

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C07C323/52

C07C 59/60

C07C 69/708 A61K 31/20

A61K 31/19 A61P 33/06

A61P 29/00 //C07C69/734

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95196205.1

[45]授权公告日 2002 年 7 月 24 日

[11]授权公告号 CN 1088058C

[22]申请日 1995. 10. 13

[21]申请号 95196205.1

[30]优先权

[32]1994. 10. 13 [33]AU [31]PM8781

[32]1994. 10. 26 [33]AU [31]PM9066

[86]国际申请 PCT/AU95/00677 1995. 10. 13

[87]国际公布 WO96/11908 英 1996. 4. 25

[85]进入国家阶段日期 1997. 5. 14

[73]专利权人 肽技术有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士州

共同专利权人 阿德莱德妇幼医院

[72]发明人 安东尼奥·费兰特

阿尔弗雷德·保罗斯

克里斯托弗·约翰·伊斯顿

迈克尔·约瑟夫·皮特

托马斯·阿里斯泰尔·罗伯逊

德博拉·安·拉思简

[56]参考文献

EP-345038 1989. 12. 6 A61K31/19

审查员 陈 矛

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 甘 玲

权利要求书 4 页 说明书 31 页 附图页数 13 页

[54]发明名称 经修饰的多不饱和脂肪酸

[57]摘要

本发明提供了具有抗疟和/或中性白细胞刺激活性的多不饱和脂肪酸化合物。该多不饱和脂肪酸含有 18-25 个碳和 1-6 个双键,其特征在于它们有一个或两个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂的取代基。多不饱和脂肪酸化合物还优选包括选自羟基、氢过氧基、过氧基、羧甲基基团的进一步取代或连接到一个氨基酸上。本发明也提供了一种制备不饱和氧杂取代脂肪酸的方法,它包括不饱和脂肪酸醇与卡宾反应,使卡宾插入到醇的 O-H 键中。本发明进一步提供了一种用组合物治疗炎症的方法,该组合物含有至少一个具有 C₁₈₋₂₄ 碳链和 1-6 个顺式或反式双键的多不饱和脂肪酸的羟基、氢过氧基或过氧基衍生物。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

1. 具有抗疟和/或中性白细胞激活活性的多不饱和脂肪酸化合物，该多不饱和脂肪酸含有 18—25 个碳和 1—6 个双键，其中在多不饱和脂肪酸化合物上有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。
2. 权利要求 1 的多不饱和脂肪酸化合物，其中该多不饱和脂肪酸化合物包括选自羟基、氢过氧基、羧甲基取代基团的进一步的取代或通过其羧基与氨基酸连接。
3. 权利要求 1 的多不饱和脂肪酸化合物，其中该多不饱和脂肪酸化合物含有 20—25 个碳原子和 3—6 个双键。
4. 权利要求 1 的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物是一个 $n-3$ 或 $n-6$ 脂肪酸。
5. 权利要求 1—4 任一个的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物是含有 β 氧杂或 β 硫杂取代的、有 3—4 个双键的 21 个碳原子的化合物。
6. 权利要求 1—4 任一个的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物是含有 γ 硫杂或 β 氧杂取代的、有 3—4 个双键的 22 个碳原子的化合物。
7. 权利要求 1—4 任一个的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物是含有 β 硫杂取代的、有 3—4 个双键的 23 个碳原子的化合物。
8. 权利要求 1—4 任一个的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物是含有 γ 硫杂取代的、有 3—4 个双键的 24 个碳原子的化合物。
9. 权利要求 1—4 任一个的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物

是含有 β 氧杂取代的、有 3—6 个双键的 25 个碳原子的化合物。

10. 权利要求 1—4 任一个的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物是含有 β 硫杂取代的、有 3—6 个双键的 25 个碳原子的化合物。

11. 权利要求 1 的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物有 ω 羟基取代。

12. 权利要求 1—4 任一个的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物是含有 β 硫杂和 α -羧甲基基团的、有 3—6 个双键的 23 个碳原子的化合物。

13. 权利要求 1—4 任一个的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物是通过羧基端与氨基酸共价连接。

14. 权利要求 13 的多不饱和脂肪酸化合物，其中多不饱和脂肪酸化合物共价连接到天冬氨酸或甘氨酸上。

15. 一种制备含有 β 氧杂取代、18—25 个碳和 1—6 个双键的不饱和脂肪酸的方法，其包括使相应的不饱和脂肪酸醇与卡宾反应使卡宾插入到醇的 O-H 键中。

16. 权利要求 15 的方法，其中卡宾通过乙酸铈催化的重氮化合物合成。

17. 抗炎药物组合物，其含有多不饱和脂肪酸的羟基、氢过氧基或羧甲基衍生物和药物学上可接受的载体，该多不饱和脂肪酸衍生物含有 18—25 个碳原子碳链和 1—6 个顺式或反式双键，而且有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。

18. 权利要求 17 的组合物，其中多不饱和脂肪酸选自于 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸、5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸、4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸和花生四烯酸

的衍生物，这些衍生物都有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。

19. 多不饱和脂肪酸的羟基、氢过氧基或羧甲基衍生物在制备用于治疗炎症的药物中的应用，其中该多不饱和脂肪酸衍生物含有 18—25 个碳原子碳链和 1—6 个顺式或反式双键，而且有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。

20. 权利要求 19 的应用，其中多不饱和脂肪酸选自于 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸、5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸、4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸和花生四烯酸的衍生物，这些衍生物都有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。

21. 抗炎药物组合物，其含有多不饱和脂肪酸和药学上可接受的载体，该多不饱和脂肪酸含有 18—25 个碳原子碳链和 1—6 个顺式或反式双键，而且该多不饱和脂肪酸通过其上的羧基与氨基酸连接，并有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。

22. 权利要求 21 的组合物，其中多不饱和脂肪酸选自 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸、5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸、4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸和花生四烯酸的衍生物，这些衍生物都有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。

23. 多不饱和脂肪酸在制备用于治疗炎症的药物中的应用，其中该多不饱和脂肪酸的羟基衍生物含有 18—25 个碳原子碳链和 1—6 个顺式或反式双键，而且该多不饱和脂肪酸通过其上的羧基与氨基酸连接，并有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。

24. 权利要求 23 的应用，其中多不饱和脂肪酸选自于 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸、5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸、4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸和花生四烯酸的衍生物，这些衍生物都有一个选自 β 氧杂、 γ 氧杂、 β 硫杂和 γ 硫杂基团的取代基。

25. 抗疟药物组合物，其含有如权利要求 1—14 之一所述的多不饱和脂肪酸和药物学上可接受的载体。

26. 如权利要求 1—14 之一所述的多不饱和脂肪酸在制备用于治疗疟疾的药物中的应用。

27. 用于治疗类风湿关节炎药物组合物，其含有如权利要求 1—14 之一所述的多不饱和脂肪酸和药物学上可接受的载体。

28. 如权利要求 1—14 之一所述的多不饱和脂肪酸在制备用于治疗类风湿关节炎的药物中的应用。

说明书

经修饰的多不饱和脂肪酸

本发明涉及具有抗疟活性和/或嗜中性白细胞刺激活性的新多不饱和脂肪酸。本发明进一步涉及一组修饰的多不饱和脂肪酸，它们有抑制细胞因子产生和细胞因子作用的能力。当与天然产生的多不饱和脂肪酸比较时，该脂肪酸有增强的稳定性。本发明进一步涉及包含所述多不饱和脂肪酸为活性成分的组合物和包括服用该组合物在内的抗疟、抗感染或抗炎治疗或预防方法。

超过半数的世界人口遭受患疟疾的危险，其中每年记录约 5 亿急性感染以及大约 1 百万死亡。（Tropical Disease Progress in International Research. 1987-1988. Ninth Programme Report. UNDP/World Bank/WHO. Geneva. 43-49; Stevenson MM Preface In; Stevenson MM. Ed. Malaria; Host responses to Infection. CRC Press. Inc.）。因为增加的抗药性和毒副作用，抗疟药的使用伴随着较多的问题。大多数现用的抗疟药不适宜用于儿童（大多数遭受潜在地致命的脑疟危险）、怀孕妇女和老年人。

