 1640 中并置入 96 孔微板中（每孔 50μl，细胞密度为 4 × 10^6细胞/ml ）。随后加入 50μl 脂肪酸并与细胞在 37 ℃、 5 % CO_2下预温育 30 分钟，然后加入 100μl 促分裂原（ PHA 、 ConA 、 PWM 、金黄色葡萄球菌）并与细胞在 37 ℃、 5 % CO_2下温育 66 小时，再加入含氚胸腺嘧啶（ 1μCi/孔）。总共培养 72 小时后，收集细胞并测量增殖（胸腺嘧啶掺入）和上清中是否存在细胞因子。

细胞因子检测

用抗细胞因子抗体通过特异性 ELISA 测定培养物上清中的细胞因子水平，测定下述细胞因子水平： TNFα 、 TNFβ 、干扰素γ 、 IL - 1β 、 IL - 2 。

化学合成

花生四烯酸 - 甘氨酸 - OH

将花生四烯酸（ 0.50g ）溶于 DMF （ 2.0ml ），并加入 HOSu(0.38g 于 0.5mlDMF 中)和 H - Gly-OtBu.HCl(0.55g 于 1.5mlDMF 中)，将混合物在冰浴中冷却。加入 DCC(0.41g 于 0.5mlDMF 中)，再加入 N - MM 并将混合物在冰浴中搅拌 30 分钟，然后在室温搅拌 20 小时。反应未进行完全，约有 20 - 3 %花生四烯酸未反应。加入更多的 DCC(0.16g)、HOSu(0.19g)、 H-Gly-OtBu.HCl(0.20g)和 N - MM(0.24g)并将混合物搅拌 24 小时。滤掉 DCU ，用制备 HPLC 分离产物并冻干得到一种浅绿色油(0.67g, 98%)。在冰浴中将花生四烯酸 - Gly-OtBu 重溶于纯三氟乙酸（ 40ml ）并搅拌 30 分钟，然后在室温继续搅拌 30 分钟。蒸发除去 TFA 得到花生四烯酸 - Gly - OH ，其为泥浆状绿色油(0.53g)。用 HPLC 将其纯化并冻干得到浅黄色胶状固体(0.23g, 39%)。

纯化

制备 HPLC 条件:

缓冲液 A： 0.1% TFA/H_2O, 缓冲液 B： 0.1% TFA/10%H_2O/90%CH_3CN 。

40ml/min, 214nm, C18 semiPrePak

逐步增量 % B： 10--20--30--40--50--60--70--80--90--100 % B 。

花生四烯酸在 60 % B 处洗脱，在 75 - 80 % B 处洗脱，花生四烯酸 - Gly-OtBu 在 80 - 85 % B 处洗脱。

1 、 HPLC

缓冲液: 0.1% TFA/10%H_2O/90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

isocratic

组分的保留时间:

花生四烯酸: Rt 4.14 分钟

花生四烯酸 - Gly - OH： Rt 2.78 分钟

花生四烯酸 - Gly-OtBu： Rt 5.23 分钟

2 、 ^{13}C n.m.r.

花生四烯酸 - Gly - OH

(DMSO-d6): 14.1. C20, 22.1. 25.4. 26.4. 26.8. 28.9. 31.0, 34.7. 10 x CH_2: 40.7. Ga; 127.7, 127.85. 127.93, 128.2, 128.3, 129.6, 130.1, 8 x CH; 171.5. C=O. G: 172.5, C1.

3 、 FAB - MS

m/z 362(M+1)

4 、氨基酸分析

存在甘氨酸

花生四烯酸 - 天冬氨酸 - OH

将花生四烯酸、 HOSu 和 H - Asp(OtBu)-OtBu.HCl 一起溶于 DMF(3ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入在 DMF 中的 DCC(0.7ml)。加入 N - MM 并搅拌混合物 20 小时，

