



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102438468 B

(45) 授权公告日 2014.06.04

(21) 申请号 200980158786.7

(22) 申请日 2009.04.17

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2011.10.17

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/EP2009/002842 2009.04.17

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02010/118761 EN 2010.10.21

(73) 专利权人 纳塔克制药有限公司  
地址 西班牙马德里

(72) 发明人 何塞·曼纽尔·塞拉洛佩兹

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111  
代理人 王蕊 张一军

(56) 对比文件

CN 101381298 A, 2009.03.11,  
CN 101019914, 2007.08.22,  
US 2007299272 A1, 2007.12.27,  
CN 1378846 A, 2002.11.13,  
WO 2009020406 A1, 2009.02.12,  
US 4792418 A, 1988.12.20,  
US 5698594 A, 1997.12.16,  
GB 2069520 B, 1984.08.22,  
蒋汉明等.  $\Omega$ -3 多不饱和脂肪酸与人类健康. 《预防医学论坛》. 2005, 第 11 卷 (第 1 期),

审查员 颜小平

(51) Int. Cl.

A23L 1/30 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

C11C 1/02 (2006.01)

C11C 1/08 (2006.01)

权利要求书6页 说明书61页 附图5页

(54) 发明名称

富含低含量植烷酸的  $\omega$ -3 脂肪酸的组合物

(57) 摘要

本发明涉及获得富含  $\omega$ -3 脂肪酸的组合物的方法, 该  $\omega$ -3 脂肪酸的植烷酸含量低于  $90 \mu\text{g}/\text{克油}$ 。本发明还涉及获得富含 DHA 且植烷酸含量低于  $90 \mu\text{g}/\text{克油}$  的组合物, 更具体地, DHA 为  $650\text{--}950\text{mg}/\text{g}$ , 即,  $65\%$  (重量) 至  $95\%$  (重量) 且 PhA 的值为每克形成所述组合物的油的低于  $90 \mu\text{g}$ 、优选低于  $5 \mu\text{g}$ 。获得的组合物由于其预防作用和治疗效果而用于食品添加、营养产品和药物产品领域。

1. 一种用于从海洋生物来源的油中获得富含  $\omega$ -3 脂肪酸的组合物的方法,其中,所述  $\omega$ -3 脂肪酸的 PhA 含量低于  $90 \mu\text{g/g}$ ,所述方法包括下述步骤:

a) 皂化海洋来源的油,从而获得脂肪酸盐;

b) 酸化所述来自步骤 a) 的脂肪酸盐,从而获得酸化的油;

c) 在 27Pa 真空下,在 10 摄氏度的温度下,在甘油梯度中对所述来自步骤 b) 的酸化的油进行超离心;

d) 在 0 摄氏度至 -57 摄氏度的温度范围,使所述来自步骤 c) 的甘油梯度进行结晶,从而获得固相和液相,其中所述固相含有饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和 PhA,而所述液相含有 PhA 含量低于  $90 \mu\text{g/g}$  的多不饱和  $\omega$ -3 脂肪酸;

e) 从所述固相中分离所述来自步骤 d) 的液相,以通过倾析进行回收。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述方法还包括另外的步骤,在该步骤中酯化所述  $\omega$ -3 脂肪酸以获得 PhA 含量低于  $90 \mu\text{g/g}$  的  $\omega$ -3 甘油三酯。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,在惰性气氛下,在 40 摄氏度的温度下,采用 KOH、水和乙醇以 300rpm 震荡混合物 1 小时而进行所述步骤 a) 的皂化。

4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项所述的方法,其中,在惰性气氛下以 200rpm 混合所述步骤 a) 中获得的脂肪酸盐和 70% 的乙酸而进行所述步骤 b) 的酸化。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述步骤 c) 的超离心是等密度的,并且以 100000g 持续进行 42 小时。

6. 根据权利要求 1 所述的方法,其中所述步骤 c) 的超离心在未平衡的密度梯度中进行,并且以 100000g 持续进行 24 小时。

7. 根据权利要求 5 所述的方法,其中在 0 摄氏度下进行所述结晶步骤 d)。

8. 根据权利要求 5 所述的方法,其中在 -30 摄氏度下进行所述结晶步骤 d)。

9. 根据权利要求 6 所述的方法,其中在 -30 摄氏度下进行所述结晶步骤 d)。

10. 一组组合物,其特征在于,所述组合物包含范围为 65% (重量)至 99% (重量)的  $\omega$ -3 脂肪酸且所述  $\omega$ -3 脂肪酸的 PhA 含量低于  $90 \mu\text{g/g}$ 。

11. 根据权利要求 10 所述的组合物,其中所述 PhA 含量低于  $5 \mu\text{g/g}$ 。

12. 根据权利要求 10 所述的组合物,其中所述  $\omega$ -3 脂肪酸的含量范围是 75% (重量)至 99% (重量)。

13. 根据权利要求 12 所述的组合物,其中所述  $\omega$ -3 脂肪酸的含量范围是 90-99% (重量)。

14. 根据权利要求 10 所述的组合物,其中所述  $\omega$ -3 脂肪酸包含 65% (重量)至 95% (重量)的 DHA。

15. 根据权利要求 14 所述的组合物,其中所述 DHA 的含量范围为 75% (重量)至 95% (重量)。

16. 根据权利要求 15 所述的组合物,其中所述 DHA 的含量范围为 80-95% (重量)。

17. 根据权利要求 10 所述的组合物,其中所述  $\omega$ -3 脂肪酸还包含范围为 5% (重量)至 35% (重量)的 EPA。

18. 根据权利要求 11 所述的组合物,其中所述  $\omega$ -3 脂肪酸的以重量计总含量为 91.75% (重量),其中的 80.65% 为 DHA, 13.38% 为 EPA, 5.07% 为其它  $\omega$ -3 脂肪酸, 0.69% 为

其它多不饱和脂肪酸,0.08%为其它饱和脂肪酸,0.08%为单不饱和脂肪酸。

19. 根据权利要求10所述的组合物,还包含用于药物和食品用途的赋形剂和/或佐剂。

20. 营养添加剂,其含有饮品、软或硬胶囊、水性乳液或粉末形式的根据权利要求10-19中任一项所述的组合物。

21. 食品,其含有饮品、软或硬胶囊、水性乳液或粉末形式的根据权利要求10-19中任一项所述的组合物。

22. 一种药物组合物,其包含富含 $\omega$ -3脂肪酸的化合物和药学稀释剂或载体,其中,所述富含 $\omega$ -3脂肪酸的化合物是权利要求10至19中任一项所述的组合物。

23. 根据权利要求10至19中任一项所述的组合物在制备用于治疗或预防眼中、眼表面的过敏性病况和/或干眼症的药物组合物中的用途。

24. 根据权利要求23所述的组合物的用途,其中所治疗的疾病选自眼睑炎、眼睑结膜炎、结膜炎、角膜炎、干燥性角膜结膜炎、角膜疾病,治疗角膜移植排斥,在LASIK(激光援助屈光角膜层状重塑术)术前和术后通过测厚提高平均细胞角膜密度。

25. 根据权利要求10至19中任一项所述的组合物在制备用于治疗或预防与遗传性营养不良无关的视网膜退行性疾病的药物组合物中的用途。

26. 根据权利要求25所述的组合物的用途,其中所治疗的疾病选自与增龄有关的潮湿性和干燥性黄斑变性、糖尿病视网膜病变、青光眼、眼内压改变、与近视有关的视网膜病变、视网膜脱落、LASIK后近视眼中孔源性视网膜脱落、缺血造成的继发性黄斑水肿、黄斑囊样水肿、欧文-加斯综合症、柏林盲点、脉络膜病、脉络膜视网膜炎、梅毒性视神经视网膜炎、麻疹、巨细胞病毒、脉络膜的恶性黑色素瘤、汞中毒、视网膜血管炎(伊尔斯氏病)、或出血外伤性视网膜劈裂。

27. 根据权利要求26所述的组合物的用途,其中所述汞中毒包括水俣病、肢端痛和亨-罗二氏征。

28. 根据权利要求10至19中任一项所述的组合物在制备用于治疗或预防非色素性视网膜炎的遗传性视网膜营养不良的药物组合物中的用途。

29. 根据权利要求28所述的组合物的用途,其中所治疗的疾病选自眼底黄斑点退化、先天性利伯氏黑蒙、X-连锁的无脉络膜、X-连锁的视网膜劈裂症、高-凡氏玻璃体视网膜营养不良、瓦格纳氏玻璃体视网膜营养不良、和斯蒂克勒氏综合症、睫状体平坦部炎。

30. 根据权利要求10至19中任一项所述的组合物在制备用于治疗或预防非色素性视网膜炎的药物组合物中的用途。

31. 根据权利要求10至19中任一项所述的组合物在制备用于治疗或预防非色素性视网膜炎相关综合症的药物组合物中的用途。

32. 根据权利要求31所述的组合物的用途,其中所治疗的疾病选自非综合症的RP,其由于肝合成或DHA转运中的特定突变和/或故障,或者由于代谢压力,典型非全身性RP的所有孟德尔类型,区域嵌合体的非全身性RP、两侧的非全身性RP、单侧的非全身性RP、两侧的非全身性RP、反向的非全身性RP,常染色体显性RP,常染色体隐性RP,X连锁的RP,简单或偶发的RP,玻璃体视网膜RP,RP点状白变,不具有色素的RP,脉络膜萎缩,脉络膜和/或视网膜萎缩,具有视锥细胞和视杆细胞营养不良的RP,Usher综合症I型,Usher综合症II型,Usher综合症III型,Usher综合症IV型,医源性RP,例如NP207,甲硫哒嗪,CloroKine,

羟氯喹, 氯丙嗪; 具有过氧化物酶体缺陷的遗传性综合症, 与 RO 相关且具有 PhA 和 PA 的提高, 表现出可变的神经、心血管、肌肉骨骼和 / 或皮肤改变, 脑肝肾综合症、婴儿雷弗素姆氏疾病、新生儿肾上腺脑白质营养不良、过氧化物酶体生物发生异常、根茎软骨发育不全点状 (RCDP)、乙酰辅酶 A 氧化酶缺陷、双功能酶缺陷、雷弗素姆氏疾病、 $\beta$ -氧化缺陷、家族性鱼鳞癣样角化病, 舍格伦-拉森综合症, 具有线粒体营养不良的疾病, COX 缺陷和 / 或 Leigh 综合症, 具有过氧化物酶体、线粒体缺陷和 / 或与 RP 和相关的视网膜改变有关的遗传性综合症, 棘状红细胞- $\beta$ -脂蛋白缺乏综合症 (Bassen-kornzweig) 综合症, 巴氏或脂褐质症综合症, 低  $\beta$ -脂蛋白血症, 视网膜色素变性综合症 (Usher 综合症), 哈-斯二氏综合征 (Hallervorden-Spatz) 综合症, 无铜蓝蛋白血症, 卡恩斯-塞尔综合征 (Kearns-Sayre) 综合症, 达-柏氏肌肉营养不良, 拉-姆-巴-贝氏 (Lawrence-Moon-Bardet-Biedl) 综合症, 拉-姆氏 (Lawrence-Moon) 综合症, 巴-贝氏 (Bardet-Biedl) 综合症, 拉格夫 (Grafe) 综合症, 海氏 (Hallgreen) 综合症, 科凯恩 (Cokayne) 综合症, 阿氏 (Alstrom) 综合症, 派-莫氏 (Pelizaeus-Merzbacher) 综合症, 瑟氏运动失调症 (Cerebellous Ataxy), 弗氏 (Friederich Atax) 综合症, 脂褐素沉积病, 家族性玛-艾氏综合征 (maurotic idiopathic); 泰-撒氏 (Tay-Sachs) 综合症, 海-森氏 (Haltia-Santavuori) 综合症、贝-思-詹氏综合征 (Biel-Schowsky-Jansky), 沃-思-柏-麦氏 (Vogt-Spielmeyer-Batten-Mayou) 综合症, 库氏 (Kufs) 综合症, 骨神经内分泌发育不良, 莫氏综合征 (Mucopolisaccharidosis), 赫氏 (Hurler) 综合症, 亨特 (Hunter) 综合症, 斯氏 (Scheire) 综合症, MPS I-H/S, 瑟氏 (Sanfilippo) 综合症, 巴-科 (Bassen Kornzweig) 综合症、黑视网膜发育不良, 骨骼发育不良, 若-欧-思科氏 (renal-ocular-skeletal) 综合症, 爱德华兹 (Edwards) 综合症, 与 X 隐性连锁欧科 (Oculocerebrorenal) 或洛氏 (Lowe) 综合症, 莱-凡氏 (Lignac-Fanconi) 综合症, 巨大轴索型神经病, 和 / 或家族性丹麦痴呆。

33. 根据权利要求 31 所述的组合物的用途, 其中所治疗的疾病选自非综合症的 RP, 其由于肝合成或 DHA 转运中的特定突变和 / 或故障, 或者由于代谢压力, 典型非全身性 RP 的所有孟德尔类型, 区域嵌合体的非全身性 RP、两侧的非全身性 RP、单侧的非全身性 RP、两侧的非全身性 RP、反向的非全身性 RP, 常染色体显性 RP, 常染色体隐性 RP, X 连锁的 RP, 简单或偶发的 RP, 玻璃体视网膜 RP, RP 点状白变, 不具有色素的 RP, 脉络膜萎缩, 脉络膜和 / 或视网膜萎缩, 具有视锥细胞和视杆细胞营养不良的 RP, Usher 综合症 I 型, Usher 综合症 II 型、Usher 综合症 III 型, Usher 综合症 IV 型, 医源性 RP, 例如 NP207, 甲硫哒嗪, CloroKine, 羟氯喹, 氯丙嗪; 具有过氧化物酶体缺陷的遗传性综合症, 与 RO 相关且具有 PhA 和 PA 的提高, 表现出可变的神经、心血管、肌肉骨骼和 / 或皮肤改变, 脑肝肾综合症、婴儿雷弗素姆氏疾病、新生儿肾上腺脑白质营养不良、过氧化物酶体生物发生异常、根茎软骨发育不全点状 (RCDP)、乙酰辅酶 A 氧化酶缺陷、双功能酶缺陷、雷弗素姆氏疾病、 $\beta$ -氧化缺陷、家族性鱼鳞癣样角化病, 舍格伦-拉森综合症, 具有线粒体营养不良的疾病, COX 缺陷和 / 或 Leigh 综合症, 具有过氧化物酶体、线粒体缺陷和 / 或与 RP 和相关的视网膜改变有关的遗传性综合症, 棘状红细胞- $\beta$ -脂蛋白缺乏综合症 (Bassen-kornzweig) 综合症, 巴氏或脂褐质症综合症, 低  $\beta$ -脂蛋白血症, 视网膜色素变性综合症 (Usher 综合症), 哈-斯二氏综合征 (Hallervorden-Spatz) 综合症, 无铜蓝蛋白血症, 卡恩斯-塞尔综合征 (Kearns-Sayre) 综合症, 达-柏氏肌肉营养不良, 拉-姆-巴-贝氏 (Lawrence-Moon-Bardet-Biedl) 综合

症,拉-姆氏(Lawrence-Moon)综合症,巴-贝氏(Bardet-Biedl)综合症,拉格夫(Grafe)综合症,海氏(Hallgreen)综合症,科凯恩(Cokayne)综合症,阿氏(Alstrom)综合症,派-莫氏(Pelizaesus-Merzbacher)综合症,瑟氏运动失调症(Cerebellous Ataxy),弗氏(Friederich Atax)综合症,脂褐素沉积病,家族性玛-艾氏综合征(maurotic idiopathic);泰-撒氏(Tay-Sachs)综合症,海-森氏(Haltia-Santavuori)综合症、贝-思-詹氏综合征(Biel-Schowsky-Jansky),沃-思-柏-麦氏(Vogt-Spielmeyer-Batten-Mayou)综合症,库氏(Kufs)综合症,骨神经内分泌发育不良,莫氏综合征(Mucopolisaccharidosis),赫氏(Hurler)综合症,亨特(Hunter)综合症,斯氏(Scheire)综合症, MPS I-H/S, 瑟氏(Sanfilippo)综合症,巴-科(Bassen Kornzweig)综合症、黑视网膜发育不良,骨骼发育不良,若-欧-思科氏(renal-ocular-skeletal)综合症,爱德华兹(Edwards)综合症,与X隐性连锁欧科(Oculocerebrorenal)或洛氏(Lowe)综合症,胱氨酸病,巨大轴索型神经病,和/或家族性丹麦痴呆。

34. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防葡萄膜炎和相关疾病的药物组合物中的用途。

35. 根据权利要求 34 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自虹膜炎、扁平部睫状体炎、脉络膜炎、脉络膜视网膜炎、前部和/或后部葡萄膜炎、虹膜睫状体脉络膜炎、感染性葡萄膜炎、布氏杆菌病、单纯疱疹病毒、带状疱疹、钩端螺旋体病、莱姆病、眼拟组织胞质菌病综合症、梅毒、弓蛔虫病、弓形体病、肺结核、念珠菌、葡萄膜炎综合症、急性后部多灶性鳞状色素上皮病变、鸟枪弹样脉络膜视网膜炎、福斯氏异色虹膜睫状体炎、多灶性脉络膜炎和全葡萄膜炎综合症、多发性一过性白点综合症、点状内层脉络膜病变、匍行性脉络膜视网膜炎、与葡萄膜炎有关的全身性障碍例如强直性脊柱炎、白塞病、慢性肉芽肿、起止点炎、炎症性肠病、幼年类风湿病、风湿性关节炎、多发性硬化、结节性多动脉炎、银屑病关节炎、莱特尔氏病、结节病、系统性红斑狼疮、Vogt-小柳原田综合症、惠普尔病、前部和/或后部的伪装综合症例如成视网膜细胞瘤、视网膜脱落、恶性黑色素瘤、白血病、幼年性黄色肉芽肿、眼内异物伤、淋巴瘤、多发性硬化和/或网状细胞肉瘤。

36. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防视网膜退行性疾病和与血管疾病有关的继发性眼科病况的药物组合物中的用途。

37. 根据权利要求 36 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自高血压性视网膜病变、高压缺血性视神经病变、高血压病变(Hypertensive Choroidopathies)、脉络膜硬化、支静脉或中央静脉栓塞、艾氏和赛氏(Elschnig and Slegrist)条纹、粥状动脉硬化、脑和神经眼科缺血、主动脉弓综合症、多发性大动脉炎、全身动脉炎、虹膜睫状体炎、巩膜炎、由缺血造成的视网膜前新血管化并且可导致玻璃体积血、角膜水肿、房水中炎性渗出物、增生性糖尿病性视网膜病变或新生血管性青光眼、颈动脉灌注不足或慢性眼部缺血、眼动脉堵塞、视网膜中心动脉堵塞、凝血障碍、蛋白 S 和 C 缺乏、潘氏视网膜炎(Panophtalmia retinitis)、脉络膜炎、派氏停滞病变(papillar stasis);视网膜出血、罗恩(Roth)斑、免疫复合物造成的损伤、视神经病变、缺血性视网膜病变、眼肌麻痹、眼眶假瘤、眼部缺血综合症、枕叶梗死、复视、眼睑水肿、眼睑下垂、眼睑毛细血管扩张、结膜、视网膜、视网膜中央动脉急性堵塞、眼科或其分支、睫状后动脉堵塞、非动脉炎性的缺血性视神经病变、低灌注造成的慢性眼部缺血综合症和/或视力模糊或思-达氏(Shy-Drager)综合症。

38. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防与视网膜无关的视觉灵敏度损失的、或用于不涉及眼表面的其它眼科用途的药物组合物中的用途。

39. 根据权利要求 38 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自白内障、眼内炎、近视、远视、玻璃体炎、玻璃体脱落和 / 或老花眼。

40. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防神经和 / 或精神障碍的药物组合物中的用途。

41. 根据权利要求 40 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自特别是遗传性运动和感觉性神经病、痴呆、阿尔茨海默氏病、多发性硬化和 / 或运动失调。

42. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防癌性疾病的药物组合物中的用途。

43. 根据权利要求 42 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自转移、最为普遍的肿瘤系、结肠直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、艾氏(esofagic)癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、脑癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、视网膜神经胶质瘤、胆囊、多发性骨髓瘤、内分泌癌和 / 或与对胰岛素抗性有关的癌症。

44. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防肾病的药物组合物中的用途。

45. 根据权利要求 44 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自 IgA 肾病和 / 或与全身性红斑狼疮有关的肾病、肾功能不全、肾小球疾病、肾小管病、间隙组织和 / 或肾血管病。

46. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防心血管疾病的药物组合物中的用途。

47. 根据权利要求 46 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自缺血改变、动脉硬化、高甘油三酯血症、高脂血症、室性心律失常、高血压、糖尿病和 / 或其中脱辅基蛋白 a (载脂蛋白(a))水平提高的心血管疾病。

48. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防医源性疾病的药物组合物中的用途。

49. 根据权利要求 48 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自横纹肌溶解症、肝脏毒性、心脏毒性、神经毒性、水肿、脂肪营养不良、和 / 或与他汀类、类皮质激素类、抗逆转录病毒药和 / 或免疫抑制剂有关的免疫抑制。

50. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防纤维肌痛和 / 或慢性疲劳综合症的药物组合物中的用途。

51. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防关节病和骨质疏松的药物组合物中的用途。

52. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防自身免疫疾病、慢性炎性和 / 或骨骼肌肉疾病的药物组合物中的用途。

53. 根据权利要求 52 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自类风湿关节炎、幼年型关节炎、肖格伦氏病、强直性脊柱炎、全身性红斑狼疮、关节病和 / 或骨质疏松。

54. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防皮肤病的药物组合物中的用途。

55. 根据权利要求 54 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自雄激素性脱发、酒糟

鼻、痤疮、湿疹和 / 或银屑病。

56. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防呼吸系统疾病和 / 或炎性肠病的药物组合物中的用途。

57. 根据权利要求 56 所述组合物的用途,其中所治疗的疾病选自自身免疫、病毒和 / 或毒性胃炎、食管炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、假膜性结肠炎、胶原性结肠炎、小肠通透性改变、消化吸收不良综合症、食物不耐受和过敏症和 / 或痔疮。

58. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于治疗或预防寄生虫和感染性疾病的药物组合物中的用途。

59. 根据权利要求 10 至 19 中任一项所述组合物在制备用于改善生理情况的药物组合物中的用途,从而提高视觉灵敏度、记忆和认知功能,提高运动表现和降低损伤和 / 或降低正常神经肌肉疲劳。

## 富含低含量植烷酸的 $\omega$ -3 脂肪酸的组合物

### 技术领域

[0001] 本发明涉及获得富含  $\omega$ -3 脂肪酸的组合物的方法,所述  $\omega$ -3 脂肪酸具有含量低于  $90 \mu\text{g}/\text{克油}$  的植烷酸。本发明还涉及获得富含 DHA 且植烷酸含量低于  $90 \mu\text{g}/\text{克油}$  的组合物,更具体地,DHA 为  $650\text{--}950\text{mg}/\text{g}$ ,即,65% (重量) 至 95% (重量) 且 PhA 的值为每克形成所述组合物的油的低于  $90 \mu\text{g}$ 、优选低于  $5 \mu\text{g}$ 。获得的组合物由于其预防作用和治疗效果而用于食品添加、营养产品和药物产品领域。

### 背景技术

[0002]  $\omega$ -3 脂肪酸是多不饱和脂肪酸家族,其共同特点在于最后一个双键位于从该脂肪酸的最后一个甲基起始的第三个 C-C 键处。 $\omega$ -3 脂肪酸是必需的,即人体自身无法产生,因此必需通过膳食或通过组合物摄取它们。由于它们多不饱和的性质, $\omega$ -3 脂肪酸在人体内具有非常特殊的物化功能(即极低的熔点)并因此已得到广泛研究。目前,已知存在多达 10 种  $\omega$ -3 脂肪酸(即硬脂酸),但是除了 DHA 和 / 或 EPA,它们在人体内以极少量存在,并且其生理活性非常低或者没有生理活性。

[0003] 5,8,11,14,17- 二十碳五烯酸或 EPA 以及 4,7,11,13,16,19- 二十二碳六烯酸或 DHA 是具有最多生理功能的  $\omega$ -3 脂肪酸,特别是 DHA,其在视网膜、精子、神经组织等具有特定功能。DHA 和 EPA 都具有共同的生理功能,但是 DHA 所具有的特定生理功能是其它脂肪酸所不具备的,特别是在光感受器、神经组织和精子等方面。摄入高剂量 DHA 可以提高 EPA 的水平,但反过来不发生;并且,DHA 不改变其它脂肪酸的合成(Voss 等人,1992 年)。

[0004] 从生理角度来说,出于生物学观点,DHA 是用于人体摄入的最令人感兴趣的  $\omega$ -3 脂肪酸。由于 DHA 和 EPA 存在于相同的食物来源中,并且由于 EPA 含量更大,最初 EPA 是得到更多关注、更容易获得的  $\omega$ -3 脂肪酸。但是,经过过去 15 年对这两种脂肪酸的了解,对 DHA 及其所必需的纯化的兴趣已经显著增强,这是因为,除了例外情况,DHA 最多以不超过脂肪的 10-15% 存在于大量的食物来源中。

[0005] 用于获得富含 DHA 的  $\omega$ -3 脂肪酸的多数来源为海洋来源:微藻(即裂壶藻、隐甲藻、吾肯氏壶藻(Ulkenia sp.)、裸藻),甲壳类(即南极磷虾),多脂鱼(即 Thunnus ibynnus thynnus 或红色金枪鱼),海洋哺乳动物;以及蘑菇和酵母(即解脂耶氏酵母)和细菌(即乳酸杆菌)。

[0006] 鱼类是用于以高纯度且最充足地获得供人体摄入的富含 DHA 的  $\omega$ -3 脂肪酸的最大来源,原因在于每年鱼类和贝类动物的产量为 1.4 亿吨(FAO,2007 年),并且估计每年鱼油产量为 100 万公吨(IFFO,International Fishmeal & Fish oil Organisation)。最适合的鱼是金枪鱼和其它物种, $\omega$ -3 含量最高,DHA 的百分比高于 20% (重量);并且,由于它们为食品,因此在公共健康方面最有保证、最安全。另一方面,除了鱼类以外,磷虾是地球上 DHA 的最大储库和生物质。但是,开发磷虾来获得  $\omega$ -3 脂肪酸对于营养链和发展人类膳食必需的物种和鱼类具有严重的已知风险。将来,一种可能性是从磷虾养殖场获得此类磷虾,在磷虾养殖场将不会有对于营养链的风险,并且,它们将在不含有通常存在于海洋水



域中的污染物的环境中繁殖。

[0007] 很多作者都认为,在世界范围内的多数膳食中,DHA 都是一种缺乏的营养物。但是,除了其作为 DNA 缺乏疾病的治疗方法的相关性,DHA 的生理作用使得其成为用于治疗 and 预防下述疾病的最相关的辅助因子:神经退行性疾病,例如阿尔茨海默氏病或精神分裂症;视网膜退行性疾病、癌症、自身免疫疾病、慢性关节和皮肤炎性疾病、肾和泌尿疾病(前列腺)、雄激素性脱发、男性和女性生育力改变、原发性注意力障碍或多动症、智力和认知发育,并且是视觉发育(特别是黄斑)、心血管疾病、糖尿病和高甘油三脂血症所必需的。

[0008] 为了治疗多种疾病,必需使用比仅通过膳食获得的(通常> 2-4 克)高数十倍的剂量,这使得必需获得高纯度的 DHA 组合物,以便得到足够剂量的摄入(即,要从 20%油组合物中获得 4 克 DHA 的剂量,将必需需要 20 克油或 40 个 500mg 的常规软凝胶)。

[0009] 多不饱和脂肪酸在其自由形式时极不稳定,因此其口服需要稳定化,这可以通过酯化或连接至其它分子如甘油和乙醇实现,使得它们更稳定并提高其生物利用度。第一种载体(甘油)使得可以获得更高的纯度(甘油三酯)、稳定性并具有最大的生物利用度,避免了醇的存在,这在需要高剂量的情况下和在多种应用中其长期使用、以及对于怀孕妇女和儿童是特别重要的。甘油三酯以高于正常食物部分数百倍的浓度摄入,并且是天然的营养来源和靶标组织中脂肪酸的药代动力学。甘油三酯的药代动力学最大,并且其使得活性物质 DHA 的纯度最高,因此 DHA 甘油三酯表现具有最佳的吸收且具有更好的生理和代谢作用。

[0010] 伴随着对于食物和健康之间联系的敏感性提高,将鱼类作为健康营养来源的接受程度提高。除了多不饱和  $\omega$ -3 脂肪酸以外,鱼类还是高质量蛋白、矿物质和维生素的重要来源,其健康益处得到了广泛的认可。然而,近期研究揭示了与环境污染有关的危险,所述环境污染例如已知在鱼类中积累的汞和二噁英。

[0011] 脂肪酸的合成和活生物中的营养链是膜的物化性质以及膜对环境条件(即温度)的生理适应的成因。见于活生物的磷脂和脂肪中的具有最低熔点(FP)的脂肪酸是降植烷酸(PA)、植烷酸(PhA)、EPA、DHA、花生四烯酸(AA)和 estearic acid(SDA),这些物质在低温下允许最佳生理情况。生物采用两种化学策略来获得具有极低 FP 的脂肪酸:甲基化和羧酸的不饱和。考虑到海洋来源的生物面临的极端条件,此类脂肪酸的最为丰富的来源主要位于寒冷海洋水域中,这并不令人惊讶。在这点上,自然界、食物和脂肪衍生产物如海洋来源的油中的具有最低 FP 的脂肪酸为长支链脂肪酸( $C > 18$ ),其具有多个甲基,其中 PhA 是浓度最高的一种,并且长链线性  $\omega$ -3 脂肪酸( $C \geq 18$ )为 DHA 和 EPA(由于它们的浓度和丰度是最为相关的种类)。

[0012] PhA 存在于人类膳食或动物组织中,在动物组织中其可以穿过叶绿素。PhA 由相应的醇即叶绿醇形成,并氧化以形成 PA,这就是通常发现 PA 和 PhA 在一起的原因。PhA 参与一种人类病理,即雷弗素姆氏综合症,其特征在于 PhA 在血液和组织中积累,随后已发现其与肝中的  $\alpha$ -氧化途径缺乏有关。

[0013] 多数食物含有小于  $5 \mu\text{g}$  的 PhA/g,然而有些具有超过  $1\text{mg}$  的 PhA/g 的最高含量,并且在鱼类的情况下,由于其数量与脂肪百分比成比例,因此其超过  $750 \mu\text{g/g}$ 。认为具有最高浓度 PhA 的食物在疾病如色素性视网膜炎(RP)和 PhA 氧化缺陷如雷弗素姆氏综合症中具有摄入的较高风险(III 类)。另一方面,用于在鱼油生产中分离脂肪的方法显著提高了

PhA 的浓度。

[0014] 已知来自鱼类的脂肪酸是膳食中  $\omega$ -3 脂肪酸 DHA 和 EPA 的主要来源,但是它也是 PhA 的主要来源。具有最高 EPA 和 DHA 含量的来源代表多数 DHA 和 EPA 的摄入,同时与 PhA 的最高浓度和摄入来源有关。DHA 和 PhA 具有相同的来源,远高于用于食物和药物用途的产品,因此在海洋和微生物来源的产品中可见最高浓度的 DHA 和 PhA。通常,PhA 与 EPA 和 DHA 一起可见。细菌、真菌和微藻是自然界中具有最高浓度的 PhA 的生物。源自微生物的油类富含 DHA,且 PhA 比例最小,通常超过 100  $\mu$ g/g。

[0015] 研究的所有西方膳食(包括地中海地区的膳食),具有 100-150mg 的 DHA 的每日摄入量,然而很多作者认为每日需要 200-300mg。DHA 是实际上全世界范围的人群都在其膳食中缺乏的唯一一种营养物。

[0016] 在文献中通常未显示且非常重要的一点是,来自膳食的 DHA 是 100% 的动物来源,这是因为在植物食物来源中不存在 DHA(除了不用做食物的一些藻类之外)。因此,素食者的需求更高,特别是在严格的素食主义者中,仅可见最低水平。其缺乏甚至更严重,并被一些作者认为是疾病色素性视网膜炎(RP)以及与过氧化物酶体缺陷有关的代谢性的神经退行性疾病的标志物。

[0017] 鉴于全世界范围内对纯化  $\omega$ -3 脂肪酸(主要为 DHA、EPA 或二者)的关注,几十年来,已有多个专利和常规程序来获得富含 DHA 和 EPA 的精制油,从而获得更高的纯度。

[0018] 然而,如图 3 所示,市场上现有的和通过专利方法和良好生产规范(Good Manufacturing Practice, GMP)获得的精制和纯化油,含有高水平的 PhA,甚至在具有高 DHA 纯度的那些油中也是如此。