炎症可以由细菌、病毒和/或其它感染剂、机会感染（可能是免疫降低状态的必然结果，如由癌症或治疗，特别是细胞毒药物治疗或放疗造成）、自身免疫性或其它方面造成。脓毒性休克是包含炎症的疾病的例证。许多革兰氏阴性脓毒性休克的临床特征可以通过给动物服用 LPS 在动物身上重现，LPS 可以促使严重的能致死的代谢和生理变化。广泛促炎细胞因子，如肿瘤坏死因子 α （TNF α ）与 LPS 的注射有关联。长期暴露于 TNF 或白介素 6 的特征是产生恶病质，其是晚期恶性肿瘤和严重感染的普遍症状。其特征是非正常的蛋白和葡萄糖代谢及身体逐渐衰竭。给小鼠、大鼠和/或人长期服用 TNF IL-1，在 7 ~ 10 天内造成厌食、体重下降和身体脂肪及蛋白耗竭（Cerami 等，1985, Immunol. Lett. 11. 173; Fong 等，1989, J. Exp. Med. 170, 1627; Moldawer 等，Am. J. Physiol., 254 G450-G456, 1988; Fong 等，Am. J. Physiol. 256, R659-R665(1989); McCarthy 等，Am. J. Clin. Nutr., 42, 1179-1182, 1982）。测定了患有癌症和与恶质病有关的慢性疾病的病人的 TNF

水平。

TNF α 和白介素-1，具有如致热性、致睡眠性和做为炎症介质的普通功能活性，已经影响除毒性休克及与癌症相关的恶病质外的与慢性感染相关的其它疾病的病理学。在带有类风湿和活性关节炎的病人的滑液的液体中以及在带有类风湿关节炎的病人的血液中检测到了 TNF（Saxne 等，1988，Arthrit Rheumat 31,1041）。在肾移植病人急性排斥发作期间检测到 TNF 的水平升高（Manury 和 Teppo 1987，J. Exp. Med. 166, 1132）。在动物中，TNF 显示其与同种异体骨髓移植后在皮肤和内脏中产生的移植物抗宿主疾病的病原有关。

服用兔抗鼠 TNF 抗体，显示阻止与移植物抗宿主疾病有关的组织学变化并减少死亡率（Piquet 等，1987，J. Exp. Med. 166, 1220）。TNF 也显示出对疟疾的病理贡献显著（Clark 等，1987，Am. J. Pathol. 129, 192-199）。进一步，已有报道在疟疾病人中 TNF 的血清水平升高（Scuderi 等，1986，Lancet 2, 1364-1365）。

多发性硬化（MS）是一种中枢神经系统慢性脱髓鞘病并是年轻青年人的最普遍的慢性 neurological 疾病。MS 的发生率和其传播类型几十年无改变。该病仍基本不能治愈。

MS 影响中枢神经系统（CNS）白质的多重区域，最经常地影响 periventricular 白质、脑干、脊髓和视神经。初步的作用是破坏髓鞘，并最终杀死少突神经胶质细胞，产生 MS 的特征噬斑。

噬斑的早期发展以血管周炎症的发展，随后淋巴细胞、浆细胞和巨噬细胞进入损害处为特点。随后是星形细胞神经胶质增生和少突神经胶质细胞的脱神经髓鞘作用的企图。噬斑被淋巴细胞包围。抗 T 细胞剂如抗 CD4 疗法是有效的。此药物抑制 T-细胞的繁殖。

尽管 MS 的病原学仍是未知的，但是形成似乎有理的假说的研究努力集中于那些免疫调节异常，包括自身免疫和基因素质（predisposition），两者都在疾病的实际发展中起作用。TNF β （淋病毒素）和 TNF α 都被认为在病理生理学上起作用。

在处于疾病急性期的病人身上能再现地发现多重免疫学异常。免疫球蛋白的合成，尽管在外周部正常，在中枢神经系统则升高，而且产生的抗体具有特有带型。

不知道这些抗体的抗原专一性，且仍不清楚它们在疾病的进程中是否起作用。

已知各种能激活免疫系统的应激物，如病毒感染或外伤也会产生 MS 的加剧。其它激活剂，如 γ -干扰素，当用药时产生相似的作用。另外，例如用皮质类固醇的免疫抑制抗炎治疗，能产生有节制的缓和或至少减轻一段时间。

脊髓病，一种脊髓障碍，可有多种不同的病因，大多数由炎症引起，包括如下：

神经梅毒；

b₁₂或叶酸缺乏；

肉样瘤病；

横向骨髓炎；

蛛网膜炎 (arachidonitis) ；

颈脊椎炎；

运动神经元疾病；

神经纤维瘤病；

由肿瘤、脊面 (disc) 或关节炎引起的脊髓压迫；

脊髓红斑狼疮；以及

脑脊髓炎

发生慢性炎症或如更普遍知道的慢性免疫系统激活作用是对持续抗原的应答，所述抗原来源可以是外源的或由自身免疫状态造成。这样的炎症导致局部组织破坏，并且依赖于炎症的类型，由于炎性介质的持续产生能导致全身的影响。此炎症介质包括细胞因子，它是由激活的淋巴细胞和巨噬细胞产生的可溶介质，并影响细胞的沟通和生理学反应。感染性疾病，如慢性疲劳综合症或中毒性休克综合症或通过导致此情况的自身免疫机理，如类风湿关节炎，炎性肠疾病，节段性回肠炎和其它如移植物抗宿主疾病，可导致慢性免疫激活作用。

类风湿关节炎 (Marrow 等, I "Autoimmune Rheumatic Disease", Blackwell Scientific Publ. Oxford, UK. Chapter 4 pp148-207(1987)) 是一种特征为慢性炎症和侵蚀性关节炎的疾病，影响达 3% 的人，包括儿童。类风湿关节炎的症状包括初期僵直，在运动时至少一个关节肿胀以及关节痛和肿胀。包括嗜睡、厌食和虚弱以及发烧和淋巴结病 (免疫激活的特征) 的非专一症状可先于关节发生。类风湿关

炎关节外的表现有脉管炎、白内障、眼色素层炎、间质纤维化、心包炎和心肌炎、外周神经痛、骨髓沉积、慢性贫血和皮下及肺结节。

基因因素和包括细菌、真菌、支原体以及病毒在内的感染剂与类风湿关节炎的发展有关。轻度类风湿关节炎可以用非类固醇抗炎药物治疗，而严重情况需要全身皮质类固醇，抗代谢剂或细胞毒药物。抗 CD4 单克隆抗体和抗 $\text{TNF}\alpha$ 抗体已试验性地用于治疗类风湿关节炎(Horneff 等, 细胞因子 3 266-267(1991); Horneff 等, Arth. Rheum. 34 129-140(1991)和 Shoenfeld 等, Clin. Exp. Rheum. 9, 663-673(1991); Williams 等, 1992 PNAS 89, 9784)。

炎性肠疾病 (IBD) 和节段性回肠炎是慢性炎症的一种情况，它们满足一些自身免疫疾病的标准 (Snook, Gut 31 961-963(1991))。炎症和组织损害包含中性白细胞、巨噬细胞和淋巴细胞的补充和激活 (MacDermott 等, Adv. Immunol. 42 285-328(1988))，它们产生细胞因子和炎症前分子，如前列腺素和白三烯 (MacDermott, Mt. Sinai J. Med. 57 273-278(1990))。作为免疫活性细胞慢性激活的结果，IL-1, IL-6 (Starter, Immunol. Res. 10 273-278(1990); Fiocchi, Immunol. Res. 19 239-246(1991)) 和 $\text{TNF}\alpha$ (MacDermott, Mt. Sinai J. Med. 57 273-278(1990)) 都在 IBD 和节段性回肠炎病人身上得到提高。

用于治疗 IBD 和节段性回肠炎的药物包括抗炎剂如柳氮磺胺吡啶 (5-ASA)，皮质类固醇，环孢多肽 A 和咪唑硫嘌呤 (Hanauer. Scand J. Gastroenterol 25 (Supl. 175) 97-106(1990); Peppercorn. Annal. Intern. Med. 112 50-60(1990))。试验性地，抗 CD4 和抗 TNF 单克隆抗体已成功地用于治疗溃疡性结肠炎 (Emmerich 等, Lancet 338 570-571(1991))。