约剩余 20 % 花生四烯酸。加入更多的 HOSu(0.19g)、 H - Asp(OtBu)-OtBu.HCl(0.30g)、DCC(0.16g)和 N - MM(0.24g)，继续搅拌混合物 20 小时。滤掉 DCU 并用 HPLC 分离产物。纯化的 Ara - Asp(OtBu)-OtBu 浓缩至油状并加入 TFA(25ml)。搅拌 1 小时后，蒸发除去 TFA，得到暗绿色油。花生四烯酸 - Asp - OH 用 HPLC 纯化，将纯化的 Ara-Asp-OH 组分合并、浓缩并冻干(于 tBu-OH 中)，得到棕色油（ 0.38g, 55%）。

纯化

HPLC 纯化:

缓冲液 A： 0.1% TFA，

缓冲液 B： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 SemiPrepPak

% B 的逐步增量： 10%--20--30--40--50--60--70--80--85--100%B 。

花生四烯酸在 70 % B 处洗脱。

花生四烯酸 - Asp(OtBu) - OtBu 在 80 % B 处洗脱。

花生四烯酸 - Asp - OH 在 60 % B 处洗脱。

分析

1 、 HPLC

缓冲液： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

isocratic

保留时间:

花生四烯酸： Rt 4.12 分钟

花生四烯酸 - Asp(OtBu) - OtBu： Rt 9.52 分钟

花生四烯酸 - Asp - OH： Rt 2.31 分钟

2 、 ^{13}C n.m.r.

花生四烯酸 - Asp - OH

(DMSO-d6): 14.1. CH_3; 22.1, 25.4. 26.4. 26.8. 28.9. 31.0. 31.5. 34.8. 10 x CH_2; 34.4, ??; 36.2, Dß; 48.7, Da; 67.1. ??; 127.7, 127.88, 127.97. 128.18. 128.23. 129.6, 130.1, 8 x CH; 171.6. D; 172.1, C=O, Asp; 172.7, C=O,

花生四烯酸。

花生四烯酸

_(DMSO-d6): 14.1. CH_3; 22.2, 24.6. 25.4. 26.3. 26.8, 26.9. 28.9. 31.1. 33.3, 10 x CH_2; 127.7, 127.9. 128.0. 128.2. 128.3. 128.4. 129.3, 130.1. 8 x CH; 174.5. C=O.

3、 FAB - MS 和 CI - MS

m/z 420(M+1)

4、氨基酸分析

存在天冬氨酸。

二十碳五烯酸 - 甘氨酸 - OH

将二十碳五烯酸、 H - Gly -(OtBu).HCl 和 HOSu 一起溶于 DMF(4ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入 DCC(在 1mlDMF 中)。加入 N -甲基吗啉并在冰浴搅拌混合物 20 分钟，然后室温搅拌混合物 20 小时，约剩 36 %二十碳五烯酸未反应。加入更多的 H - Gly -(OtBu).HCl(0.22g)、 HOSu(0.15g)、 DCC(0.16g)和 N - MM(0.27g)，继续搅拌混合物 20 小时。仍剩余一些二十碳五烯酸（由 HPLC 测出约 30 %），过滤混合物并用 HPLC 纯化粗产物，得到 Epe - Gly - OtBu，其为有色油（ 0.49g, 71%）。将油重溶于冷三氟乙酸(30ml)并搅拌 1 小时，蒸发除去 TFA，得到黑色油。粗 Epe - Gly - OH 用 HPLC 纯化，得到 0.13g （ 22 %）棕色油。

纯化

HPLC 纯化:

缓冲液 A： 0.1% TFA/H_2O

缓冲液 B： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 semiPrepPak

% B 的增量： 10--20--30--40--50--55 - 60--65--68--70%B 。

二十碳五烯酸和 Epe - Gly - OtBu 在 65 - 70 % B 处洗脱。能够分离 Epe - Gly - OH 的一些纯化组分。合并含该两个化合物的组分并再纯化。

在上述相同条件下， Epe - Gly - OH 在 60 % B 处洗脱。

分析

1 、分析 HPLC

缓冲液： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

isocratic

反应组分的保留时间:

二十碳五烯酸： Rt 3.1 分钟

Epe - Gly - OtBu： Rt 3.9 分钟

Epe - Gly - OH： Rt 2.1 分钟

2 、 ^{13}C n.m.r.