[0019] PhA 对健康的负面作用。

[0020] PhA 是公共健康的风险因素,原因在于其引起前列腺癌、乳腺癌、结肠癌等以及神经和视觉障碍(Lloyd-MD 等人,2008;Allen-NE 等人,2008;Thornburg-G 等人,2006 年;Xu-J 等人,2005 年)。此外,它具有细胞毒性(Komen-JC 等人,2007 年;Schönfeld et Reiser,2006 年;Schönfeld 等人,2006 年;Heinz,2005 年;Elmazar & Nau,2004 年)。PhA 的摄入是下列疾病的发展和/或演化的风险因素:眼部(视网膜、白内障、干眼等)、嗅觉和听觉改变,神经(阿尔茨海默氏病、脑病等)和精神改变,肾脏改变,心血管(电异常 S. Purkinje、平滑肌改变、缺血性心脏病、动脉粥样硬化),肌病和严重肌萎缩,骨改变,肝改变,男性和女性生育力的改变,慢性自身免疫和炎症性疾病(克罗恩病、溃疡性结肠炎、LES)和癌症(前列腺、结肠、乳腺、肾脏、卵巢、一些类型的白血病等)。

[0021] PhA 对感觉神经和神经组织、心脏、肾、肝、肠、平滑肌和横纹肌、前列腺、乳腺、精子、肺和骨系统具有毒性的确切机制正在逐步得到阐明。最为众所周知的机制与肿瘤标志物( $\alpha$ -methylacyl 辅酶 A 消旋酶(AMACAR)或 SPC-2)的过表达以及线粒体和细胞质膜中的呼吸电子传递链的解偶联去质子作用(即视网膜中的光传导)有关。在极低剂量下,PhA 是具有体内氧化应激最高诱导作用的分子之一,其增强致畸,并且是动脉粥样硬化和心力衰竭造成死亡的重要诱导因子。

[0022] PhA 对线粒体具有直接的毒性,并且表现具有致动脉粥样硬化的强活性。PhA 在线粒体内膜的氧化磷酸化作用中的复合物 I 解偶联中具有鱼藤酮型活性,导致随后产生活性氧簇以及 DHA 和其它多不饱和脂肪酸或 PUFA 的体内脂质过氧化(Kahler-S 等人,2005 年)。

其降低磷脂（主要在光受体和神经组织中）中的 DHA 水平，提高对缺血、心血管再灌注创伤和低密度脂蛋白 (LDLox) 氧化的敏感性，提高巨噬细胞抗炎活性，降低活力和代谢活性（抑制氧化磷酸化作用）并诱导线粒体 DNA 突变。其自身的此毒性代谢活性对下述情况作出了解释：光受体、色素上皮、神经组织 (Purkinje 细胞)、肾、肝、卵巢、精子、肺等所有富含线粒体的组织是在具有 PhA 高浓度的患者中最先受到影响的部分。PhA 诱导 Purkinje 细胞中  $Ca^{+2}$  介导的细胞凋亡 (Powers-J. M 等人, 1999 年) 和动物模型中的心脏性猝死。PhA 造成缺血、血管平滑肌的细胞凋亡、致动脉粥样硬化，特别具有心脏毒性。在小鼠中，甾醇-2 转运蛋白 (SPC-2) 的缺乏造成由 PhA 积累引起的心脏性猝死。PhA 诱导人、小鼠和猪的血管平滑肌细胞 (VSMC) 的细胞培养物的细胞凋亡。

[0023] 由于 PhA 造成的  $Ca^{+2}$  再吸收的活性改变和破骨细胞的细胞凋亡导致骨异常。在光受体外部（钙调蛋白特别浓集于在此处）膜上的与  $Ca^{+2}$  连接的蛋白负责控制光受体内部多个事件的  $Ca^{+2}$  流动，所述事件包括光传导和突触传导。钙调蛋白的功能由与其相连的多种蛋白介导，所述蛋白包括 GTP 酶。当光受体中的钙调蛋白浓度降低时，在视觉、特别是对光和暗的适应中会发生缺陷。

[0024] PhA 对睫状神经节细胞具有直接的毒性，所述睫状神经节细胞影响眼睑后部区域的副交感神经节神经，负责瞳孔缩小和视觉适应（老花眼、远视、光敏等）。PhA 干扰睫状细胞、基体以及与生物发生纤毛 (cillium) 所需的微管相连的蛋白的功能，所述功能受不同类型的肌球蛋白的相互作用和光受体原发纤毛中的 Rab GTP 酶的异戊烯化介导，影响必需蛋白例如 opsine 的转运、嗅觉细胞、耳蜗、肾细胞、呼吸系统、精子、肠微绒毛、以及视网膜色素上皮中的黑素体的运动。表现具有 PhA 的代谢改变的 RP 是睫状细胞改变的模型，可见精子轴丝和视杆睫状细胞的异常，引发依赖睫状体的视杆细胞外部的更新，造成不可逆的视力损害。并且，在没有相关综合症的 RP 中，发现了听觉诱发电位的改变以及与睫状细胞特有的耳蜗改变相一致的听力测定改变。睫状体的显著改变导致例如与听觉改变的综合症无关的患者的 RP 和耳聋，其方式与 Usher 和其它综合症相似。

[0025] Rho 和 Rab 家族小 G 蛋白需要在其 C 末端添加这些类异戊二烯基部分以发挥正常的 GTP 酶功能。特别需要 Rho GTP 酶信号传导途径来靶向在下述疾病中的治疗性干预：肾脏疾病、神经障碍（髓鞘形成）、癌症发展、心血管疾病、感染性疾病等。PhA 和其它类异戊二烯以与 DHA 和他汀类相反的方式损害 Rho-GTP 酶信号传导，特别是 Rac 途径。PhA 以与一些生物毒素类似的方式改变上皮和消化和呼吸粘膜中的 Rho-GTP 酶，从而发展侵入和感染过程；肿瘤过程和转移（即前列腺、乳腺）、肾损伤（肾小球、肾小管等）和 demyelination。

[0026] 这些 GTP 酶作为主要机制，解释了无 PhA 的 DHA 比有 PhA 的 DHA 在本发明的多种应用中更有效的原因。

[0027] 此外，PhA 和 PA 是血管发生和炎症表型的主要和最有力的介质的控制者。PhA 和 PA 诱导血管发生、TNF  $\alpha$ 、GBP-1、GBP-2 和炎性细胞因子 (CI) 是发展癌症（转移）、自身免疫疾病、炎性疾病、感染性疾病、肾、肺和神经疾病的决定因素。

[0028] PhA 通过氧化成为 PA，并且 PhA 和 PA 二者在处理 2 小时内都诱导由一氧化氮合酶和高浓度的该蛋白的 UNAM 形成介导的细胞凋亡 (Ide1 等人 2002)。此外，PhA 和 PA 控制血管发生表型和炎症的主要和最有力的介质。并且，PhA 和 PA 是活化和分泌肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF  $\alpha$ ) 的最有力的诱导剂 (Ide1 等人 2002)。人鸟苷酸结合蛋白 (GBP)-1 的表达

由炎症细胞因子 (IC) 高度诱导,因此,可以表征 IC- 活化细胞。GBP-1 是表征内皮细胞的 IC- 活化表型的新型细胞活化标志物。GBP-1 是内皮细胞对 IC 的抗血管生成响应的主要调节子。GBP-1 是胞浆蛋白,其在内皮细胞中的表达由干扰素- $\gamma$ 、白介素-1 $\alpha$ 、白介素-1 $\beta$ 、或 TNF- $\alpha$  选择性地诱导,但不被其它细胞因子、趋化因子、或生长因子诱导。PhA 和 PA 是  $\alpha$  TNF 和干扰素  $\gamma$  的诱导剂。GBP-1 表达与血管内皮细胞高度相关,而在皮肤中是不可检测的,但是其在具有高炎症组分的皮肤疾病的血管中被高度诱导,所述皮肤疾病包括银屑病、药物不良反应、和卡波西氏肉瘤。已表明 GBP-1 的表达和基质金属蛋白酶-1 (MMP-1) 的表达在体内和体外负相关,并且 GBP-1 在内皮细胞中选择性抑制 MMP-1 的表达,而不抑制其它蛋白酶的表达。后一发现表明,毛细血管形成的抑制特异性地归因于 GBP-1 对 MMP-1 表达的抑制,而不被 GBP-1 的螺旋结构域的抗增殖活性影响 (Guenzi 等人,2003 年)。

[0029] PhA 引发视黄酸的致畸作用 (Elmazar & Nau, 2004 年),这是特别相关的,原因在于经常与 PhA 相结合的 DHA 推荐用于怀孕、哺乳和儿童食品中。

[0030] 色素性视网膜炎 (RP) 是研究在 DHA 存在下 PhA 的毒性的理想模型,如本文献将要进一步阐明的。PhA 的物化性质使其成为在 DHA 开始掺入到磷脂 2 位 (DHA 在光感受器中的通常位置) 时的重要竞争者。PhA 具有大量自由旋转键 (14 个),且具有非常低的结晶点,使其在膜中具有高度流动性。然而,由于范德华力与视紫红质的  $\alpha$ -螺旋相互作用,PhA 缺少 DHA 特有的结构构型,这对于其在膜中的运动和四级结构是必需的。因此,PhA 降低视紫红质和光传导的活性。PhA 具有使光感受器膜解偶联的能力,造成见于 RP 中光传导失败 (连续超极化)。PhA 对于氧化造成降解不敏感,并且对如见于 RP 中的那些营养不良条件具有抗性。这特别会发生于 DHA 缺乏的情况下,例如在作为营养不良的后果的 RP 中,在这种情况下,RP 是其中 DHA 缺乏的单一疾病,所述 DHA 缺乏被认为是该疾病的标志物。

[0031] PhA 通过其掺入到磷脂和甘油三酯中而改变光感受器的功能,从而替代 DHA (McCoII & Converse, 1995 年; Powers 等人, 1999 年, Mönning 等人, 2004 年) 并且由于脂质过氧化和由 PhA 引起的线粒体损伤而降低 DHA 的水平。PhA 还具有毒性能力,从而在线粒体和光感受器膜中都作为质子转运体 (解偶联剂) (Gutknecht-J, 1988 年),从而改变光感受器外部区段的极化。

[0032] 用 PhA 替代 DHA。

[0033] PhA 通过其掺入到磷脂和甘油三酯中而改变光感受器的功能,从而从 ROS 膜中和线粒体中的磷脂的第 2 个碳替代 DHA。因此, DHA 在膜中被 PhA 替代,改变了光感受器的功能,成为在光传导中的 DHA 拮抗剂,改变了钙的动态平衡和视紫红质的再生。DHA 被 PhA 替代是一些疾病中的不同作用机制之一 (即 RD = 雷弗素姆氏疾病),是部分致病机制。

[0034] 而 DHA 是细胞凋亡的抑制剂,以及光感受器的神经营养或存活因素,PhA 则是氧化和体内细胞凋亡的最有力的诱导剂之一,以拮抗剂方式干扰 DHA 的作用机制。由于 DHA 抑制视网膜内细胞凋亡的能力被 PhA 的存在以剂量依赖性方式降低,因此油中的 PhA 水平干扰 DHA 的活性。

[0035] PhA 在具有 RP 的动物模型中造成光感受器的细胞凋亡,产生线粒体的不可逆的损伤。在这些条件下,负责光感受器存活的肽无法抑制细胞凋亡。然而,DHA 是在营养不良条件下中和视网膜中的反应性物质的唯一的脂肪酸。PhA 在营养不良的视网膜中特别具有毒性,而 DHA 降低其作用。已证实 DHA 是氧化应激和不可逆的线粒体损伤的抑制剂,所述不可

逆的线粒体损伤导致光感受器退化 (Rotstein 等人, 2003 年)。

[0036] 因此, 可以得出以下结论: PhA 除具有毒性外, 还在所涉及的所有适应症中是 DHA 的拮抗剂。特别地, PhA 以 DHA 的拮抗剂的方式经线粒体诱导细胞凋亡。

[0037] 在本发明中, 已开发了两个在光感受器中诱导细胞凋亡的临床前实验, 所述光感受器具有百草枯 (图 1) 和 MNU (图 2), 从而研究 DHA 与 PhA 浓度相联系的体外和体内抗细胞凋亡作用。在两个实验中都证实了 DHA 在光感受器中的抗细胞凋亡能力与 PhA 浓度负相关。通过 0 至 20  $\mu\text{g/g}$  的浓度获得了最高的抗细胞凋亡活性, 其中比率 Bcl-2/Bax 显著低于饲喂  $< 5 \mu\text{g/g}$  的小鼠。

[0038] PhA 的毒性。

[0039] PHA 氧化的代谢改变或药理或营养相互作用并不一定是表现毒性所必需的, 这是由于通过常规膳食的 PhA 的营养剂量也造成 PhA 的显著改变以及健康和毒性的风险上升。以示意方式, PhA 通过其低剂量摄入的毒性与下述情况相关:

[0040] 1. PhA 的氧化过程被包括为生理病理过程——诱导 AMACAR——的一部分。PhA 对健康的作用还由与流行病学价值极大的多种癌症有关的某些分子标志物的过表达决定, 所述多种癌症为前列腺癌、结直肠癌和肾细胞癌。存在证据即此相同的标志物与卵巢癌、乳腺癌以及与对胰岛素抗性有关的内分泌癌症相关。PhA 对于导致过表达 AMACAR 和 SPC-2 的数种肿瘤细胞系 (前列腺、肾、乳腺、结肠、肺) 的存活至关重要。已描述了具有神经病、RP 的下述病例: 其 AMACAR 缺陷, 且 PhA 和 PA 上升 (Ferdinanduse 等人, 2000 年)。

[0041] 2. 在具有 RP 的患者中, 例如在幼年或成人的雷弗素姆氏疾病、脑肝肾综合症、新生儿肾上腺脑白质营养不良和肢根点状软骨发育不良中, PhA 氧化失败造成 PhA 积累增加。

[0042] 3. 然而, 相比正常人群, 由于过氧化物酶体缺陷, 其它遗传疾病表现出 PhA 的提高, 例如在 a) 具有线粒体病 (复合物 IV)、COX 缺陷、Leigh 综合症、肾范可尼综合症的疾病中 (Fingerhut R 等人 1994)。

[0043] 4. 经氧化和细胞色素 P450 消除超过 50mg/ 天的 PhA。众所周知, 细胞色素 P450 介导 PhA 的氧化, 但是还已知存在细胞色素 P450 的强抑制剂 (即唑类抗真菌药、丙戊酸、西咪替丁、红霉素、磺胺甲基异噁唑、阿片类、环孢素、蛋白酶抑制剂、抗抑郁剂、刺桐硷、巴比妥类、抗组胺药、它莫西芬、大麻素类、S-warfarine 等)。因此, 某些药物能够以显著方式提高 PhA 浓度。多种药物治疗剂抑制 PhA 的代谢降解, 从而积累并且主要形成视网膜毒性、神经和心血管毒性。PhA 可以和钙拮抗剂、抗血管生成剂、免疫抑制剂和抗炎剂相互作用。人体内, 细胞色素 P450 的不同同工酶 (即 CYP2C8) 介导 PhA 的快速氧化 ( $\alpha$ -氧化 = PhA 的 90% 氧化)。由于其商业价值和用途, 一种最为突出的药物是高血脂药: 贝特类和他汀类, 这是 P450 CYP2C8 的抑制剂, 强烈抑制 PhA 氧化代谢从而造成 PhA 积累。贝特类活化过氧化物酶体的  $\beta$  氧化, 但是 PhA 的降解需要  $\alpha$  氧化, 贝特类通过抑制细胞色素 P450 CYP2C8 而抑制  $\alpha$  氧化。PhA 可能是其主要次生效应即横纹肌溶解的部分成因。

[0044] 5. PhA 氧化中的次生故障: 在阿尔茨海默氏病中, 过氧化物酶体中的硫胺素依赖性酶的活性被降低, 导致 PhA 氧化所必需的羟基植烷酰辅酶 A 裂解酶的量降低。伴随着见于阿尔茨海默氏病中的乙酰胆碱水平提高, 可见 PhA 水平的提高。

[0045] 6. 引发硫胺素降低的营养改变 (抗代谢物: 硫胺素酶和硫胺素拮抗剂乙酰胆碱) (其中经裂解酶, 焦磷酸硫胺素是 PhA 氧化的辅因子) 以及最为熟知的之中的硫胺素缺乏与

Wernicke-Korsakoff 综合症有关,即由于摄入 carp 和 salmonid 造成的致命的心血管疾病(维生素 B 缺乏)和神经毒性综合症。硫胺素拮抗剂见于例如来自植物和常规食物(即茶、葡萄、柠檬酸等)的食物防腐剂(即亚硫酸盐)的物质中,其对沸腾具有抗性(间和羟基苯酚),例如咖啡酸、绿原酸和单宁酸、槲皮黄素和 rutine(经常用于药物中和用作食品添加剂);来自食物的硫胺素酶(常见于主要来自鱼类养殖场的鱼类中,80%的摄入)、酸菜、奶制品和反刍动物的肉(富含 PhA)、醇摄入、葡萄果汁(以及较轻程度的橙汁、中国柑橘、苹果、葡萄及其衍生物)和咖啡因能够引起较轻程度的 PhA 累积。令人感兴趣的模型是产生硫胺素和神经感受性耳聋的遗传疾病。仅需要醇和吡啶硫胺素(硫胺素抗代谢物)100  $\mu$ g/ml 即可在短于 7 天内产生严重的硫胺素缺乏。这些相互作用引起关注,其不仅对于获取食物中所含的 PhA 和植醇是重要的,而且与膳食、药物治疗剂、食品添加剂和习惯有关的食物可以引发来自膳食的 PhA 的积累。

[0046] 7. 在另一方面,流行病学数据确定,认为正常的剂量(50-100mg/天)具有毒性效应,在低至 0.1  $\mu$ mol/mg 脂肪的剂量即具有毒性。即使在低得多的浓度,PhA 是具有诱导体内氧化的最强能力的分子之一,其与 DHA 的一些必需生理机制相互作用并降低其体内水平,通过脂质过氧化损害其结构。在神经组织的总脂肪酸的 300  $\mu$ g/ml 或 < 1mmol/l (< 1% 总脂肪酸)和大约 5-10% 的这一极低血液浓度,其产生严重的神经疾病和死亡。在与 PhA 积累有关的死亡后毒性研究中(雷弗素姆氏疾病),最高水平见于达到总脂肪酸的 8.5% 的一些组织中<sup>23</sup>。成人和儿童中的具有严重 PhA 积累的雷弗素姆氏疾病是研究 PhA 毒性的理想模型,其包括色素性视网膜炎、眼球震颤、眼张力过低、运动失调、智力和生长迟缓、面部和骨变形、肝肿大和低胆固醇血症。

[0047] DHA 和 PhA

[0048] PhA 毒性与其中推荐 DHA 摄入和使用的疾病和情况有关,例如色素性视网膜炎(RP),其中 DHA 作为疾病的标志物,而 PhA 为 RP 的病原。通常需要 DHA 用于其治疗的疾病同时受 PhA 诱导。除了癌症,最为明显的是 RP。支链脂肪酸 PhA 和 PA 是不同 RP 疾病的标志物(雷弗素姆氏、新生儿肾上腺脑白质营养不良(NALD)、肢根点状软骨发育不良、脑肝肾综合症、Usher IV),所述不同 RP 疾病与 PA 的  $\alpha$  和  $\beta$  氧化的代谢缺陷有关。PhA 是这些病况中 RP 的单独成因。

[0049] 数十年来,已知 RP 中,所有靶组织中都缺乏 DHA。具有 RP 的所有患者都表现出 DHA 代谢的改变,并且其绝大部分具有高浓度的 PhA,后者在某种程度上是疾病发展的成因。DHA 缺乏的程度并不与疾病的发展和预后有关。从这一点来看,非全身的主要常染色体的 RP 是所有遗传性疾病中最为良性的(博士论文 Cella-López, JM),即使在 DHA 水平低于那些偶尔摄入的情况下也是如此(Schaefer 等人,1995 年)。然而,在具有 XLRP 的患者中 2g/天的 DHA 的口服也不能使 DHA 的水平正常化,这是由于在营养不良的视网膜中的 DHA 损失需要摄入 4g/天,从而使红细胞磷脂中的 DHA 水平正常化。不同类型的 RP 的发展和预后取决于 DHA 和其最初摄入时刻的药物剂量以及 PhA 水平。因此,可以说,PhA 的浓度与疾病的发展和中枢功能(黄斑区)的损失中最严重的预后有关。

[0050] 植烷酸水平提高已见于用“DHA”的治疗中。

[0051] 来自到达我们实验室的 4 位患者的 4 个样品用于评估在具有 RP 的两个综合症中用 DHA 治疗的有益效果。在 3 个月期间,用 4g/天的 DHA(4.86mg 植烷的)对 4 位患者(具

有青少年雷弗素姆氏病和脑肝肾综合症)进行治疗,以 50%和 44%提高了支链脂肪酸植烷酸和降植烷酸的量。以平行方式观察到临床病况的完全恶化:神经性的耳聋和 RP(视觉灵敏度和视野)。来自 Kennedy Krieger 研究所(Baltimore)的过氧化物酶体实验室定期提供的对他们全年研究的所有患者的所有分析结果,对来自鱼类的 DHA 的摄入提高了植烷酸的毒性水平,因此,他们一直推荐来自藻类的 DHA。数据表明 DHA 的商业浓度对具有和过氧化物酶体缺陷有关的 RP 患者具有毒性。

[0052] 1994 年,RP 患者协会(AARPE,西班牙)进行了具有 RP 的 17 位患者的研究,所述患者具有或不具有综合症(雷弗素姆氏、脑肝肾、NADL、Kearns、Bordet-Bield、常染色体缺陷 RP、和偶发 RP),且具有血浆内植烷酸的升高的水平。他们在 1 个月至 3 年的不同时间段内都摄入具有不同量的植烷酸(5mg 至 11.5mg/天)的 DHA 油。他们都显示植烷酸水平从 23%升高至 82%,无论其鱼油来源。1 年后,RP 的发展要比不具有综合症的 RP 患者(11 位患者)(小 8.3%)中所期望的大,尽管在具有综合症的患者中(6 位患者),视觉功能的损失相当严重。接下来,放弃用富含植烷酸的 DHA 进行治疗,根据植烷酸的血浆水平(中度水平:5-30  $\mu$ g/ml;高水平 30-900  $\mu$ g/ml)将患者分成两组。进行用 4g 低植烷酸(< 90  $\mu$ g/ml)的 DHA 治疗,评估植烷酸的水平 and 视觉功能。在具有中度植烷酸水平的组(与综合症无关)中,观察到植烷酸水平的逐步降低,在十二个月内变得正常(图 4)。同时,在疾病的进展中观察到视觉功能的回复,其和开始用富含植烷酸的 DHA 治疗之前获得的相似。

[0053] PhA 的毒性和摄入富含 DHA 和 EPA 的来源(即金枪鱼)有关,因为其以非常低的百分比(约 0.1%)存在于油中。

[0054] PhA 存在于人类膳食或动物组织中,在动物组织中,它可以从植物提取物获得叶绿素,这是它可以在动物组织中积累的原因。PhA 由植醇形成,并且氧化形成降植烷酸(PA)。鉴于人群脂肪膳食中存在较大不同(素食主义、蛋奶素食主义等),已经发现 PhA 血液水平的变化(达 6.7 倍)完全与从常规膳食中摄入 PhA 有关,其中素食主义膳食表现出高达 10 倍少的 PhA,而同时极度缺乏 DHA。

[0055] 植烷酸是前列腺癌的风险因素,而 DHA 是相同类型的癌症的保护因素。具有超出众多分子研究的证据,并且受到流行病学数据和众多病理研究的支持,其中膳食研究关于 DHA 与其它化学治疗药物(塞来考西、Plaquitaxel)在预防和临床治疗前列腺癌以及胃癌中的作用,其中一些进展良好(II 期)(Ballet 等人,2004 年;Jones 等人,2007 年)。对于植烷酸在诱导前列腺癌中的作用,还存在足够的流行病学证据(Walsh,2005 年;Xu 等人,2005 年;Thornburg 等人,2006 年;Mobley 等人,2003 年)。此外,还存在将摄入脂肪鱼类、红肉和奶制品(具有最高浓度植烷酸的来源)与前列腺癌联系起来的 3 个不同研究。

[0056] 在专利领域,已知有文献来纯化含有 EPA 和 DHA 的油,例如文献 US 4,874,629(1989),其涉及处理含有  $\omega$ -3 脂肪酸的油的程序,例如大马哈鱼、沙丁鱼和其它含有 EPA 和 DHA 的鱼类,其基本包括:a)在 30-150 摄氏度下使油进行真空蒸馏 2-5 小时,然后使油与选自硅胶和硅酸的吸收剂接触,以降低高沸点温度和减少最挥发的极性调味剂以及其它不期望的组分。例如聚合物、胆固醇、色素、杀虫剂和重金属;和 b)之后从混合物中回收油。之后,同一作者在 US 5,023,100 中应用前述程序来产生具有 EPA 和 DHA 的食用油,其可以与植物油和/或迷迭香油组合以改善其氧化稳定性。

[0057] 同样,文献 US2008/0268117 A1 描述了纯化含有 EPA 和 DHA 的油的方法,其包括:

(a) 在油和醇分离成 2 个相的温度 (约 10 摄氏度) 下, 向油中加入 C1-C4 的脂族醇, 优选 60-70% 的乙醇水溶液; (b) 加热混合物直至油和醇开始混溶 (50-80 摄氏度); (c) 在油和醇分离的温度 (约 10 摄氏度) 下, 冷却混合物; 以及 (d) 回收油相。特别指出的是, 此方法尤其足以制备用于食品和药品的油, 其原因在于下述事实: 前述方法消除了例如胆固醇的有机污染物和例如汞的重金属。事实上, 其提到以此方法制备的油特别适用于制备婴儿配方 (US 5, 013, 569) 和用于治疗风湿性关节炎的组合物 (US 4, 843, 095)。

[0058] 还存在用于获得 EPA 和 DHA 甘油三酯的文献, 例如文献 ES 2035751 T3, 其涉及制备在分子中具有至少一个长脂肪酸 C8+ 的甘油三酯的程序, 其特征在于在酯酶存在下进行游离长链脂肪酸或其一个低级烷基酯 C1-C4 与分子中具有一个或多个短链脂肪酸 C2-C6 的甘油三酯的酯交换, 并且在反应过程中通过蒸发分离短链脂肪酸或其低级烷基酯以及组合物, 在组合物中多不饱和脂肪酸为 EPA 或 DHA 或者二者的混合物。文献 GB 2350610 A 描述了由这种油将 DHA 制备为甘油三酯, 其通过组合使用下述反应的程序进行: 甘油三酯与低级烷基醇的酯转移反应、蒸馏和采用通过可以固定化的酯酶催化的与烷氧基醇的选择性酯转移反应。此外, 文献 US2008/0114181 A1 涉及用于采用脂族醇 C1-C8 将脂肪酸酯化为甘油三酯的方法。该方法采用酸性离子交换树脂作为催化剂, 其在进行酯化反应的充足条件下与反应混合物接触, 所述反应混合物含有至少具有 1% 的游离脂肪酸的甘油三酯。

[0059] 同样, 已知作为乙基酯获得 EPA 和 DHA 的方法, 例如在文献 US 5, 679, 809 中, 其描述了用于从多不饱和脂肪酸获得乙基酯浓缩物的程序, 所述多不饱和脂肪酸优选为 EPA 和 DHA, 所述方法包括: 在催化剂存在下, 将含有脂肪酸的油与乙醇混合, 从而形成脂肪酸的乙基酯, 通过将其与尿素和乙醇混合分离其相, 然后将其冷却直至产生固相, 之后分离液相, 从中获得富含期望的多不饱和酸的级份。另一篇文献是 EP 0347509 A1, 其也采用尿素来分离饱和的脂肪酸和来自存在于海洋动物油中的剩余脂肪酸的多数单不饱和脂肪酸, 所述文献中获得的最终产物为 EPA 和 DHA 的混合物。文献 US 5734071 使用和尿素类似的方法从鱼油中获得了含有 EPA+DHA 的产品, 而 ES 2018384 以 1 : 2 至 2 : 1 的相对量制备了含有 EPA 和 DHA 的组合物, 其中这些脂肪酸占总脂肪酸的 75% (重量), 并且还有一种方法, 其使用通过用尿素分级的浓缩和分子蒸馏和 / 或在超严格条件或色谱法下用流体萃取。

[0060] 文献 ES 2056852 T3 还要求保护一种用于从鱼油中提取 DHA 的乙基酯的程序, 其包括在硫酸存在下, 用乙醇进行鱼油的酯转移反应, 然后用己烷、硅胶色谱法进行萃取, 在冷却至 -40 摄氏度的丙酮中处理残余物, 过滤, 蒸发丙酮, 在 0, 133Pa 下分两步进行分子蒸馏, 其中第一步在 80-100 摄氏度下, 第二步在 105-125 摄氏度下。

[0061] 存在大量文献涉及将 DHA 用于不同需求状态和上文提及的疾病。例如, 我们将提到文献 CN1557453(A), 其描述了一种提高记忆并改善认知的组合物, 所述组合物包含千层塔、还阳草和 50mg 的鱼油浓缩物, 其中 DHA 为活性物质。该文献强调, 其加强信息在神经元突触连接之间的传递, 改善对缺氧的耐受, 稳定神经细胞的结构, 并且给此类神经细胞提供必需营养物质。

[0062] 此外, 在不同文献中都提及 DHA 具有健康的有益性质, 例如, 作为用于人类大脑的营养物质和恢复智力 (CN 1130040(A))。在 JP 8098659(A) 中, 提到 DHA 作为酯或磷脂, 具有抗压的改进效果。CN 1105205(A) 描述了这样一种胶囊, 其含有 11-45% 的纯 DHA 以及钙、维生素和淀粉, 从而补养大脑和活化智力。此外, 文献 ES 2277557 A1 涉及 DHA 用于制备药



物组合物的用途,所述药物组合物用于治疗氧化性细胞损伤。

[0063] 在本领域中,可以发现选择性分离和纯化 EPA 和 DHA 的文献。因此,文献 EP 1065196 A1 涉及从酸或酯的混合物中选择性分离和纯化 EPA 或 DHA 或它们的酯的方法,所述方法包括:(a) 将具有银盐的含水流体通过具有硅藻土的柱子,从而使银盐附着于硅藻土上;(b) 使含有高度不饱和的脂肪酸或其衍生物的混合物的溶剂的溶液通过该具有硅藻土和银盐的柱子;以及(c) 通过溶剂来分离期望的脂肪酸。

[0064] 文献 US 6,846,942 B2 涉及用于制备纯 EPA 和 DHA 的方法,所述方法包括:a) 将 DHA 和 EPA 的混合物溶解于丙酮中,并加入镁离子,产生在丙酮中具有不同溶解性的 EPA 和 DHA;b) 冷却(a) 中获得的溶液以沉淀 EPA 盐,c) 过滤沉淀的 EPA 盐,以及 d) 酸化获得的沉淀物,从而获得纯 EPA,以及 e) 从滤液中蒸发溶剂,以获得纯 DHA。当 EPA 和 DHA 混合物获自鱼油时,首先进行醇解或皂化,从而将甘油三酯转化成游离酸。

[0065] 因此,仍存在对下述组合物的需求:所述组合物应该不仅由于健康有效量(即高量的 DHA) 的 DHA 的存在而对膳食和健康有益,而且同时,其应该含有最少可能量的 PhA,从而防止在摄入 DHA 时 PhA 的作用。

## 发明内容

[0066] 因此,本发明的第一个目的是从海洋来源的油中获得富含  $\omega$ -3 脂肪酸的组合物的方法,所述  $\omega$ -3 脂肪酸具有低于  $90 \mu\text{g/g}$  的植烷酸水平,其中所述方法包括下述步骤:

[0067] a) 皂化海洋来源的油,从而获得脂肪酸盐。

[0068] b) 酸化来自步骤 a) 的脂肪酸盐,从而获得酸化的油。

[0069] c) 在真空(27Pa)下,在 10 摄氏度的温度下,在甘油梯度中使来自步骤 b) 的酸化的油进行超离心。

[0070] d) 在 0 摄氏度至 -57 摄氏度的温度范围,使来自步骤 c) 的甘油梯度进行结晶,从而获得固相和液相,其中固相含有饱和脂肪酸、单不饱和脂肪酸和 PhA,而液相含有 PhA 含量低于  $90 \mu\text{g/g}$  的多不饱和  $\omega$ -3 脂肪酸。

[0071] e) 从固相中分离来自步骤 d) 的液相,以通过倾析进行其回收。

[0072] 并且,所述方法包括另外的步骤,其中酯化所述  $\omega$ -3 脂肪酸以获得 PhA 含量低于  $90 \mu\text{g/g}$  的  $\omega$ -3 甘油三酯。

[0073] 在优选实施方式中,在惰性气氛下,在 40 摄氏度的温度下,采用 KOH、水和乙醇以 300rpm 震摇混合物 1 小时而进行本发明目的的皂化步骤。在另一个优选实施方式中,在惰性气氛下以 200rpm 混合步骤(a) 中获得的脂肪酸盐和 70% 的乙酸而进行酸化步骤 b)。

[0074] 如果步骤 c 的超离心为等密度的,则意味着采用的超离心条件应该是 100000g 持续 42 小时。如果超离心为根据未平衡的密度梯度,则超离心条件应该是 100000g 持续 24 小时。