当宿主对亲缘不相容的移植物发生反应，产生宿主抗移植物反应时，免疫活性移植 (如骨髓或肠组织) 会反抗宿主导致移植物抗宿主疾病。这些反应是通过直接对抗外来 MHC 分子的同种异体反应来介导的，并在与体外通过混合的淋巴细胞反应 (MLR) 模拟。移植/宿主相互作用在移植组织周围造成慢性炎症，伴随如在 ADS 中所见的免疫活性标志物的升高 (Grant. Immunol. Today 12 171-172(1991))。移植/宿主相互作用的治疗目前包括咪唑硫嘌呤，环孢多肽 A 或甲基泼尼松，以及最近的雷帕霉素 (Spekowski 等, Transplantation 53 258-264(1992); Huber 等, Bibliotheca Cardiologica, 43 103-110(1988))。对 CD3 (Wissing 等, Clin Exp

Bibliotheca Cardiologica, 43 103-110(1988))。对 CD3 (Wissing 等, Clin Exp Immunol. 83 333-337(1991)), CD4 (Reinke 等, Lancet 338 702-703(1991)) 和 $\text{TNF}\alpha$ 特异的单克隆抗体已试验性地用于抑制移植/宿主反应。

如上所述, 各种 PUFA 有一个有效的生物活性范围 (例如见国际专利申请 Nos. W093/00084 和 W0 95/00607 及其引用的文献)。不幸的是, 由于它们在体内有限的稳定性, PUFA 做为治疗药物未得到广泛的应用。本发明已研制了替代的 PUFA, 它在保持生物活性的同时, 在体内具有增加的稳定性即更慢的代谢循环。这些新的多不饱和脂肪酸 (PUFA) 化合物有直接抗疟活性。除了其直接的抗疟活性, 此新的 PUFA 激活人中性白细胞造成颗粒内容物的释放, 并在产生超氧化物中与 TNF 显示协同作用。人中性白细胞被 PUFA 激活导致这些细胞杀死红血细胞内的疟原虫 (*P. falciparum*) 并且也提高了杀死金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) 的能力。

进一步, 本发明也已发现某些多不饱和脂肪酸和新的多不饱和脂肪酸以及它们的羟基和氢过氧基衍生物抑制细胞因子的产生。

这些新的 PUFAs 包括至少一个 β 氧杂、 β 硫杂、 γ 氧杂或 γ 硫杂取代。尽管饱和的 β 氧杂脂肪酸可以用醚合成的标准方法, 通过卤代烷与 α -羟基酸的二价阴离子反应或通过 α -卤代酸与去质子醇反应得到, 但本发明的不饱和 β 氧杂脂肪酸用普通的方法不易得到。以此方法获得不饱和化合物的企图仅导致分解产物, 由在烯属的和烯丙基属的碳上的不期望的副反应造成。

在标准方法的新近变动中, 由不太剧烈条件下的亲核取代反应, 通过三氟化硼乙醚配合物活化的重氮基乙酸酯与醇反应, 得到了饱和 β -氧杂脂肪酸。然而, 已知三氟化硼乙醚会造成烯的异构化, 所以不适合用于不饱和 β -氧杂脂肪酸的合成中。

本发明者现已发现, 通过在醇的 O-H 键中插入卡宾, 能以好的产率获得不饱和 β -氧杂脂肪酸。其它卡宾的插入反应没有引起复杂情况出现, 并且特别重要的是, 烯属部分在反应条件下不受影响。

卡宾可以从相应的重氮基乙酸酯或重氮基烷烃, 通过用催化剂如铑盐处理而生成。卡宾与补充的醇反应提供了不饱和 β -氧杂脂肪酸, 此醇或是 α -羟基乙酸的衍生物或是不饱和脂肪醇。在优选的实施方案中, 醇是通过天然产生的不饱和脂肪酸或

相应酯的还原得到的，并与重氮基乙酸的酯反应提供不饱和 β -氧杂脂肪酸。

本发明者也证明， β -氧杂和 β -硫杂取代的脂肪酸都不能进行 β -氧化。另外，某些新化合物表现与天然 PUFA 不同的其它性质，包括增加的溶解性，改变的氧化还原电位以及不同的电荷和极性。

因此，在第一个方面中，本发明涉及具有抗疟和/或中性白细胞刺激活性的多不饱和脂肪酸化合物。该多不饱和脂肪酸含 18-25 个碳和 1-6 个双键，其中该多不饱和脂肪酸化合物含有一个或两个选自 β -氧杂、 γ -氧杂、 β -硫杂和 γ -硫杂的取代基。

在本发明优选的实施方案中，多不饱和脂肪酸化合物含有选自羟基、氢过氧基、过氧基和羧甲基取代的进一步取代。在另一实施方案中，该取代的脂肪酸共价连接到氨基酸上。

在本发明进一步优选的实施方案中，多不饱和脂肪酸化合物含有 20-25 个碳原子和 3-6 个双键，优选是 n-3 到 n-6 脂肪酸。

在本发明另一个优选的实施方案中，多不饱和脂肪酸化合物是含有 β -氧杂或 β -硫杂取代的有 3-4 个双键的 21 个碳，含有 γ -硫杂或 β -氧杂取代的有 3-4 个双键的 22 个碳，含有 β -硫杂取代的有 3-4 个双键的 23 个碳，含有 γ -硫杂取代的有 3-4 个双键的 24 个碳，含有 β -氧杂取代的有 3-6 个双键的 25 个碳，含有 β -硫杂取代的有 3-6 个双键的 25 个碳，或含有 β -硫杂和 α -羧甲基取代的有 3-6 个双键的 23 个碳。

在本发明另一个更优选的实施方案中，多不饱和脂肪酸化合物有一个 ω 羟基取代。

在本发明另一优选的形式中，多不饱和脂肪酸化合物与氨基酸结合，优选天冬氨酸或甘氨酸。

在第二个方面中，本发明涉及一种制备不饱和氧杂取代脂肪酸的方法，包括不饱和脂肪酸醇与卡宾反应，使卡宾插入到醇的 O-H 键中。

在本发明这方面的优选实施方案中，不饱和脂肪酸含有 18-25 个碳原子和 1-6 个双键。

在本发明这方面进一步优选的实施方案中，卡宾通过重氮化合物的乙酸铈催化来合成。

在本发明这方面另一个优选的实施方案中，制备不饱和 β 氧杂取代脂肪酸。

在第三个方面中，本发明涉及一种治疗患者炎症的方法，该方法包括给患者服用治疗有效量的抗炎组合物，该组合物包括含有 18-24 个碳原子碳链和 1-6 个顺式或反式双键的多不饱和脂肪酸之至少一个羟基、氢过氧基或过氧基衍生物。

在本发明这方面的优选实施方案中，多不饱和脂肪酸可以在碳链中含有氧或硫原子做为氧杂或硫杂衍生物。

在本发明这方面的进一步优选实施方案中，多不饱和脂肪酸选自 C20: 4n-6 (5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸)、C20: 5n-3 (5, 8, 11, 14, 17-二十碳五烯酸)、C22: 6n-3 (4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯酸) 和花生四烯酸。

中性白细胞/巨噬细胞刺激剂应用于其它感染的治疗，包括 sp. 念球菌、锥虫属、血吸虫病、结核病，病毒如疱疹、山得别斯病毒、军团菌、李司忒氏菌病、肺囊虫、假单孢菌属。它们也可用于免疫受损个体，包括那些经受癌症化疗和移植接受者及烧伤病人的辅助治疗。另外，还可对那些所谓已知具有弱吞噬细胞的细胞活性的正常个体进行治疗，如老人、两岁下儿童、酗酒者。

为了使本发明的性质被更清晰地理解，其优选的形式现在将参考下面的实施例和图例做描述，其中：

图 1a 显示花生四烯酸 5, 8, 11, 14-二十碳四烯酸

图 1b 显示 5-氢过氧基-6E, 8Z, 11Z, 14Z-二十碳四烯酸

图 1c 显示 9-氢过氧基-5Z, 7E, 11Z, 14Z-二十碳四烯酸

图 1d 显示 8-氢过氧基-5Z, 9E, 11Z, 14Z-二十碳四烯酸

图 1e 显示 12-氢过氧基-5Z, 8Z, 10E, 14Z-二十碳四烯酸

图 1f 显示 11-氢过氧基-5Z, 8Z, 12E, 14Z-二十碳四烯酸

图 1g 显示 15-氢过氧基-5Z, 8Z, 11Z, 13E-二十碳四烯酸

图 1h 显示 5-羟基-6E, 8Z, 11Z, 14Z-二十碳四烯酸

图 1i 显示 9-羟基-5Z, 7E, 11Z, 14Z-二十碳四烯酸

图 1j 显示 8-羟基-5Z, 9E, 11Z, 14Z-二十碳四烯酸

图 1k 显示 12-羟基-5Z, 8Z, 10E, 14Z-二十碳四烯酸

图 1l 显示 11-羟基-5Z, 8Z, 12E, 14Z-二十碳四烯酸

图 1m 显示 15-羟基-5Z, 8Z, 11Z, 13E-二十碳四烯酸

图 1n 到图 1z 显示取代的 PUFAs 的范围, 其中 Y 是羟基、氢过氧基或过氧基。

图 2a 显示 β -氧杂 23: 4 (n-6)