(DMSO-d6): 14.3, CH_3; 20.2, 25.4, 26.4, 34.8, CH_2; 40.7, Ga; 127.2, 127.9, 128.1, 128.2, 128.3, 129.7, 131.8, CH; 171.6, 172.5, C=O.

3 、 CI - MS

m/z 360(M+1).

二十碳五烯酸 - 天冬氨酸 - OH

将二十碳五烯酸、 H - Asp(OtBu) -(OtBu).HCl 和 HOSu 一起溶于 DMF(4ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入 DCC(在 1mlDMF 中)。加入 N - 甲基吗啉并在冰浴搅拌混合物 20 分钟，然后室温搅拌混合物 20 小时，由 HPLC 测出约剩 23 %二十碳五烯酸。加入更多的 H - Asp(OtBu) - (OtBu).HCl(0.28g)、 HOSu(0.11g)、 DCC(0.12g)和 N -

MM(0.20g)，继续搅拌混合物 20 小时。仍剩余约 17 %二十碳五烯酸，过滤混合物并用 HPLC 纯化粗 Epe - Asp(OtBu) -(OtBu)，得到 0.83g 棕色油。向棕色油中加入冷三氟乙酸(30ml)并搅拌混合物 1 小时，蒸发除去 TFA，得到暗棕色油，将该暗棕色油重溶于 CH_3CN(10ml)并用 HPLC 纯化，纯的 Epe-Asp-OH 重量为 0.50g （ 72 % ）。

纯化

缓冲液 A： 0.1% TFA/H_2O

缓冲液 B： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 semiprepPak

% B 的增量: 10%--20--30--40--50--52--55 - 57--60--65--68--70%B 。

二十碳五烯酸 65 % B 处洗脱， Epe - Asp(OtBu) - OtBu 在 70 % B 处洗脱， Epe - Asp - OH 在 55 % B 处洗脱。

分析

1、分析 HPLC

缓冲液: 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak ， isocratic

保留时间:

二十碳五烯酸: Rt 3.1 分钟

Epe - Asp(OtBu) - OtBu： Rt 6.7 分钟

Epe - Asp - OH： Rt 1.8 分钟

2、 ^{13}C n.m.r.

(DMSO-d6): 14.3. CH_3; 20.2. 25.3. 25.4. 26.4. 31.5. 34.8. 8 x CH_2; 36.3. Dß; 48.7. Da; 127.2, 127.92, 127.97. 128.1. 128.2, 128.3. 129.7. 131.8. 10 x CH; 171.9, 172.1, 172.7. 3 x C=O.

3、 CI - MS

m/z 418(M+1).

廿二碳六烯酸－甘氨酸－ OH

将 H － Gly －(OtBu).HCl 和 HOSu 一起溶于 DMF(2ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入廿二碳六烯酸、 DCC(在 0.4mlDMF 中)和 N －甲基吗啉，在冰浴搅拌混合物 30 分钟，然后室温搅拌混合物 5 小时，约剩 30 %廿二碳六烯酸（ Dhe 酸）。加入更多的 DCC(0.11g)并继续搅拌混合物 20 小时。仍剩余约 28 %廿二碳六烯酸。过滤混合物并用 HPLC 纯化粗产物，冻干的 Dhe － Gly － OtBu（浅黄色油）重 0.62g （ 92%）。向油中加入冷 TFA(30ml)并搅拌混合物 1 小时，蒸发除去 TFA，得到暗棕色油，将该暗棕色油重溶于 CH_3CN （ 10ml ）并用 HPLC 纯化，将纯化的 Dhe-Gly-OH 冻干得到暗棕色油（ 0.27g， 46 %）。

纯化

HPLC 条件:

缓冲液 A： 0.1% TFA/H_2O

缓冲液 B： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 semiprepPak

% B 的手工增量： 10%--20--30--40--50--55--60--65--70--73--100%B 。

廿二碳六烯酸和 Dhe － Gly － OtBu 均在 71 － 73 % B 处洗脱，酸比 Dhe － Gly － OtBu 洗脱的略早。

Dhe － Gly － OH 在 60 % B 处洗脱。

分析

1 、分析 HPLC

缓冲液： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

反应组分的保留时间:

廿二碳六烯酸： Rt 3.6 分钟

Dhe － Gly － OtBu： Rt 4.5 分钟

Dhe - Gly - OH： Rt 2.5 分钟

2、 ^{13}C n.m.r.