[0075] 在另一个优选实施方式中,如果超离心步骤是等密度的,则在 0 摄氏度的温度下进行结晶步骤。

[0076] 在另一个优选实施方式中,如果超离心步骤是等密度的,则在 -30 摄氏度的温度下进行结晶步骤。

[0077] 在另一个优选实施方式中,如果超离心步骤是在未平衡的密度梯度的,则在 -30

摄氏度的温度下进行结晶步骤。

[0078] 本发明的第二个目的包括组合物,其根据第一发明中描述的方法获得,所述组合物具有范围为 65% (重量) 至 99% (重量) 的  $\omega$ -3 脂肪酸,所述  $\omega$ -3 脂肪酸具有低于 90  $\mu$ g/g 的 PhA 含量;优选的,所述组合物具有范围为 75% (重量) 至 99% (重量) 的  $\omega$ -3 脂肪酸含量;更优选的,其中所述  $\omega$ -3 脂肪酸占重量的至少 90%。

[0079] 在另一个优选实施方式中,根据第一发明中描述的方法获得所述组合物,所述组合物具有范围为 65% (重量) 至 99% (重量) 的  $\omega$ -3 脂肪酸,所述  $\omega$ -3 脂肪酸具有低于 5  $\mu$ g/g 的 PhA 含量;优选的,所述组合物具有范围为 75% (重量) 至 99% (重量) 的  $\omega$ -3 脂肪酸含量;更优选的,其中所述  $\omega$ -3 脂肪酸占重量的至少 90%。

[0080] 在另一个优选实施方式中,根据第一发明中描述的方法获得所述组合物,所述  $\omega$ -3 脂肪酸包含范围为 65% (重量) 至 95% (重量) 的 DHA,并且 PhA 含量低于 90  $\mu$ g/g;优选地,具有 75% (重量) 至 95% (重量) 的 DHA 含量;更优选地,具有小于 80% (重量) 的 DHA 含量。

[0081] 在另一个实施方式中,根据第一发明所述的方法获得所述组合物,所述  $\omega$ -3 脂肪酸包含范围为 65% (重量) 至 95% (重量) 的 DHA,并且 PhA 含量低于 5  $\mu$ g/g;优选地,具有 75% (重量) 至 95% (重量) 的 DHA 含量;更优选地,具有至少 80% (重量) 的 DHA 含量。

[0082] 在另一个实施方式中,根据第一发明所述的方法获得所述  $\omega$ -3 脂肪酸组合物,所述  $\omega$ -3 脂肪酸组合物还包含范围为 5% (重量) 至 35% (重量) 的 EPA。

[0083] 在另一个优选实施方式中,根据第一发明所述的方法获得包含 DHA 的所述  $\omega$ -3 脂肪酸组合物,其还包含范围为 5% (重量) 至 35% (重量) 的 EPA。

[0084] 在优选实施方式中,根据第一发明所述的方法获得的所述组合物中,DHA 的重量百分比为 80.65%,EPA 的重量百分比为 13.38%,在所述组合物中的脂肪酸总重量中的百分比为 91.75%。

[0085] 在优选实施方式中,根据第一发明所述的方法获得的所述组合物还包含辅因子、提取物和 / 或用于药物或食品用途的活性物质。

[0086] 在优选实施方式中,根据第一发明所述的方法获得的所述组合物还包含用于药物或食品用途的赋形剂和 / 或佐剂。

[0087] 本发明的第三个目的涉及营养添加剂,其在可饮用形式、软或硬胶囊、水性乳液或粉末中含有在本发明的第二个目的中描述的组合物。

[0088] 本发明的第四个目的涉及食品,其在可饮用形式、软或硬胶囊、水性乳液或粉末中含有在本发明的第二个目的中描述的组合物。

[0089] 本发明的第五个目的涉及药物组合物,其包含富含  $\omega$ -3 脂肪酸的化合物或药学稀释剂或载体,所述富含  $\omega$ -3 脂肪酸的化合物根据本发明的第二个目的或者可以通过根据本发明的第一个目的的方法获得。

[0090] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防过敏性病况、眼表面疾病和干眼症的药物组合物中的用途,所述疾病优选自眼睑炎、眼睑结膜炎、结膜炎、角膜炎、干燥性角膜结膜炎、角膜疾病,治疗角膜移植排斥,在 LASIK (激光辅助屈光角膜层状重塑术) 术前和术后通过测厚提高平均细胞角膜密度。

[0091] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防与遗传性营养不良无关的视网膜退行性疾病的药物组合物中的用途,所述疾病优选自:与增龄变性有关的潮湿性或干燥性黄斑变性、糖尿病视网膜病变、青光眼、眼内压改变、与近视有关的视网膜病变、视网膜脱落、LASIK 后近视眼中孔源性视网膜脱落、缺血造成的继发性黄斑水肿、黄斑囊样水肿或欧文-加斯综合症、柏林(Berlin)盲点、脉络膜病、脉络膜视网膜炎、梅毒性视神经视网膜炎、麻疹、巨细胞病毒、脉络膜的恶性黑色素瘤、汞中毒(水俣病、肢端痛、亨-罗二氏征)、视网膜血管炎(伊尔斯氏病)、出血外伤性视网膜劈裂。

[0092] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防非色素性视网膜炎的遗传性视网膜营养不良的药物组合物中的用途,所述疾病优选自 Stargardt 病(眼底黄斑点退化)、X-连锁的无脉络膜、先天性利伯氏黑蒙、X-连锁的视网膜劈裂症、Goldman-Favre 高-凡氏(Goldman-Favre)玻璃体视网膜营养不良、瓦格纳(Wagner)氏玻璃体视网膜营养不良、和斯蒂克勒(Stickler)氏综合症、睫状体平坦部炎。

[0093] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防非色素性视网膜炎的药物组合物中的用途。

[0094] 本发明的第九个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防非色素性视网膜炎相关综合症的药物组合物中的用途。

[0095] 在优选实施方式中,所治疗的视网膜营养不良是非综合症的 RP,其由于肝合成或 DHA 转运中的特定突变和/或故障,或者由于代谢压力,并且优选自典型非全身性 RP 的所有孟德尔类型,例如区域嵌合体的、两侧的、单侧的、两侧的、反向的;常染色体显性 RP;常染色体隐性 RP;X 连锁的 RP;简单或偶发的 RP;玻璃体视网膜 RP;RP 点状白变;不具有色素的 RP;脉络膜萎缩;脉络膜和/或视网膜萎缩;具有视锥细胞和视杆细胞营养不良的 RP;Usher 综合症,如 I、II、III、IV 型;医源性 RP,例如 NP 207;甲硫哒嗪、CloroKine、羟氯喹、氯丙嗪。

[0096] 在另一个优选实施方式中,所治疗的视网膜营养不良为具有过氧化物酶体缺陷的遗传性综合症,其具有 RP 和/或 DHA 缺乏和 PhA 和 PA 的提高,所述视网膜营养不良表现出可变的神经、心血管、肌肉骨骼和皮肤改变,并且优选自脑肝肾综合症、婴儿雷弗素姆氏疾病、新生儿肾上腺脑白质营养不良、过氧化物酶体生物发生异常、根茎软骨发育不全点状(RCDP)、乙酰辅酶 A 氧化酶缺陷、双功能酶缺陷、雷弗素姆氏疾病、 $\beta$ -氧化缺陷、家族性鱼鳞癣样角化病(舍格伦-拉森综合症)。具有线粒体营养不良的疾病(复合物 IV):COX 缺陷、Leigh 综合症。

[0097] 在另一个优选实施方式中,所治疗的视网膜营养不良为具有过氧化物酶体、线粒体缺陷和/或与 RP 和相关的视网膜改变有关的遗传性综合症,并且优选自棘状红细胞- $\beta$ -脂蛋白缺乏综合症(Bassen-kornzweig)综合症,巴氏或脂褐质症综合症,低 $\beta$ -脂蛋白血症,视网膜色素变性综合症(Usher 综合症),哈-斯二氏综合征(Hallervorden-Spatz)综合症,无铜蓝蛋白血症,卡恩斯-塞尔综合征(Kearns-Sayre)综合症,达-柏氏肌肉营养不良,拉-姆-巴-贝氏(Lawrence-Moon-Bardet-Biedl)综合症,拉-姆氏(Lawrence-Moon)综合症,巴-贝氏(Bardet-Biedl)综合症,拉格夫(Grafe)综合症,海氏(Hallgreen)综合症,科凯恩(Cokayne)综合症,阿氏(Alstrom)综合症,派-莫氏(Pelizaeus-Merzbacher)综合症,瑟氏运动失调症(Cerebellous Ataxy),弗氏(Friederich

Atax) 综合症, 脂褐素沉积病, 家族性玛-艾氏综合征 (maurotic idiopathic): 泰-撒氏 (Tay-Sachs) 综合症, 海-森氏 (Haltia-Santavuori) 综合症、贝-思-詹氏综合症 (Biel-Schowsky-Jansky), 沃-思-柏-麦氏 (Vogt-Spielmeyer-Batten-Mayou) 综合症, 库氏 (Kufs) 综合症, 骨神经内分泌发育不良, 莫氏综合症 (Mucopolisaccharidosis), 赫氏 (Hurler) 综合症, 亨特 (Hunter) 综合症, 斯氏 (Scheire) 综合症, MPS I-H/S, 瑟氏 (Sanfilippo) 综合症, 巴-科 (Bassen Kornzweig) 综合症、黑视网膜发育不良, 骨骼发育不良, 若-欧-思科氏 (renal-ocular-skeletal) 综合症, 爱德华兹 (Edwards) 综合症, 与 X 隐性连锁欧科 (Oculocerebrorenal) 或洛氏 (Lowe) 综合症, 莱-凡氏 (Lignac-Fanconi) 综合症 (胱氨酸病), 巨大轴索型神经病, 和 / 或家族性丹麦痴呆。

[0098] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防葡萄膜炎或相关疾病的药物组合物中的用途, 所述疾病优选自: 虹膜炎、扁平部睫状体炎、脉络膜炎、脉络膜视网膜炎、前部和 / 或后部葡萄膜炎、虹膜睫状体脉络膜炎、感染性葡萄膜炎例如布氏杆菌病、单纯疱疹病毒、带状疱疹、钩端螺旋体病、莱姆病、眼拟组织胞质菌病综合症、梅毒、弓蛔虫病、弓形体病、肺结核、念珠菌、葡萄膜炎综合症例如急性后部多灶性鳞状色素上皮病变、鸟枪弹样脉络膜视网膜病变、福斯氏异色虹膜睫状体炎、多灶性脉络膜炎和全葡萄膜炎综合症、多发性一过性白点综合症、点状内层脉络膜病变、匍行性脉络膜视网膜炎、与葡萄膜炎有关的全身性障碍例如强直性脊柱炎、白塞病、慢性肉芽肿、起止点炎、炎症性肠病、幼年类风湿病、风湿性关节炎、多发性硬化、结节性多动脉炎、银屑病关节炎、莱特尔氏病、结节病、系统性红斑狼疮、Vogt- 小柳原田综合症、惠普尔病、前部和 / 或后部的伪装综合症例如成视网膜细胞瘤、视网膜脱落、恶性黑色素瘤、白血病、幼年性黄色肉芽肿、眼内异物伤、淋巴瘤、多发性硬化、网状细胞肉瘤。

[0099] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防视网膜退行性疾病和与血管疾病有关的继发性眼科病况的药物组合物中的用途, 所述疾病优选自: 高血压性视网膜病变; 高压缺血性视神经病变; 高血压病变 (Hypertensive Choroidopathies), 例如脉络膜硬化、支静脉或中央静脉栓塞、艾氏和赛氏 (Elschnig and Slegrist) 条纹; 粥状动脉硬化; 脑和神经眼科缺血; 主动脉弓综合症; 主动脉弓综合症; 多发性大动脉炎; 全身动脉炎; 虹膜睫状体炎; 巩膜炎; 由缺血造成的视网膜前新血管化, 并且可导致玻璃体积血; 角膜水肿; 房水中炎性渗出物; 增生性糖尿病性视网膜病变或新生血管性青光眼; 颈动脉灌流不足或慢性眼部缺血; 眼动脉堵塞; 视网膜中心动脉堵塞; 凝血障碍, 例如蛋白 S 和 C 缺乏、潘氏视网膜炎 (Panophtalmia retinitis)、脉络膜炎、派氏停滞病变 (papilar stasis); 视网膜出血, 例如罗恩 (Roth 斑)、免疫复合物造成的损伤、视神经病变; 缺血性视网膜病变; 眼肌麻痹、眼眶假瘤; 眼部缺血综合症; 枕叶梗死; 复视; 眼睑水肿; 眼睑下垂; 眼睑毛细血管扩张; 结膜; 视网膜; 视网膜中央动脉急性堵塞; 眼科或其分支; 睫状后动脉堵塞, 例如非动脉炎性的缺血性视神经病变、低灌注造成的慢性眼部缺血综合症和视力模糊或思-达氏 (Shy-Drager) 综合症。

[0100] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防与视网膜或其它眼科用途无关的视觉灵敏度损失的药物组合物中的用途, 所述疾病优选自: 白内障、玻璃体炎、玻璃体脱落、眼内炎、远视、近视和 / 或老花眼。

[0101] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或

预防神经和 / 或精神障碍的药物组合物中的用途,特别是神经退行性疾病,优选自:遗传性运动和感觉性神经病、运动失调、痉挛状态、视神经炎、阿尔茨海默氏病、痴呆、原发性注意不足、抑郁、双相和分裂障碍、多发性硬化和 / 或肌萎缩性侧索硬化症。

[0102] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防癌性疾病的药物组合物中的用途,所述疾病优选自:转移和最为普遍的肿瘤系、结肠直肠癌、前列腺癌、乳腺癌、肺癌、卵巢癌、胃癌、艾氏(esofagic)癌、胰腺癌、肾癌、肝癌、脑癌、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、视网膜神经胶质瘤、胆囊、多发性骨髓瘤、内分泌癌和 / 或与对胰岛素抗性有关的癌症。

[0103] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防肾病(肾炎和肾病)的药物组合物中的用途,所述疾病优选自:IgA 肾病、与全身性红斑狼疮有关的肾病、肾功能不全、肾小球疾病、肾小管病、间隙组织和 / 或肾血管病。

[0104] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防心血管疾病的药物组合物中的用途,所述疾病优选自:缺血改变、动脉硬化、高甘油三酯血症、高脂血症、室性心律失常、高血压、糖尿病和 / 或其中脱辅基蛋白 a(载脂蛋白(a))水平提高的心血管疾病。

[0105] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防医源性疾病的药物组合物中的用途,所述疾病优选自:横纹肌溶解症、肝脏毒性、心脏毒性、神经毒性、水肿、脂肪营养不良、和 / 或与他汀类、类皮质激素类、免疫抑制、抗逆转录病毒药和 / 或免疫抑制剂有关的免疫抑制。

[0106] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防纤维肌痛和 / 或慢性疲劳综合症的药物组合物中的用途。

[0107] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防关节病和骨质疏松的药物组合物中的用途。

[0108] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防自身免疫疾病、慢性炎性和骨骼肌肉疾病的药物组合物中的用途,所述疾病优选自:类风湿关节炎、幼年型关节炎、肖各伦病(Sjogren disease)、强直性脊柱炎、全身性红斑狼疮、关节病、骨质疏松。

[0109] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防皮肤病的药物组合物中的用途,所述疾病优选自:雄激素性脱发、酒糟鼻、痤疮、湿疹和 / 或银屑病。

[0110] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防过敏性病况、哮喘和 / 或慢性呼吸性疾病的药物组合物中的用途。

[0111] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防呼吸系统疾病和炎性肠病的药物组合物中的用途,所述疾病优选自:自身免疫、病毒和 / 或毒性的、胃炎、食管炎、克罗恩病、溃疡性结肠炎、假膜性结肠炎、胶原性结肠炎、小肠通透性改变、消化吸收不良综合症、食物不耐受和过敏症和 / 或痔疮

[0112] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或预防寄生虫和感染性疾病的药物组合物中的用途。

[0113] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物在制备用于治疗或

预防 DHA 不足的药物组合物中的用途。在优选实施方式中,此类不足由小肠吸收不良综合症造成,其选自:囊肿性纤维化、小肠吸收不良综合症、胰腺炎、胰功能不全和 / 或胆石病。在另一个优选实施方式中,DHA 不足由消化道障碍造成,其选自:厌食症和 / 或易饥症。在第三个优选实施方式中,本发明目的的化合物涉及补充在人类社会观察到的常见营养 DHA 缺乏,优选在怀孕妇女、哺乳妇女和优选在出生第一年期间的儿童。

[0114] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物作为其它药物的辅因子或辅佐剂以降低其次生效应和 / 或提高其治疗活性的用途,当与他汀类、抗炎药、类皮质激素、免疫抑制剂、抗高血压药共同使用时治疗高血脂、抗炎、治疗自身免疫疾病、过敏、治疗移植器官排斥和 / 或抗高血压。

[0115] 本发明的另一个目的涉及根据本发明的第二个目的的化合物用于改善生理情况的用途,从而提高视觉灵敏度、记忆和认知功能,提高运动表现和降低损伤和 / 或降低正常神经肌肉疲劳。

### 附图说明

[0116] 图 1. 在不同 PhA 浓度 (蓝色) 和 Bcl-2/Bax 指数 (绿色) 下,DHA 对百草枯体外诱导的光感受体细胞凋亡 (%) 的抑制能力。红色线示出了不用 DHA 处理的细胞凋亡程度。在此实验中,可以明显看到具有  $< 5 \mu\text{g/g}$  的 PhA 的 DHA 油比具有较大浓度的那些油具有更大的细胞凋亡抑制活性,并且产生的氧化压力也比较小。这确定了体外 DHA  $< 5 \mu\text{g/g}$  作为细胞凋亡抑制剂对治疗视网膜营养不良具有较高的生理活性。

[0117] 图 2. 在不同 PhA 浓度 (蓝色) 和 Bcl-2/Bax 指数 (绿色) 下,DHA 对 MNU 体内诱导的光感受体细胞凋亡的抑制能力。红色线示出了不用 DHA 处理的细胞凋亡程度。此实验证实了体外观察结果,证明口服摄入具有  $< 5 \mu\text{g/g}$  的 PhA 的 DHA 作为细胞凋亡抑制剂对口服治疗视网膜营养不良具有较高的生理活性。

[0118] 图 3. 此图显示了在进行研究时市场上的主要公司和产品,以及市场上可见的具有最低 PhA 水平的那些产品。对于多数制造商,这些产品的质量和方法得到保障,满足根据欧洲药典和 FDA 的食品和药品 GMP,得到用于营养用途的明确批准。它们是专利的目的,并且在人类研究中进行了系统地研究。可以看到,不同纯度 DHA 的商业油含有高水平的 PhA,不论 DHA 纯度而明显不同。

[0119] 图 4. 在不具有综合症且具有 DHA  $< 5 \mu\text{g/ml}$  的患者中 PhA 水平的降低。此图示出 11 位具有无相关综合症的 RP 的患者采用含有 PhA  $< 5 \mu\text{g/g}$  的 DHA 的变化,所述患者事先用含有 PhA  $\geq 5 \mu\text{g/g}$  的 DHA 进行过治疗。在此图中,可以看到具有 RP 且具有 PhA  $\geq 5 \mu\text{g/g}$  水平的 DHA 的患者提高了他们 PhA 的水平 (T0),显示当摄入含有 PhA  $< 5 \mu\text{g/g}$  的 DHA 时 PhA 水平显著降低。这证实了含有 PhA  $< 5 \mu\text{g/g}$  的 DHA 可安全用作具有 RP 的患者的治疗剂。

[0120] 图 5. 通过 DSC (差量扫描量热法) 对 PhA 的两种非对映异构体的熔点 (FP) 的计算。

[0121] DSC 方法是一种热分析技术,其区分提高样品温度所需的热。该技术的主要功能是研究相转变或物理状态如熔点 (MP)。该技术显示具有消除 MP 的极大灵敏性。对于本发明,由于世界市场上无法获得,因此已经为 PhA 的每种异构体制备了 2 个标准物。

[0122] 纯化了来自金枪鱼的 PhA。该图显示了从来自金枪鱼的富含 DHA ( $> 700\text{mg/g}$ ) 的油中分离的含有  $> 96.5\%$  的 PhA 的样品的 MP。进行了 DSC, 并发现 2 个明显不同的峰。为了进行研究, 将其在  $-50$  摄氏度结晶, 分离 2 个相, 通过 GC-MS 分析, 表明它们是 PhA 的 2 个级分。再重复 DSC 技术一次, 通过纯化, 分离的每个相都可见在  $-45$  摄氏度和  $-65$  摄氏度的单峰。通过结晶学, 证实并检查到异构体 PhA (3S) 具有  $-45$  摄氏度的 MP, 而 PhA (3R) 具有  $-65$  摄氏度的 MP。

[0123] 以此方式, 通过 DSC, 可以开发出进行 PhA 的 2 种异构体的定量分析的简单方法。这使得可以证实, 可以选择本发明中 PhA 的最有效分离, 对 PhA (3S) 进行评估。不排除将来用于从富含 DHA 和  $\omega-3$  的油的不同样品中分离 PhA 的其它方法。

[0124] 如本发明中所述, 所述两种异构体在人类健康中显示出不同的生理病理活性。通过该分析对异构体进行确定将是具有重要意义流行病学、临床和营养标志物, 从而在癌症和来自主导 (3R) 的毒性中测定其它分子标志物如 AMACAR (与 3S 有关, 而与 3R 无关) 的活性。

[0125] 图 6. 密度分级结晶 (FCD)。在富含  $\omega-3$  的粗油的密度平衡梯度或等密度中进行分级。级分 (a) 绿色, 级分 (b) 蓝色, 级分 (c) 橙色。

[0126] 此图显示当将油暴露给等密度离心时脂肪酸级分的形成。对应于起始点所用的油中的最大密度的  $\omega-3$  脂肪酸 (级分 c) 在转子轴的最远端进行分级, 而具有较低密度的级分 a 和 b 较接近转子轴。梯度以及级分 a 和 b 的结晶使得能够分离液相, 其中  $\omega-3$  脂肪酸保留在级分 c 中。

## 具体实施方式

[0127] 本发明涉及用于获得含有水平低于  $90 \mu\text{g/g}$  油的植烷酸的丰富  $\omega-3$  脂肪酸的方法。具体而言, 本发明提供了用于分离处理海洋动物、微生物和藻类中存在的  $\omega-3$  脂肪酸的方法, 其通过温度梯度, 冷却该提取物直至形成浓缩了 PhA 以及饱和和单不饱和脂肪酸的固相, 以及浓缩了基本上不含 PhA 的  $\omega-3$  脂肪酸、优选 DHA 的液相。所述方法可以用于获得和纯化自然中存在的任何高度不饱和的脂肪酸。

[0128] 常规上, 用于获得基本上不含 PhA 的  $\omega-3$  脂肪酸、优选 DHA 的油要尽可能新鲜, 从而避免可能的脂肪酸降解或氧化。大多数鱼类 (基本上为油性鱼类)、单细胞藻类培养物和磷虾最初被认为是  $\omega-3$  的主要来源。然而, 还可以从其它海洋来源 (即金枪鱼、鳕鱼、大马哈鱼、沙丁鱼、鲑鱼、鲸鱼、海豹、鲨鱼、非单细胞藻类等)、细菌来源和真菌获得  $\omega-3$ 。除了海洋来源, 最有价值的来源是具有微生物来源的那些 (得自受控培养和发酵器), 其含有更高水平的 PhA 和类异戊二烯。尚未利用的一些物种 (即迪氏 (Diatomea) 海藻) 将引起作为 PhA 产生者的极大兴趣, 如鳕鱼肝油将是姥鲛烷的来源。将来, 我们可以利用来自基因修饰的动物、植物、微生物和 / 或真菌物种的油, 所述物种作为提高  $\omega-3$  产量 (特别是 DHA) 的来源物质。PhA 水平在养殖和野生鱼中都高。

[0129] 本发明的主题方法由若干阶段组成, 尽管其中部分是任选的:

[0130] 1. 预精炼 (任选):

[0131] 此阶段的目的是去除不可皂化的脂肪。其可专门应用于非精制的粗原料, 例如粗鱼油。

[0132] 2. 甘油三酯和酯水解：

[0133] 此阶段的目的是允许用于从油获得脂肪酸的过程。

[0134] 水解可以是：a) 皂化 + 酸解，或 b) 通过酯酶水解。

[0135] 皂化过程可以形成脂肪酸盐。酸化将形成非极性游离脂肪酸（酸化油）的相以及打开反应器底部而去除的盐的极性相。

[0136] 3. 离心（等密度或非等密度）：

[0137] 在此阶段中，通过甘油梯度使上阶段获得的酸化油进行超离心。超离心可以是等密度的或通过非平衡密度梯度。

[0138] 当离心为等密度时，通过使用甘油梯度的密度梯度进行分级结晶，从而形成平衡。

[0139] 如果离心后甘油梯度的温度在 0 摄氏度急剧降低，获得 3 个级分：2 个固体——其一具有饱和脂肪酸；第二个具有不饱和脂肪酸和 PhA，并且这 2 个被去除；以及具有多不饱和脂肪酸的第三液体级分，含有 65% -99% 的  $\omega$ -3 酸和 65% -85% 的 DHA 水平，以及小于 90  $\mu$  g/g 的 PhA。

[0140] 使用甘油梯度可以将温度降低至 -30 摄氏度 24 小时，结果为获得 2 个相：固相，其含有饱和和单不饱和脂肪酸、PhA 和甘油梯度；以及液相，其含有多不饱和脂肪酸，后者具有 65% -99% 的  $\omega$ -3 脂肪酸水平和含有小于 90  $\mu$  g/g 的 PhA 的 65% -85% 的 DHA 水平。

[0141] 如果离心是非等密度的，应将温度急剧降低至 -30 摄氏度甘油梯度，从而产生 2 个级分：固体级分，其含有饱和和单不饱和脂肪酸以及 PhA；以及液相，其含有多不饱和脂肪酸，后者具有 65% -99% 的  $\omega$ -3 脂肪酸水平和含有小于 90  $\mu$  g/g 的 PhA 的 65% -85% 的 DHA 水平。

[0142] 4. 游离脂肪酸的酯化：

[0143] 目标是将游离脂肪酸稳定为酯和乙基酯或者甘油三酯（将为第一终产物）。

[0144] 在油纯化过程中，不分离 PhA，除非为此目的而稳定特定的相，这是由于 PhA (C20) 的物化性质类似于长链  $\omega$ -3 脂肪酸 ( $C \geq 18$ )：PF、熔点、皂化值、碘指数、水和其它溶剂中的溶解性、对溶剂的极性、旋光性等。作为对照研究，DHA 和 PhA 具有相同 H(2 个) 键受体和供体 (1 个) 的值、自由旋转键 (14 个)、极性表面积 (26.3A<sup>2</sup>)、在 25 摄氏度的水溶解性 (0.001) 和比较分子体积 (347.0 相比 354.8cm<sup>3</sup>)、分子量 (328.49 相比 312.53)，蒸发焓 (77.28 相比 74.2kJ/mol)、极性 (41.97  $10^{-24}$  相比 38.09  $10^{-24}$ )、折射率 (1.52 相比 1.454)。在所有的脂肪酸中，PhA、PA、EPA、DHA、SDA 具有最低的 PF，为 -40 摄氏度至 -80 摄氏度。

[0145] 基于使用尿素复合物对饱和脂肪酸的皂化和降低从而去除皂化产物和去除饱和脂肪中的硬脂，提高了 PhA 在富含  $\omega$ -3 级分中的浓度。在精制鱼油中，所分析的所有情况都显示了 PhA 浓度的提高 (> 0.1%)，仅在获得高纯度 DHA (> 700mg/g) 的某些程序中，降低了最初精炼和纯化程序中的前述提高 (< 0.1%) (图 3)。这表明用鱼油进行的所有精炼和纯化程序 (即最大值 DHA < 200mg/g)，PhA 都没有被去除，并且相反，鉴于 PhA 具有与见于  $\omega$ -3 中的高度类似的物化性质 (而非将其与饱和脂肪酸的其余种类相比时的情况)， $\omega$ -3 浓度水平的提高产生了 PhA 成比例提高。

[0146] 尿素复合物的形成和这些复合物结晶的方法变化在专利 (W01995/011216) 中，并由于其极大工业应用而优化，并且广泛用于鱼油纯化过程。已证明这些程序中在形成尿素复合物中乙醇-尿素反应引起氨基甲酸乙酯或氨基甲酸乙酯 (urethan, EC) 的形成，并且其



存在于纯化的油中。氨基甲酸乙酯于超过 150 年前发现,已知是致癌剂,并且如 FDA 成员喀纳斯 (Canas) 和 Yurawecz 编辑所称,其处于 FDA (食品和药品监督管理局) 的研究之下,自 1980 年以来是环境危险物质列表中的成员 (CERCLA)。因此,本发明提供了对于当前脱臭和纯化过程的改进结果,避免了在工业中频繁但并不理想的过程的使用,所述过程例如脱臭 (高温),和用尿素的纯化和精炼程序,其明显不足且不推荐用于 PhA 去除。

[0147] 专利中,通常在超过 -5 摄氏度的温度下采用冷却精炼和纯化过程,并且在一些情况中,在低至 -20 摄氏度的温度进行。然而,这样的用于分离饱和脂肪酸的可用程序并不适用于 PhA,原因在于其会在  $\omega$ -3 级分中浓缩,因为 EPA、DHA、PhA 和 PA 分别具有约 -54 摄氏度、-43 摄氏度、-65 摄氏度和 -80 摄氏度的 PF。

[0148] PhA 和 PA 是见于鱼油中与  $\omega$ -3 脂肪酸类似的甘油三酯的部分。目前,通常使用酶促水解过程;其是浓缩  $\omega$ -3 脂肪酸并且特别是 DHA 的选择性酯化反应。长时间以来,证实了在 PhA 的所有生物学中,如见于 DHA 和其它 PUFA,其具有位于甘油三酯和磷脂的第 2 位碳上的趋势;还已知 PhA 和 DHA 以及其它  $\omega$ -3 对皂化和酶促水解具有相同的抗性。胰腺酯酶水解短链脂肪酸要比水解长链脂肪酸快,而 PhA、PA、DHA、EPA 作用非常慢,因此对酯解具有抗性 (Brocherhoff, 1970 年; Ellingboe & Steinberg, 1972 年)。由于 PhA、PA、DHA 和 EPA 的类似的硬脂酸效应,这样的抗性类似于在 DHA 和 PhA 上发现的抗性 (Nus 等人, 2006 年)。更严重的,使用酶促过程和其它程序一样,可以提高 PhA 的水平。例如完全水解的过程和非特异酯酶和皂化和催化固体水解一样有效,并不改变 PhA 水平。

[0149] 出于这些原因,不存在分离具有  $\omega$ -3 和 DHA 的油中的 PhA 而不改变油组成 (或者通过精炼过程) 的方法,因此需要这样一种用于分离 PhA 的特定方法。

[0150] 图 3 显示了用于获得基本上纯的 DHA (> 700mg/g) 的方法,造成对于本发明的目的并不有效的变化。色谱方法可能是最佳选择,并且尽管其不特定用于分离 PhA,其实际上用于获得基本上纯的 DHA。对于以合理成本分离 PhA 和 PA,现今通过色谱法进行的工业分离方法并不足够灵敏,发现水平在本发明的所需范围之外,随着其产生于分子蒸馏中,在相同时间具有苯并芘水平提高的较高风险 (由于使用高温)。最突出的色谱方法 (即 SFC) 基于极性和硬脂酸效应。强度吸收不仅取决于极性、洗脱时间和分子官能团特性,还取决于硬脂酸因子。如之前所述,相比 EPA 和其它脂肪酸,PhA 和 DHA 具有的硬脂酸功能、分子量等更为接近 DHA。鉴于 PhA 的低浓度,并考虑在所有 DHA 纯化过程中 EPA 也有相当地提高,发现表明下述情况的分析并不令人吃惊:同样不适当地存在 PhA,并且在某些情况中,其存在在所有金枪鱼油中达到升高水平,金枪鱼油中含有 700mg/g 并通常可见 400  $\mu$ g/g 的水平,而可见专利水平下的其它方法高于 1500  $\mu$ g/g (> 0.1%),这表明了比粗油 (金枪鱼) 中可见的更高 PhA 水平。

[0151] 鉴于具有色谱分析级的常规研究中 PhA 的低浓度 (< 0.1%),并没有测定 PhA 和 PA。为此目的,需要改变色谱技术 (GC),以高得多的敏感水平用于 PhA 的特异检测。

[0152] 鉴于 PhA 和 DHA 的物化特性,需要改变此技术至非常高的纯度水平,以非常昂贵的成本从而降低 PhA。由此方法且无需投入以及需要的工业技术,已经从实验室色谱技术和从分子蒸馏从鱼油 (特别是从金枪鱼,因为其具有最高浓度水平的 DHA) 中纯化了 DHA,直至获得了 830mg/g,而可见平均值为 57  $\mu$ g/g 的 PhA 水平,显示出高可变性 (+31  $\mu$ g/g)。就此,特定工业 DHA 纯化方法并不有效去除鱼油中存在的 PhA。