图 2b 显示 β -氧杂 21: 3 (n-6)

图 2c 显示 β -氧杂 21: 3 (n-3)

图 2d 显示 β -氧杂 25: 6 (n-3)

图 2e 显示 β -氧杂 21: 4 (n-3)

图 2f 显示 β -硫杂 23: 4 (n-6)

图 2g 显示 β -硫杂 21: 3 (n-6)

图 2h 显示 β -硫杂 21: 3 (n-3)

图 2i 显示 β -硫杂 25: 6 (n-3)

图 2j 显示 α -羧甲基- β -硫杂 23: 4 (n-6)

图 2k 显示 γ -硫杂 24: 4 (n-6)

图 2l 显示 γ -硫杂 22: 3 (n-6)

图 2m 显示 γ -硫杂 22: 3 (n-3)

图 2n 显示 16-OH- β -氧杂 22: 3 (n-6)

图 2o 显示 16-OH- β -氧杂 22: 3 (n-3)

图 3 显示 20: 4, 20: 4 甲酯 (ME), 20: 4 氢过氧基 (HP) 和 20: 4 羟基 (H) 对通过促分裂原 PHA 刺激, 由人外周血单核细胞 (PBMC) 产生的细胞因子的影响。

图 4 显示 22: 6, 22: 6HP, 22: 6H, 20: 5, 20: 5HP 和 20: 5H 对 PHA 诱导的细胞因子生成的影响。这些化合物体外抑制来自巨噬细胞及 T 细胞的细胞因子的产生。

图 5 显示 20: 4, 20: 4 氢过氧基 (HP) 和 20: 4 羟基 (OH) 抑制 $\text{TNF}\alpha$ 诱导的通过人脐血管内皮细胞的 E - 选择素的表达。

图 6 显示脂肪酸刺激的嗜中性嗜苯胺蓝颗粒的释放。

图 7 显示脂肪酸刺激的嗜中性特异性颗粒的释放。

图 8 显示脂肪酸对中性白细胞介导的杀死金黄色葡萄球菌的增强。

图 9(a) 显示花生四烯酸与 β -氧杂 23: 4 (n-3) 相比发生 β -氧化的能力。

图 9(b) 显示化合物不象花生四烯酸发生 β -氧化, 因此不会干扰正常细胞的新陈代谢。

- 表 1 显示新的脂肪酸对氯喹敏感的 *P. faciparum* 的直接抗疟活性。
- 表 2 显示该新的脂肪酸激活中性白细胞杀死 *P. faciparum* 的能力。
- 表 3 显示新的脂肪酸对氯喹耐药株 *P. faciparum* 的直接作用。
- 表 4 显示脂肪酸对促分裂原刺激的外周血单核细胞增殖的抑制作用。
- 表 5 显示脂肪酸对 PHA 刺激的 $\text{TNF}\alpha$ 生成的抑制作用。
- 表 6 显示脂肪酸对金黄色葡萄球菌刺激的干扰素 γ 生成的抑制作用。

方法

TNF 诱导的 ELAM-1 和 ICAM-1 的检测

人脐内皮细胞 (5×10^4 第一代) 接种于 96 孔板的中央 60 孔内, 剩余的孔加满无热原的蒸馏水以减少含细胞孔的蒸发。每隔一天细胞加入新鲜培养基 (补充以 20%FCS 和内皮细胞生长补充物的 M199) 直到细胞铺满。测试前一天细胞用 HBSS 洗并重加培养基。测试时吸出培养基。在介质中制备的脂肪酸加入到每一个孔中并在 37°C 5% CO_2 下如图所示温育不同时间。细胞温育后进行洗涤并用 TNF 或 PMA 处理, 然后用 PBS 洗三次并固定 (100 μl 溶于 PBS 的 0.025%戊二醛, 4°C 过夜)。各孔用 PBS 洗并加入抗 ELAM (Becton-Dickinson, 100 μl , 1/1000 在含 20%FCS 的 M199 中) 或抗 ICAM (Immunotech, 100 μl , 12/2500 含 20%FCS 的 M199) 之一, 室温温育 1 小时后, 孔用 PBS 洗并加入 100 μl 兔抗鼠 Ig-HRP 偶联物 (1/1,000, Dako)。进一步在室温温育 1 小时, 随后在加入 100 μl 底物 (ABTS) 前把板洗三次, 在微板读数仪上于 410nm 测量显色。

单核细胞繁殖实验

如 Ferrante 和 Thong (1978……) 所述, 单核细胞从正常人的末梢血分出。该单核细胞重悬于含 20%人 AB 血清的 RPMI-1640 中并放置在 96 孔板内 (每孔 50 μl , 细胞密度 4×10^6 细胞/ml)。然后加入 50 μl 脂肪酸 (66 μM) 并在 37°C , 5% CO_2 预温育细胞 30 分钟。加入 100 μl 促细胞分裂剂 (PHA, ConA, PWM, 金黄色葡萄球菌), 在加入氚代胸腺嘧啶核苷 (1 μCi /孔) 前于 37°C 、5% CO_2 下温育细胞 66 小时。在培养基中总共 72 小时后, 收集细胞并繁殖 (插入胸腺嘧啶核苷) 并测定上清液细胞因

子的存在。

细胞因子测定

培养基上清液中细胞因子水平通过特异 ELISA 用抗细胞因子抗体测定。测定了下列细胞因子: $\text{TNF}\alpha$ 、 $\text{TNF}\beta$ 、干扰素- γ 、 $\text{IL-1}\beta$ 、 IL-2 。

脂肪酸胶束的制备和中性白细胞的预处理

为了克服脂肪酸在水性溶液中的不溶解,在 HBSS 中用超声处理制备混合的二棕榈酰磷脂酰胆碱 (DPC, 400 μg): 脂肪酸 (100 μg) 胶束。中性白细胞在 37 $^{\circ}\text{C}$ 预处理 30 分钟。在一些实验中 PUFA 溶于乙醇中。

疟疾生长抑制测定

等份的 RBC (5×10^6 含 305% 寄生虫血症) 与中性白细胞 (10^6) 在 96 孔板中混合,然后在加入 1 μCi 3H-次黄嘌呤前在 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 下在空气中温育 2 小时。然后 96 孔板温育过夜。各孔内含物被收集到玻璃滤纸上,在液闪计数器上测定掺入的 3H。然后计算寄生虫的生长抑制百分率。

中性白细胞化学发光测定

向 100 μl 在 HBSS 中的中性白细胞 (1×10^6) 中加入 100 μl 脂肪酸胶束或只加入 DPC 并补加 300 μl HBSS。随后立即加入 500 μl 光泽精 (0.25 mg/ml PBS 液)。在照度计上随时间测定产生的光输出 (mv)。实验用来自不同个体的细胞重复进行三次,产生的数值代表反应的峰值。

脱粒作用的测定

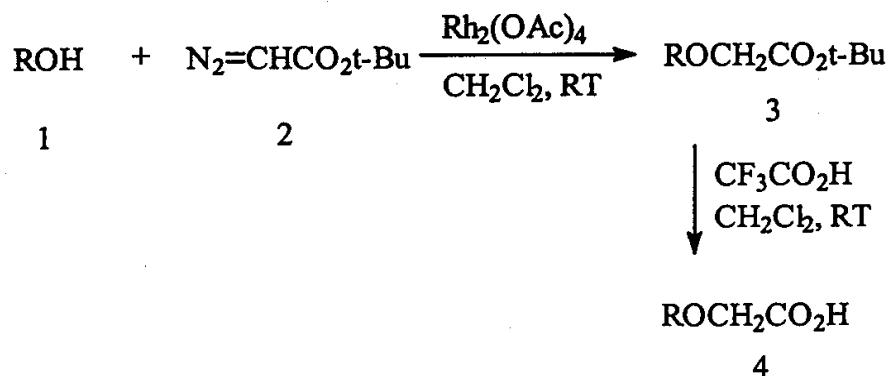
通过测定维生素 B12 结合蛋白 (如 Gottlieb 等所述, 1965, Blood 25: 875-883) 和 β -葡萄糖苷酶释放 (如 Kolodney 和 Mumford 所述, 1976, Clin. Chem. Acta 70: 247-257) 来测定脱粒作用。

杀菌测定

根据 Ferrante 和 Abell, 1988, Infect. Immun. 51: 607 的描述, 测定中性白细胞对金黄色葡萄球菌的杀菌活性.