(DMSO-d6): 14.3, CH_3; 20.2, 23.2, 25.3, 25.36, 25.42, 35.1, 8 x CH_2; 40.8, Ga; 127.1, 127.90, 127.98, 128.06, 128.1, 128.27, 128.3, 129.1, 131.8, 6 x CH; 171.5, 172.0, 2 x C=O.

3、 CI - MS

m/z 386(M+1).

廿二碳六烯酸 - 天冬氨酸 - OH

将 H - Asp(OtBu) - (OtBu).HCl 和 HOSu 一起溶于 DMF(2ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入廿二碳六烯酸、 DCC(在 0.4mlDMF 中)和 N - 甲基吗啉，在冰浴搅拌混合物 30 分钟，然后室温搅拌混合物 4 小时，约剩 30 % 廿二碳六烯酸（ Dhe 酸）。加入更多的 DCC(0.11g)并继续搅拌混合物 20 小时。仍剩余约 18 % 廿二碳六烯酸。过滤混合物并用 HPLC 纯化粗产物，冻干的 Dhe - Asp(OtBu) - OtBu（浅黄色油）重 0.73g （ 86%）。向油中加入冷 TFA(30ml)并搅拌混合物 1 小时，蒸发除去 TFA，得到暗棕色油，将该暗棕色油重溶于 CH_3CN （ 5ml ）并用 HPLC 纯化，将纯化的 Dhe-Gly-OH 冻干得到暗棕色油（ 0.33g， 49 % ）。

纯化

HPLC 条件:

缓冲液 A： 0.1% TFA/H_2O

缓冲液 B： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 semiprepPak

% B 的手工增量： 10%--20--30--40--50--55--60--65--68--70--73--75%B 。

廿二碳六烯酸在 73 % B 处洗脱， Dhe - Asp(OtBu) - OtBu 在 73 - 75 % B 处洗脱，Dhe - Asp - OH 在 58 % B 处洗脱。

分析

1、分析 HPLC

缓冲液: 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

反应组分的保留时间:

廿二碳六烯酸: Rt 3.6 分钟

Dhe - Asp(OtBu) - OtBu : Rt 8.2 分钟

Dhe - Asp - OH : Rt 2.0 分钟

2、^{13}C n.m.r.

(DMSO-d6): 14.3. CH_3: 20.2. 23.2, 25.3. 25.4, 25.4. 35.0. 8 x CH_2: 36.4, Dß: 48.7, Da: 127.1. 127.9. 127.98. 128.0. 128.1. 128.22. 128.28. 128.3, 129.0. 131.8. CH: 171.6. 171.8. 172.7. 3 x C=O

3、CI - MS

m/z 444(M+1).

亚麻酸 - 甘氨酸 - OH

将亚麻酸、HOSu 和 H - Gly -(OtBu).HCl 一起溶于 DMF(3ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入 DCC(在 0.3mlDMF 中)。加入 N - 甲基吗啉并搅拌混合物 20 小时，此时还剩一些未反应的亚麻酸。加入更多的 DCC(0.10g)并继续搅拌混合物 20 小时。滤掉 DCU 并用逆相 HPLC 分离产物，纯化的产物浓缩成油并加入 TFA(30ml)，搅拌 1 小时后，蒸发除去 TFA，得到的产物为棕色油。将该棕色油重溶于 CH_3CN(6ml)并用 HPLC 纯化，将得到的纯化组分合并、浓缩并冻干（在叔丁醇中），得到棕色油（0.24g，40 %）。

纯化

HPLC 纯化:

缓冲液 A: 0.1% TFA/H_2O

缓冲液 B： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 小制备柱

Lino-Gly-OH 在 65 % B 处洗脱，亚麻酸在 67 % B 处洗脱，亚麻酸-Gly-OtBu 也在 67 % B 处洗脱，但稍晚。

分析和定性

1、分析 HPLC

缓冲液 A： 0.1% TFA，缓冲液 B： 0.1% TFA/10%H_2O/90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

100 % B isocratic

各成分的保留时间:

亚麻酸: Rt 3.96 分钟

亚麻酸 - Gly - OtBu： Rt 4.63 分钟

亚麻酸 - Gly - OH： Rt 2.59 分钟

2、 ^{13}C n.m.r.