[0153] 在摄入具有高纯度 DHA 水平的油和较低 PhA 摄入之间存在间接关系,其原因基本在于存在的这一几何事实:从较低纯度的油中摄取较高量的油,从而获得相同的 DHA 量。就此而言,高纯度的商业产品并不带来 PhA 水平的任何降低。用于精炼或纯化 DHA 和  $\omega$ -3 脂肪酸的方法之间的差别非常大(图 3),尽管它们都具有比期望的更高的浓度水平。

[0154] 此本发明而言,已经开发了用于分离 PhA 的特定方法,其应该在最初的阶段或者精炼阶段进行,从而获得含有所有 DHA 纯度水平和 / 或不同  $\omega$ -3 组合的油,从而获得丰富的 DHA 和  $\omega$ -3 油,其具有非常低的 PhA 或甚至不含 PhA(检测限值:5  $\mu$ g/ml)。因此,此方法可以适用于所有工业过程以及具有不同纯度水平的产品。

[0155] 本发明还表明,为了获得低 PhA 的油或不含 PhA 的油,无需再纯化一种或多种脂肪酸,或者改变油的天然组成。当使用  $\omega$ -3 脂肪酸的天然混合物用于食品或健康目的时,这是特别相关的。该方法还是一种有利方法,因为不再需要  $\omega$ -3 脂肪酸的脱臭和纯化过程,从而相比目前进行的方法,获得风险更小的食品和药物级。

[0156] 本发明涉及一种用于从富含  $\omega$ -3 的来源中物理地分离见于含有 > 5  $\mu$ g/gPhA/g 且富含  $\omega$ -3 脂肪酸的酯的任何油中的 PhA,用于大规模工业生产 DHA、EPA 或其它  $\omega$ -3 脂肪酸,所述富含  $\omega$ -3 的来源例如鱼、藻类或具有低水平至零水平的 PhA 的其它微生物。

[0157] 此方法采用结晶从而获得油的物理状态的改变,将 PhA 和 PA 保持在液相中,其原因在于,PhA 和 PA 具有的 MP 要显著低于 DHA 和  $\omega$ -3 脂肪酸或任何其它脂肪酸。

[0158] 表 1. 在大气压下进行的最显著的脂肪酸的实验性 MP 的参照值:

[0159]

常用名	MP	常用名	MP
月桂酸 (C12)	+44 摄氏度	月桂酸甲酯	+6 摄氏度
肉豆蔻酸 (C14)	+54 摄氏度	月桂酸乙酯	+2 摄氏度
棕榈酸 (C16)	+62 摄氏度	棕榈酸甲酯	+35 摄氏度
硬脂酸 (C18)	+69 摄氏度	棕榈酸乙酯	+25 摄氏度
油酸 (C18:1)	+14 摄氏度	油酸甲酯	-20 摄氏度
亚油酸 (C18:2, n6)	-8.5	油酸乙酯	-27 摄氏度
$\alpha$ -亚麻酸 (C18:2, n3)	-16.5	亚油酸甲酯	-35 摄氏度
二十二碳六烯酸 (C22:6, n3)	-43 摄氏度	亚油酸乙酯	-38 摄氏度
花生四烯酸 (C20:4, n6)	-49.5 摄氏度	亚油酸甲酯	-40 摄氏度

[0160]

二十碳五烯酸 (C20:5, n6)	-54 摄氏度	亚油酸乙酯	-46 摄氏度
十八碳四烯酸 (C18:4, n3)	-57 摄氏度	二十二碳六烯酸乙酯	-65 摄氏度
植烷酸 (C20)	-65 摄氏度	花生四烯酸乙酯	-73 摄氏度
降植烷酸 (C19)	-80.5 摄氏度	二十碳五烯酸乙酯	-76 摄氏度

[0161] 就从油（特别是鱼中的油）的生产链开始处去除 PhA 而言，所述方法令人感兴趣，其不具有毒性，且报告具有形成反式脂肪酸的较低风险，并也足以获得药物或食品级。本发明涉及对于现有技术（特别是对于药物和食品技术）的可高度适应的方法，原因在于冷却技术已经用于这两个工业当中。提高富含  $\omega$ -3 的油的压力从而降低 MP 和其能量成本不是

可选方法,因此 PUFA 和 DHA 对氢化反应敏感。

[0162] 另一方面,本发明和目前的工业方法组合用于分离 PhA,允许提高具有极低 MP 的 DHA、EPA 和其它脂肪酸的纯度,而不增加任何其它额外的纯化过程。其还是主要用于鱼类的 DHA 和  $\omega$ -3 脂肪酸纯化过程。

[0163] 本发明涉及含有任何  $\omega$ -3 比例的非精制和精制的油,并且涉及进行纯化以获得任何  $\omega$ -3 脂肪酸(优选 DHA)的高纯度水平或总  $\omega$ -3 含量的油。为此目的,我们可以基于含有任何种类的酯、主要是甘油三酯、磷脂和乙基酯的脂肪或油。

[0164] 主要目的是获得优选具有高纯度水平( $> 700\text{mg/g}$ )的 DHA 和低或零水平( $< 5\mu\text{g/g}$ )的 PhA 的  $\omega$ -3 油,优选地与富含甘油三酯的酯相连,以获得更高纯度、稳定性和生物利用度,无需添加具有潜在相互作用的非营养成分,例如乙醇,乙醇是在用作食品时要避免的,特别是用于怀孕妇女和儿童时,而正是这些人群部分更为需要和使用此类油。对于口服,游离脂肪酸是高度不稳定的,尽管其用作可注射剂可以获得益处(即静脉内注射)。鉴于本发明的活性部分是  $\omega$ -3 脂肪酸,特别是 DHA,并且考虑到所需剂量对于治疗用途来说过高,我们认为甘油三酯是最佳选择,原因在于其是 DHA 的酯,允许更高浓度的活性成分。口服摄入乙基酯是有害的,而经膳食摄入的天然脂肪酸来自甘油三酯。每日膳食获得超过 100 克的甘油三酯的天然摄入,从生理和药代动力学角度来看,这证实了在哺乳动物中 DHA 摄入最为高效。

[0165] 乙基-DHA 是难以用于人和用于自然的化学物质,而甘油三酯则生物利用度远远更高,且没有与乙基酯类型相关的缺点和次生效应。DHA 作为乙基酯效果较低,在生理上其对氧化更敏感,不是食品(其含有乙醇),不形成活生物的任何膳食的一部分,用途有限(不足以成为食品),干扰其它脂肪酸,并且提高其它乙基酯的产生,干扰其它药物和食品(即咖啡),在很大部分人群中造成不耐受,由于是醇形式摄入而具有次生效应,并且它是乙醇的非氧化代谢物,引起肝毒性和胰腺炎。此文献涉及 DHA 的甘油三酯形式,作为  $\omega$ -3 的来源是安全、健康和最有效的药物,而乙基酯是获得甘油三酯形式的 DHA 和 EPA 的中间过程。

[0166] 产物的主要用途是获得更健康且富含 DHA 的治疗剂、添加物或食品,其具有更高的生理活性,没有与 DHA 不相关的干扰或相互作用,具有更低的体内氧化能力,对于人类健康的与 PhA 相关的毒性更小和零风险。根据大量和近期的分子证据、临床前和流行病学研究,PhA 尽管出现在膳食中,但它是非营养物质,引发健康主要风险之一。

[0167] 分离 PhA 的本方法是高度有效的脱臭方法。为了进行之,将对具有污物或活化的鱼油进行充分处理,从而去除重金属,避免任何加热或脱臭过程。本发明不仅能够去除 PhA 和 PA,而且有效去除引起特殊气味的挥发颗粒,还避免可能损害油的过程(高温),并且由于不加入特殊过程而降低成本。

[0168] 根据本 PhA 分离方法而进行的油脱臭基础是相对的:

[0169] a) 为了降解蛋白,蛋白具有非常高的 RP,在室温下为固体状态。分离固体级分中的蛋白或粗鱼油中的硬脂。

[0170] b) 原因在于下述事实:在鱼类中造成气味的挥发物质具有低 MP。例如庚二烯醛、辛二烯、辛烯、庚烯醛、癸三烯醛且特别是二甲胺和三甲胺的物质分别具有  $-92$  摄氏度和  $-117$  摄氏度的 PF 值。

[0171] 在油的冷却和固化过程中,前述物质将是要被分离的液体级分的一部分,并且所

述级分含有这些挥发性物质以及 PhA 和具有低水平的 PhA 的其它烯烃和醇。通过冷却过程而非通过加热进行脱臭,无需任何纯化过程。本发明允许获得非纯化的精制油而不必进行用于脱臭的任何常规过程,后者提高了改变多不饱和脂肪酸的风险(高温)。

[0172] PhA 基本上以甘油三酯(约 > 80%)和其它酯出现,检测到小量的游离形式,在油中的甘油三酯和磷脂中都出现在相同位置(C-2),和 PUFA 脂肪酸相同(原因在于它们类似的物化性质)。PhA 提取,如所有 DHA 和  $\omega$ -3 纯化过程,不能直接从甘油三酯进行,甘油三酯根据其混合物具有不同 MP 的 3 个脂肪酸。因此,必须事先通过甘油三酯(为油或脂肪的一部分)的水解获得脂肪酸,从而通过由醇形成酯的酯转移(催化)形成游离脂肪酸,或者通过水解(催化)以形成游离酸。可能出现两种情况:

[0173] 脂肪酸(即乙醇)的酯的酯转移和形成:

[0174] 然而,尽管其可以从获自催化酯转移(即乙醇)的醇酯进行,取决于醇的类型(表 1),脂肪酸的 MP 显著降低至约 > 20 摄氏度。这一事实产生更高的能量成本,就固化具有 DHA 的油,相比脂肪酸为游离形式的情况,温度应该降低 20 摄氏度。

[0175] b) 催化水解(即:皂化+酸化),以获得游离脂肪酸:

[0176] 催化水解是广泛用于鱼油的方法,其作为广泛开发的常规方法的基础,并用于当前工业中。食品或药物级的任何有机酸将用作催化剂,例如乙酸,或固体催化剂,例如离子交换树脂(苯乙烯树脂),或者通过酯酶的酶促催化剂(例如 Novozyme 435),固定化的或溶液形式的皆可。

[0177] 鱼油具有不可皂化的脂肪,所述脂肪含有胆固醇、PCB、维生素 A 和 D 等,出于获得食品或药物级的目的,其必须从富含 DHA 或  $\omega$ -3 的油中去除。在精炼过程中,用来分离不可皂化的脂肪(硬脂)的广泛使用的具有成本效益且高效的方法是:在低温和惰性环境中,通过在温和碱性介质中皂化鱼油的完全水解,从而避免多不饱和脂肪酸的改变。以此方式,在精炼过程中的必需水解可用于进行本发明中的 PhA 的分离。

[0178] 由于此原因,本发明起始自在温和碱性介质(即氢氧化钾或氢氧化钠)中水解见于鱼油中的甘油三酯和酯。用于获得液体油并且有利于水解(即 40 摄氏度-90 摄氏度),直至脂肪酸的完全水解和皂化。

[0179] 得到的混合物含有不适于本发明所述程序的脂肪酸的盐(钾盐或钠盐),原因是该混合物改变了脂肪酸的 MP,从而通过使用非氧化有机酸(即乙酸)而进行酸化或催化水解,将其加入到剧烈搅拌的混合物中,以获得游离形式的脂肪酸。

[0180] 可行的是在惰性气氛下进行油的真空蒸馏,以分离游离脂肪酸(即 2mmHg),从而避免对游离 PUFA 脂肪酸的任何损害。然而,此方法有利于通过倾析和离心分离固相(含有硬脂和不可皂化的脂肪)和通过反复洗涤而分离液相(其含有酸化油),含有乙酸钠或乙酸钾。这将保证甘油的保留。

[0181] 甘油比食品或药物级的溶剂安全,并且鉴于乙醇必需存在于产物的起始阶段和最终阶段二者中,可以产生更为简单的方法。但是最为突出的方面是甘油允许密度梯度分离,这使得结晶比目前和其他化学物质(即尿素)一起使用的分级饱和和单不饱和脂肪酸、特别是用于分离 PhA 和  $\omega$ -3 的分馏方法而为高效。

[0182] 酸化油中的甘油是最安全的冷冻保护剂和良好的保湿剂,其有利于在 PhA 分离阶段结晶饱和脂肪酸。此外,本发明向酸化油中加入甘油,从而有利于密度梯度分馏,其还有

助于通过离心梯度的分馏以及结晶。

[0183] 对于用于本发明中的密度梯度离心,需要具有特定特征的梯度:低分子量(降低离心时间)、低粘度、比溶质(脂肪酸)高的密度、在UV光下透明以及良好的溶剂特征。具有高密度( $1.25\text{g}/\text{cm}^3$ )的甘油,作为密度梯度分馏的介质,或者如在见于富含 $\omega-3$ 的油中的脂肪酸的情况下检测的分子达到 $1.15\text{g}/\text{cm}^3$ 。甘油可以与水或任何其它溶剂混合,从而显著降低其共晶点(即:甘油在水中以65%溶解,将MP从+18摄氏度降低至-47摄氏度),这使得其在结晶过程中可以为液态。小级分溶剂中的甘油允许降低粘度(表2),用作等密度离心的理想梯度。通过提高温度也可以降低粘度,特别是在本发明的冷却阶段。对于通过密度梯度和结晶而离心脂肪酸得到的级分而言,这是理想的梯度。

[0184] 脂肪酸组合物,作为这些油的成分的关键,并没有显示分子量和密度的显著差异(脂肪酸的3个级分)。其MP类似,显著地优化了MP接近的这些脂肪酸的结晶。在通过密度梯度的离心技术(区域或等密度)中,由于在PhA( $312.53\text{g}/\text{mol}$ )和DHA( $328.5\text{g}/\text{mol}$ )和EPA( $302.4\text{g}/\text{mol}$ )的分子量之间不存在显著差异,本发明的最为充分的技术是等密度技术,因为其根据密度产生级分。然而,其可以用于分离饱和的和单不饱和的 $\omega-3$ 脂肪酸,并且在用于分离DHA和EPA的技术限值(8%)(尽管在本发明中,它们以和分子量差异 $<10\%$ 的其它分子以相同方式进行分离)(Fuentes-Arderiu等人,1998年)。

[0185] 在本发明中,在结晶之前进行密度梯度分馏,从而形成根据密度的对应于主要油级分的3个级分:饱和和单不饱和脂肪酸和 $\omega-3$ 。这将引起油的脂肪酸混合物的共晶点的级分和修改,以高比例优化了根据其MP的级分的固化。此程序当优化从 $\omega-3$ 分离PhA时也是有效的,无需使用任何溶剂。

[0186] 表2:对于甘油-水溶液(mPa)的粘度-温度相关性(Dorsey,1940年)

[0187]

温度 (摄氏度)											
甘油											
%w/w	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
0	1.792	1.308	1.005	0.8007	0.6560	0.5494	0.4688	0.4061	0.3565	0.3165	0.2838
10	2.44	1.74	1.31	1.03	0.826	0.680	0.575	0.500	-	-	-
20	3.44	2.41	1.76	1.35	1.07	0.879	0.731	0.635	-	-	-
30	5.14	3.49	2.50	1.87	1.46	1.16	0.956	0.816	0.690	-	-
40	8.25	5.37	3.72	2.72	2.07	1.62	1.30	1.09	0.918	0.763	0.668
50	14.6	9.01	6.00	4.21	3.10	2.37	1.86	1.53	1.25	1.05	0.910
60	29.9	17.4	10.8	7.19	5.08	3.76	2.85	2.29	1.84	1.52	1.28
65	45.7	25.3	15.2	9.85	6.80	4.89	3.66	2.91	2.28	1.86	1.55
67	55.5	29.9	17.7	11.3	7.73	5.50	4.09	3.23	2.50	2.03	1.68
70	76	38.8	22.5	14.1	9.40	6.61	4.86	3.78	2.90	2.34	1.93
75	132	65.2	35.5	21.2	13.6	9.25	6.61	5.01	3.80	3.00	2.43
80	255	116	60.1	33.9	20.8	13.6	9.42	6.92	5.13	4.03	3.18
85	540	223	109	58	33.5	21.2	14.2	10.0	7.28	5.52	4.24
90	1310	498	219	109	60.0	35.5	22.5	15.5	11.0	7.93	6.00

[0188]

91	1590	592	259	127	68.1	39.8	25.1	17.1	11.9	8.62	6.40
92	1950	729	310	147	78.3	44.8	28.0	19.0	13.1	46	6.82
93	2400	860	367	172	89	51.5	31.6	21.2	14.1	10.3	7.54
94	2930	1040	437	202	105	58.4	35.4	23.6	15.8	11.2	8.19
95	3690	1270	523	237	121	67.0	39.9	26.4	17.5	12.4	9.08
96	4600	1580	624	281	142	77.8	45.4	29.7	19.6	13.6	10.1
97	5770	1950	765	340	166	88.9	51.9	33.6	21.9	15.1	10.9
98	7370	2460	939	409	196	104	59.8	38.5	24.8	17.0	12.2
99	9420	3090	1150	500	235	122	69.1	43.6	27.8	19.0	13.3
100	12070	3900	1410	612	284	142	81.3	50.6	31.9	21.3	14.8

[0189] 通过下述分离 PhA 和纯化  $\omega$ -3 脂肪酸:1- 使用密度梯度根据它们的不同密度进行分级结晶。

[0190] 进行见于油中的脂肪酸的分离方法特别复杂,特别是在脂肪酸具有共同的为分离

方法中所必需的物化性质的情况下,所述分离方法包括蒸馏、结晶、用溶剂萃取或色谱法。分级结晶是分离在温度不同情况下溶解性不同的不同物质的方法。尽管分级结晶的基础涉及此物化性质的这一事实,事实上,分级结晶由根据两种或更多种化合物的不同的 MP 而对其进行分离组成。

[0191] 本发明中提出的方法之前并未被描述过,原因在于其提出了一种其中可分离两种或更多种组分的方法,根据温度变化就其密度而非溶解性对它们进行分级。由于此原因,本发明主要在于密度分级结晶(FCD)。

[0192] 所描述的方法可用于分离下述组分:a) 其具有关于造成共晶组合物图谱变化的复合物相互作用的类似性质(即均质溶液),或者 b) 甚至在具有不同溶解性的异质组合物(其中存在组分的任一种)中,其对温度变化或上升高度敏感。本发明特别涉及在两种或更多种组合物中分离特定油均质组合物,改变它们的共晶点和通过施加冷却过程进行温度变化以及通过分级结晶进行分离。主要目的是分离由饱和的和单不饱和的脂肪酸和 PhA 组成的级分,其具有比含有  $\omega$ -3 脂肪酸的级分高的共晶点。

[0193] 当分离  $\omega$ -3 脂肪酸、PhA 和饱和脂肪酸时,证明结晶和密度是最有差别的性质。本发明允许分离脂肪酸或胶束的级分(根据梯度的脂溶解性),所述级分含有高比例的较低密度脂肪酸(为饱和的和单不饱和的脂肪酸)和较高密度的  $\omega$ -3 脂肪酸的 PhA。这两种组合物可以纯或不纯(不同脂肪酸的混合物),具有和 MP 以及和脂肪酸单独组合物的浓度有关的不同的共晶点;可以通过分级结晶分离不同组合物的两个级分。

[0194] 本发明还特别有效用于通过根据它们的密度的分级结晶分离甚至类似的物质。当组分之一即低浓度水平的 PhA(3S) 和(DHA) 组分具有类似的 MP 时,即是本发明的特殊情况。本发明中,可以应用通过等密度或非等密度密度的超离心。在本发明的方法中不需要通常用于获得高纯度水平的 DHA 的溶剂的应用。

[0195] 选择 1:通过等密度密度梯度超离心的分级结晶

[0196] 由于离心不使用用于分离脂肪酸和脂肪的溶剂,已证明其在以下方面具有下述更高的成本效益:化学产品 90%,人工负荷 70%,60%更快和更具有生态性(Feng 等人,2004 年)。离心和冷冻被广泛用于食品工业中。本发明中,可行的是有利于用或不用溶剂进行  $\omega$ -3 脂肪酸和 PhA 的分离和结晶。在制药工业中已经广泛使用大规模的超离心。应该注意,超离心允许在结晶前分离不同的脂肪酸级分。

[0197] 采用离心用于分离大分子是熟知的,但是它还没有用于分离非常小的分子,例如具有类似分子量和不同密度的脂肪酸。通过 Fico11 密度-梯度超离心已经分离了 99% 的 DDT,这是一种脂溶性的化合物,具有和脂肪酸类似的分子量(Adamich 等人,1974 年)。在本发明中,通过等密度密度梯度超离心分馏具有类似分子量(300 道尔顿)的脂肪酸。

[0198] 在本发明的特定阶段中采用含有游离脂肪酸的酸化油:从富含  $\omega$ -3 的油中分离 PhA。本发明中,通过结晶油本身而改变油的物理状态,所述油含有  $\omega$ -3 脂肪酸(即 DHA),将 PhA 和 PA 保留为液体状态,并从 DHA、EPA、PhA(3S) 的级分结晶中特异地分离 PhA 和 PA。此技术允许获得具有 > 95% 和 > 99% 的高纯度的 DHA 和 EPA,或者食品或药物级别的甘油三酯(> 850mg/g),而不含 PhA(< 5  $\mu$ g/g)。可以避免  $\omega$ -3 脂肪酸的极大损失。

[0199] 脂肪酸具有自成核性质,并且它们不具有过渡融合的质量。熔点(MP)和凝固点是相同的。由于此,对于进行不含 PhA 的  $\omega$ -3 脂肪酸的纯化,足够获得具有不同共晶点的允



许前述纯化过程的 2 个或更多个级分。

[0200] 饱和脂肪酸具有高 MP (> 18 摄氏度), 而单不饱和脂肪酸的 MP 为 > 13 摄氏度。此外, 在粗酸化油中饱和的和单不饱和脂肪酸的组合物为 > 50% (藻类来源的那些), 通常达到 70% 的水平 (鱼油)。然而, 大量  $\omega$ -3 脂肪酸种类及存在显著地降低了共晶点, 此导致在极低温度 (例如 -20 摄氏度) 下无效的冷却结晶过程。

[0201] 另一方面, 如从表 1 中可见, PhA 的 MP 比 DHA 的 MP 高 20 摄氏度, 比 EPA 的 MP 低 10 摄氏度。然而, 某些油 (即鱼油) 中存在的 PhA 异构体使 PhA (3S) 和 DHA 之间的现有差异降低约 2 摄氏度。

[0202] 鉴于下述事实: 即油并不满足结晶其组分或进行分馏的具有类似溶解性的脂肪酸的条件, 通过密度分级结晶事先进行脂肪酸分级。所以就此发明, 优化了脱臭方法以及含有  $\omega$ -3 的油的纯化以及 DHA 和  $\omega$ -3 的分级结晶。

[0203] 为了此目的, 最初通过密度梯度或通过等密度自形成的梯度进行分级离心。不仅在实验室过程中, 而且在实质的制药工业过程中, 这都是用于分离具有类似分子量但不同密度的分子的技术, 以纯化和分离蛋白以及产生疫苗和其它应用。

[0204] 在此技术中, 将油溶解于均质溶液中并处于离心力下, 由于脂肪酸在离心期间分布在反应器中的这一事实, 因此脂肪酸根据它们的密度而非根据它们的分子量而形成梯度。主要前提是最大梯度密度 (即甘油) 应该总是高于脂肪酸密度。通过密度梯度的离心允许脂肪酸沿着梯度移动直至它们达到它们的密度与梯度的密度为相同的点 (等密度)。恰在此时, 将进行结晶分离, 因为常规分离要非常谨慎地进行, 并且将引起  $\omega$ -3 油的不期望的污染。

[0205] 含有部分非极性溶剂 (即庚醇) 的梯度可以用于产生均质的油梯度混合物, 并有助于分离单独的脂肪酸而不形成胶束。以此方式, 存在游离脂肪酸的分散液, 获得  $\omega$ -3 脂肪酸更纯的级分, 而无 PhA 和损失。然而, 这样带来了两个困难: 终产物上的梯度的分离, 和下述事实: 游离脂肪酸的分子分离需要更长的超离心时间。由于第一个原因, 梯度的一个正常情况是它的水溶解性。当使用脂溶解性的梯度时, 可以在此程序后的最终过程期间对其进行分离, 只要其含有的 MP 与要分离的级分不同即可。

[0206] 用于本发明的梯度是甘油, 由于它是在过程期间产生的, 因此其便宜且安全用于食品和药物用途, 而不废弃用于此目的的任何其它梯度 (即蔗糖), 两种情况下其粘度高, 最为不便。当使用甘油作为梯度时, 在超离心期间, 应将其在 10 摄氏度或低于甘油的 MP (18 摄氏度) 下冷冻。然而, 它作为溶于水以及其它溶剂中的超溶液体表现非常好。

[0207] 本发明中, 将若干和甘油的溶剂混合物用于降低粘度, 并降低梯度的 MP。特别地, 采用有利于结晶的溶剂, 但是它们中的多数都降低梯度的共晶点和粘度。使用具有高食品和药物级别的溶剂, 例如甘油 / 水混合物、异丙醇或其它醇, 是可取的, 但不是排他的。例如甘油 / 水混合物和丙酮的溶剂具有极大的两亲性和保湿剂性质, 由于其具有非常低的 MP (-95 摄氏度), 可作为刺激脂肪酸结晶的溶剂, 尤其是在本发明所需的温度下。

[0208] 最适合的甘油混合物是允许甘油降低粘度、适当地降低 MP 和显著降低粘度的那些甘油混合物。梯度的粘度降低对于级分的分离和用于平衡时间是必须的, 从而更有效地分离 PhA。采用甘油 / 水混合物, 理想比例是允许形成超冷却或超溶的液体的比例, 从而显著降低其 MP: 甘油: 67% w/w 具有 -47 摄氏度的 MP。同时, 降低了密度, 显著缩短了通过密

度梯度的离心持续时间,结果便宜且安全。

[0209] 使用其它甘油混合物也是可行的,采用低量溶剂,避免密度降低低于 DHA ( $> 0.95\text{g}/\text{cm}^3$ ),因此其可以用作梯度,使醇作为短链极性溶剂 (C1-C5) 用于分散胶束,并且优选地,用于获得中链部分极性梯度 (C6-C8) 的溶剂允许分散游离脂肪酸。这些醇中甘油的比例必须具有较高的密度和低 MP。甘油的量为 5% 至 50% 允许在超离心期间 MP 的降低与温度范围成反比,从而显著降低密度和粘度,但始终为  $> 1\text{g}/\text{cm}^3$  (本发明所必需的)。对于本发明,25% w/w 的甘油梯度和约 -7 摄氏度的 MP 允许优化分馏程序,降低超离心时间。50% w/w 的甘油足以获得约 -23 摄氏度的 MP,和超出大规模超离心的最大温度降低。

[0210] 使用水溶性梯度将刺激纳米胶束的形成,这将降低平衡时间。然而,为了达到理想平衡和分馏,这些胶束的组合物需要根据它们的密度而高度均质。脂肪酸的扩散将按照根据密度的形式而进行,而非随即选择,通过密度梯度的超离心改变。如在离心梯度中发生的,根据与转子轴的距离形成密度梯度,该过程最初开始形成含有密度最高的脂肪酸的胶束,这将形成最致密的、离转子轴最远的级分。

[0211] 脂肪酸 (尤其是 PhA 和饱和  $\omega-3$  脂肪酸) 密度的显著提高使其成为一种高效技术。主要问题是相对较小的分子量需要非常高的速度和持续时间以获得分离。时间过量将不影响分离。然而,因为分子具有如此低的分子量,需要的时间长 (即 48 小时),并且尽管在分离程序中并不明显,可以优化此时间。

[0212] 通过施加于富含  $\omega-3$  的粗油的等密度超离心,根据分子量和密度形成 3 个级分:a) 主要含有肉豆蔻酸、棕榈酸和硬脂酸的饱和脂肪酸,其分子量为 (228-290g/mol),密度低于油 (0.85-0.86g/cm<sup>3</sup>);b) 具有类似分子量和稍高密度的单不饱和脂肪酸 (0.88-0.89g/cm<sup>3</sup>);c) 具有分子量 (300-330g/mol) 和较高密度 (0.93-0.95g/cm<sup>3</sup>) 的  $\omega-3$  脂肪酸。通过密度为 0.88g/cm<sup>3</sup> 的等密度离心在级分 (b) 中检测到 PhA。

[0213] 可以采用线性或非线性、连续或不连续的梯度进行,由于连续线性方法的工业用途而为本发明选择了此方法。在本发明中降低获得平衡所必需的时间是必须的。这就是此情况中最充分的方法是使用竖直转子的原因,因为它们显著降低平衡时间。

[0214] 可以以 30,000rpm 或 100,000×g 开始超离心速度,直至达到平衡。在此技术中无过量时间。随着超离心开始,脂肪酸借助于梯度开始缓慢地扩散。饱和脂肪酸在 20 摄氏度下缓慢结晶,而单不饱和脂肪酸在 10 摄氏度下结晶。平衡的形成将显著提高在超离心开始时油的共晶点,并且伴随其的晶体的缓慢形成。在固体状态下,脂肪酸的密度不显著变化。

[0215] 因此,在 10 摄氏度下超离心有助于相的结晶,从而去掉含有饱和和单不饱和脂肪酸的 (a) 和 (b)。因此,当达到平衡时,可以分离含有  $\omega-3$  的液体级分和梯度,而没有污染的风险。

[0216] 离心期间级分并不总是在 10 摄氏度下完全结晶,这是因为单不饱和脂肪酸和 PhA 的混合物降低了共晶点。出于此原因,可取的是在 0 至 -5 摄氏度或优选地在 -30 摄氏度的温度下,或者在低于具有  $\omega-3$  脂肪酸的纯化级分的共晶点的温度下冷却,这将根据约 -44 摄氏度至 -57 摄氏度的组合物而变,基本上取决于 DHA 和 EPA 的组成。

[0217] 可以简单地通过冷却含有平衡梯度的烧杯进行冷却过程。然而,此冷却过程可以在超离心期间进行,因为大规模的超离心允许温度降低至 -20 摄氏度,从而改善这些阶段中的结晶。然而,本发明中,在平衡点期间或接近平衡点进行冷却过程,因此保证了 PhA 的

固化。

[0218] 本发明中将超离心期间的温度设定为 20 摄氏度或更低并不是排他的。可以降低平衡时间,和通过提高温度(即 60 摄氏度)(20 摄氏度至 90 摄氏度)优化超离心过程,因为其显著降低了饱和脂肪酸的粘度,特别是饱和和单不饱和脂肪酸的粘度,和降低了梯度(甘油)的粘度,优化分馏,以及显著降低离心时间直至达到平衡。

[0219] 可以对等密度离心过程进行改变,从而降低其持续时间和优化 PhA 的分离。在此方面,可以不经达到平衡而实现结晶,从而降低超离心的持续时间。通常,达到平衡所必需的时间为 48-72 小时,取决于采用的梯度、温度、速度和转子。鉴于 PhA 构成非常小的级分,并且我们的目标并不在于化学纯度,可以获得本发明的说明书而不达到平衡。

[0220] 24 小时内,已经出现了  $\omega$ -3 脂肪酸的多数分馏和剩余脂肪酸以及 PhA。以此方式,多数脂肪酸(包括多数 PhA)在低于  $\omega$ -3 脂肪酸的那些温度下对结晶敏感。以此方式,我们可以在达到平衡之前进行结晶,降低必需的任何时间(即 24 小时)期间的超离心的温度(即摄氏度),从而分离含有  $\omega$ -3 酸和梯度的液体级分。大规模的超离心允许使温度达到 -20 摄氏度。通过此操作,我们还可有效分离 PhA,并纯化含有  $\omega$ -3 脂肪酸的油,而无损失任何物质。

[0221] 选择 2:通过不等密度密度梯度超离心进行的分级结晶

[0222] 即使可以从级分中萃取  $\omega$ -3 纯化油,但是污染的风险高。也可以显著降低超离心的持续时间而无需达到密度梯度的完全平衡或半平衡。通过此操作,可以去除高浓度的饱和脂肪酸和部分 PhA(根据其起始浓度和异构体(3R)),可以足以获得本发明的说明书。然而,在多数情况下,当通过结晶分离时,获得较好的结果。

[0223] 在此发明中,可以建立不同的温度周期,或者可以采用区域分馏以纯化 DHA 和 EPA。

[0224] 异构体 PhA(3S)通常可以小比例见于鱼油和其它海洋来源的油中,而不见于哺乳动物和微生物中(即富含 DHA 的金枪鱼),其具有接近 DHA 的 MP(表 1 和图 5)。这种异构体对于其通过结晶进行分离构成了大的障碍。因此,鉴于 PhA(0.882g/cm<sup>3</sup>)和 DHA(0.943g/cm<sup>3</sup>)的密度差异,而 PhA 的 MP 温度仅低 2 摄氏度,分离此种异构体,特别是使用本发明时,需要预先等密度离心油。