化学合成

β -氧杂脂肪酸的合成



- a: R = $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}^{\text{cis}}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_5-$
b: R = $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4(\text{CH}^{\text{cis}}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_4-$
c: R = $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}^{\text{cis}}=\text{CHCH}_2)_3(\text{CH}_2)_7-$
d: R = $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}^{\text{cis}}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_2-$
e: R = $\text{CH}_3\text{CH}_2(\text{CH}^{\text{cis}}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_5-$

试剂

花生四烯醇 (1a) - Nu Chek Prep., Elysian, MN, USA

γ -亚麻醇 (1b) - Nu Chek Prep., Elysian, MN, USA

亚麻醇 (1c) - Nu Chek Prep., Elysian, MN, USA

二十二碳六烯醇 (1d) - Nu Chek Prep., Elysian, MN, USA

Z, Z, Z, Z-6, 9, 12, 15-十八碳四烯醇 (1e) - 用氢化铝锂还原 6, 9, 12, 15-十八碳四

烯醇甲酯合成

Z, Z, Z, Z-6, 9, 12, 15-十八碳四烯醇甲酯 - Sigma Chemical Company

乙酸铈二聚体 - Aldrich Chemical Company

重氮基乙酸叔丁酯 (2) - 从乙酰乙酸叔丁酯按照: Regitz, M; Hoche, J;

Leidhegener, A. Organic Syntheses Coll. Vol. 5, 179 合成

乙酰乙酸叔丁酯 - Fluka AG

三氟乙酸 - Aldrich Chemical Company

所有溶剂用前重蒸。

柱层析在正氮气压下在 Merck Silica Gel 60 (230-400 目), Art. 9385 上进行。

步骤

烷氧基乙酸叔丁酯 3

相应的脂肪醇 1 (1mol 当量) 称重放入干燥氮气下的两口圆底烧瓶中并溶解于二氯甲烷。向此搅拌溶液中加入乙酸铯二聚体 (0.5 mol%), 随后用注射器滴加重氮基乙酸叔丁酯 2 (2.5 mol 当量) 的二氯甲烷溶液。加完后反应混合物于氮气下室温搅拌 2 小时。粗产物干燥氮气流下浓缩, 残留物硅胶柱纯化, 用己烷/乙醚 (9:1) 洗脱, 给出相应的油状烷氧基乙酸叔丁酯 3。

烷氧基乙酸 4

相应的烷氧基乙酸叔丁酯 3 (约 100mg, 1mol 当量) 称重放入干燥氮气下的两口圆底烧瓶中并加入二氯甲烷 (约 4ml) 溶解。向此搅拌溶液中加入三氟乙酸 (1 ml), 反应混合物室温氮气下搅拌 2 小时。粗反应混合物在干燥氮气流下浓缩, 残渣硅胶柱纯化, 用己烷/乙醚/乙酸 (40:60:2) 洗脱, 给出相应的油状烷氧基乙酸 4。

(5, 8, 11, 14-二十碳四烯氧基) 乙酸叔丁酯 (3a)

[t-Bu β -氧杂 23:4(n-6)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.89 (3H, t, J6.7 Hz, $\text{C20}'\text{-H}_2$), 1.25-1.38 (8H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$, $\text{C18}'\text{-H}_2$, $\text{C19}'\text{-H}_2$), 1.49 (9H, s, $\text{C(CH}_3)_3$), 1.56-1.69 (2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.01-2.15 (4H, m, $\text{C4}'\text{-H}_2$, $\text{C16}'\text{-H}_2$), 2.79-2.87 (6H, m, $\text{C7}'\text{-H}_2$, $\text{C10}'\text{-H}_2$, $\text{C13}'\text{-H}_2$), 3.52 (2H, t, J6.6Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 3.94 (2H, s, C2-H_2), 5.32-5.45 (8H, m, $\text{C5}'\text{-H}$, $\text{C6}'\text{-H}$, $\text{C8}'\text{-H}$, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C11}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C14}'\text{-H}$, $\text{C15}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 169.82s, 130.48d, 129.97d, 128.55d, 128.42d, 128.08d, 128.02d, 127.96d, 127.59d, 81.40s, 71.63t, 68.83t, 31.58t, 29.29t, 29.07t, 28.14q, 27.23t, 27.01t, 26.09t, 25.66t, 22.57t, 14.09q.

(6, 9, 12-十八碳三烯氧基) 乙酸叔丁酯 (3b)

[t-Bu β -氧杂 21:3(n-6)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.89(3H, t, J 6.7 Hz, $\text{C18}'\text{-H}_2$), 1.25-1.45(10H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C4}'\text{-H}_2$, $\text{C15}'\text{-H}_2$, $\text{C16}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$), 1.48(9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.56-1.68(2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.01-2.13(4H, m, $\text{C5}'\text{-H}_2$, $\text{C14}'\text{-H}_2$), 2.77-2.84(4H, m, $\text{C8}'\text{-H}_2$, $\text{C11}'\text{-H}_2$), 3.51(2H, t, J 6.6Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 3.94(2H, s, $\text{C2}\text{-H}_2$), 5.27-5.48(6H, m, $\text{C6}'\text{-H}$, $\text{C7}'\text{-H}$, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C10}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C13}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 169.82s, 130.41d, 130.10d, 128.33d, 128.21d, 127.87d, 127.64d, 81.39s, 71.72t, 68.82t, 31.52t, 29.57t, 29.49t, 28.12q, 27.18t, 25.74t, 25.63t, 22.56t, 14.04q.

Z, Z, Z-(9, 12, 15-十八碳三烯氧基) 乙酸叔丁酯 (3c)

[t-Bu β -氧杂 21:3(n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.98(3H, t, J 7.5 Hz, $\text{C18}'\text{-H}_2$), 1.25-1.40(10H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C4}'\text{-H}_2$, $\text{C5}'\text{-H}_2$, $\text{C6}'\text{-H}_2$, $\text{C7}'\text{-H}_2$), 1.48(9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.51-1.67(2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.01-2.15(4H, m, $\text{C8}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$), 2.75-2.86(4H, m, $\text{C11}'\text{-H}_2$, $\text{C14}'\text{-H}_2$), 3.50(2H, t, J 6.6Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 3.95(2H, s, $\text{C2}\text{-H}_2$), 5.31-5.43(6H, m, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C10}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C13}'\text{-H}$, $\text{C15}'\text{-H}$, $\text{C16}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 169.84s, 131.94d, 130.35d, 128.27d, 127.66d, 127.13d, 81.36s, 71.83t, 68.82t, 29.64t, 29.45t, 29.25t, 28.12q, 27.24t, 26.04t, 25.62t, 25.53t, 20.53t, 14.25q.