(DMSO-d6): 14.2, CH_3: 20.2, 25.26, 25.32, 26.8, 28.7, 28.8, 29.2, 35.2, CH_2: 40.7, Ga: 127.1, 127.7, 128.1, 130.1, 131.7, CH: 171.6, 172.7, C=O.

3、 C.I. - M.S.

m/z 336(M+1).

亚麻酸 - 天冬氨酸 - OH

将亚麻酸、 HOSu 和 H - Asp(OtBu) - (OtBu).HCl 一起溶于 DMF(3ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入 DCC(在 0.3mlDMF 中)。加入 N - MM 并搅拌混合物 20 小时，此时还剩一些未反应的亚麻酸。加入更多的 DCC(0.10g)并继续搅拌混合物 20 小时。滤掉 DCU 并用逆相 HPLC 分离产物，纯化的产物浓缩成油(0.66g)并加入 TFA(30ml)，搅拌 1 小时后，蒸发除去 TFA，得到的产物为棕色油。将该棕色油重溶于 CH_3CN(6ml)并用 HPLC 纯化，将得到的纯化组分合并、浓缩并冻干(在叔丁醇中)，得到棕色油（ 0.38g，

54 %) 。

纯化

HPLC 纯化:

缓冲液 A： 0.1% TFA/H_2O

缓冲液 B： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 小制备柱

Lino-Asp-OH 在 55 % B 处洗脱，亚麻酸在 65 % B 处洗脱，亚麻酸-Asp(OtBu)-OtBu 在 70 % B 处洗脱。

分析和定性

1 、分析 HPLC

缓冲液 A： 0.1% TFA ，缓冲液 B： 0.1% TFA/10%H_2O/90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

100 % B isocratic

各成分的保留时间:

亚麻酸: Rt 4.14 分钟

亚麻酸 - Asp(OtBu) - OtBu : Rt 8.46 分钟

亚麻酸 - Asp - OH : Rt 2.04 分钟

2 、 ^{13}C n.m.r.

(DMSO-d6): 14.2, CH_3; 20.2, 25.26, 25.34, 26.8, 28.69, 28.72, 28.83, 29.2, 35.2, CH_2; 36.3, Dß; 48.7, Da; 127.1, 127.7, 128.1, 130.1, 131.7, CH; 171.8, 172.2, 172.7, C=O.

3 、 C.I. - M.S.

m/z 394(M+1).

γ - 亚麻酸 - 甘氨酸 - OH

将γ－亚麻酸、HOSu 和 H－Gly－(OtBu).HCl 一起溶于 DMF(3ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入 DCC(在 0.3mlDMF 中)。加入 N－MM 并搅拌混合物 20 小时，此时还剩一些未反应的亚麻酸。加入更多的 DCC(0.10g)并继续搅拌混合物 20 小时。滤掉 DCU 并用逆相 HPLC 分离产物，纯化的产物浓缩成油(0.46g)并加入 TFA(30ml)，搅拌 1 小时后，蒸发除去 TFA，得到的产物为棕色油。将该棕色油重溶于 CH_3CN(6ml)并用 HPLC 纯化，将得到的纯化组分合并、浓缩并冻干（在叔丁醇中），得到棕色油（0.35g，58%）。

纯化

HPLC 纯化:

缓冲液 A： 0.1% TFA/H_2O

缓冲液 B： 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 小制备柱

γ－Lino-Gly-OH 在 66 % B 处洗脱，γ－亚麻酸在 66 % B 处洗脱，γ－亚麻酸-Gly-OtBu 在 67 % B 处洗脱，化合物以所列顺序洗脱。

分析和定性

1、分析 HPLC

缓冲液 A： 0.1% TFA，缓冲液 B： 0.1% TFA/10%H_2O/90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

100 % B isocratic

各成分的保留时间:

γ－亚麻酸： Rt 4.07 分钟

γ－亚麻酸－Gly－OtBu： Rt 4.85 分钟

γ－亚麻酸－Gly－OH： Rt 2.82 分钟

2、^{13}C n.m.r.