[0225] 在分级富含  $\omega$ -3 的油之前,其共晶点低于 40 摄氏度。采用此分离程序,可以获得不同级分的结晶,和级分的脂肪酸组合物的不同共晶点具有足够的差别。和含有 PhA(~0.1%)的脂肪酸的初始组合物相比,级分(a)和(b)中的混合物的共晶点显著提高。并且,此级分中还含有造成油的特殊气味的挥发性组分。所述共晶点,使得可以在 < -20 摄氏度的温度进行级分的固化,而且足够高从而有效分离共晶点低于 -40 摄氏度的  $\omega$ -3 脂肪酸的级分 c)。以此方式,PhA 是固体级分(b)或(b+a)的一部分。级分(b)实际上含有油中全部的 PhA(2 个异构体),这允许高效分离对于通过结晶分离非常复杂的 PhA(3S)。

[0226] 必需的结晶时间可以为 18 至 72 小时。冷却速度应该足够慢,从而刺激脂肪酸的结晶,尽管 DHA 结晶随着温度/速度为 -3.3 摄氏度的降低或者更低的冷却速度在 24 小时内发生。

[0227] 可以获得游离 DHA 晶体的生长,从而一旦分离,它们保留可能的最小的液相量。大的晶体在过程期间缓慢降低温度而形成,这就是便利的原因。可以以大的沉积物形成结晶,

放置在在 -44 摄氏度开始的温度下的冷却储存器或冷藏冰箱中。

[0228] 在非纯化或粗油或者含有高比例的饱和和 / 或单不饱和脂肪酸的油中, 通过使用低于  $\omega$ -3 脂肪酸的 MP 和油的共晶点的 -30 摄氏度 (-20 摄氏度至 -40 摄氏度) 的温度周期, 分离 PhA。这就是含有饱和脂肪酸 + 单不饱和脂肪酸 + PhA 的固体级分可以通过蒸馏 (如果需要的话) 从含有高纯度的 DHA 和 EPA 的液体级分中分离的原因。

[0229] 在此温度下, 甘油梯度结晶, 仅具有最高密度和最低 MP 的具有高纯度  $\omega$ -3 的级分保留在液体状态, 还分离  $\omega$ -3 脂肪酸的梯度。然而, 如果采用 67% 的甘油 / 水混合物, 其将保留将允许另一个通过密度梯度的离心过程 (即分离 DHA/EPA 或富含 DHA/PhA 的油) 的液体, 或者为另一批次的油的另一个 PhA 分离过程而再生梯度。

[0230] 此程序几乎完全去除 2 种 PhA 异构体的总和。以此方式, 获得了 2 个主要组分 DHA 和 EPA 高纯度 (> 95% 或 > 800mg/g) 的  $\omega$ -3 油, 并且通常 > 99% 脱臭, 且具有低或零 PhA。根据初始油中 DHA/EPA 比, 可以获得:

[0231] a) 对于基本上含有 DHA 作为主要  $\omega$ -3 脂肪酸 (即裂壶藻) 的油, 获得 DHA > 95% (> 800mg/g) 或 > 99% (> 900mg/g)。

[0232] b) 对于 DHA/EPA 比 > 3 (即金枪鱼), 获得富含 DHA > 700mg/g、含有 PhA (< 5  $\mu$  g/g) 的油;

[0233] c) 对于 DHA/EPA 比为 1 至 3 (即大马哈鱼), 获得 DHA < 700mg/g、含有 PhA < 90  $\mu$  g/g 的油;

[0234] d) 对于 DHA/EPA 比 < 1 (即鲑鱼、凤尾鱼、鲭鱼、沙丁鱼、鳕鱼), 获得含 EPA > 400mg/g 且 DHA < 400mg/g、含有 PhA < 5  $\mu$  g/g 的油。

[0235] 采用此发明, 我们还分馏了 DHA 和 EPA, 获得高纯度的 DHA 和 EPA 以及低含量 PhA 或零 PhA。DHA 和 EPA 具有 10% 的分子量差异, 其差别足以进行区域超离心 (Arderiu 等人, 1998 年)。就此, 可以进行第二冷却周期, 是在 -50 摄氏度或 -44 摄氏度至 -54 摄氏度或者在 DHA 和 EPA 的 MP 之间的任何其它温度的区域密度梯度超离心的事先而必须的过程。不论起始组成, 在所有的油中获得了高纯度的 DHA 和 EPA 以及低浓度 PhA 或无 PhA。

[0236] 此时可以添加一些食品或药物的亲脂抗氧化剂 (即生育酚), 从而稳定 PUFA 的氧化。我们的主要目的, 即具有低 PhA 或零 PhA 含量的酸化油需要通过醇解的立即酯化游离脂肪酸或形成 NOVO 甘油三酯, 通过目前工业中进行的任何常规方式、非特异或选择性酶促或采用液体或固体催化剂的另一种方法 (即专利 US 20080114181)。在含有乙基酯的油的情况下, 还要进行再次酯转移反应, 从而获得甘油三酯。

[0237] 图解作为用于开发 > 700mg/g 的 DHA 和 < 0.5  $\mu$  g/g 的 PhA 的甘油三酯的实例。然而, 我们通常可以获得的 DHA 浓度为 > 900mg/g (DHA 在油中的理论最大纯度值是 100% 纯的甘油三酯, 其将含有约 960mg/g)。选择的程序和用于所有的粗物质的相同, 尽管 DHA 浓度将取决于在开始时选择的粗物质和分馏 DHA 以分离 EPA 的任选方法。在此方面, 对于含有 DHA/EPA > 3 的所有来源油,  $\omega$ -3 的纯化过程将产生 DHA > 700mg/g 的纯度。实施例:

[0238] 粗物质 1: 仅含有 DHA 而无显著含量的  $\omega$ -3 脂肪酸的油。

[0239] ● 即: 来自生物质或微生物 (即裂壶藻) 的油, 其含有甘油三酯 DHA > 400mg/g 和 PhA > 120  $\mu$  g/g。

[0240] 粗物质 2: 富含具有不同 DHA/EPA 比作为  $\omega$ -3 脂肪酸的唯一显著含量的  $\omega$ -3 的

油。

[0241] ● DHA/EPA < 1。即：鲑鱼精制油 (30%  $\omega$ -3), 其含有甘油三酯 DHA > 100mg/g ; EPA > 150mg/g 和 PhA > 1900  $\mu$  g/g。

[0242] ● DHA/EPA < 3。即：金枪鱼精制油 (30%  $\omega$ -3), 其含有甘油三酯 DHA > 200mg/g ; EPA > 60mg/g 和 PhA > 1300  $\mu$  g/g。

[0243] ● DHA/EPA < 3。即：纯化的金枪鱼精制油 (70%  $\omega$ -3), 其含有甘油三酯 DHA > 500mg/g、EPA < 150mg/g 和 PhA > 1600  $\mu$  g/g。

[0244] 粗物质 3 :产生具有 > 700mg/g 的低 EPA 含量的 DHA 纯化油, 并且通常以乙基酯和纯化的制剂获得 (即分子蒸馏)。它们不需要纯化  $\omega$ -3 脂肪酸, 仅要萃取 PhA。

[0245] ● DHA/EPA > 7。即：纯化的金枪鱼精制油 (90%  $\omega$ -3), 其含有甘油三酯 DHA > 700mg/g、EPA < 150mg/g 和 PhA > 3  $\mu$  g/g。

[0246] 此程序同时去除游离 PhA 和 PA, 但是如所指出的, 仅 PhA 具有临床显著数量, 这是我们总是指 PhA、而仅在结果中和定期在专利中提到 PA 的原因。通过结晶在与 PhA 相同的分馏点分离 PA。实施例 1 显示了之前存在的 PA 的量和在终产品的最终分析中剩余的量 (实施例 1)。

[0247] 为了说明本发明, 示出了从不同的油中获得的不同萃取物, 其富含 DHA 且具有低 PhA 含量。对于本发明下述实施例不是排他的。获得的萃取物可以之后用于不同的医学制剂, 优选为胶囊, 作为健康添加物或治疗不同疾病的药物。

[0248] 实施例 :

[0249] 实施例 1 :通过等密度超速离心和结晶来获得含有 DHA > 700mg/g 且 PhA < 5  $\mu$  g/g 的甘油三酸酯的萃取物的过程。

[0250] 使用的原料为包含 DHA (210mg/g)、EPA (67mg/g) 和总  $\omega$ -3 (285mg/g) 的未除臭 (non-deodorised) 且未纯化的原金枪鱼油 (Sanco)。通过气相色谱和质谱定量油中的脂肪酸后, 确定存在的 PhA (1.3mg/g)。进行两次降温循环来获得其效能 (effectiveness), 并快速实现不含 PhA 的 DHA 创新产品的主要目的。

[0251] 1. 皂化

[0252] 在一个带有搅拌器的 5- 升的反应器中, 我们使 1000gr 原金枪鱼油与 250gKOH、280ml 水和 10ml 乙醇在惰性氛围 (氮气) 中、40 摄氏度的温度下发生皂化反应, 以 300rpm 的速度搅拌混合物 1 小时。

[0253] 2. 由其盐酸化形成游离脂肪酸

[0254] 向前一阶段获得的钾混合物中, 添加 3 升 70% 乙酸 (非氧化酸), 我们将其在惰性氛围 (氮气) 中以 200rpm 的速度剧烈混合 60 分钟。形成乙酸钾盐, 沉淀并通过过滤除去。一旦静置, 就会形成两相 :非极性相和极性相, 极性相密度较高, 且含有残余的乙酸, 其通过反应器底部的开口除去。然后, 通过向反应器中添加 4 升纯化水并以 150rpm 的速度搅拌 30 分钟来洗涤, 一旦放置, 就会形成两相 :含有油的非极性相和在反应器底部、含有水的极性相。极性相通过反应器底部的开口除去。接着, 添加 4 升水再清洗 4 次, 直到获得金枪鱼酸化油。

[0255] 3. 等密度离心

[0256] 将前一阶段得到的金枪鱼酸化油在 150rpm 下离心 20 分钟, 形成固相或硬脂酸和

含有游离脂肪酸的液相,将该液相真空处理,供下一步使用。由 25% w/w 的甘油 / 水混合物来制备 2400ml 的梯度 (添加 1800 的水和 535ml 的甘油),在室温下,我们向其中添加以前得到的游离脂肪酸和甘油。

[0257] 将 3000g 该混合物在 Hitachi-Koki CC40 超速离心器和 C40CT4 Core(H) 转子中均质化 1h。然后,抽真空 (27Pa),起始温度为 10 摄氏度,离心速度增加到 1000000g/42h。超速离心 24 小时后,温度迅速下降至 0 摄氏度,在该温度下保持 18 小时,直到达到平衡。从该离心过程中,我们在转子轴向上得到 2 种可使用的固体组分。一种含有饱和脂肪酸,另一种含有单不饱和脂肪酸和 PhA。

[0258] 为了分析该液相,使用吸液管来获取样品。将样品经过 GC-MS 分析,随后检测 PhA 和 DHA 的浓度,结果分别为  $< 90 \mu\text{g}/\text{mg}$  和  $740\text{mg}/\text{g}$ 。

[0259] 在这种特殊情况下,没有分离组分,尽管可以获得含有浓度低于  $90 \mu\text{g}/\text{mg}$  的 PhA 和浓度为  $740\text{mg}/\text{g}$  的 DHA 的产品。

[0260] 4. 通过结晶分离  $\omega$ -3 脂肪酸

[0261] 接着,将前述阶段中得到的包含 3 种组分的圆筒在  $-30$  摄氏度的温度下直接或迅速冷却 24 小时。在该温度下形成两相:一种固相和一种液相。固相组分包含饱和与单不饱和脂肪酸、PhA、降植烷酸 (pristanic acid) 和甘油梯度,而液相包含富含 DHA 的聚不饱和脂肪酸的混合物。液相在离圆筒轴半径最远处,通过该圆筒底部的开口与固态组分相分离。

[0262] 该液态组分包含富含 DHA 的  $\omega$ -3 脂肪酸和低含量的 PhA 或不含 PhA。通过 GC-MS 分析获得的富含 DHA 的 281gr 脂肪酸。该分析显示在  $-30$  摄氏度下制冷之前和制冷之后  $\omega$ -3 分别为 96.7% 和 97.2%,制冷之前 PhA 水平低于  $90 \mu\text{g}/\text{g}$ ,制冷之后低于  $5 \mu\text{g}/\text{g}$ 。

[0263] 5. 油中游离脂肪酸在甘油三酸酯中的酯化

[0264] 我们采用了专利 US20080114181 中描述的方法对步骤 4 中获得的游离脂肪酸进行酯化。使用 Soxhlet 冷凝器,将 5% 聚苯乙烯树脂与游离脂肪酸 (200g) 和甘油 (50g) 相混合,混合物使用机械式加热搅拌器在 185rpm, 40 摄氏度下搅拌 20 分钟。然后,我们向混合物中添加 80ml 乙醇,将温度上升到 60 摄氏度,将搅拌速度上升到 235rpm。在惰性氛围 (氮气) 中、大气压下维持反应 24 小时。接着将混合物冷却到室温,通过过滤油来回收树脂或催化剂。除去乙醇,得到甘油三酸酯混合物。

[0265] 如所述的,取最终的产物样品进行 GC-MS 分析,实施例 1 获得的结果如下所示 (包含游离的脂肪酸):

[0266] 在实施例 3 中,通过 GC-MS 分析来确定油,以便确定获得的甘油三酸酯、偏甘油酯和游离脂肪酸的组合物。

[0267] 在 5 个阶段中,从操作程序,我们得到了完全脱臭的油,该油包含浓度  $> 700\text{mg}/\text{g}$  的 DHA 甘油三酸酯,  $\text{PhA} < 5 \mu\text{g}/\text{g}$  和共  $\omega$ -3 为  $870\text{mg}/\text{g} (> 95\%)$ 。

[0268] 实施例 2:获得  $\text{DHA} \geq 700\text{mg}/\text{g}$  和  $\text{PhA} < 90 \mu\text{g}/\text{g}$  的连续化过程。

[0269] 对于该实施例,使用精制红鱼油 (Sebastes sp.) 作为起始原料。(LYSI)  $\omega$ -3 含量为  $315\text{mg}/\text{g}$ ,其中 DHA 为  $110\text{mg}/\text{g}$ ,EPA 为  $165\text{mg}/\text{g}$ ,PhA 为  $1.9\text{g}/\text{kg}$ 。

[0270] 1. 皂化和 2. 酸化

[0271] 根据实施例 1 使用的相同的比例和过程我们对 1000gr 红鱼继续进行皂化和酸化。

[0272] 从酸化油,可以完成两件事。将纯化油分成两个等份,用于 PhA 分离和  $\omega$ -3 脂肪

酸的纯化,使用一份用于以下步骤:

[0273] a) 等密度超速离心和结晶

[0274] 1. 等密度离心

[0275] 如实施例 1 所述,将 500g 酸化油在 150rpm 下离心 20 分钟,形成固相或硬脂酸 (274gr),真空处理包含游离脂肪酸的上清液,供下一阶段甘油梯度使用。如前述实施例所述的,一旦达到平衡,将会获得包含饱和、单不饱和与 PhA 脂肪酸的两个固相和包含富含 DHA 聚不饱和脂肪酸的另一液相。

[0276] 2. 通过结晶来分离  $\omega$ -3 脂肪酸

[0277] 我们在 -30 摄氏度的温度下继续冷却含有前述三种相的圆筒达 24 小时,以便固化该梯度并因而获得含有饱和、不饱和脂肪酸和 PhA 的固态组分和含有  $\omega$ -3 脂肪酸的液态组分。通过圆筒底部的开口分离液态组分,获得 156g 酸化油。

[0278] 根据起始红鱼原油说明书,我们能够估计废弃的固体组分包含饱和脂肪酸 (68%)、单不饱和脂肪酸 (31%) 和 PhA 2.2g。使用 GC-MS 我们分析 156gr 富含  $\omega$ -3 的酸化油,获得  $\omega$ -3 纯度为 98.3% 和 PhA 水平  $< 90 \mu\text{g/g}$ 。

[0279] 3. 不含甘油三酸酯的脂肪酸的酯化 (与实施例 1 相同)

[0280] 使用的酯化方法为第一个实施例第 5 阶段所描述的方法。使用 Soxhlet 冷凝器,我们将 5% 聚苯乙烯树脂与游离脂肪酸 (200g) 和甘油 (50g) 相混合,混合物使用机械式加热搅拌器在 185rpm, 40 摄氏度下搅拌 20 分钟。然后,向混合物中添加 80ml 乙醇,将温度上升到 60 摄氏度,将搅拌速度上升到 235rpm。在大气压下、惰性氛围 (氮气) 中维持反应 24 小时。接着将混合物冷却到室温,通过过滤油来回收树脂或催化剂。除去乙醇,得到甘油三酸酯混合物。取获得的样品通过 GC-MS 进行分析,确定获得的油包含低于 0.4% 的游离脂肪酸、浓度为 470mg/g 的 DHA 以及  $< 90 \mu\text{g/g}$  的 PhA。

[0281] b) 非等密度离心 (未平衡的密度梯度)

[0282] 2. 超速离心

[0283] 将从本实施例阶段 1 和阶段 2 过程中获得的残余油中 491gr 酸化油以 150rpm 的速度离心 20 分钟,形成固相或硬脂酸 (267gr) 和含有游离脂肪酸的液相,将该液相真空处理。将该液相添加到甘油梯度 (根据实施例 1 第 3 阶段的方法制备) 中,并且在没有达到平衡时,在 100000g 下离心 24 小时。

[0284] 3. 通过结晶分离  $\omega$ -3 脂肪酸

[0285] 我们在温度 -30 摄氏度下继续直接冷却包含在圆筒中的油达 24 小时。结果,形成固相,85g,其含有饱和、单不饱和脂肪酸和 PhA; 以及液相,145g,其含有  $\omega$ -3 脂肪酸。通过圆筒底部的开口分离液态组分。

[0286] 由于该过程和通过对液相进行 GC-MS 分析的结果,我们确定获得的产品含有纯度为 92.4% 的  $\omega$ -3, PhA 水平  $< 90 \mu\text{g/g}$ 。

[0287] 4. 不含甘油三酸酯的脂肪酸的酯化

[0288] 为了酯化前述阶段获得的游离脂肪酸,仅如实施例 1 一样,使用专利 US20080114181 中所描述的方法。使用 Soxhlet 冷凝器,我们将 5% 聚苯乙烯树脂与游离脂肪酸 (200g) 和甘油 (50g) 相混合,混合物使用机械式加热搅拌器在 185rpm, 40 摄氏度下搅拌 20 分钟。然后,我们向混合物中添加 80ml 乙醇,将温度上升到 60 摄氏度,将搅拌速度上

升到 235rpm。在大气压下维持反应 24 小时。该过程在惰性氛围（氮气）中发生。接着将混合物冷却到室温，通过过滤油来回收树脂或催化剂。通过在 90 摄氏度下加热油来除去乙醇。

[0289] 取获得的样品通过 GC-MS 进行分析，确定获得的油包含低于 0.6% 的游离脂肪酸、浓度为 440mg/g 的 DHA 以及 < 90  $\mu$ g/g 的 PhA。

[0290] 在该实施例 2 中，由于起始产品含有较低量的 DHA，因此，最终产品也含有较低量的 DHA。尽管如此，我们能够得出结论，从该过程，我们能够获得 4 倍量的 DHA（从 110mg/g 到 440mg/g），将 PhA 降低 200 倍。使用获得的产品作为起始产物重复该过程之后，获得含有 740mg/g DHA 和低于 90  $\mu$ g/g PhA 的组合物。

[0291] 实施例 3：产品分析

[0292] 为了确定脂肪酸的总量，我们进行了如下分析：

[0293] i) 通过气相色谱 - 质谱 (GS-MS) 对脂肪酸进行分析：

[0294] 试剂：乙醇 96%，石油醚，己烷，甲醇，0.8mol/L KOH(Sigma-aldrich)。

[0295] 仪器：安捷伦 HP6890 系列 GC SYSTEM-5793 质量选择检测器 (Agilent HP 6890 Series GC SYSTEM-5793 Mass selective detector)；HP 分析 CD-ROM MS Chemstation Libraries 版本 A.00.00 (HP Analytical CD-ROM MS Chemstation Libraries Version A.00.00)。

[0296] 操作过程：将 10ml 试管内的 50mg 脂肪酸在醚和己烷混合物 (2 : 1)、5ml 甲醇和 1ml 0.8mol/L KOH 中混合并搅拌。添加水，并以 3000rpm 的速度离心 10 分钟。丢弃上清液，并通过 GC/MS 进行分析。

[0297] GC/MS：色谱柱 HP-1. 17m  $\square$  200  $\mu$ m  $\square$  0.11  $\mu$ m。进样口温度：280 摄氏度；相间温度：290 摄氏度；速度：从 100 摄氏度到 260 摄氏度为 5 摄氏度 / 分钟；氮柱，流量 0.9ml / 分钟；进样量：1  $\mu$ l；离子源温度：230 摄氏度；电极温度：150 摄氏度。

[0298] ii) 通过气相色谱 (GS) 分析 PhA：

[0299] 萃取：在螺旋管中，添加 1ml 样品、9.5ml 氯仿 / 甲醇 (2 : 1) 和 2ml KCl，在漩涡混和器 (vortex) 中搅拌，并在 3000rpm 下离心 20 分钟。分离并弃去上层（含水液），以硫酸钠上的滤纸过滤。回收带有螺旋盖的管中的滤液（有机层），并蒸发。

[0300] 衍生：向干燥萃取物中，添加 1ml 甲醇中的三氟化硼，在 100 摄氏度下加热 30 分钟，并冷却该管。添加 3ml 水和 3ml 正己烷，振荡并静置。分离并保留上层，向含水层添加 3ml 正己烷并振荡。收集有机层，以硫酸钠上的滤纸过滤，蒸发直到干燥，以正己烷稀释样品，注射 2 $\mu$ l。

[0301] 仪器：带有火焰离子化 (FID) 的安捷伦科技公司 6890N 气相色谱仪。柱：TRB-WAX 30m 0.25mm 0.5 $\mu$ m。标准品：植烷酸甲酯 (Sigma)。反应衍生试剂 (reactive derivatizante)：甲醇中 20% 的三氟化硼 (Merck)。柱程序：箱温：205 摄氏度。进样口温度：250 摄氏度。检测器温度：260 摄氏度。

[0302] iii) 分析根据实施例 1 描述的程序结果获得的产品

[0303] 通过 GC-MS 分析实施例 1 获得的产品中的脂肪酸和 PhA。

[0304] 分析获得的  $\omega$ -3 脂肪酸的总 % 是 DHA+EPA+SDA+DPA 之和。组合物包含极低含量的其它  $\omega$ -3 脂肪酸或者由于技术原因无法检测的组分，其在药典和分析中均未考虑（即：



C28:8, n3)。

[0305]

明细单			
试验	下限	上限	结果
233nm 吸光度	0.00	0.73	0.21
色度	0	5	2 加德纳 ( Gardner )
甲氧基苯胺指数	0	20	12
酸度指数	0	2	1.23mg KOH/g
Totox 指数(总氧化指数)	0	26	11
过氧化物值	0	5	2 mEqO2/kg
胆固醇	0	1	0.1mg/g).
DHA	720	1000	740mg/g).
EPA	0	150	123mg/g).
其它 $\omega$ -3	0	50	46mg/g
总 $\omega$ -3	87.5	100	909mg/g).
其它聚饱和脂肪酸	0	1	0.6mg/g
饱和脂肪酸	0	1	< 1mg/g
单饱和脂肪酸	0	1	< 1mg/g
PhA	0	5	< 5 $\mu$ g/ml
降植烷酸	0	2	< 2 $\mu$ g/ml
赋形剂：基于生育酚的抗氧化剂	2500	4000	3000ppm

[0306] 因此,获得的组合物的比例为：

[0307] ●脂肪酸 :91.75%

[0308] 其中,80.65%为 DHA,13.38%为 EPA,5.07%为其它  $\omega$ -3,0.69%为其它聚不饱和物,0.08%为其它饱和物,0.08%为单不饱和物。PhA 和 PA 杂质的%分别 < 0.000005%和 < 0.000002%。

[0309] ●其它不能够皂化的脂质 0.1%。

[0310] ●甘油 (sterified)8.1%。

[0311] ●乙醇 (sterified)0.11%。

[0312] ●赋形剂:生育酚(3.5ppm-0.000003%)。

[0313] ●重杂质,二恶英…(<0.000001%)。

[0314] iv) 苯并(a)芘毒性分析(GC-MS):

[0315] Thermo-Finnigan AS 2000,5-mm ID 衬垫(Focusliner)(Restek, USA) 和软件 Xcalibur 1.2(ThermoFinnigan 公司)。色谱柱 30m×0.25mm(ID)×0.25mm, Rtx-5ms(Restex, USA)。进样口温度:280 摄氏度;相间温度:285 摄氏度;速度:从 75 摄氏度到 150 摄氏度为 25 摄氏度/分钟;以 4 摄氏度/分钟的速度运行直到 265 摄氏度;最后以 30 摄氏度/分钟的速度运行直到 285 摄氏度。氦柱,流量为 40cm/seg;进样量:1 μl;离子源温度:200 摄氏度。在辐射为 250mA,电压为 70eV 和离子显示为 m/z±0.5 的离子选择模式(ISM)中运行。为了定量油样品,我们使用 20、50、100、500、1000ng/ml 的苯并芘。对于内部控制,使用芘-d12(200ng/ml)。

[0316] v) PCB 毒性分析和二恶英呋喃(Furan Dioxines)(PCDD/Fs)。

[0317] 使用 CAPE 技术公司的 PCB1 和 DF1 免疫检测试剂盒进行免疫检测来确定 PCB 和相关物质以及二恶英呋喃。对此,使用了简化的方法(Harrison 和 Carlson, 2000)。

[0318] vi) 重金属的毒性分析:

[0319] 取 6 个酸化油样品,在已知重量的瓷坩埚上各称 1g。在马弗炉中通过煅烧来使该油矿物化,随后在大气压下酸消化。使用的分析方法是带有阳极解析液(anionic redissolution)和滴汞电极的微分阳极脉冲伏安法(DPASV),在 -1150 和 75mV 之间采用微分电位溶出。我们也使用了氢化物发生原子吸收(HGAAS)来分析砷和汞的冷蒸汽。lichen Evernia prunatri L(IAEA-336)为参考材料,随后,方法与标准一直依据生效的标准(DOCE, 1990)。使用统计软件 SPSS 12-0 for Windows XP 来测试单个样品和因子的 ANOVA。

[0320] vii) 实施例 1 获得的产品的毒性分析

[0321]

毒性	下限	上限	结果
砷	0	0.1	< 0.1ppm
铅	0	0.1	< 0.1ppm
汞	0	0.1	< 0.1ppm
镉	0	0.1	< 0.1ppm
PCB	0	0.09	< 0.09ppm
二恶英呋喃(Tec.-OMS)	0	1	0pg
苯并芘(A)	0	2	2 μg/kg

[0322] 实施例 4:最终产品封装

[0323] 为口服,在不排除采用其它软植物胶囊技术来封装油的情况下,我们可以采用软明胶胶囊(明胶、甘油、水)。其它可能的胶囊组合是向油(即 5-6.5%的柠檬精华油)中

添加 (> 95%) 增味剂, 以填充可咀嚼的软胶囊 (即: 覆盖在“色板”的凝胶中, 1.5% -2.5% 的柠檬)。最终分析结果: 能量: 14.7 千卡; 蛋白: 0.283g; 碳水化合物: 0.170g; 脂肪: 1.4g; DHA: 1g。

[0324] 乳剂与水或其它水溶性物质也能够通过将它们与增味剂混合制成可饮用的液体并制备脂质体。最终产品也能够以粉末形式获得。其它不同于口服的应用也是可能的, 尤其是作为等渗乳液 (盐溶液) 静脉注射和玻璃体内注射。

[0325] 本专利的最终产品是含有实施例 1 获得的 100% 液态油的补充剂和药物的发展, 以透明明胶软胶囊形式存在, 为大小 24 的椭圆形 (组合物: 明胶、甘油、水), 包含 1389mg 油, 其中 1000mg 为 DHA。也可能使用带有肠溶制剂涂层的胶囊。

[0326] 该处方可以包含用于治疗色素性视网膜炎所必需的辅因子, 诸如: 牛磺酸、 $\beta$ -氨基-L-丙酰组氨酸锌 (Beta-alanyl-L-zinc histidinate)、硫辛酸、抗坏血酸酯、色素: a) 玉米黄素双棕榈酸酯 (ES 枸杞) (ES lycium barbarum), b) 飞燕草素 (delfidinine) (ES 含低含量 cianidine 的欧洲越桔)、杨梅树皮素 (Myricetine)、柚配基 (Naringenine)、橙皮甙 (Hesperitine) 以及它们的糖苷、积雪草苷 (Asiaticoside)、银杏黄酮苷 A+B (Ginkgoflavonglycosides A+B); 以及表没食子儿茶素没食子酸酯 (epigallocatechin gallate)、长春胺衍生物。

[0327] i) 使用的辅因子

	氨基酸, 矿物质, 维生素, 辅酶	每日最小剂量	每日最大剂量
	L-牛磺酸	250mg	1000mg
	L-肌肽 (β-氨基-L-丙酰组氨酸 锌)	90mg	375mg
	N-乙酰半胱氨酸	100mg	400mg
	还原型谷胱甘肽	12.5mg	50mg
	乙酰 L-肉碱	50mg	200mg
	元素硒 (硒代蛋氨酸)	37.5μg	150μg
	元素锌 (甘氨酸锌)	7.5mg	30mg
	铜 (葡萄糖酸盐)	25mcg	100mcg
	视黄醇棕榈酸酯 (A)	0.5mg	0.5mg
	胆钙化醇 (D)	5mcg	5mcg
[0328]	酯化抗坏血酸钙 (C)	250mg	1000mg
	α-生育酚琥珀酸酯 (E)	25mg	100mg
	d-生物素 (H)	1mg	1mg
	盐酸吡哆醇 (B6) *	62.5mg	250mg
	氰钴维生素 (B12)	25μg	100μg
	烟酰胺 (B5)	62.5mg	250mg
	烟酸 (B3)	12.5mg	50mg
	四氢叶酸酯 (B9)	100mcg	400mcg
	焦磷酸氢氯酸硫胺素 (Thiamin chlorhydrate pyrophosphate)	25mg	100mg
	硫辛酸	25mg	100mg
	二氢硫辛酸	100mg	400mg
	辅酶 Q10**	25mg	100mg

[0329] ii) 使用的提取物

[0330]	标准植物提取物	活性物质	每日最大剂量
--------	---------	------	--------

[0331]

ES 胡萝卜	$\beta$ -胡萝卜素	90mg
C.类胡萝卜素: Neo-Life Dynamite (GNLD)	叶黄素	22.5mg
	玉米黄质	22.5mg
	番茄素	37.5mg
ES 欧洲越桔(野生的: 狭叶越桔)(1)	Antocianosides (15 差异)	750mg
	飞燕草素葡萄糖苷 (30%)	450mg
Antho 50® (Antocianosides50%), 优选 > 80%	杨梅树皮素葡萄糖苷	如标准
宁夏枸杞多糖 LBP (20-90%) HPLC (2)	多糖	750mg
	玉米黄素二棕榈酸酯	40mg
	甜菜碱	如标准
ES 小蔓长春花 (3)	富马酸溴长春胺	145mg
	长春布宁	15mg
	长春胺	120mg
ES 银杏 (EGb 761 提取物 50: 1 24%银杏黄酮苷)	银杏黄酮苷 A+B	180mg
	杨梅树皮素葡萄糖苷	如标准
ES 亚洲积雪草 (40%-90%) 苷 (HPLC)	积雪草苷	90mg
ES 杜仲皮质 60%木脂素苷 (4)	珊瑚木苷	60mg
ES 问荆 60%甾醇	菜油甾醇	30mg
ES 杨梅 (o carlinensis) (4)	杨梅树皮素葡萄糖苷	如标准

[0332]

ES 茄子诱导 Marunasu L (Solanum melongena var. Marunasu L) (茄色貳)	飞燕草素葡萄糖苷	如标准
ES 茶多酚 98%多酚 80%EGCG 咖啡因 <0.5%HPLC	表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)	如标准
ES 葡萄柚 (4)	柚皮素葡萄糖苷 (3-羟基)	如标准
ES 酸橙 (4)	橙皮苷 (3-羟基)	如标准

## [0333] iii) 相关活性物质的分析

植物性化学物质 (fitochemical substances)	每日最小剂量	每日最大剂量
积雪草苷	22.5mg	90mg
飞燕草葡萄糖苷	175mg	700mg
表没食子儿茶素没食子酸酯 (EGCG)	50mg	200mg
[0334] 银杏内酯 A	18.75mg	75mg
银杏内酯 B	26.25mg	105mg
杨梅树皮素葡萄糖苷	50mg	200mg
多糖 LBP-x (枸杞属)	187.5mg	750mg
长春胺	30mg	120mg
总玉米黄质 (二棕榈酸 57%)	17.5mg	70mg

## [0335] iv) 组合物中其它活性物质的分析

植物性化学物质	每日最小剂量	每日最大剂量
[0336] 总叶黄素	30mg	30mg
$\beta$ 胡萝卜素	100mg	100mg
富马酸溴长春胺	145mg	145mg