Z, Z, Z, Z, Z, Z-(4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯氧基) 乙酸叔丁酯 (3d)

[t- Bu β -氧杂 25: 6 (n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.98 (3H, t, J7.5 Hz, $\text{C22}'\text{-H}_3$), 1.48 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.58-1.76 (2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.00-2.21 (4H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C21}'\text{-H}_2$), 2.79-2.87 (10H, m, $\text{C6}'\text{-H}_2$, $\text{C9}'\text{-H}_2$, $\text{C12}'\text{-H}_2$, $\text{C15}'\text{-H}_2$, $\text{C18}'\text{-H}_2$), 3.52 (2H, t, J6.6Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 3.95 (2H, s, $\text{C2}\text{-H}_2$), 5.28-5.46 (12H, m, $\text{C4}'\text{-H}$, $\text{C5}'\text{-H}$, $\text{C7}'\text{-H}$, $\text{C8}'\text{-H}$, $\text{C10}'\text{-H}$, $\text{C11}'\text{-H}$, $\text{C13}'\text{-H}$, $\text{C14}'\text{-H}$, $\text{C16}'\text{-H}$, $\text{C17}'\text{-H}$, $\text{C19}'\text{-H}$, $\text{C20}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 169.76s, 132.03d, 129.41d, 128.57d, 128.39d, 128.36d, 128.24d, 128.21d, 128.16d, 128.12d, 128.02d, 127.88d, 127.02d, 81.40s, 71.08t, 68.83t, 29.53t, 28.12q, 25.63t, 25.59t, 25.54t, 23.72t, 20.55t, 14.25q.

Z, Z, Z, Z-(6, 9, 12, 15-十八碳四烯氧基) 乙酸叔丁酯 (3e)

[t- Bu β -氧杂 21: 4 (n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.98 (3H, t, J7.5 Hz, $\text{C18}'\text{-H}_3$), 1.21-1.52 (4H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$), 1.48 (9H, s, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.53-1.66 (2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.01-2.15 (4H, m, $\text{C5}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$), 2.77-2.87 (6H, m, $\text{C8}'\text{-H}_2$, $\text{C11}'\text{-H}_2$, $\text{C14}'\text{-H}_2$), 3.51 (3H, t, J6.6Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 3.95 (2H, s, $\text{C2}\text{-H}_2$), 5.28-5.47 (8H, m, $\text{C6}'\text{-H}$, $\text{C7}'\text{-H}$, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C10}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C13}'\text{-H}$, $\text{C15}'\text{-H}$, $\text{C16}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 169.82s, 132.00d, 130.15d, 128.49d, 128.42d, 128.01d, 127.96d, 127.78d, 127.05d, 81.39s, 71.72t, 68.81t, 29.57t, 29.49t, 28.12q, 27.18t, 25.74t, 25.63t, 25.54t, 20.55t, 14.25q.

Z, Z, Z, Z-(5, 8, 11, 14-二十碳四烯氧基) 乙酸 (4a)

[β -氧杂 23: 4 (n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.89 (3H, t, J6.7 Hz, $\text{C20}'\text{-H}_3$), 1.25-1.49 (8H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$, $\text{C18}'\text{-H}_2$, $\text{C19}'\text{-H}_2$), 1.57-1.74 (2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.00-2.14 (4H,

m, C4'-H₂, C16'-H₂), 2.78-2.85 (6H, m, C7'-H₂, C10'-H₂, C13'-H₂), 3.58 (2H, br t, J6.0Hz, C1'-H₂), 4.08 (2H, s, C2-H₂), 5.29-5.46 (8H, m, C5'-H, C6'-H, C8'-H, C9'-H, C11'-H, C12'-H, C14'-H, C15'-H);

¹³C n.m.r. (50MHz, CDCl₃) δ 173.37s, 130.47d, 129.64d, 128.55d, 128.24d, 128.13d, 128.02d, 127.86d, 127.152d, 71.81t, 31.49t, 29.49t, 29.21t, 27.20q, 26.88t, 26.03t, 25.63t, 25.63t, 22.54t, 14.02q.

Z, Z, Z-(6, 9, 12-十八碳三烯氧基) 乙酸 (4b)

[β-氧杂 21: 3 (n-6)]

¹H n.m.r. (200MHz, CDCl₃) δ 0.89 (3H, t, J6.8 Hz, C18'-H₃), 1.23-1.43 (10H, m, C3'-H₂, C4'-H₂, C15'-H₂, C16'-H₂, C17'-H₂), 1.51-1.71 (2H, m, C2'-H₂), 2.00-2.10 (4H, m, C5'-H₂, C14'-H₂), 2.75-2.86 (4H, m, C8'-H₂, C11'-H₂), 3.60 (2H, t, J6.6Hz, C1'-H₂), 4.17 (2H, s, C2-H₂), 5.26-5.47 (6H, m, C6'-H, C7'-H, C9'-H, C10'-H, C12'-H, C13'-H);

¹³C n.m.r. (50MHz, CDCl₃) δ 171.74s, 130.45d, 129.84d, 128.40d, 128.20d, 128.10d, 127.59d, 71.13d, 31.51d, 29.36d, 29.31d, 27.20d, 27.10d, 25.62d, 22.57d, 22.55d, 14.04q.

Z, Z, Z-(9, 12, 15-十八碳三烯氧基) 乙酸 (4c)

[β-氧杂 21: 3 (n-3)]

¹H n.m.r. (200MHz, CDCl₃) δ 0.97 (3H, t, J7.5 Hz, C18'-H₃), 1.25-1.43 (10H, m, C3'-H₂, C4'-H₂, C5'-H₂, C6'-H₂, C7'-H₂), 1.51-1.63 (2H, m, C2'-H₂), 2.01-2.15 (4H, m, C8'-H₂, C17'-H₂), 2.75-2.86 (4H, m, C11'-H₂, C14'-H₂), 3.55 (2H, t, J6.5Hz, C1'-H₂), 4.12 (2H, s, C2-H₂), 5.28-5.46 (6H, m, C9'-H, C10'-H, C12'-H, C13'-H, C15'-H, C16'-H);

¹³C n.m.r. (50MHz, CDCl₃) δ 174.73s, 131.93d, 130.29d, 128.25d, 127.68d, 127.11d, 72.16t, 29.60t, 29.41t, 29.20t, 27.21t, 25.88t, 25.60t, 22.52t, 20.53t, 14.24q.

z, z, z, z, z, z-(4, 7, 10, 13, 16, 19-二十二碳六烯氧基) 乙酸 (4d)

[β -氧杂 25: 6 (n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.97 (3H, t, J7.5 Hz, $\text{C}_{22}'\text{-H}_3$), 1.65-1.78 (2H, m, $\text{C}_{2}'\text{-H}_2$), 2.01-2.21 (4H, m, $\text{C}_{3}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{21}'\text{-H}_2$), 2.75-2.92 (10H, m, $\text{C}_{6}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{9}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{12}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{15}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{18}'\text{-H}_2$), 3.57 (2H, t, J6.4Hz, $\text{C}_{1}'\text{-H}_2$), 4.12 (2H, s, $\text{C}_2\text{-H}_2$), 5.28-5.46 (12H, m, $\text{C}_{4}'\text{-H}$, $\text{C}_{5}'\text{-H}$, $\text{C}_{7}'\text{-H}$, $\text{C}_{8}'\text{-H}$, $\text{C}_{10}'\text{-H}$, $\text{C}_{11}'\text{-H}$, $\text{C}_{13}'\text{-H}$, $\text{C}_{14}'\text{-H}$, $\text{C}_{16}'\text{-H}$, $\text{C}_{17}'\text{-H}$, $\text{C}_{19}'\text{-H}$, $\text{C}_{20}'\text{-H}$), 10.22 (1H, br. CO_2H);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 172.99s, 132.04d, 128.98d, 128.75d, 128.59d, 128.49d, 128.38d, 128.28d, 128.22d, 128.17d, 128.08d, 127.86d, 127.01d, 71.48s, 29.26t, 25.64t, 25.59t, 25.54t, 23.55t, 14.25q.