(DMSO-d6): 14.1, CH_3; 22.2, 25.0, 25.4, 26.7, 26.8, 28.8, 28.9, 31.1, 35.1, CH_2; 40.7, Ga; 127.7, 127.9, 128.1, 128.2, 129.9, 130.1, CH; 171.6, 172.6, C=O.

3、C.I.-M.S.

m/z 336(M+1).

γ-亚麻酸-天冬氨酸-OH

将γ-亚麻酸、HOSu 和 H-Asp(OtBu)-(OtBu).HCl 一起溶于 DMF(3ml)中，将混合物在冰浴中冷却并加入 DCC(在 0.3mlDMF 中)。加入 N-MM 并搅拌混合物 20 小时，此时还剩一些未反应的亚麻酸。加入更多的 DCC(0.10g)并继续搅拌混合物 20 小时。滤掉 DCU 并用逆相 HPLC 分离产物，纯化的产物浓缩成油(0.65g)并加入 TFA(30ml)，搅拌 1 小时后，蒸发除去 TFA，得到的产物为棕色油。将该棕色油重溶于 CH_3CN(6ml)并用 HPLC 纯化，将得到的纯化组分合并、浓缩并冻干(在叔丁醇中)，得到棕色油(0.30g，42 %)。

纯化

HPLC 纯化:

缓冲液 A: 0.1% TFA/H_2O

缓冲液 B: 0.1% TFA + 10%H_2O + 90%CH_3CN

40ml/min, 214nm, C18 小制备柱

γ-亚麻酸-Asp-OH 在 50 % B 处洗脱，亚麻酸在 70 % B 处洗脱，亚麻酸-Asp(OtBu)-OtBu 在 75 % B 处洗脱。

分析和定性

1、分析 HPLC

缓冲液 A: 0.1% TFA，缓冲液 B: 0.1% TFA/10%H_2O/90%CH_3CN

2ml/min, 214nm, C18 NovaPak

100 % B isocratic

各成分的保留时间:

γ－亚麻酸: Rt 4.14 分钟

γ－亚麻酸－Asp(OtBu)－OtBu: Rt 8.71 分钟

γ－亚麻酸－Asp－OH: Rt 2.28 分钟

2、^{13}C n.m.r.

(DMSO-d6): 14.1. CH_3; 22.2. 25.1, 25.4. 26.7. 26.8. 28.7, 28.9. 31.08, 35.1. CH_2: 36.3. Dß; 48.7. Da: 127.8. 127.9. 128.1. 128.2. 130.0. 130.1. CH: 171.9. 172.2. 172.7, C=O.

3、C.I.－M.S.

m/z 394(M+1).

应理解的是在不超出所述的本发明的实质或范围的情况下，本领域熟练技术人员可以对具体实施方案中所述的本发明作出各种变动和/或改进，因此，本发明的实施方案应理解为示意性而非限制性。

表 1： 氨基酸偶联的 PUFA 对抗氯喹的恶性疟原虫 K 株的抑制作用

化合物	%抑制
氯喹	20.1
花生四烯酸－甘氨酸－ OH	84.2
廿二碳六烯酸－甘氨酸－ OH	84.9
亚麻酸－甘氨酸－ OH	81.5

所有 PUFA 均为 11μM

表 2： 氨基酸偶联的 PUFA 对 PHA 刺激的 TNFα 和干扰素γ 的产生的作用

化合物	TNFα	IFNγ
α-亚麻酸-甘氨酸-OH	29.3	14.5
α-亚麻酸-天冬氨酸-OH	0	0
γ-亚麻酸-甘氨酸-OH	21.5	0
γ-亚麻酸-天冬氨酸-OH	4.7	0
花生四烯酸-甘氨酸-OH	26.6	35.9
花生四烯酸-天冬氨酸-OH	38.3	68.4
二十碳五烯酸－甘氨酸－ OH	11	68.2
二十碳五烯酸－天冬氨酸－ OH	17.1	66.1
廿二碳六烯酸－甘氨酸－ OH	16.2	44
廿二碳六烯酸－天冬氨酸－ OH	17.4	8.3