[0337]	长春布宁	15mg	15mg
	甜菜碱	-	-
	Acubine	60mg	60mg
	菜油甾醇	30mg	30mg
	总黄酮类化合物 (total flavonoids)	3500mg	3500mg
	总花青素	1200mg	1200mg
	总黄酮 (total flavonols)	600mg	600mg
	槲皮素葡萄糖苷	150mg	150mg
	总黄酮 (total flavones)	300mg	300mg
	常规 (Routine)	100mg	100mg
	总黄烷酮 (total flavanols)	400mg	400mg
	总黄烷酮 (total flavanons) (4)	1500mg	1500mg
	柚皮素葡萄糖苷	200mg	200mg
	橙皮甙葡萄糖苷	200mg	200mg
	柚皮芸香苷 (柚皮素-7-芸香糖苷)	300mg	300mg
	橙皮芸香苷 (橙皮-7-芸香糖苷)	300mg	300mg

[0338] 通过不同的机制,该组合物的不同葡萄糖苷(即:飞燕草素和杨梅树皮素)提高了视网膜和光感受器(photoreceptors)中DHA的浓度,并且抑制了由光造成的光感受器细胞的凋亡(Laabich等人,2007)。

[0339] 实施例5:根据PhA确定DHA的抑制活性及其机理的实验,既包括体内(口服)又包括体外:

[0340] A) 实验A:百草枯诱导的光感受器细胞的凋亡

[0341] 酪胺信号放大(TSA)-FISH(PerkinElmer, Boston, MA, USA.);二抗、Bax的单克隆抗体(sc-7480)、Bcl-2(sc-7382)、视紫红质抗体RET-P1(sc-57433)(Santa Cruz Biotechnology, Inc.-USA)、PhA、二十二碳六烯酸、百草枯二氯盐(Sigma-Aldrich)。溶剂和反应物具有HPLC和分析纯。

[0342] 根据Politi等人的方法(1966)从Wistar大白鼠制备纯化的神经元培养物,并且如Adler-R(1982)中所述的在多聚鸟氨酸培养基中处理。在培养的第一天,向神经元培养物中添加等浓度的DHA(9mA),7种不同浓度的PhA(/5/20/100/500/2500和12500 $\mu$ gPhA/g油)(通常存在于富含DHA的海洋来源的油中),2种不含DHA、含有或不含百草枯的对照品。在培养的第三天,添加百草枯,培养24h,然后将其以磷酸盐缓冲液(0.01M NaH<sub>2</sub>P<sub>4</sub>[pH 7.4]中0.9% NaCl)中的多聚甲醛固定一小时,随后以Triton X-100(0.1%)固定15分钟。在细胞凋亡中,根据Rotstein-NP等人的方法(2003)确定并量化Bax和Bcl-2的表达。

为进行细胞化学研究,随机量化 10 个领域 / 样品,其结果表示 3 个样品 / 板的各含 PhA 的 DHA 浓度的平均值。

[0343] DHA 在光感受器中抗细胞凋亡能力与 PhA 的浓度 (PhA) 呈负相关 (图 1)。通过使用 PhA 浓度为 0 至  $4 \mu\text{g/ml}$  的 DHA 能够获得较高的抗凋亡活性,但是没有检测到明显的不同。含有 0 和  $4 \mu\text{g/gPhA}$  的 DHA 的油的抗凋亡活性分别明显高于含有浓度  $\geq 20 \mu\text{g/g}$  和  $\geq 100 \mu\text{g/g}$  PhA 的 DHA 的油,后者中 DHA 的抗凋亡活性被显著降低。当 PhA 浓度为  $2500\text{mg/g}$  时,抑制光感受器细胞凋亡的活性失效,当在更高的浓度时,无论是否存在 DHA,都会诱导光感受器细胞的凋亡。Bcl-2/Bax 指数,除与光感受器细胞的凋亡和氧化应激呈负相关外,还显示浓度  $\leq 20 \mu\text{g/g}$  的 DHA 与浓度  $\geq 100 \mu\text{g/g}$  的 DHA 相比具有明显低的氧化应激。

[0344] B) 实验 B :MNU 诱导的视网膜细胞凋亡

[0345] 使用了与实验 A 相同的材料和免疫组织化学以及定量方法。没有使用百草枯诱导凋亡,而是使用了 N-亚硝基-N-甲脒 (MNU) (Sigma-Aldrich)。没有如实验 A 那样分析体外培养物,而是分析了处死的 Wistar 大白鼠的视网膜。为该目的,选择了 8 只 42 天大的大鼠 S-D,并以标准基础饮食 (standard basal diet) 喂养 4 周。每只动物以不同的方式进行喂养:一只大鼠根据标准控制饮食来喂养,而对于其他 7 只大鼠,饮食以 15% 的 DHA 进行改性,如实验 A 所述,该 DHA 含有不同浓度的 PhA :0/4/20/100/500/2500/12500  $\mu\text{gPhA/g}$  油。4 周以后,单独腹腔注射 MNU ( $75\text{mg/kg}$  体重)。所有的大鼠以相同的饮食喂养 6 天,禁食 24 小时后,在第 7 天处死,提取视网膜,随后如实验 A 所述进行固定并进行免疫组织化学处理。为进行细胞化学研究,随机量化了 10 个领域 / 样品,其结果表示 10 个眼睛 / 样品的平均值。

[0346] 如体外实验显示的结果 (图 1), DHA 抗光感受器细胞凋亡活性与 PhA 的浓度呈负相关。体外含 DHA 的油中 PhA 的浓度表现方式也与体内所观察到的相当 (图 2)。在浓度为 0 和  $20 \mu\text{g/g}$  之间获得较高的抗凋亡活性,且没有显著的不同,但是当 PhA 体外水平为  $20 \mu\text{g/g}$  时, Bcl-2/Bax 显著低于喂养  $< 5 \mu\text{g/g}$  的大鼠。DHA 抑制凋亡细胞的作用没有失效。以  $< 5 \mu\text{g/g}$  DHA 喂养大鼠,在抗凋亡活性方面没有显示改变, DHA 标记物为 Bax 和 Bcl-2,没有添加 PhA。

[0347] 这两个实施例证实了无论是体外还是体内,不含 PhA 的 DHA 比许多市售的含高水平 PhA 的 DHA 商标在治疗退行性疾病 (诸如 RP) 方面更有效且更安全。这些实施例描述了 DHA 在本专利全文描述的疾病中作用的决定性机制,并且描述了 PhA 是如何在其效果中进行干涉的。这与许多流行病学证据和关于 PhA 的有害作用及其对 DHA 的拮抗作用相关的分子和临床前研究均一致。不含 PhA 的 DHA 在神经组织退化疾病、泌尿生殖疾病、肌-骨骼疾病、心血管疾病以及本发明所述的应用中的活性高于其他商业 DHA 的活性,这是由于本发明所述的 PhA 的拮抗作用,尤其会在这些实施例中线粒体和抗凋亡活性中观察到。

[0348] 实施例 6 :含高含量 DHA 且不含 PhA 的组合物用于视网膜色素变性的临床研究的应用。

[0349] 在本研究中,第一次在没有相关综合症的 RP 患者中发现若干高频率的变异,诸如:亚临床听觉变异、严重的心血管疾病 (心律失常)、前列腺、高血压、糖尿病和甲状腺炎。

[0350] 在过去十年,已经发现 RP 患者中二十二碳六烯酸 (DHA) 下降,部分患者中 PhA 上升。对动物的不同干预研究显示了在控制 PhA 水平的情况下 DHA 的益处。DHA 对光感受器的存活和光传导是必不可少的。



[0351] 为了确定吸入超出营养剂量的、PhA  $< 5 \mu\text{g/g}$  的 DHA 是否可以治疗 RP 以及其具有哪种临床优势,根据随机干预交叉双盲研究进行了临床试验。随机选择患有 RP 的 40 位患者,平均年龄在 46 岁 (17-70)。进行了以下测试:视网膜电图、视觉诱发电位 (VEP)、自动视野、视力 (VA)、听力、标准和临床眼科检查、血液测试、止血测试和脂肪酸。随机干预交叉双盲研究分两组 (A 和 B) 进行,在 10 个月内口服给药 740mg/天 (两次营养剂量) 可饮用的 DHA 和少量 ( $< 0.20\text{mg}$ ) PhA,各组控制生活方式习惯。在该研究的第一阶段结束时,将两组进行交叉,在第二阶段再重复相同的干预。

[0352] 结果:在开始该研究之前,61%的患者有异常高的 EVP 和黄斑萎缩。81%的眼视野  $< 10^\circ$ ,其中 35.5%的 VA  $\geq 0.5$  (20/40)。根据 VA 值确定的法定盲患者占 25.8%。6.4%的 VA  $< 20/200$ 。平均 VA 为  $0.41 \pm 0.22$ 。在 RP 患者中,48%的 VA  $\leq 20/40$ ,60 岁以上增加至 62.5%,平均 VA 为  $0.39 \pm 0.21$ 。VA 每年下降 0.06。子组的患者 ( $n = 8$ ) 显示高水平的 PhA, VA  $\leq 0.2$ 。该子组表示仅有的以 DHA 治疗没有导致 VA 增高的 RP 患者。在剩余的患者中 ( $n = 32$ ),PhA 水平正常,以 DHA 治疗导致组 A 和组 B 中 VA 显著增加 0.055 和 0.119。所有显性常染色体 RP、简单的、常染色体隐性遗传和散发性遗传形式的 VA 分别增加:0.104、0.091、0.068 和 0.025。VA1  $\leq 0.2$ 、VA2 = 0.2-0.5、VA3  $\geq 0.5$  的眼睛按比例增加,它们的 AV 分别增加 0.02、0.08 和 0.13。在此种 PhA 水平正常的患者中,尽管在组 A (分别为 5.3%、9.8%) 和组 B (分别为 6.6%、11.3%) 中中央凹和副中央凹的灵敏度没有明显增加,但是也观察到了视野变化。在两组中,HDL1 胆固醇的水平增加了 30%。

[0353] RP 患者患心血管疾病、糖尿病和甲状腺机能亢进的几率高。没有发现副作用。视功能似乎与症状发生的长短更有关,而非患者的年龄和 PhA 的浓度。显性类型比隐性类型具有更好的预后。高水平 PhA 的子组具有较差的预后,且在以 740mg/天的 DHA 治疗后,VA 没有改善。在正常水平 PhA 的子组中,无论是何种遗传方式,均有 76.5%的患者改善了他们的 VA。该治疗并未对视野产生改善。该试验计划似乎表明,DHA 在治疗至少中央视力功能方面可能是有用的,并且考虑到子组患者显示高水平的 PhA,确定了在 RP 中对视网膜萎缩症可以避免使用何种剂量。

[0354] 实施例 7 DHA 的药代动力学和对 RP 中周边和中心视野功能的影响以及 2 种剂量的 DHA:4g/天 (60mg/kg) 和 8g/天 (120mg/kg) 与常规治疗 RP 的安慰剂相比较的耐药性。

[0355] 随机、双盲、安慰剂控制的研究作为平行组,进行 24 个月双盲处理。

[0356] 患者 ( $n = 18$ ) 平均年龄为 42 岁 (24-68),来自 RP 社团 (AARPE)。21 个患者承认协议,随机选了 18 个进入双盲试验,然而,从意向治疗分析中排除了 3 个,其原因是没有进行双盲评估或者他们中心没有所有治疗组中的患者。评估了所有 18 位患者的不良事件。从中,18 位患者完成了治疗。对控制饮食和饮用 DHA 和 PhA 的患者进行试验。进行了以下测试:视网膜电图、视觉诱发电位 (PEV)、毒性和免疫学分析、止血测试和脂肪酸以及氧化副产物。

[0357] 主要结果变量 (中心视觉功能) 中,平均 VA 发生了改变,其在 24 个月内增加了。在 4g (0.05) 和 8g (0.06) 的 DHA 组中,VA 值显著高于安慰剂组 (-0.04) (分别为  $P = 0.03$  和  $P < 0.05$ );次要结果变量 (周围视觉功能) 中,视野发生了改变,在 4g 和 8g 的 DHA-组中,增加了 2%和 5%,而安慰剂组下降了 1.2% (分别为  $P = .15$  和  $P = .23$ ),尽管并不显著。

[0358] DHA-组显示电生理得到了改善(振幅降低, EVP 潜伏期降低)。在 DHA-组中,没有出现显著的临床差异。在治疗之后所有患者 PhA 水平正常,但是各 DHA-组中均有 1 位患者例外,其有高水平的 PhA。没有患者存在耐药性问题,在安慰剂或 DHA 组中均未观察到不良反应。没有观察到 PhA 变化,高水平的两个患者除外,该两个患者在 4g 和 8g 的 DHA-组中仍然分别下降了 52%和 48%。DHA 在 AA 水平上没有产生显著的变化,其他  $\omega$ -6 脂肪酸显著增加了 DHA 组中 EPA 的浓度。在靶组织中,DHA 的增加与治疗剂量成正比,观察到与基底水平相比较,DHA 水平是磷脂的 5.2、7.3 倍。在口服正常脂肪含量的食物 3h 至 6h 后,血浆浓度达到最大。

[0359] 因此,我们能够得出结论:本发明的 DHA 组合物会有效改善视网膜萎缩症中的视觉中心功能,然而由于样品的数量以及试验的周期,并不能排除其对 RP 患者的周围视觉功能的益处。还能够得出结论:DHA 作为 RP 的治疗方法具有很好的耐药性;响应有明显的剂量依赖性。

[0360] 实施例 8:确定本发明的组合物在与视网膜遗传性病变相关的不同病理中的功效和安全性。

[0361] 在现有的技术水平中,视网膜病变包括多种疾病,其中包括以下疾病:常染色体显性遗传视网膜色素变性(AD)、常染色体隐性遗传视网膜色素变性(AR)、简单视网膜色素变性(SP)、与性别相关的视网膜色素变性(XL)、斯特格病变(ST)、无脉络膜、Leber 氏病等。

[0362] 为了进行以下研究,选择了 171 个患者,76 位男性,85 位女性,平均年龄为 45 岁(8-72),来自 RP 患者档案(AARPE)。将其分组。第一组 97 人,41 位男性,56 位女性(14AD, 26AR, 44SP, 1XL, 7ST, 1 Refsum, 1 Kearns, 3 Usher),以本发明的组合物,4g/天,进行治疗。第二组 74 人,35 位男性,39 位女性(9AD, 24AR, 34SP, 4ST, 1Leber, 1Usher, 1XL),不给予任何治疗。在评估疾病中考虑确定本发明组合物功效的参数为视觉敏锐度(VA)和视野(VF)。在研究的 8 年期间,对此种参数进行了测量,一年一次。

[0363] 组 1 中经治疗的患者的 VA 和 VF 显著不同,而没有经治疗的组的参数保持不变或者恶化,这与该病的正常发展相一致。在治疗组中,两年后视觉敏锐度显示不同,而视野直到第 6 年才显示明显不同。摄取 4g/天 DHA 改善了 RP 患者和斯特格病变中的视觉参数。

[0364] 实施例 8.1 与 X 相关的无脉络膜

[0365] 患有 X 相关的无脉络膜的 9 岁、13 岁和 16 岁的 3 兄弟,在 ERG、夜盲症方面显示变异,在 VA 方面没有变化,年龄稍长的那位在视野方面显示变化,但是  $VF > 60$  摄氏度。以不含 PhA 的 DHA 开始治疗,2g/天。治疗 6 个月后,没有使红细胞磷脂中的 DHA 达到标准水平,ERG 也没有变化。然后在 6 个月期间将剂量增加至 4g/天,注意到磷脂的 DHA 水平增加、ERG 产生明视变化,并且 16 岁的患者中 VF 得到改善。

[0366] 实施例 8.2 斯特格病变

[0367] 6 位年龄在 21 至 42 之间的患有斯特格病变的患者参加了如前所述的横断面研究(RP 的研究 3)。在 8 年期间,他们中 4 个没有使用本发明的产品(DHA)进行治疗,他们中的一位治疗了 8 年,另一个不定期地摄取了 DHA 和制剂中所述的辅因子 3 年。所有未接受治疗的患者 VA 逐渐减退,遵循该疾病的自然进展,两只眼睛维持在  $VA \leq 20/200$  (AO)。在 8 年期间摄取 DHA 的患者保持  $VA 2/10AO$ ,在此期间没有任何变化。采用 DHA 和该制剂进行治疗的患者在 6 个月期间 VA 从  $1/10AO$  上升到  $3/10AO$ 。然而,一旦中断治疗,VA 会恶化,接受治

疗 2 年后, VA 为 1/10。该患者再次接受治疗, 直到目前, VA 上升至 2/10。

[0368] 实施例 8.3 遗传性视网膜劈裂

[0369] 两位 11 岁和 13 岁大的兄弟被诊断为视网膜劈裂, 在诊断时 VA 分别为 4/10A0 和 6/10A0。在 31 个月的期间内开始自愿摄取本发明的 3g/DHA, 到治疗结束时, 保持 AV 的 VA 为 5/10 和 8/10。

[0370] 实施例 9 本发明的组合物在治疗与遗传性疾病不相关的视网膜病变中的应用。

[0371] DHA 在缺血性条件下增加了神经元阻力, 降低了神经病中的视神经萎缩和血管病变。DHA 除有抗凋亡作用外, 其对 F2 前列腺素还有抑制作用。用于青光眼的药物和用来控制眼内压力 (IOP) 的药物与 DHA 相似, 用作血管收缩前列腺素受体拮抗剂 (PGF2)。因此, 已经证实了在患有以下疾病的患者中的治疗作用: 增生性缺血视网膜病变、neoprostane、视神经缺血性病变和脱髓鞘疾病、糖尿病微血管病变、干性和湿性年龄相关的黄斑性病变、青光眼和近视 (myopia magna)。每个病例的描述是长的。一些需要作为典型, 但是在所有的病例中, 在眼底检查、光学相干断层扫描 (OCT) 和血管造影中, 视觉功能 (根据 VA 和 VF 测量) 和黄斑病变得改善。尤其是, 在该患者组中, DHA 与以前描述的处方相组合变得更为必须, 这是由于视网膜严重的流变学变化以及其中 DHA 下降的生物利用度。此外, 血管病变是主要的原因。

[0372] 实施例 9.1 继发于视网膜病变 (即 RP) 或缺血性起源的黄斑水肿: 囊状黄斑水肿 (欧文 - 加斯综合症)、柏林盲点。

[0373] 6 位年龄在 33 至 75 岁的患者在至少 12 个月前被诊断为囊状黄斑水肿和欧文 - 加斯综合症 (CMO), 以全身用糖皮质激素、去炎松和碳酸酐酶 (即乙酰唑胺) 的抑制剂治疗 12 个月。他们中没有一位患有已知的视网膜病变。这些患者在患有囊状黄斑水肿前至少 24 个月 AV > 8/10。以本发明的 DHA (4g/天) 组合本发明所描述的制剂治疗之前, VA 为 1/10 和 3/10。治疗时间为 3 和 12 个月。

[0374] 治疗 3 个月后, 所有患者的 VA 增加了。到治疗结束时, 所有患者的 VA 达到标准化, VA 在 9/10 和 10/10 之间, 其在一个病例中高于囊状黄斑水肿 (其发生在白内障手术之后) 发作之前的 VA。

[0375] 诊断为 RP 的 3 位患者患有 CMO。将他们以与之前描述的相同的治疗方案进行治疗。治疗前的 VA 为 1/10、1/10 和 1.5/10。6 个月之后, 该三个病例的 VA 增加到 3/10、6/10 和 7/10。患 CMO 之前的 VA 为 3/10、5/10、7/10。

[0376] 实施例 9.2 出血性偏平部睫状体炎

[0377] 一位重 32kg 的 8 岁女孩被诊断为出血性偏平部睫状体炎。诊断 3 个月后, 在临床进展中没有积极的变化, 决定进行外科手术干涉。干涉前 10 天, 她收到了 33g/天本发明的 DHA, 直到手术前 24 小时 (9 天)。在手术之前的研究中, 专家观察到临床症状有改善, 从而推迟了手术 30 天。在 30 天期间内, 她摄取了 PhA 水平低于 5ug/g 的 DHA, 3g/天, 观察到完全缓解并且视觉功能达到标准。

[0378] 实施例 10 本发明的组合物在健康患者视觉功能中的超生理作用。

[0379] 在健康人群中, DHA 增加了光传导并使视紫红质再生。年龄在 18 到 45 岁之间的、没有视网膜病变的、没有正视或远视变化的 32 位健康的人在 6 周内接收不含 PhA 的 DHA, 4g/天, 研究治疗前和治疗后的 VA。

[0380] 在治疗开始,所有人的 VA 为 10/10。6 个月后,所有的 VA 超出 (20/16)。在两个病例中,两眼的散光为 0.0。在 9 人中,VA 超过 20/12。他们中所有人(适应性测量法)的夜适应性增加。

[0381] 也已经检测到有近视的健康个体中 VA 增加,并未改变视觉等级。在有近视的年轻个体以及有近视的个体中,跟随 10 年后近视消失。

[0382] 实施例 11 本发明的组合物用于治疗过敏性疾病、眼表和干眼病变的应用

[0383] 眼表的 DHA 可以提供机制保护和营养性作用、化学保护及杀菌的作用。DHA 有神经病学、激素、免疫学和抗炎控制作用(前列腺素)。DHA 在泪脂质膜的组织中起着积极的作用,降低了黏膜水相的蒸发,降低了相间的表面张力,且用作抗菌剂。其抑制了细胞凋亡并控制了杯形细胞的分泌。其标准化了脂质分泌和睑板腺的黏度。DHA 对各种干眼病起作用:过敏症、激素(雄性)、感染和脂肪酸组合物中的代谢营养。DHA 抑制泪腺中二氢睾酮的形成,同时会增加雄性激素水平。这预防了泪腺细胞的凋亡、坏死和炎症。DHA 在慢性炎症、过敏症和角膜水肿中发挥了有效的控制作用,这是因为其会抑制白细胞三烯的合成(76%)、降低血小板 PAF、前列腺素 E<sub>2</sub>(40%),降低前列腺素 F<sub>2</sub>(81%),并控制 TNF、白细胞介素 IL-6 和 IL-1b。

[0384] 在进行近视手术前一个月的 Lasik 术前手术时,向 50 个年龄在 20 到 43 岁的、没有视网膜病变和近视 < 9 屈光度的患者给予 DHA,4g/天,进行角膜厚度测量,术前观察到平均增加了 12.4%。在一些病例中,治疗前和手术后的角膜厚度相似或略微升高。

[0385] 实施例 12 本发明的组合物作为佐剂在神经病和精神病中的治疗作用。

[0386] 除与以前所述的神经系统疾病相关的遗传病外,DHA 在消化道紊乱疾病中缺乏,其在诸如与厌食症和食欲过盛相关的临床演变以及缓解方面以及精神分裂型障碍、人格障碍、原发性注意力障碍中均有决定性作用。

[0387] 通过多种观察和干预研究,已经看出 DHA 会降低抑郁症、攻击性、原发性注意力欠缺,增加记忆力,提高学习能力并降低患老年痴呆症的风险。DHA 在大脑和神经组织中积累,大脑皮层是其保留更多的生物体领域。其在增加染色体结合、缺血情况下抑制细胞凋亡中的作用已经被广泛研究。已经对总数为 30 人的病例进行了研究,以 4g/天、8g/天、15g/天不含 PhA 的 DHA 对多种硬化症和脊髓症:精髓缺血、精髓瘤、横贯性精髓炎、颈椎病、大脑瘫痪或退行性颈椎病中的痉挛进行治疗。

[0388] 在所有研究的病例中,痉挛、肌肉僵化得到缓解,运动性得到改善,由于痉挛导致的疼痛减少。所有患者有长的历史、临床跟随,并在不低于 2 年的期间内进行药物治疗(即巴氯芬、干扰素等),在治疗初期,痉挛和活动性的临床状态不好。结果显示,该治疗具有剂量依赖性,即接收较高剂量(15g/天)的患者有较快的临床反应(7 天前),提高了活动性,更快地缓解了痉挛,或与与以较低剂量(4g/天)治疗的患者相比为更有效的方式。研究的三种剂量造成痉挛得到改善。

[0389] 实施例 13 本发明的组合物作为佐剂在肿瘤治疗中的治疗作用。

[0390] 考虑到 PhA 是发病率最高的肿瘤中的肿瘤风险因子,因此,在肿瘤中提供不含植烷酸的 DHA 作为佐剂是非常重要的。PhA 会提高肿瘤活性,显示药理相互作用,并且可能导致较大的心血管死亡率。目前,由于 DHA 会提供以下多种益处,因此已经被用作抗肿瘤的治疗方法(即,以紫杉醇治疗前列腺癌):诸如在肿瘤细胞因子中抑制血管再生、诱导细胞凋

亡,在肿瘤细胞因子中减少复发等。不含 PhA 的 DHA 是肿瘤中的辅因子,这是由于:

[0391] a) 其会通过不同的机制以非常有效的方式抑制血管再生;控制肿瘤中前列腺素的新陈代谢并作为 VEGF 的强效抑制剂、降低疼痛的剧烈程度、改善抗炎剂和镇痛剂的抗炎作用、允许使用较低的剂量以及降低其次生效应。

[0392] b) 诱导多种肿瘤细胞的凋亡、在较低的剂量下就可提高其他抑制细胞生长和抗肿瘤治疗剂的细胞毒性、降低抗肿瘤治疗剂的细胞毒性、提高其功效且允许较长的治疗周期。

[0393] c) 当在肺、前列腺、结直肠等腺癌的肿瘤细胞因子中诱导细胞凋亡时,其也会提高肺、心脏、前列腺等健康组织的功能,会显著提高患者的生活质量。

[0394] d) 不含 PhA 的 DHA 直接降低心脏毒性、神经毒性和肝毒性。其也与较低的造血或骨髓毒性有关。

[0395] e) DHA 降低最普遍肿瘤细胞因子(结直肠癌、前列腺、乳腺、肺、卵巢、胃、食管等)的复发。

[0396] 不含 PhA 的 DHA 与类视黄酮一起使用是治疗肺腺癌中的佐剂,主要是由于不含 PhA 将不会对类视黄酮诱导额外的毒性。类视黄酮和 DHA 在除其他之外的某些肺癌、骨髓增殖性疾病和结直肠癌中有协同作用。DHA 在肺癌(Serini 等人,2008)、结肠癌等中已经被用作化学保护剂。尤其是,他汀类药物也是化学保护剂,且本发明也利用了其协作作用。特别是因为 PhA 诱导了与他汀类药物的相互作用。DHA 和他汀类药物作为化学保护剂在多种肿瘤和主要的有较大流行病学价值的肿瘤中有潜在的作用,。它们的流行病学价值仍待评估,其导致认为目前它们是降低病例、严重性和预后数目、降低转移、提高治疗几率、延迟发展和防止复发中重要的制剂。特别是,由于 DHA 没有诱导次生效应或给人群增加风险,并且特别是由于其是唯一的营养,在普通人群中缺乏,因此,对与年龄相关的重大流行病学价值(造成失明和痴呆的疾病)有其他重要的保护作用。

[0397] 作为示例性实例,尽管并不限于,对患有肺腺癌的患者在低于 1cm 的肺、以及骨头和肝中转移 20 次以上的描述的情况。在以不含 PhA 的 DHA 进行治疗之前,2 年的抗肿瘤治疗经历显示随着转移数目的增加病情恶化。在 3 次最初救援化疗周期失败之后,在第 4 次救援化疗周期中,引入不含 PhA 的 DHA,12g/天。在随后的控制中,在 6 周内,通过腹-盆腔 TAC,获知病变有缓解。第 7 轮的救援方案是使用本发明的组合物作为佐剂来实现的。在控制近 3 年时,患者的肿瘤活性保持缓解状态。

[0398] 使用不含 PhA 的 DHA 作为肿瘤治疗中的佐剂在较长时间内改善了患者的临床状况,并且提高了统计预期寿命。

[0399] 实施例 14 本发明的组合物在肾脏病和糖尿病中的应用。

[0400] 以 DHA 来治疗与 IgA 相关的肾病以及与系统性红斑狼疮相关的肾病在十年以前就已经被报道。DHA 会抑制肾细胞凋亡,降低缺血性肾脏病变且是炎症性肾脏疾病(肾炎、血管球性肾炎)中非常有效的抗肾炎物质。DHA 是肾脏移植中多药免疫抑制治疗中的理想佐剂。对于耐受或排斥,树突状细胞负责显示抗原,而“其他细胞决定是否排斥或耐受”。DHA 通过调节树突状细胞来预防排斥、老年痴呆症、自身免疫性疾病等是众所周知的。

[0401] 不含 PhA 的 DHA 特别能够降低泌尿感染的风险。由于其对前列腺素的控制作用、对合成 DHT 的抑制作用,以及特别是由于其不含 PhA(其为前列腺癌、良性前列腺增生和前列腺功能病变的高风险因子),其在治疗和预防良性前列腺增生和预防勃起功能障碍中特

别有效。以下是 5 个病例的描述,其中,证实了不含 PhA 的 DHA 对抗不同肾病的功效。

[0402] 实施例 14.1 肾病综合症

[0403] 一个 12 岁的男孩在 5 岁时被诊断为肾病综合症,以皮质激素进行控制(每两天 15mg)。在若干次终止治疗的尝试中,肾病综合症出现,3 周前尿中有高水平的蛋白质。暂停该治疗,引入不含 PhA 的 DHA,4g/天,进行临床随访。3 个月的治疗后,尿中没有蛋白质迹象。暂停治疗 3 周后,肾病综合症出现,因此,决定在另 2 年应用本发明的组合物,剂量为 4g/天,在该期间内,没有肾病活性迹象。

[0404] 实施例 14.2 与恶性高血压相关的肾功能不全

[0405] 38 岁的男性患者,定期消费卡洛因,造成恶性高血压情形。控制血压,并且排除使用麻醉药。该患者左眼为视神经萎缩,右眼为神经炎,视力为 4/10,肾功能不全,肌酐值为 6.9mg/dl。6 个月跟踪之后,肌酐由 4.5mg/dl 增至 6.9mg/dl,决定开始透析。在开始透析之前,引入不含 PhA 的 DHA 治疗,8g/天。治疗两周后,肌酐值降为 4.8mg/dl,决定延迟透析。使用同样不含 PhA 的 DHA 的治疗方案 6 个月后,肌酐水平为 1.8mg/dl,右眼视力为 10/10。

[0406] 实施例 14.3 与狼疮性肾炎相关的慢性肾功能不全

[0407] 24 岁的女性,有狼疮性肾炎的病史,在她 9 岁时,长期使用皮质激素治疗,在 18 岁时,以霉酚酸酯和环磷酰胺进行了大约六个月的 6 次完全治疗,当肌酐值为 4.6mg/dl 时,引入不含 PhA 的 DHA 进行治疗,8g/天。30 天后,肌酐值下降至 3.1mg/dl。在一年的跟踪内,肌酐水平下降至 1.3mg/dl。然后在随后两年内进行治疗,肌酐值保持稳定。暂停治疗后,90 天后,观察到肌酐为 3.4mg/dl。于是决定以不含 PhA 的 DHA(8mg/天)联合 1mg 强的松进行长期治疗。

[0408] 实施例 14.4 狼疮性肾炎患者中的肾脏移植

[0409] 33 岁的女性患者在 6 年以前进行了肾脏移植,经过稳定治疗,肌酐值为 1.8mg/dl,以霉酚酸酯(1g/天)和普乐可复(7mg/天)继续治疗,通过肾脏活检诊断为排斥,肌酐增高至 2.9mg/dl。提高普乐可复的治疗,并且引入 corticotherapy 治疗 6 个月,没有活检,平均肌酐值为 2.4mg/dl。引入不含 PhA 的 DHA 治疗,12g/天,7 天后,证实肌酐降低到 1.7mg/dl,在 1 年内,将肌酐水平降低到 0.9mg/dl,平均值为 1.1mg/dl。

[0410] 进行肾脏活检,排斥项目为阴性,以普乐可复(7mg/天)、霉酚酸酯(500mg/天)和不含 PhA 的 DHA(4g/天)继续进行治疗。在接下来 4 年的随访中,肌酐水平保持在 1.17mg/dl 的平均值,没有肾功能病变的迹象。

[0411] 实施例 14.5 与全身性疾病无关的肾脏移植

[0412] 70 岁的女性患者,在 62 岁时进行了肾脏移植。移植两年后,她遭受了两次排斥反应,肌酐值在 2.1 至 2.5mg/dl 之间。以 corticotherapy 进行治疗。在随后的 4 年内,肌酐值稳定在 1.3mg/dl。在第 6 年,由于移植手术,她开始服用不含 PhA 的 DHA,剂量为 4g/天,在此期间,肌酐值在 1.1 y 1.2mg/dl 之间。采用该治疗 2 年后,在随后的 6 个月内,观察到肌酐水平下降到 0.97 到 1mg/dl 之间。医疗团队确定该患者显示了对移植器官不排斥的症状。