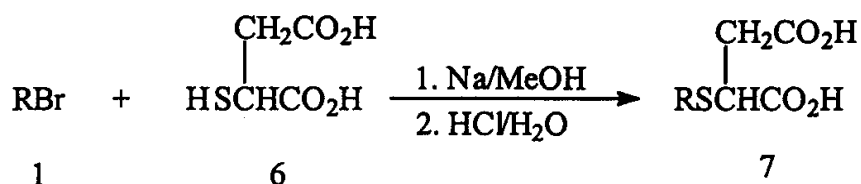
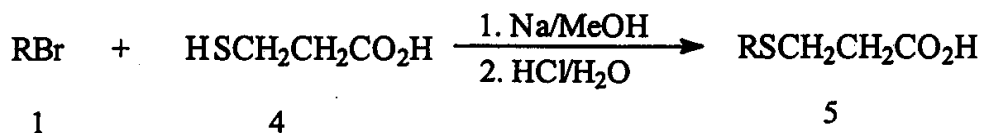
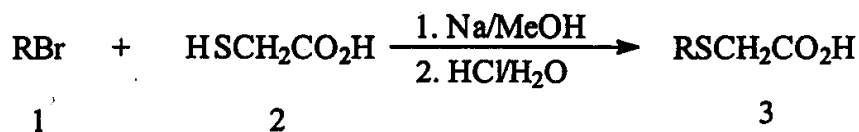
z, z, z, z-(6, 9, 12, 15-十八碳四烯氧基) 乙酸 (4e)

[β -氧杂 21: 4 (n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.97 (3H, t, J7.5 Hz, $\text{C}_{18}'\text{-H}_3$), 1.33-1.40 (4H, m, $\text{C}_{3}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{4}'\text{-H}_2$), 1.54-1.68 (2H, m, $\text{C}_{2}'\text{-H}_2$), 2.00-2.15 (4H, m, $\text{C}_{5}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{17}'\text{-H}_2$), 2.77-2.87 (6H, m, $\text{C}_{8}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{11}'\text{-H}_2$, $\text{C}_{14}'\text{-H}_2$), 3.56 (3H, t, J6.6Hz, $\text{C}_{1}'\text{-H}_2$), 4.11 (2H, s, $\text{C}_2\text{-H}_2$), 5.24-5.45 (8H, m, $\text{C}_{6}'\text{-H}$, $\text{C}_{7}'\text{-H}$, $\text{C}_{9}'\text{-H}$, $\text{C}_{10}'\text{-H}$, $\text{C}_{12}'\text{-H}$, $\text{C}_{13}'\text{-H}$, $\text{C}_{15}'\text{-H}$, $\text{C}_{16}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 172.05s, 132.03d, 139.92d, 128.53d, 128.35d, 128.08d, 128.01d, 127.94d, 127.04d, 71.10t, 29.34t, 27.10t, 25.64t, 25.55t, 20.55t, 14.25q.

β 和 γ 硫杂脂肪酸的合成



a: R = CH₃(CH₂)₄(CH^{cis}=CHCH₂)(CH₂)₃-

b: R = CH₃(CH₂)₄(CH^{cis}=CHCH₂)(CH₂)₄-

c: R = CH₃CH₂(CH^{cis}=CHCH₂)(CH₂)₇-

d: R = CH₃CH₂(CH^{cis}=CHCH₂)(CH₂)₈-

试剂

脂肪溴 (1a-1d) - 通过在二氯甲烷中用三苯基膦和四溴化碳处理相应的脂肪醇合成而得

花生四烯醇 - Nu Chek Prep.

γ-亚麻醇 - Nu Chek Prep.

亚麻醇 - Nu Chek Prep.

二十二碳六烯醇 - Nu Chek Prep.

巯基乙酸 - Aldrich Chemical Company

巯基丙酸 - Aldrich Chemical Company

所有溶剂用前重蒸。

柱层析在正氮气压下在 Merck Silica Gel 60 (230-400 目), Art. 9385 上进行。

步骤

烷硫基乙酸 3a-d

在干燥氮气下，在两口圆底烧瓶中钠（3mol 当量）溶于甲醇，并向此搅拌的溶液中加入巯基乙酸（12. mol 当量）。当最初形成的白色沉淀溶解后，通过注射器加入溶于乙醚的相应溴化物 1（1 mol 当量）的溶液，此混合物在氮气和室温条件下搅拌 16 小时。粗反应混合物倾入等体积的盐酸中（10% v/v）并用乙醚萃取。得到的萃取物在干燥氮气流下浓缩并用硅胶闪式层析纯化，用己烷/乙醚/乙酸（40: 60: 2）洗脱，得到相应的油状烷硫基乙酸 3。

烷硫基丙酸 5a-c

烷硫基丙酸 5a-c 是脂肪溴 1a-c 分别与烷硫基丙酸 4 用同以上描述的制备烷硫基乙酸 3a-d 类似的方式通过碱缩合合成的。

Z, Z, Z, Z-(5, 8, 11, 14-二十碳四烯硫基)琥珀酸 7a

(5, 8, 11, 14-二十碳四烯硫基)琥珀酸 7a 在钠（4. 5mol 当量）存在下用同以上描述的制备烷硫基乙酸 3a-d 类似的方式，通过脂肪溴 1a（1 mol 当量）与巯基琥珀酸 6（1. 2mol 当量）缩合合成的。

Z, Z, Z, Z-(5, 8, 11, 14-二十碳四烯硫基)乙酸（3a）

[β -硫杂 23: 4 (n-6)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0. 89 (3H, t, J6. 7 Hz, $\text{C20}'\text{-H}_3$), 1. 25-1. 54 (8H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$, $\text{C18}'\text{-H}_2$, $\text{C19}'\text{-H}_2$), 1. 57-1. 72 (2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2. 01-2. 14 (4H, m, $\text{C4}'\text{-H}_2$, $\text{C16}'\text{-H}_2$), 2. 67 (2H, t, J7. 2Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 2. 73-2. 88 (6H, m, $\text{C7}'\text{-H}_2$, $\text{C10}'\text{-H}_2$, $\text{C13}'\text{-H}_2$), 3. 25 (2H, s, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 5. 27-5. 47 (8H, m, $\text{C5}'\text{-H}$, $\text{C6}'\text{-H}$, $\text{C8}'\text{-H}$, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C11}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C14}'\text{-H}$, $\text{C15}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 175. 69s, 130. 49d, 129. 54d, 128. 56d, 128. 27d, 128. 15d, 127. 89d, 127. 55d, 33. 45t, 32. 70t, 31. 51t, 30. 38t, 29. 32t, 28. 62t, 28. 46t, 27. 23t, 26. 73t, 25. 65t, 22. 57t, 14. 05q.

Z, Z, Z, Z-(6, 9, 12-十八碳三烯硫基) 乙酸 (3b)

[β -硫杂 21: 3 (n-6)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.89 (3H, t, J6.6 Hz, $\text{C18}'\text{-H}_3$), 1.23-1.48 (10H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C4}'\text{-H}_2$, $\text{C15}'\text{-H}_2$, $\text{C16}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$), 1.52-1.70 (2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 1.89-2.15 (4H, m, $\text{C5}'\text{-H}_2$, $\text{C14}'\text{-H}_2$), 2.63 (2H, t, J7.0Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 2.70-2.87 (4H, m, $\text{C8}'\text{-H}_2$, $\text{C11}'\text{-H}_2$), 3.26 (2H, s, $\text{C2}\text{-H}_2$), 5.29-5.47 (6H, m, $\text{C6}'\text{-H}$, $\text{C7}'\text{-H}$, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C10}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C13}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 176.54s, 130.41d, 129.86d, 128.367d, 128.11d, 128.03d, 128.59d, 33.49t, 32.74t, 31.52t, 30.36t, 29.31t, 29.14t, 28.81t, 28.34t, 27.21t, 27.05t, 25.63t, 22.55t, 14.04q.

Z, Z, Z-(9, 12, 15-十八碳三烯硫基) 乙酸 (3c)

[β -硫杂 21: 3 (n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.89 (3H, t, J6.7 Hz, $\text{C18}'\text{-H}_3$), 1.21-1.52 (10H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C4}'\text{-H}_2$, $\text{C5}'\text{-H}_2$, $\text{C6}'\text{-H}_2$, $\text{C7}'\text{-H}_2$), 1.54-1.72 (2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.01-2.15 (4H, m, $\text{C8}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$), 2.67 (2H, t, J7.2Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 2.73-2.87 (4H, m, $\text{C11}'\text{-H}_2$, $\text{C14}'\text{-H}_2$), 3.25 (2H, s, $\text{C2}\text{-H}_2$), 5.27-5.48 (6H, m, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C10}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C13}'\text{-H}$, $\text{C15}'\text{-H}$, $\text{C16}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 176.21s, 131.94d, 130.29d, 128.26d, 127.69d, 127.11d, 33.49t, 32.82t, 30.39t, 29.60t, 29.36t, 29.20t, 29.12t, 28.89t, 28.70t, 27.21t, 25.61t, 25.52t, 20.53t, 14.25q.