所有 PUFA 均为 20μM

表 3： PUFA 对 PHA 诱导的细胞增殖的作用

化合物	对增殖的抑制百分率, %
γ-亚麻酸-甘氨酸-OH	15.6
γ-亚麻酸-天冬氨酸-OH	7.3
α-亚麻酸-甘氨酸-OH	29
α-亚麻酸-天冬氨酸-OH	15.4
花生四烯酸-甘氨酸-OH	8
花生四烯酸-天冬氨酸-OH	39.7
二十碳五烯酸－甘氨酸－ OH	5.4
二十碳五烯酸－天冬氨酸－ OH	20.7
廿二碳六烯酸－甘氨酸－ OH	16.6
廿二碳六烯酸－天冬氨酸－ OH	21.1

所有 PUFA 均为 20μM

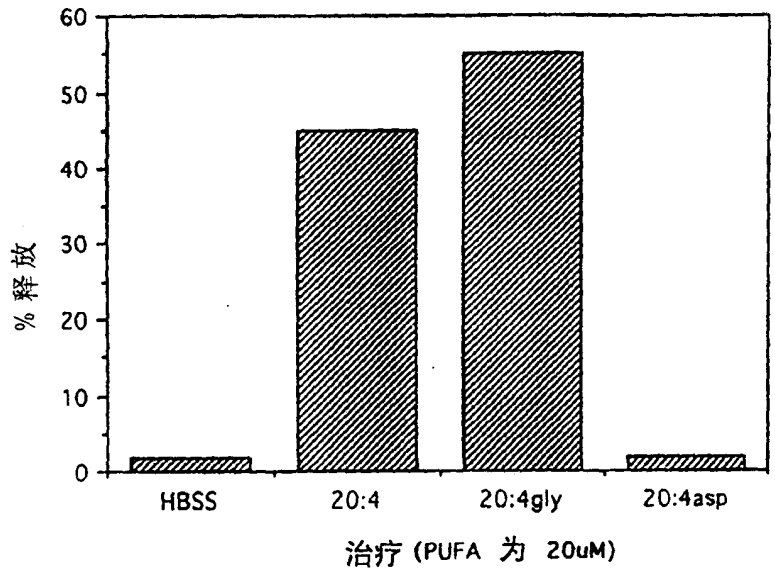


图1

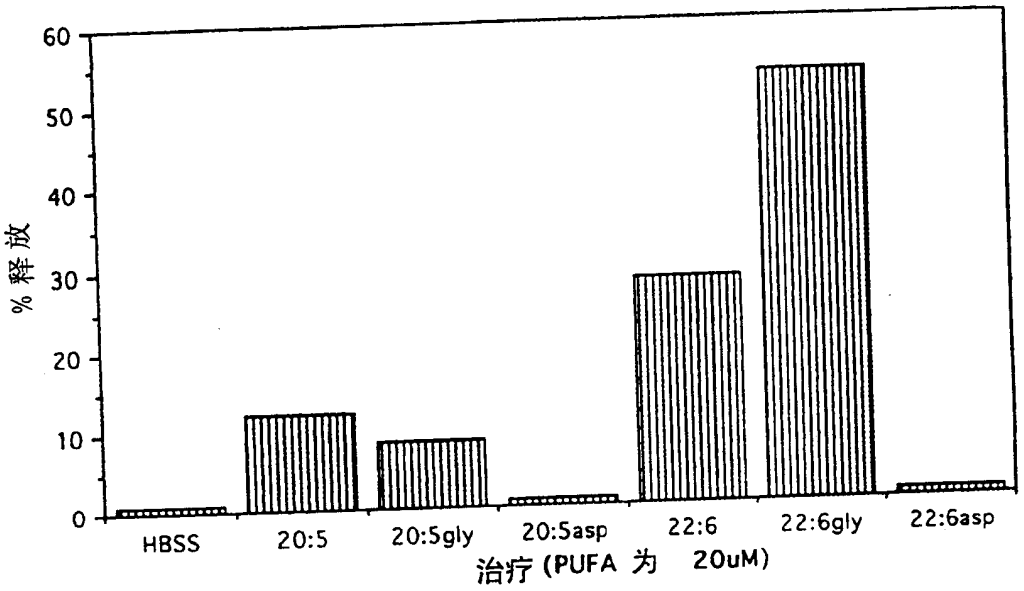

60
50
40
30
20
10
0
% 释放
HBSS
20:5
20:5gly
20:5asp
22:6
22:6gly
22:6asp
治疗 (PUFA 为 20uM)