[0413] 实施例 15 不含 PhA 的 DHA 组合物在免疫性疾病、慢性炎症疾病和骨骼疾病中的应用。

[0414] DHA 在慢性炎症中的作用是众所周知的,且已经在本申请的不同部分进行了简单

描述。但是在这些问题中最关键的是控制树突状细胞。从这个意义上说,本发明的产物作为佐剂,以显著的方式降低了剂量和免疫抑制剂的使用时间,尤其是对于本发明所研究的LES、风湿性关节炎、青少年关节炎、银屑病和痛风性关节炎以及肌肉萎缩症。也完全清楚本发明的产品在预防和治疗关节炎和骨质疏松症中的作用。

[0415] 一个26岁的女性被诊断为SLE,有8年的SLE和系统性硬皮症,以本发明的DHA进行治疗,4g/天,临床症状消失,包括出现了抗核抗体(ANA)。

[0416] 实施例16不含PhA的DHA组合在以下皮肤病中的应用:雄激素性脱发、玫瑰痤疮和寻常性痤疮、异位性皮炎、鱼鳞病、红皮病、硬皮病(escleroderma)、皮炎、牛皮癣。

[0417] 在雄激素性脱发(男性和女性)中,用于从睾丸激素形成二氢睾酮(DHT)的 $5\alpha$ 还原酶活性被提高。DHT增高导致脱发。DHA是1型和2型“ $5\alpha$ 还原酶”的抑制剂,阻止了雄激素活性(睾丸激素)。为了抑制该酶,需要不含PhA的DHA的最小剂量为2g/天,最佳剂量为4g/天;在治疗4周内可以看到脱发和头皮炎症得到改变。为了避免秃头症,该表达应该被继续抑制,可能使用较低的维持剂量(1-4g/天)。该治疗比其他抑制剂(即非那司题)有优势,其不会降低一般健康所需要的睾丸激素水平以及眼表、前列腺、肌肉和神经组织的功能;对于治疗良性前列腺增生也是有用的。

[0418] 患有雄激素性脱发的、年龄在18到44岁的36位男性与4位女性接受了不含PhA的DHA(4g/天)的治疗达5年。在4周内92.4%的人脱发得到稳定,6周内95%的人脱发得到稳定。男性中毛细血管密度增加52.8%,女性中增加75%。进行随访2年,在此期间内没有拖头症的迹象。

[0419] 对于异位性皮炎、牛皮癣和斑秃,由于DHA控制了细胞周期和免疫系统(细胞因子、树突状细胞等),其明显的抗炎作用是在预防作用之后,并且在这些病例中用作佐剂。

[0420] 有助于改善痤疮问题的原理之一是通过 $5\alpha$ 还原酶提高了从睾丸激素生产DHT。因此,基于以前对秃头症所解释的相同的机理,摄取DHA有助于改善痤疮。以不含PhA的DHA进行治疗,不管是口服还是皮肤上局部使用,均对治疗痤疮非常有效,这是由于其抗菌性和抗炎性以及其会使由雄性激素控制的皮肤皮脂腺的液体分泌物恢复正常的能力,主要制剂参与了痤疮。因此,在皮肤上局部使用,20分钟内 $200\text{mg}/\text{cm}^2$ ,每周2-5次,对囊状痤疮特别有效。

[0421] 一位23岁的女性,患有复杂且永久性囊性痤疮7年,对抗生素和顺式维生素A酸治疗有耐药性。以不含PhA的DHA进行治疗,4g/天,在2周期间,将除臭且有柠檬味的相同的油直接应用到皮肤上20分钟,然后,将其移除。第一周内观察到缓解迹象,8周后,仅有残余的痤疮。坚持口服9个月直到痤疮全部缓解,在随访的至少一年内,没有观察到新的痤疮活性。

[0422] DHA作为免疫系统病变治疗剂作用方面的知识是随着时间的增长而增加的。尤其是,已经在异位性皮炎中进行了临床试验,其中诸如DHA的脂肪酸通过细胞因子(IL-5、IL-13、IL-10和IFN- $\gamma$ )降低了对所有抗原的免疫响应,降低了异位性皮炎的活性。尤其是,异位性皮炎和空气过敏与IL-10相关,其中,DHA在降低IL-10和过敏反应中十分有效(Dunstan等人2003和2005)。

[0423] 本发明的DHA呈现降低的过敏性,这是因为本发明可以获得不含PhA的DHA,来源与鱼中来源(过敏的例子)不同,纯度高,无臭味且大大降低了酞及其衍生物。

[0424] 具体地,本发明的组合物用于指示鱼鳞病(即丑角样鱼鳞病、寻常、先天性红皮鱼鳞病),这是因为该产品不含鱼鳞病的诱导剂 PhA 以及 DHA 的抗感染、免疫调节和抗细胞凋亡的作用,其中一些种类鱼鳞病在眼表和角膜中也呈现眼部表现。

[0425] 实施例 17:不含 PhA 的 DHA 组合物在神经病和哮喘中的应用。

[0426] 在 DHA 特别集中的靶组织或有高线粒体活动的组织中,DHA 会提高此种组织(即光感受器、神经元、肺泡、朴金耶细胞、肾、树突状细胞、正常横纹肌细胞、肝细胞、游泳精子、胚珠)的功能活性。DHA 提高此种细胞类型的功能,而 PhA 通过降低其线粒体活性降低他们的活性和正常的功能。

[0427] 从这个意义上来说,DHA 降低吸入性过敏原的高敏性免疫反应是已知的,该吸入性过敏原不仅是异位性皮炎的原因,而且是下呼吸道疾病和哮喘的原因。此外,DHA 在预防通过树突状细胞活性感染的疾病、降低感染和哮喘中特别有效。与改善树突状细胞的功能(抗病毒、杀菌、防止排斥、抗肿瘤)相同,DHA 也会改善呼吸功能,在哮喘和慢性呼吸道疾病(EPOC)中尤其有效。以 DHA 进行治疗改善了慢性呼吸道疾病和哮喘中的通气能力(Kompauer 等人,2008)。

[0428] 因此,特别推荐使用本发明的组合物来治疗囊肿性纤维化,这是由于该病缺乏 DHA,且有频繁的慢性感染。由于本发明的组合物不含 PhA,这造成其有较强的抗感染作用。DHA 在本发明描述的不同的细胞类型中有特定的功能。然而,通过 DHA 来调节树突状细胞是 DHA 作为佐剂和预防制剂在人类疾病中进行治疗的最相关的一般机理,尤其是当不含 PhA 时,这是由于后者改变了树突状细胞的功能并且提高了对感染的敏感性。

[0429] 实施例 18 不含 PhA 的 DHA 组合物在消化系统和炎症性肠病(IBD)中的应用。

[0430] DHA 在调节前列腺素、细胞因子和纤溶动态平衡以及炎症性肠病(IBD)中血小板的抗凝集中的治疗作用在医学文献中可能是第一个已知的应用。DHA 提供了优于其他 PUFA 的优势,其会提高从 EPA 合成 3 型前列腺素的活性,尤其是使用高剂量的 DHA( $> 4g/天$ )时;其也会抑制 2 型前列腺素,并其自身衍生物类二十烷酸具有其自身活性。DHA 也会控制肠杯状细胞和肠上皮细胞的活性。在这些疾病中,在长期内需要预防作用。从这点来看,以 DHA 治疗是非常恰当的,这是因为其不降低其他必需脂肪酸的合成,诸如对合成大多数 1 型抗炎前列腺素所必需的  $\gamma$  亚麻酸( $\omega-6$ ),其的合成会受到诸如 EPA 的其它  $\omega-3$  脂肪酸的抑制。

[0431] 不含 PhA 的 DHA 对细菌、病毒、真菌和寄生虫显示提高的抗炎活性,在剂量超过  $4g/天$ ,其抗炎活性会显著增加。许多炎症性肠病与慢性感染(即幽门螺旋杆菌、梭状芽孢杆菌属等)相关。在本发明中,已经对成人和儿童中的溃疡性结肠炎、伪膜性结肠炎、克罗恩病、胶原性结肠炎、肠易激综合症、胃炎和食管炎进行了研究。

[0432] 为了进行该研究,口服剂量组使用了不含 PhA 的 DHA,  $4g/天$ ,高达  $8g/天$  的较高的剂量用于严重的病例。直肠(尤其是直肠炎)与低剂量的皮质激素(即  $5-10mg/天$ )组合使用对 IBD 有有效的治疗作用。

[0433] 32 岁患有溃疡性结肠炎的女性,患病 6 年没有缓解,该患者以系统性 corticotherapy 治疗了 6 年,被建议手术治疗。在 8 周内以不含 PhA 的 DHA( $12g/天$ )与皮质激相结合进行治疗,起始强的松为  $10mg$ ,降至  $2.5mg/15天$ 。在治疗的起初 48 小时中,出血和腹痛有显著下降,在第 20 天,出血完全缓解。8 周后,进行活检,观察到炎症活性显著降



低。不再使用 corticotherapy 治疗,在随后 8 周,起始剂量由 12g/天降低至一周 1gDHA,直到维持量的 4g/天,维持该剂量 2 年,溃疡性结肠炎未显示活性。

[0434] 使用 DHA 作为佐剂与皮质激素和抑制素组合在治疗 IBD 中能够降低后者的剂量及其次级效应,诸如脂肪代谢障碍。不含 PhA 的 DHA 不与抑制素相互作用,其尤其能够降低患横纹肌溶解症和与辛伐他汀相关的肝病的风险,从而能够降低所需的抑制素,该抑制素在与逆转录病毒治疗相关的脂肪代谢障碍中是禁忌的。DHA 降低了高甘油三酸酯血症,并且在降低 LDL 胆固醇组分的情况下提高了脂蛋白趋势,在非常高的剂量 (> 8g/天) 或与运动相结合时除外 (Yates-A 等人, 2009)。使用高剂量的 DHA (高于 8g/天) 可以用使用 1-4g/天或更高与低剂量的抑制素 (即 5g 辛伐他汀) 的组合来替代,这是治疗脂肪代谢障碍有效的剂量 (即以抗逆转录病毒药物和皮质激素来治疗)。

[0435] 7 位患者使用剂量为 4g/天不含 PhA 的 DHA 和皮质激素治疗 3 个月以上降低了通常的脂肪代谢障碍的形成。

[0436] 实施例 19 不含 PhA 的 DHA 组合物在运动医学中的应用

[0437] DHA 在运动医学中的作用越来越令人感兴趣,这是因为其提高了脂蛋白趋势,降低了胆固醇,在控制扑金耶细胞中有作用,同时控制了心脏频率,且改善了通气功能和心肌细胞的有氧代谢。对职业运动人员中的 DHA 作了研究,结果显示其为具有更高血脂活性的脂肪酸,且根据在生理学和病理学上对 DHA 作用的研究,表明其改进了有氧代谢能力。在中等且更密集的体力中,长期服用低剂量的 (0.5g/天)、以结构脂质形式存在的 DHA 是动态平衡的重要补充 (Lopez-Roman 等人 2008)。

[0438] 这些研究的基础与 PhA 的作用机制有关系,如本发明所述的, PhA 为特定的拮抗剂。因此,从理论上来看,预期本发明的 DHA 在运动生理学中有更高的活性。如本发明所述的, PhA 有很大的毒性,并且会在线粒体电子传递链中造成不可逆转的损害,严重降低了氧化性磷酸化作用,这是运动行为和运动医学中有氧、肌肉和心血管代谢中的临界点。PhA 与传导延迟和突发心脏病死亡有关 (Monning 等人 2004)。

[0439] 实施例 20 :不含 PhA 的 DHA 组合物在甲状腺病症中的应用

[0440] 目前,甲状腺炎病例明显增加,该病在有症状和没有症状的甲状腺功能正常的人群中抗甲状腺抗体存在的情况下会诱导甲状腺功能亢进和甲状腺功能减退。在本发明中,已经描述了 RP 患者中抗体抗 TPO (抗甲状腺过氧化物酶抗体) 的存在与 DHA 缺乏之间的关系。也确定了 RP 患者中甲状腺病和抗甲状腺抗体异常水平之间的关系。DHA 改善了甲状腺机能减退病例中的肥胖问题,其有心血管保护作用,并且改善了患有甲状腺疾病患者中的脂蛋白趋势。

[0441] 以不含 PhA 的 DHA (4g/天) 治疗 11 位年龄在 17 至 49 岁的、经甲状腺机能亢进和甲状腺机能减退治疗 (根据病例,即 Tyrodil 和酪氨酸) 无临床症状、缺乏和不缺乏 DHA 且抗甲状腺抗体水平异常的患者。6 个月的治疗后,由于以甲状腺素进行了治疗,所有甲状腺机能亢进和甲状腺机能减退 (以放射性碘进行诱导) 的患者的抗甲状腺抗体明显下降且心律症状明显下降。

[0442] 实施例 21 :不含 PhA 的 DHA 组合物在心血管疾病中的应用。

[0443] 尽管 DHA 作为辅因子在预防心血管风险因子中有作用,但是并未证明在治疗这些病症中有显著的临床作用。然而,其已经降低了患有心血管疾病患者的死亡率和发病率。

DHA 降低了与这些因子相关的动脉粥样硬化作用。特别是在糖尿病中,这是由于其抗血管增生作用和视网膜(糖尿病性视网膜病)和光接收器(糖尿病性神经病)中的神经营养因子。

[0444] 本发明的组合物有显著的抗心律失常的作用,特别是由于其不含 PhA,这是因为 PhA 会诱发传导延迟和突发心脏病死亡,其在若干类型的心律失常中比商业 DHA 更有效。本发明不含 PhA 的 DHA 组合物在预防心律失常和血栓症,以及治疗一些诸如雷诺综合症等的血管病症和治疗高甘油三酯血症中是有用的。此外,DHA 降低了由与动脉粥样硬化病相关的心脏衰竭、高血糖、与高血糖相关的动脉粥样硬化、糖尿病以及与动脉硬化症(诸如高水平的同型半胱氨酸和载脂蛋白(a))相关的其他代谢和感染因子引起的死亡的数量。其尤其降低了 2 个高水平患者(> 30mg/dl)中的 apo(a)水平,该患者患有脑血管动脉粥样硬化和缺血性来源的神经病变。以 4g/天进行治疗,apo(a)水平下降了 50%,并且使得与他们遭受的循环脑梗塞有关的认知功能达到正常。

[0445] 实施例 22:不含 PhA 的 DHA 在寄生虫病和传染病中的应用。

[0446] DHA 作为抗寄生虫药和抗传染病药(寄生虫、细菌、病毒和真菌)的主要运作机制与其强大的抗炎作用有关(Tiesset 等人,2009),如本发明之前所述的,该抗炎作用通过细胞因子、白细胞吞噬来调节。PhA 降低了上皮细胞和黏膜中 Rho 亚家族的 GTP 酶的活性,有利于细菌、真菌和寄生虫引起的感染,使用多种细菌毒素机理作为它们主要的机理(假单胞菌、梭菌等)(Engel & Balachandran,2009 ;Genth- 等人,2006)。PhA 也与抗有丝分裂物质反应。因此,PhA 的活性与 DHA 的活性相拮抗,在传染病中非常明确,因此,不含 PhA 的 DHA 对传染病更有效。

[0447] 与 PhA 相反,DHA 降低了细菌感染,诸如通过炎症反应介导的肺部感染中的假单胞菌(Tiesset 等人,2009)以及通过 DHA 特异性泪花生酸(specific docosanoids)(Haas-Stapleton 等人,2007)介导的真菌感染(Bajpai 等人,2009)。在幽门螺旋杆菌引起的细菌感染中,通过使用 Kirby Bauer 法进行的体外研究已经证明 DHA 是有效的杀菌物质(Drago 等人,1999)。体外和体内研究确定了 DHA 的抗感染(病毒、真菌和细菌)和抗寄生虫的能力。DHA 大大降低了由恶性疟原虫引起的感染(Hsiao 等人,1991),已经知道进一步的降低(25%)与视网膜病变、痴呆和与其他风险因子相关的动脉硬化症的增加有关。病毒感染(麻疹)也已经与高水平的植烷酸有关(Pike 等人,1990)。

[0448] 不含 PhA 的 DHA 可以用作抗生素的预防性化合物和滋补剂,降低了感染和再感染的病例,尤其是在病毒和真菌感染中。以该方式,降低了抗生素的使用,提高了其流行病学活性,且避免了继发于使用抗生素的病毒和真菌感染。本发明产品的抗感染作用降低了大多额外传染病和流行病相关的感染的并发症和进展(诸如与螺状菌相关的消化道疾病)以及衰变。

[0449] 参考文献:

[0450] ● Adamich-M, Towle-A, Lunan-KD. Ficoll density gradient separation of extracellular DDT from *Chlorella*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 1974 ;12(5) :562-6.

[0451] ● Adler-R. Regulation of neurite growth in purified retina cultures: effects of PNPf, a substratum-bound neurite-promoting factor. J Neurosci

Res. 1982 ;8 :165-177.

[0452] ● Allen-NE, Grace-PB, Ginn-A, Travis-RC, Roaddam-AW, Appleby-PN, Key-T. Phytanic acid: measurement of plasma concentrations by gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis and associations with diet and other plasma fatty acids. Br J Nutr. 2008 Mar ;99(3) :653-9.

[0453] ● Anderson-RE, Maude-MB, McClellan-M, Matthes-MT, Yasumura-D, LaVail-MM. Low docosahexaenoic acid levels in rod outer segments of rats with P23H and S334ter rhodopsin mutations. Mol Vis. 2002 Sep ;8 :351-8.

[0454] ● Andreola-F, Giandomenico-V, Spero-R, De Luca-LM Expression of a smaller lecithin:retinol acyl transferase transcript and reduced retinol esterification in MCF-7 cells. Biochem Biophys Res Commun. 2000 Dec ;279(3) :920-4.

[0455] ● Arnhold-T, Elmazar-M, Nau-H. Prevention of Vitamin A Teratogenesis by Phytol or Phytanic Acid Results from Reduced Metabolism of Retinol to the Teratogenic Metabolite, All-trans-retinoic Acid. Toxicol Sciences. 2002 ;66 :274-282.

[0456] ● Ayranci-E, Akgul-G. Apparent molar volumes and viscosities of lauric, palmitic, and stearic acids in 2-butanol at (20,30,40, and 60) °C. Journal of chemical and engineering data. 2003 ;48(1) :56-60.

[0457] ● Bajpai-VK, Kirn-HR, Hou-CT, Kang-SC. Microbial conversion and in vitro and in vivo antifungal assessment of bioconverted docosahexaenoic acid (bdHA) used against agricultural plant pathogenic fungi. J Ind Microbiol Biotechnol. 2009 Mar.

[0458] ● Barragan-I, Marcos-I, Borrego-S, Antinolo-G. Molecular analysis of RIM1 in autosomal recessive Retinitis pigmentosa. Ophthalmic Res. 2005 Mar-Apr ;37(2) :89-93.

[0459] ● Bazan-NG ; Scott-BL ; Reddy-TS ; Pelias-MZ. Decreased Content of Docosahexaenoate and Arachidonate in Plasma Phospholipids in Usher ' s Syndrome. Biochem-Biophys-Res-Commun. 1986 ;141(2) :600-4.

[0460] ● Bellet-R, Carducci-M, Petrylak-D, Kasimis-B, Irwin-D, Modiano-M, Mansour-R, Axelrod-R, Doukas-M. Phase II study of DHA-paclitaxel (TXP) as first line chemotherapy in patients with hormone refractory prostate cancer (HRPC). Journal of Clinical Oncology, 2004 ASCO Annual Meeting Proceedings (Post-Meeting Edition). Vol 22, No 14S (July 15 Supplement), 4657.

[0461] ● Boorjian-S, Tickoo-SK, Mongan-NP, Yu-H, Bok-D, Rando-RR, Nanus-DM, Scherr-DS, Gudas-LJ Reduced lecithin:retinol acyltransferase expression correlates with increased pathologic tumor stage in bladder cancer. Clin Cancer Res. 2004 May ;15(10) :3429-37.

[0462] ● Bottino-NR, Vanderburg-GA, Reiser-R. Resistance of certain long-chain

polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis, *Lipids*. 1967 ;2(6) :489-93.

[0463] ● Britton-TC ;Gibberd-FB ;Clemens-ME ;Billimoria-JD ;Sidey-MC. The Significance of Plasma Phytanic Acid Levels in Adults. *J-Neurol-Neurosurg-Psychiatry*. 1989 ;52(7) :891-4.

[0464] ● Brown-PJ, Mei-G, Gibberd-FB, Burston-D, Mayne-PD, McClinchy-JE, Margaret-S. Diet and Refsum' s disease. The determination of phytanic acid and phytol in certain foods and the application of this knowledge to the choice of suitable convenience foods for patients with Refsum' s disease. *Journal of Human Nutrition and Diabetics*. 1993 ;6(4) :295-305.

[0465] ● Canas-BJ, Yurawecz-MP. Ethyl carbamate formation during urea complexation for fractionation of fatty acids. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 1999 ;76(4) :537.

[0466] ● Carr-SA ;Biemann-K ;Shoji-S ;Parmelee-DC ;Titani-K. N-Tetradecanoyl is the NH<sub>2</sub>-Terminal Blocking Group of the Catalytic Subunit of Cyclic AMP-Dependent Protein Kinase from Bovine Cardiac Muscle. *Proc-Natl-Acad-Sci-USA*. 1982 ;79(20) :6128-31.

[0467] ● Chau-KY, Sivaprasad-S, Patel-N, Donaldson-TA, Luthert-PJ, Chong-NV. Plasma levels of matrix metalloproteinase-2 and-9 (MMP-2 and MMP-9) in age-related macular degeneration. *Eye*. 2008 Jun ;22(6) :855-9.

[0468] ● Chucair-AJ, Rotstein-NP, Sangiovanni-JP, During-A, Chew-EY, Politi-LE. Lutein and zeaxanthin protect photoreceptors from apoptosis induced by oxidative stress: relation with docosahexaenoic acid. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2007 Nov ;48(11) :5168-77.

[0469] ● Connor-WE ;Weleber-RG ;DeFrancesco-C ;Lin-DS ;Wolff-DP. Sperm Abnormalities in Retinitis Pigmentosa. *Invest-Ophthalmol-Vis-Sci*. 1997 ;38(12) :2619-28.

[0470] ● Dizhoor-AM ;Chen-CK ;Olshevskaya-E ;Sinelnikova-W ;Phillipov-P ;Hurley-JB. Role of the Acylated Amino Terminus of Recoverin in Ca(2+)-Dependent Membrane Interaction. *Science*. 1993 ;259(5096) :829-32.

[0471] ● Dizhoor-AM ;Ericsson-LH ;Johnson-RS ;Kumar-S ;Olshevskaya-E ;Zozulya-S ;Neubert-TA ;Stryer-L ;Hurley-JB ;Walsh-KA. The NH<sub>2</sub> Terminus of Retinal Recoverin is Acylated by a Small Family of Fatty Acids. *J-Biol-Chem*. 1992 ;267(23) :16033-6.

[0472] ● DOCE. Decision de la Comision, de 26 de septiembre de 1990, por la que se establecen los metodos de referencia para la investigacion de residuos de metales pesados y de arsenico (DOUE de 18/10/1990).

[0473] ● Dorsey-NE. Viscosity of water taken from " Properties of Ordinary Water-Substance. Hafner Publishing Co. New York. 1940. p184.

- [0474] ● Drago-L, Mombelli-B, Ciardo-G, De-Vecchi-E, Gismondo-MR. Effects of three different fish oil formulations on *Helicobacter pylori* growth and viability :in vitro study. *J Chemother.* 1999 Jun ;11(3) :207-10.
- [0475] ● Dunstan-JA, Hale-J1 Breckler-L, Lehmann-H, Weston-S, Richmond-P, Prescott-SL. Atopic dermatitis in young children is associated with impaired interleukin-10 and interferon-gamma responses to allergens, vaccines and colonizing skin and gut bacteria. *Clin Exp Allergy.* 2005 Oct ;35(10) :1309-17.
- [0476] ● Dunstan JA, Mori TA, Barden A, Beilin LJ, Taylor AL, Holt PG, Prescott SL. Fish oil supplementation in pregnancy modifies neonatal allergen-specific immune responses and clinical outcomes in infants at high risk of atopy :a randomized, controlled trial. *J Allergy Clin Immunol.* 2003 Dec ;112(6) :1178-84.
- [0477] ● Elmazar-MM, Nau-H. Potentiation of the teratogenic effects induced by coadministration of retinoic acid or phytanic acid/phytol with synthetic retinoid receptor ligands. *Arch Toxicol.* 2004 Nov ;78(11) :660-8.
- [0478] ● Elmazar-MM, Ruhl-R, Nau-H. Synergistic teratogenic effects induced by retinoids in mice by coadministration of a RARalpha-or RARgamma-selective agonist with a RXR-selective agonist. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2001 Jan ;170(1) : 2-9.
- [0479] ● Engel-J, Balachandran-P. Role of *Pseudomonas aeruginosa* type III effectors in disease. *Curr Opin Microbiol.* 2009 Feb ;12(1) :61-6.
- [0480] ● Eter-N, Alex-AF, Spitznas-M, Tittel-AP, Holz-FG, Kurts-C. Inhibitory effect of epigallocatechin gallate(EGCG), resveratrol and curcumin on the proliferation of human retinal pigment epithelial cells in vitro. Symposium der International Society of Ocular Trauma. Wurzburg, Dusseldorf 2008. German Medical Science GMS Publishing House.
- [0481] ● Faber-K. *Biotransformations in Organic Chemistry*, Springer, Berlin(2004).
- [0482] ● Feng-S, Lock-AL, Garnsworthy-PC. Technical Note :A Rapid Lipid Separation Method for Determining Fatty Acid Composition of Milk. *J Dairy Sci.* 2004 ;87 :3785-8.
- [0483] ● Ferdinandusse-S, Denis-S, Clayton-PT, Graham-A, Rees-JE, Allen-JT, McLean-BN, Brown-AY, Vreken-P, Waterham-HR, Wanders-RJ. Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet* 2000 ;24 :188-91.
- [0484] ● Ferdinandusse-S, Zomer-AW, Komen-JC, van-der-Brink-CE, Thanos-M, Hamers-FP, Wanders-RJ, van der Saag-PT, Poll-The-BT, Brites-P. Ataxia with loss of Purkinje cells in a mouse model for Refsum disease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Nov 18 ;105(46) :17712-7.
- [0485] ● Finderhut-R, Schmitz-W, Garavaglia-B, Reichmann-H, Conzelmann-E.

Impaired degradation of phytanic acid in cells from patients with mitochondriopathies:evidence for the involvement of ETF and the respiratory chain in phytanic acid alpha-oxidation. *J Inherit Metab Dis.* 1994 ;17(5) :527-32.

[0486] ● Fleury-C, Mignotte-B, Vayssiere-JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 2002 Feb-Mar ;84(2-3) :131-41.

[0487] ● Fuentes-Arderiu-X, Castineiras-Lacabra-MJ, Queralto Compano-JM. *Bioquimica Clinica y Patologia Molecular.* 1998(ed. M) ;Reverte. 148-9.

[0488] ● Genth-H, Johannes-H, Hartmanna-B, Hofmanna-F, Justa-I, Gerharda-R. Cellular stability of Rho-GTPases glucosylated by *Clostridium difficile* toxin B. *FEBS letters.* 2006 Jun ;580(14) :3565-9.

[0489] ● Guenzi-E, Topolt-K, Lubeseder-Martellato-C, J[omicron]rg-A, Naschberger-E, Benelli-R, Albini-A, Sturzl-M. The guanylate binding protein-1 GTPase controls the invasive and angiogenic capability of endothelial cells through inhibition of MMP-1 expression. *EMBO J.* 2003 Aug ;22(15) :3772-82

[0490] ● Guo-X, Knudsen-BS, Peehl-DM, Ruiz-A, Bok-D, Rando-D, Rando-RR, Rhim-JS, Nanus-DM, Gudas-LJ. Retinol metabolism and lecithin:retinol acyltransferase levels are reduced in cultured human prostate cancer cells and tissue specimens. *Cancer Res.* 2002 Mar ;62(6) :1654-61.

[0491] ● Guo-X, Nanus-DM, Ruiz-A, Rando-RR, Bok-D, Gudas-LJ. Reduced levels of retinyl esters and vitamin A in human renal cancers. *Cancer Res.* 2001 Mar ;61(6) : 2774-81.

[0492] ● Guo-X, Ruiz-A, Rando-RR, Bok-D, Gudas-LJ. Esterification of all-trans-retinol in normal human epithelial cell strains and carcinoma lines from oral cavity, skin and breast:reduced expression of lecithin:retinol acyltransferase in carcinoma lines. *Carcinogenesis.* 2000 Nov ;21(11) :1925-33.

[0493] ● Gutierrez-Torre-SM. Retinosis Pigmentaria ;Estudio Comparativo de Ia Metodica y Resultados del Tratamiento en Espana y Ia Union Sovietica. " Tesis Doctoral " .Universidad-Oviedo. 1994.

[0494] ● Gutknecht-J. Proton/hydroxide conductance through phospholipid bilayer membranes:effects of phytanic acid. *Biochim Biophys Acta.* 1987 Apr ; 898(2) :97-108.

[0495] ● Haas-Stapleton-EJ, Lu-Y, Hong-S, Arita-M, Favoreto-S, Nigam-S, Serhan-CN, Agabian-N. *Candida albicans* modulates host defense by biosynthesizing the pro-resolving mediator resolvin E1. *PLoS ONE.* 2007 Dec ;2(12) :13-16.

[0496] ● Haim-M. Prevalence of Retinitis Pigmentosa and Allied Disorders in Denmark. II. Systemic Involvement and Age at Onset. *Acta-Ophthalmol-Copenh.* 1992 ; 70(4) :417-26.

[0497] ● Hansen-RP. 3,7,11,15-tetramethylhexadecanoic acid:its occurrence in the tissues of humans afflicted with Refsum' s syndrome. *Biochim Biophys*

Acta. 1965 Oct ;106 (2) :304-10.

[0498] ● Harrison-RO, Carlson-RE. Simplified sample preparation methods for rapid immunoassay analysis of pcd/d/fs in foods. 2000 ;20th International Symposium on Halogenated Environmental Organic Pollutants and POPs. August 13-17, 2000 Monterey, California.

[0499] ● Hashimoto-T, Shimizu-N, Kimura-T, Takahashi-Y, Ide-T. Polyunsaturated Fats Attenuate the Dietary Phytol-Induced Increase in Hepatic Fatty Acid Oxidation in Mice. J. Nutr. 2006 April ;136 :882-6.

[0500] ● Hoffman-DR ;Birch-DG. Docosahexaenoic Acid in Red Blood Cells of Patients with X-Linked Retinitis Pigmentosa. Invest-Ophthalmol-Vis-Sci. 1995 ; 36(6) :1009-18.

[0501] ● Horii-N, Arato-S, Narayan-B, Hosokawa-M, Sashima-T, Miyashita-K. Occurrence of conjugated cyclopropanoid acid in purified fish oil. J Am Oil Chem Soc. 2007 ;84(8) :749-54.

[0502] ● Hsiao-LL, Howard-RJ, Aikawa-M, Taraschi-TF. Modification of host cell membrane lipid composition by the intra-erythrocytic human malaria parasite Plasmodium falciparum. Biochem J. 1991 Feb 15 ;274(Pt 1) :121-32.

[0503] ● Hsing-AW, Comstock-GW, Abbey-H, PoIk-BF. Serologic Precursors of Cancer. Retinol, Carotenoids, and Tocopherol and Risk of Prostate Cancer. J Natl Cancer Inst. 1990 ;82 :941-6.

[0504] ● Idel-S, Ellinghaus-P, Wolfrum-C, Nofer-JR, Gloerich-J, Assmann-G, Spener-F, Seedorf-U. Branch Chain Fatty Acids Induce Nitric Oxide-dependent Apoptosis in Vascular Smooth Muscle Cells. J Biol Chem. 2002 December ;277(51) : 49319-25.

[0505] ● Jones-RJ, Hawkins-RE, Eatock-MM, Ferry-DR, Eskens-FA, Wilke-H, Evans-TR. A phase II open-label study of DHA-paclitaxel(Taxoprexin) by 2-h intravenous infusion in previously untreated patients with locally advanced or metastatic gastric or oesophageal adenocarcinoma. Cancer Chemother Pharmacol. 2008 Mar ; 61(3) :435-41.

[0506] ● Jurukovski-V, Simon-M. Reduced lecithin:retinol acyl transferase activity in cultured squamous cell carcinoma lines results in increased substrate-driven retinoic acid synthesis. Biochim Biophys Acta. 1999 Jan ; 1436(3) :479-90.

[0507] ● Kahier-S, Schonfeld-P, Reiser-G. The Refsum disease marker phytanic acid, a branch chain fatty acid, affects Ca<sup>2+</sup>homeostasis and mitochondria, and reduces cell viability in rat hippocampal astrocytes. Neurobiol Dis. 2005 Feb ; 18(1) :110-8.

[0508] ● Ko-CH, Shen-SC, Hsu-CS, Chen-YC. Mitochondrial-dependent, reactive oxygen species-independent apoptosis by myricetin:roles of protein kinase C,

- cytochrome c, and caspase cascade. *Biochem Pharmacol.* 2005 Mar ;69(6) :913-27.
- [0509] ● Ko-CH, Shen-SC, Lee-TJF, Chen-YC. Myricetin inhibits matrix metalloproteinase 2 protein expression and enzyme activity in colorectal carcinoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2005 ;4 :281-90
- [0510] ● Kokame-K ;Fukada-Y ;Yoshizawa-T ;Takao-T ;Shimonishi-Y. Lipid Modification at the N Terminus of Photoreceptor G-protein  $\alpha$ -Subunit[Comentarios]. *Nature.* 1992 ;359(6397) :749-52.
- [0511] ● Komen-JC, Distelmaier-F, Koopman-WJ, Wanders-RJ, Smeitink-J, Willems-PH. Phytanic acid impairs mitochondrial respiration through protonophoric action. *Cell Mol Life Sci.* 2007 Dec ;64(24) :3271-81.
- [0512] ● Kompauer-I, Demmelmair-H, Koletzko-B, Bolte-G, Linseisen-J, Heinrich-J. Association of fatty acids in serum phospholipids with lung function and bronchial hyperresponsiveness in adults. *Eur J Epidemiol.* 2008 ;23(3) :175-90.
- [0513] ● Kroemer-G, Galluzzi-L, Brenner C. Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death. *Physiol.* 2007 ;87 :99-163.
- [0514] ● Laabich-A, Manmoto-CC, Kuksa-V, Leung-DW, Vissvesvaran-GP, Karliga-I, Kamat-M, Scott-IL, Fawzi-A, Kubota-R. Protective effects of myricetin and related flavonols against A2E and light mediated-cell death in bovine retinal primary cell culture. *Exp Eye Res.* 2007 Jul ;85(1) :154-65.
- [0515] ● Lide-DR, Milne-GWA. Handbook of Data on Organic Compounds. Edition :3, illustrated, revised Published by CRC Press, 1994 ;6560 pages. ISBN 0849304458.
- [0516] ● Liu-L, Gudas-LJ. Disruption of the lecithin:retinol acyltransferase gene makes mice more susceptible to vitamin A deficiency. *J Biol Chem.* 2005 Dec ;280(48) :40226-34.
- [0517] ● Lloyd-MD, Darley-DJ, Wierzbiki-AS, Threadgill-MD. Alpha-methylacyl-CoA racemase-an 'obscure' metabolic enzyme takes centre stage. *FEBS J.* 2008 Mar ;275(6) :1089-102.
- [0518] ● Lopez-Roman-J, Luque-A, Martinez-A, Villegas-JA. Modifications in oxidative damage in sportsmen after docosahexaenoic acid(DHA) ingestion. *J Int Sports Nut.* 2008 Jun.
- [0519] ● Martinez-M. Severe Changes in Polyunsaturated Fatty Acids in the Brain, Liver, Kidney, and Retina in Patients with Peroxisomal Disorders. *Adv-Exp-Med-Biol.* 1992 ;318 :347-59.
- [0520] ● Matsuura-T, Hasumura-S, Nagamori-S, Murakami-K. Retinol esterification activity contributes to retinol transport in stellate cells. *Cell Struct Funct.* 1999 Jun ;24(3) :111-6. -McCoII-AJ ;Converse-CA. Lipid Studies in Retinitis Pigmentosa. *Prog-Lipid-Res.* 1995 ;34(1) :1-16.
- [0521] ● Mobley-JA, Leav-I, Zielie-P, Wotkowitz-C, Evans-J, Lam-YW, L' Esperance-BS, Jiang-Z, Ho-SM. Branch Fatty Acids in Dairy and Beef Products



Markedly Enhance  $\alpha$ -Methylacyl-CoA Racemase Expression in Prostate Cancer Cells in Vitro. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2004 August ;12 :775-83.

[0522] ● Monning-G, Wiekowski-J, Kirchhof-P, Stypmann-J, Plenz-G, Fabritz-L, Bruns-HJ, Eckardt-L, Assmann-G, Haverkamp-W, Breithard-G, Seedorf-U. Phytanic acid accumulation is associated with conduction delay and sudden cardiac death in sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x deficient mice. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 2004 Nov ;15(11) :1310-6.

[0523] ● Moriguchi-K ;Yoshizawa-K ;Shikata-N ;Yuri-T ;Takada-H ;Hada-T ;Tsubura-A. Suppression of N-methyl-N-nitrosourea-induced photoreceptor apoptosis in rats by docosahexaenoic acid. *Ophthalmic Res*. 2004 Mar-Apr ;36(2) : 98-105.

[0524] ● Moriguchi-K ;Yuri-T ;Yoshizawa-K ;Kiuchi-K ;Takada-H ;Inoue-Y ;Hada-T ;Matsumura-M ;Tsubura-A. Dietary docosahexaenoic acid protects against N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in rats. *Exp Eye Res*. 2003 Aug ;77(2) :167-73.

[0525] ● Neubert-TA ;Johnson-RS ;Hurley-JB ;Walsh-KA. The Rod Transducin Alfa Subunit Amino Terminus is Heterogeneously Fatty Acylated. *J-Biol-Chem*. 1992 Sep ; 267(26) :18274-7.

[0526] ● Nourooz-Zadeh-J, Pereira-P. Age-related accumulation of free polyunsaturated fatty acids in human retina. *Ophthalmic Res*. 1999 ;31(4) :273-9.

[0527] ● Nus-M, Sanchez-Muniz-FJ, Sanchez-Montero-JM. Methodological Aspects and Relevance of the Study of Vegetable Oil, Fat and Lipoprotein Oxidation Using Pancreatic Lipase and Arylesterase Food Technol. *Biotechnol*. 2006 ;44(1) :1-15.

[0528] ● O' Brien-PJ ;St Jules-RS ;Reedy-TS ;Bazan-NG ;Zatz-M. Acylation of Disc Membrane Rhodopsin may be Nonzymatic. *J-Biol-Chem*. 1987 ;262 :5210-5.

[0529] ● O' Brien-PJ ;Zatz-M ;Acylation of Bovine Rhodopsin by [H3]Palmitic Acid. *J-Biol-Chem*. 1984 ;259 :5054-7. -Pahan-K, Khan-M, Smith-BT, Singh-I. Ketoconazole and other imidazole derivatives are potent inhibitors of peroxisomal phytanic acid alpha-oxidation. *FEBS Lett*. 1995 Dec ;377(2) :213-6.

[0530] ● Pasquali-D, C Thaller-C, Eichele-G. Abnormal level of retinoic acid in prostate cancer tissues. *J Clin Endocrinology & Metabolism*. 1996 ;81 :2186-91.

[0531] ● Pike-MG, Applegarth-DA, Dunn-HG, Bamforth-SJ, Tingle-AJ, Wood-BJ, Dimmick-JE, Harris-H, Chantler-JK, HaII-JG. Congenital rubella syndrome associated with calcific epiphyseal stippling and peroxisomal dysfunction. *J Pediatr*. 1990 Jan ;116(1) :88-94. Erratum in : *J Pediatr* 1990 Feb ;116(2) :320.

[0532] ● Politi-LE, Bouzat-C, De los Santos-EB, Barrantes-FJ. Heterologous retinal cultured neurons and cell adhesion molecules induce clustering of acetylcholine receptors and polynucleation in mouse muscle BC3H-1 clonal cell line. *J Neurosci Res*. 1996 ;43 :639-651.

- [0533] ● Powers-JM et al. Cerebellar atrophy in chronic rhizomelic chondrodysplasia punctata: a potential role for phytanic acid and calcium in the death of its Purkinje cells. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1999 Aug;98(2):129-34.
- [0534] ● Pullarkat-RK;Reha-H;Patel-VK;Goedel-HH. "Ceroid-Lipofuscinosis: Batten's Disease". (Armstrong-D, Koppang-N;Rider-JA. Eds.). Amsterdam. Elsevier-Biomedical-Press. 1982;335-43.
- [0535] ● Ratnayake-WMN, Olsson-B, Ackman-RG. Novel branched-chain fatty acids in certain fish oils. *Lipids*. 1989;24(7):630-7.
- [0536] ● Reiser-G, Schonfeld-P, Kahlert-S. Mechanism of toxicity of the branch-chain fatty acid phytanic acid, a marker of Refsum disease, in astrocytes involves mitochondrial impairment, *Int J Dev Neurosci*. 2006 Apr-May;24(2-3):113-22.
- [0537] ● Rotstein-NP, Politi-LE, German-OL, Girotti-R. Protective effect of docosahexaenoic acid on oxidative stress-induced apoptosis of retina photoreceptors. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2003 May;44(5):2252-9.
- [0538] ● Rotstein-NP;Avelo-MI;Barrantes-FJ;Roccamo-AM;Politi-LE. Apoptosis to Retinal Photoreceptors During Development In Vitro: Protective Effect of Docosahexaenoic Acid. *J Neurochem*. 1997;69(2):504-13.
- [0539] ● Schaefer-EJ;Robins-SJ;Patton-GM;Sandberg-MA;Weigel-DiFranco-CA;Rosner-B;Berson-EL. Red Blood Cell Membrane Phosphatidylethanolamine Fatty Acid Content in Various Forms of Retinitis Pigmentosa. *J-Lipid-Res*. 1995;36(7):1427-33.
- [0540] ● Schonfeld P, Kahlert S, Reiser G. A study of the cytotoxicity of branched-chain phytanic acid with mitochondria and rat brain astrocytes. *Exp Gerontol*. 2006 Jul;41(7):688-96.
- [0541] ● Schonfeld P, Reiser G. Rotenon-like action of the branched-chain phytanic acid induces oxidative stress in mitochondria. *J Biol Chem*. 2006 Mar 17;281(11):7136-42.
- [0542] ● Schonfeld-P, Kahlert-S, Reiser-G. In brain mitochondria the branch-chain fatty acid phytanic acid impairs energy transduction and sensitizes for permeability transition. *Biochem J*. 2004;383(Pt 1):121-8.
- [0543] ● Schonfeld-P, Woitczak-L. Fatty acids decrease mitochondrial generation of reactive oxygen species at the reverse. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Aug;1767(8):1032-40.
- [0544] ● Serini S, Trombino S, Oliva F, Piccioni E, Monego G, Resci F, Boninsegna A, Picci N, Ranelletti FO, Calviello G. Docosahexaenoic acid induces apoptosis in lung cancer cells by increasing MKP-1 and down-regulating p-ERK1/2 and p-p38 expression. *Apoptosis*. 2008 Sep;13(9):1172-83.
- [0545] ● Serkov IV, Grigor'ev W, Ivanova TA, Gretskaya NM, Bezuglov WI, Bachurin

S0. Effect of derivatives of docosahexaenoic acid on AMPA receptors in Purkinje neurons. *Dokl Biol Sci.* 2006 Nov-Dec ;411 :434-5.

[0546] ● Sheren-Manoff-M, Shin-SJ, Su-D1 Bok-D, Rando-RR, Gudas-LJ. Reduced lecithin:retinol acyltransferase expression in human breast cancer, *Int J Oncol.* 2006 Nov ;29(5) :1193-9.

[0547] ● Shucheng-L, Chaohua-Z, Pengzhi-H, Hongwu-J. Concentration of docosahexaenoic acid(DHA)and eicosapentaenoic acid(EPA)of tuna oil by urea complexation:optimization of process parameters. *J Food Engineering.* 2006 ; 73(3)203-9.

[0548] ● Simmons-DP. Andreola-F, De Luca-LM. Human melanomas of fibroblast and epithelial morphology differ widely in their ability to synthesize retinyl esters. *Carcinogenesis.* 2002 Nov ;23(11) :1821-30.

[0549] ● Steinberg-D. Refsum disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease.* Vol. 2. (Scriver-CR, Beaudet-AL, Sly-WS1 Valle-D. Eds.) New York. McGraw-Hill. 1995 ;2351-69.

[0550] ● Thornburg-T, Turner-AR, Chen-YQ, Vitolins-M, Chang-B, Xu-J. Phytanic acid, AMACR and prostate cancer risk. *Future Oncol.* 2006 Apr ;2(2) :213-23.

[0551] ● Tucker-B, Klassen-H, Yang-L, Chen-DF, Young-MJ. Elevated MMP Expression in the MRL Mouse Retina Creates a Permissive Environment for Retinal Regeneration. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2008 Apr ;49(4) :1686-95.

[0552] ● Voss-A ;Reinhart-M ;Sprecher-H. Differences in the Interconversion between 20-and 22-Carbon(n-3)and(n-6)Polyunsaturated Fatty Acids in Rat Liver. *Biochim-Biophys-Acta,* 1992 ;1127(1) :33-40.

[0553] ● Wallstrom-P, Bjartell-A, Gullberg-B, Olsson-H, Wirfalt-E. A prospective study on dietary fat and incidence of prostate cancer (Malmo, Sweden). *Cancer Causes Control.* 2007 Dec ;18(10) :1107-21.

[0554] ● Walsh-PC. Serum levels ofphytanic acid are associated with prostate cancer risk. *J Urol.* 2005 Nov ;174(5) :1824.

[0555] ● Weleber-RG ;Tongue-AC ;Kennaway-NG ;Budden-SS ;Baist-NRM ; Ophthalmic Manifestations of Infantile Phytanic Acid Storage Disease. *Arch-Ophthalmol.* 1984 ;102 :1317-21.

[0556] ● Wieloch-T, Mattiasson-G, Hansson-MJ, Elmer-E. *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology.* Brain Energetics, *Int MoI Cell Processes.* Springer US. 2007 ;667-702.

[0557] ● Wong-F. Investigating Retinitis Pigmentosa :A Laboratory Scientists Perspective. *Prog-Retinal-Eye-Res.* 1997 ;16(3) :353-73.

[0558] ● Xu-J, Thornburg-T, Turner-AR, Vitolins-M, Case-D, Shadle-J, Hinson-L, Sun-J, Liu-W, Chang-B, Adams-TS, Zheng-SL, Torti-FM. Serum levels of phytanic acid are associated with prostate cancer risk. *Prostate.* 2005 May ;(15)63 :209-214.

[0559] ● Yates-A. Study Shows Fish Oils Dramatically Improve Cholesterol Levels in Professional Football Players. 2009. Sport Health. -Yoshizawa-K, Tsubura-A. [Characteristics of N-methyl-N-nitrosourea-induced retinal degeneration in animals and application for the therapy of human retinitis pigmentosa]. Nippon Ganka Gakkai Zasshi. 2005 Jun ;109(6) :327-37.

[0560] ● Yue-J, Thewalt-JL, Cushley-RJ. Deuterium nuclear magnetic resonance study of the interaction of branched chain compounds(phytanic acid, phytol) with a phospholipid model membrane. Chem Phys Lipids. 1988 Dec ;49(3) :205-13.

[0561] ● Zhan-HC, Gudas-LJ, Bok-D, Rando-R, Nanus-DM, Tickoo-SK. Differential expression of the enzyme that esterifies retinol, lectthinrretinol acyltransferase, in subtypes of human renal cancer and normal kidney. Clin Cancer Res. 2003 Oct ;9(13) :4897-905.

细胞培养物	μg/ml PhA	% 细胞凋亡 / 培养皿	% Bcl-2 (+)	% Bax (+)	比 Bcl-2/ Bax
对照 DHA (-) 百草枯 (-)	0	31.4±4.2	42.1±3.6	2.1±0.3	20.0
对照 DHA (-) 百草枯 (+)	0	74.4±8.1	36.8±6.1	12.4±1.1	3.0
DHA(+) <sub>0</sub>	0	34.2±2.3	62.4±3.5	2.5±0.6	25.0
DHA(+) <sub>1</sub>	4	35.3±1.9	60.9±2.2	2.3±0.2	26.5
DHA(+) <sub>2</sub>	20	42.2±4.6	63.6±1.4	2.6±0.7	24.5
DHA(+) <sub>3</sub>	100	51.1±6.4	54.5±4.1	3.3±1.0	16.4
DHA(+) <sub>4</sub>	500	61.7±7.5*	48.3±3.7	4.5±0.9	10.7
DHA(+) <sub>5</sub>	2500	73.3±5.8	42.4±4.2	6.7±1.4	6.3
DHA(+) <sub>6</sub>	12500	82.6±7.7	38.4±7.1	14.7±2.7	2.6

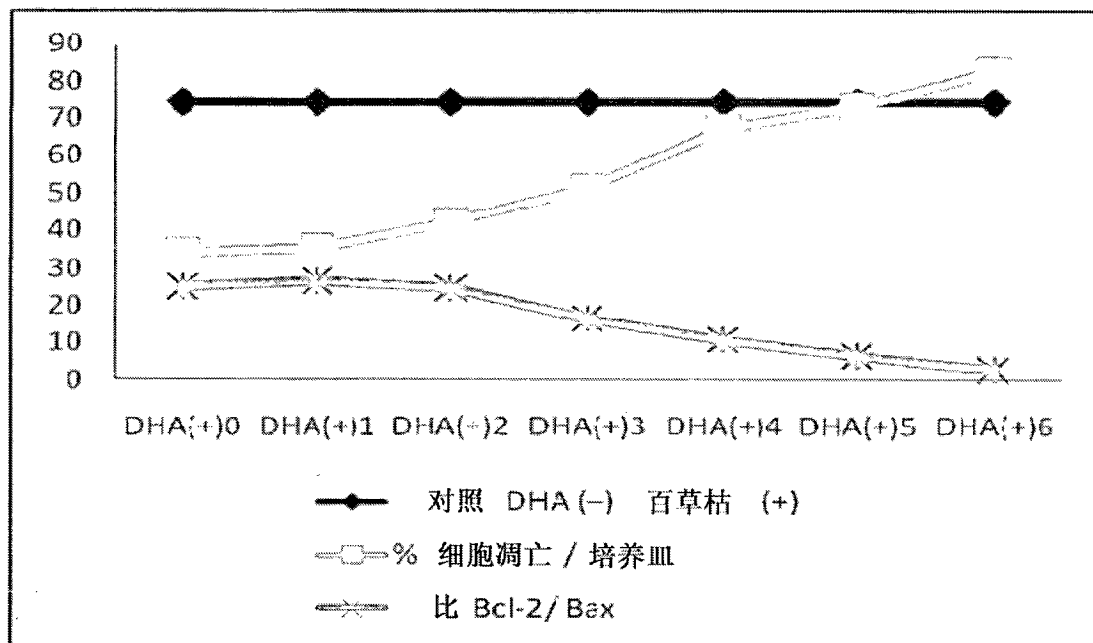


图 1

白化病小鼠的视网膜	μg/ml PhA	% 细胞凋亡 / 培养皿	% Bcl-2 (+)	% Bax (+)	比 Bcl-2/ Bax
对照 DHA (-) MNU (+)	0	84.4±5.3	31.3±4.3	17.1±2.7	3.0
DHA(+) <sub>0</sub>	0	31.2±2.3	71.1±6.2	1.9±0.3	37.4
DHA(+) <sub>1</sub>	4	29.8±3.9	70.4±6.3	2.0±0.5	35.2
DHA(+) <sub>2</sub>	20	35.6±2.9	64.2±4.1	2.3±0.2	27.9
DHA(+) <sub>3</sub>	100	43.7±3.4	57.6±5.8	3.1±0.7	18.5
DHA(+) <sub>4</sub>	500	53.1±5.2	46.1±4.9	4.3±1.3	10.7
DHA(+) <sub>5</sub>	2500	62.1±4.6	39.8±3.3	8.3±1.9	4.8
DHA(+) <sub>6</sub>	12500	71.6±5.5	33.2±5.7	13.2±2.5	2.5

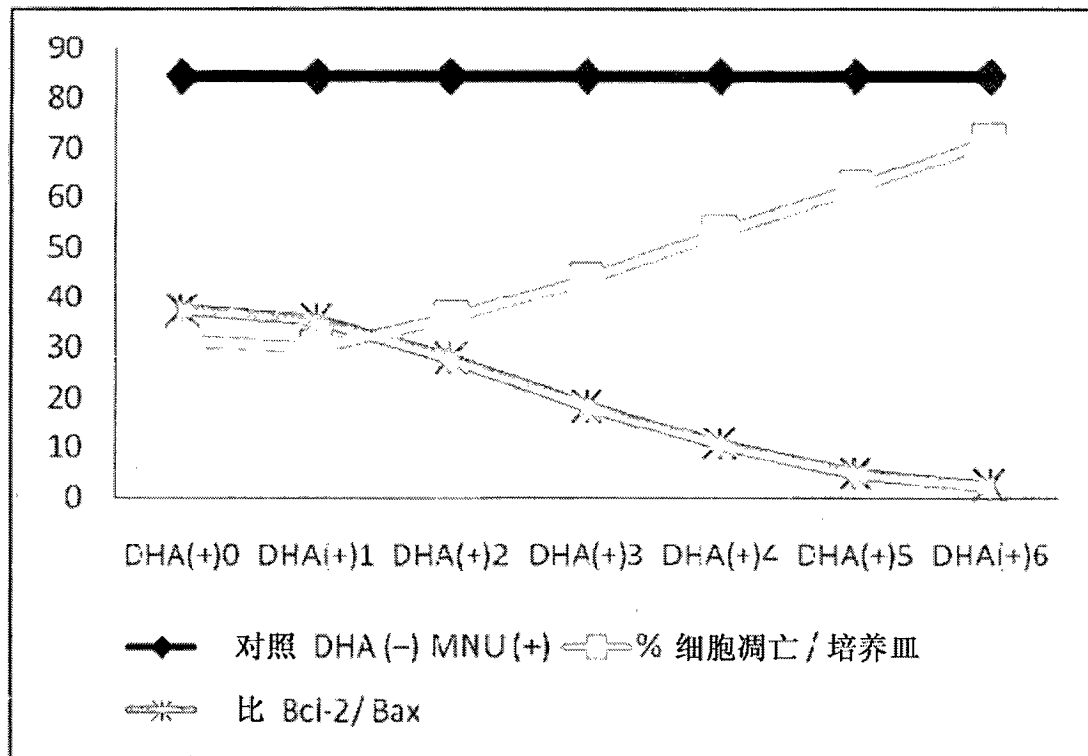


图 2

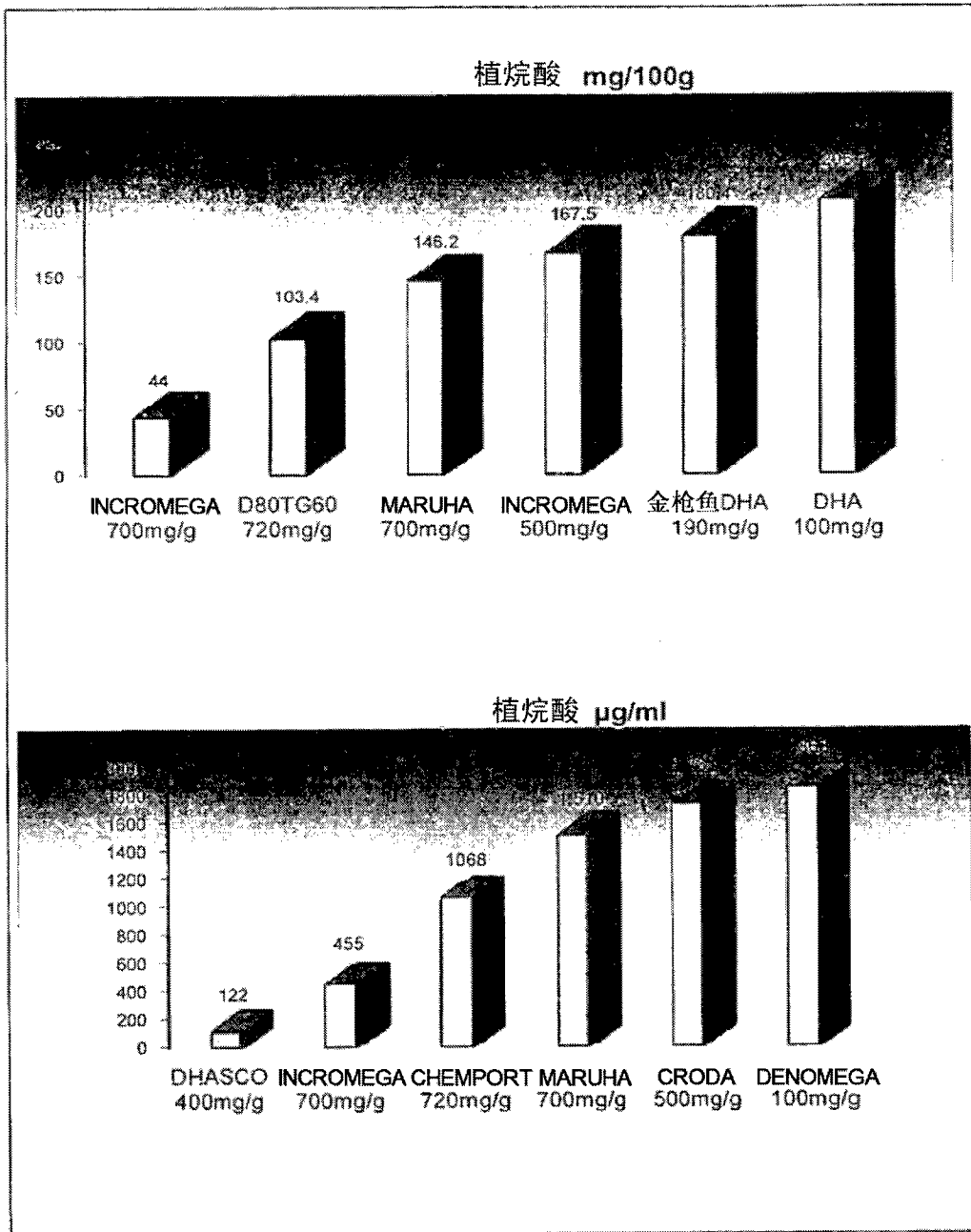


图 3

时间	参照值	在11位患者中的平均PhA水平 结果 $\mu\text{g/ml}$						
		T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6
植烷酸	$< 0.20 \mu\text{g/ml}$	35,350	4,060	6,610	4,580	2,410	2,820	1,120
降植烷酸	$< 0,02 \mu\text{g/ml}$	31,710	5,650	6,330	4,200	4,130	5,260	1,650
C22:0	$20,97 \pm 6,270$	11,030	11,340	12,670	7,370	15,860	14,230	8,840
C24:0	$17,59 \pm 5,360$	14,180	15,210	19,500	11,560	21,960	19,940	14,170

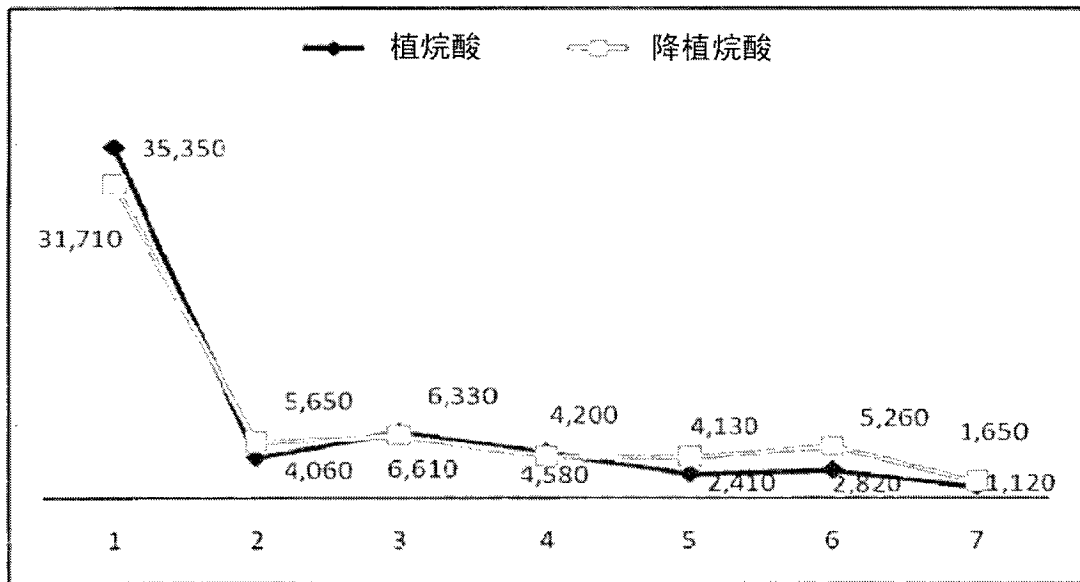


图 4



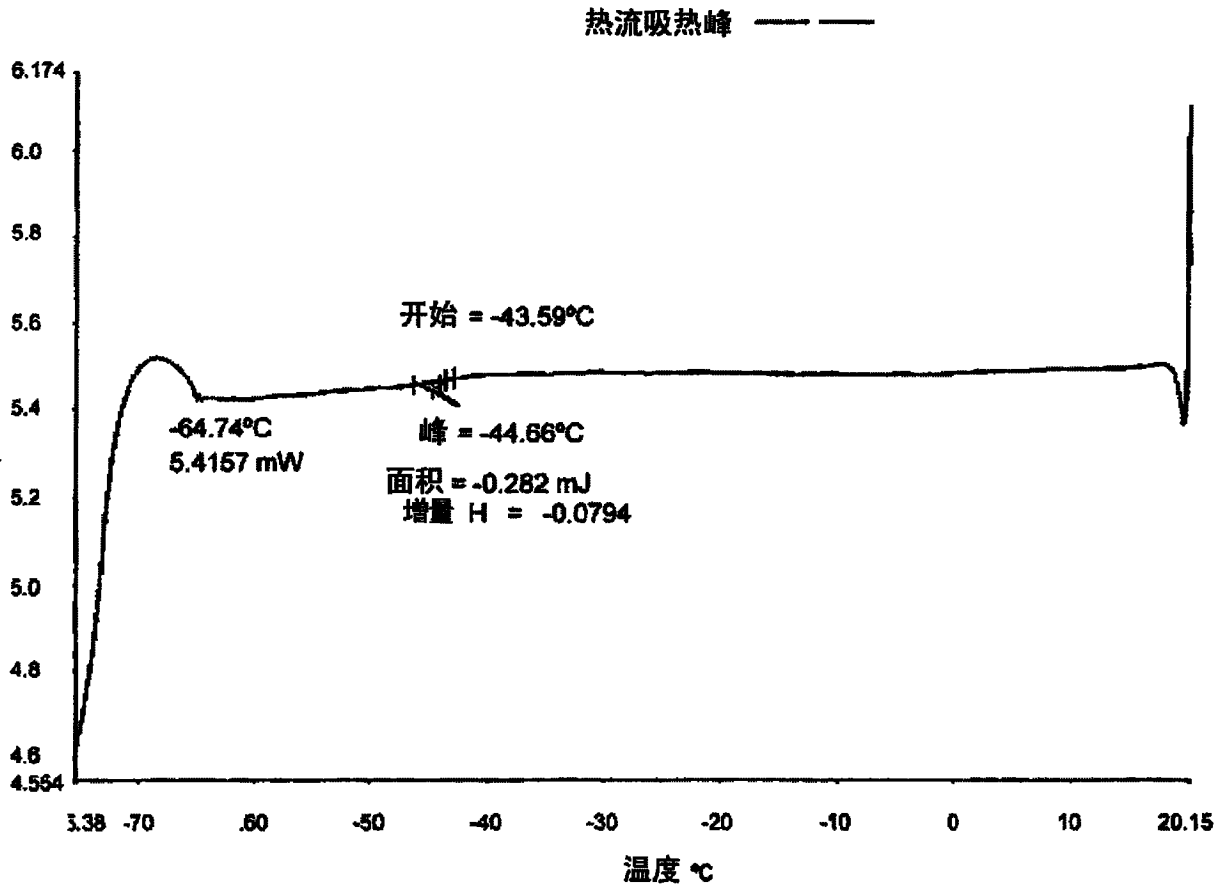


图 5

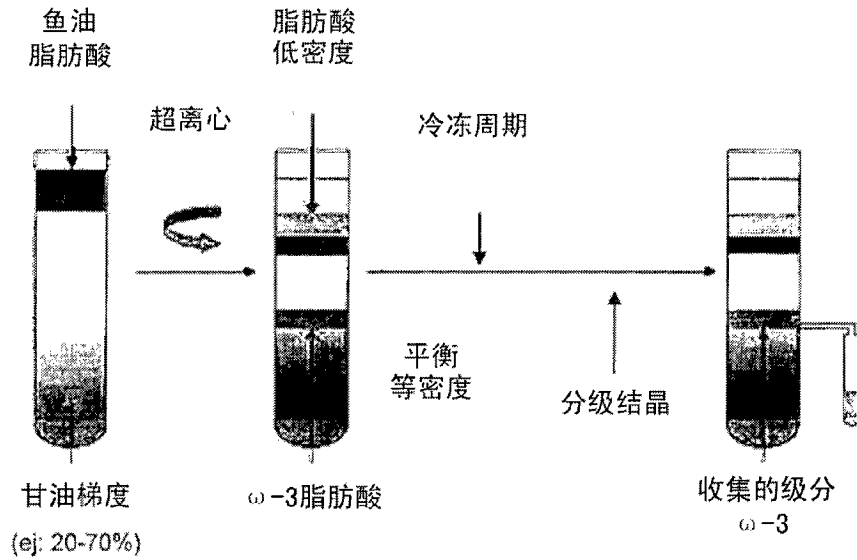


图 6