图2

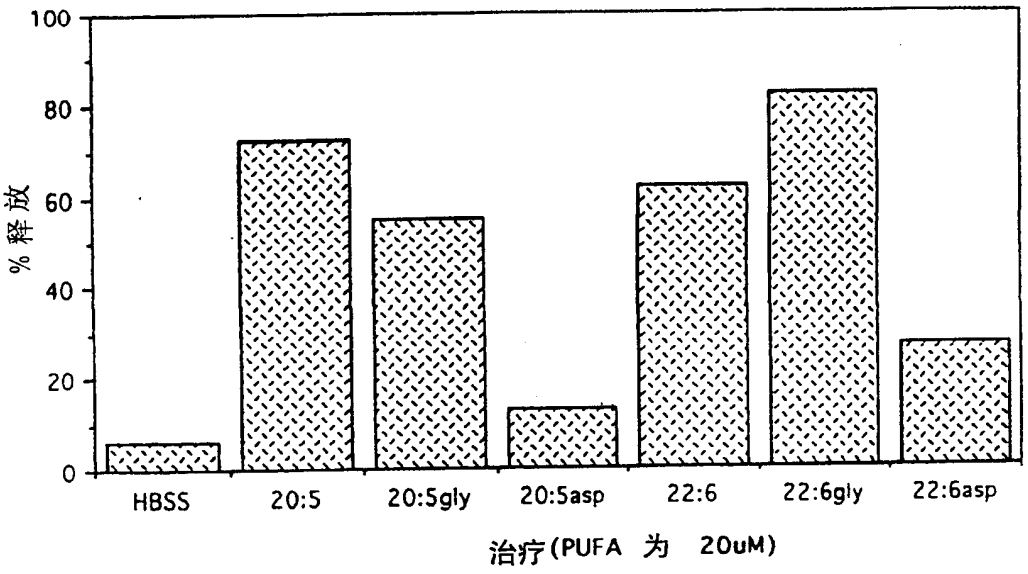

100
80
60
40
20
0
% 释放
HBSS
20:5
20:5gly
20:5asp
22:6
22:6gly
22:6asp
治疗(PUFA 为 20uM)

图3

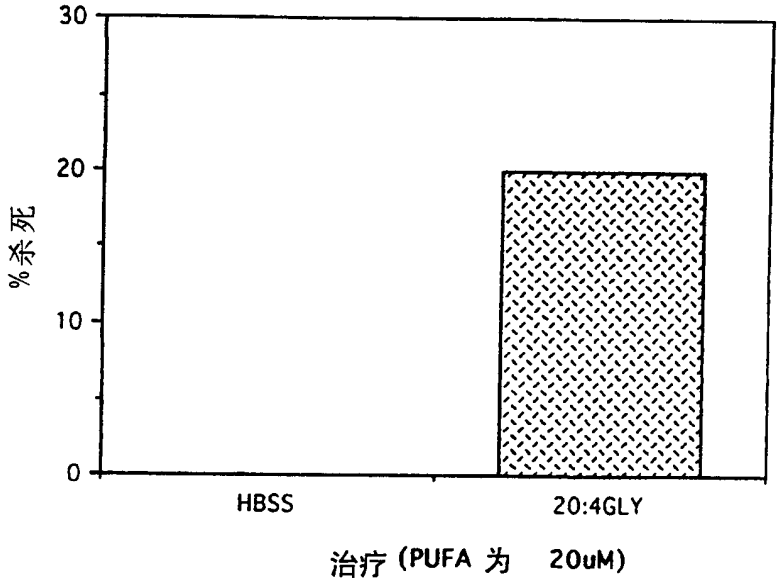


图4