Z, Z, Z, Z, Z, Z, Z-(9, 12, 15-十八碳三烯硫基) 乙酸 (3d)

[β -硫杂 25: 6 (n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.99 (3H, t, J7.5 Hz, $\text{C22}'\text{-H}_3$), 1.62-1.77 (2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.02-2.24 (4H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C21}'\text{-H}_2$), 2.68 (2H, t, J7.4Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$),

2.83-2.85 (10H, m, C6'-H₂, C9'-H₂, C12'-H₂, C15'-H₂, C18'-H₂), 3.26 (2H, s, C2-H₂), 5.29-5.47 (12H, m, C4'-H, C5'-H, C7'-H, C8'-H, C10'-H, C11'-H, C13'-H, C14'-H, C16'-H, C17'-H, C19'-H, C20'-H);

¹³C n. m. r. (50MHz, CDCl₃) δ 176.37s, 132.01d, 128.94d, 128.68d, 128.55d, 128.24d, 128.18d, 128.12d, 128.07d, 127.85d, 126.99d, 33.41t, 32.21t, 28.67t, 26.12t, 25.64t, 25.22t, 20.53t, 14.24q.

Z, Z, Z, Z-(5, 8, 11, 14-二十碳四烯硫基)丙酸 (5a)

[γ-硫杂 24: 4 (n-6)]

¹H n. m. r. (300MHz, CDCl₃) δ 0.89 (3H, t, J6.8 Hz, C20'-H₃), 1.26-1.38 (6H, m, C17'-H₂, C18'-H₂, C19'-H₂), 1.41-1.51 (2H, m, C3'-H₂), 1.56-1.66 (2H, m, C2'-H₂), 2.02-2.12 (4H, m, C4'-H₂, C16'-H₂), 2.54 (2H, t, J7.3Hz, C1'-H₂), 2.66 (2H, t, J6.6Hz, C3'-H₂), 2.78 (2H, t, J6.6Hz, C2-H₂), 2.78-2.86 (6H, m, C7'-H₂, C10'-H₂, C13'-H₂), 5.29-5.44 (8H, m, C5'-H, C6'-H, C8'-H, C9'-H, C11'-H, C12'-H, C14'-H, C15'-H);

¹³C n. m. r. (50MHz, CDCl₃) δ 178.22s, 130.37d, 129.58d, 128.46d, 128.19d, 128.10d, 128.03d, 127.81d, 127.48d, 34.68t, 32.046t, 31.44t, 29.25t, 29.01t, 28.67q, 27.15t, 26.70t, 26.54t, 25.57t, 22.50t, 13.98q.

Z, Z, Z-(6, 9, 12-十八碳三烯硫基)丙酸 (5b)

[γ-硫杂 22: 3 (n-6)]

¹H n. m. r. (200MHz, CDCl₃) δ 0.89 (3H, t, J6.8 Hz, C18'-H₃), 1.25-1.42 (10H, m, C3'-H₂, C4'-H₂, C15'-H₂, C16'-H₂, C17'-H₂), 1.53-1.65 (2H, m, C2'-H₂), 2.01-2.10 (4H, m, C5'-H₂, C14'-H₂), 2.53 (2H, t, J7.3Hz, C1'-H₂), 2.66 (2H, t, J6.8Hz, C3'-H₂), 2.78 (2H, t, J6.8Hz, C2-H₂), 2.74-2.83 (4H, m, C8'-H₂, C11'-H₂), 5.26-5.47 (6H, m, C6'-H, C7'-H, C9'-H, C10'-H, C12'-H, C13'-H);

¹³C n. m. r. (50MHz, CDCl₃) δ 178.14s, 130.38d, 129.90d, 128.33d, 128.10d, 127.97d, 127.58d, 34.69t, 32.13t, 31.49t, 29.41t, 29.29t, 29.18t, 28.46t,

27.19t, 27.06t, 26.58t, 25.61t, 14.03q.

Z, Z, Z-(9,12,15-十八碳三烯硫基)丙酸 (5c)

[γ -硫杂 22:3(n-3)]

^1H n. m. r. (200MHz, CDCl_3) δ 0.98(3H, t, J7.5 Hz, $\text{C18}'\text{-H}_2$), 1.26-1.35(10H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C4}'\text{-H}_2$, $\text{C5}'\text{-H}_2$, $\text{C6}'\text{-H}_2$, $\text{C7}'\text{-H}_2$), 1.51-1.65(2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 1.98-2.15(4H, m, $\text{C8}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$), 2.53(2H, t, J7.3Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 2.66(2H, t, J6.7Hz, $\text{C3}'\text{-H}_2$), 2.78(2H, t, J7.3Hz, $\text{C1}'\text{-H}_2$), 2.66(2H, t, J6.7Hz, $\text{C3}'\text{-H}_2$), 2.78(2H, t, J6.7Hz, C2-H_2), 2.75-2.84(4H, m, $\text{C11}'\text{-H}_2$, $\text{C14}'\text{-H}_2$), 5.27-5.46(6H, m, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C10}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C13}'\text{-H}$, $\text{C15}'\text{-H}$, $\text{C16}'\text{-H}$);

^{13}C n. m. r. (50MHz, CDCl_3) δ 178.03s, 131.92d, 130.28d, 128.24d, 127.66d, 127.10d, 34.67t, 32.19t, 29.58t, 29.50t, 29.37t, 29.20t, 29.16t, 28.81t, 27.19t, 26.59t, 25.59t, 25.50t, 20.52t, 14.245q.

Z, Z, Z, Z-(5, 8, 11, 14-十八碳四烯硫基)琥珀酸 (7a)

[α -羧甲基- β -硫杂 23:4(n-6)]

^1H n. m. r. (300MHz, CDCl_3) δ 0.89(3H, t, J6.8 Hz, $\text{C20}'\text{-H}_2$), 1.23-1.53(8H, m, $\text{C3}'\text{-H}_2$, $\text{C17}'\text{-H}_2$, $\text{C18}'\text{-H}_2$, $\text{C19}'\text{-H}_2$), 1.56-1.70(2H, m, $\text{C2}'\text{-H}_2$), 2.03-2.13(4H, m, $\text{C4}'\text{-H}_2$, $\text{C16}'\text{-H}_2$), 2.65-2.86(9H, m, $\text{C7}'\text{-H}_2$, $\text{C10}'\text{-H}_2$, $\text{C13}'\text{-H}_2$, $\text{C1}'\text{-H}_2$, CHHCO_2H), 3.01(1H, dd, J12.1, 17.6Hz, CHHCO_2H), 3.64(1H, dd, J4.0, 12.1Hz, C2-H), 5.32-5.43(8H, m, $\text{C5}'\text{-H}$, $\text{C6}'\text{-H}$, $\text{C8}'\text{-H}$, $\text{C9}'\text{-H}$, $\text{C11}'\text{-H}$, $\text{C12}'\text{-H}$, $\text{C14}'\text{-H}$, C15-H);

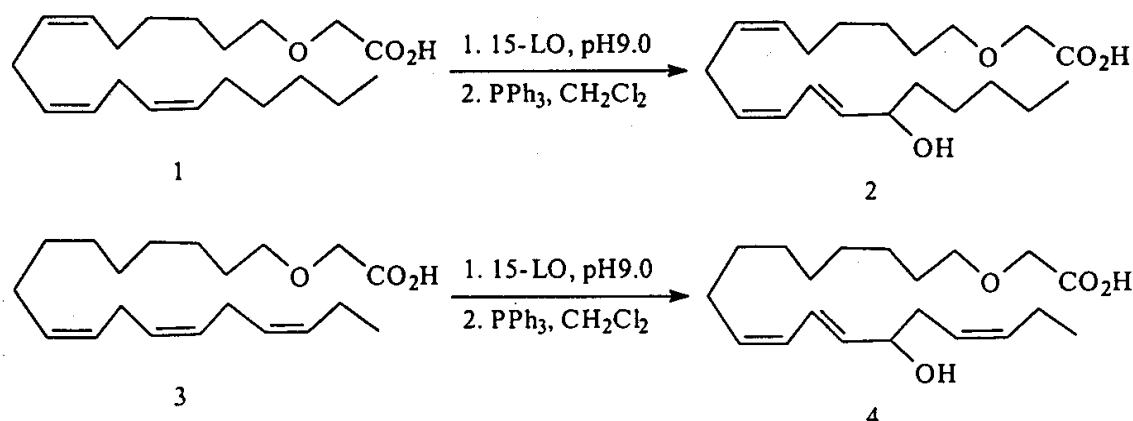
羟基和氢过氧基衍生物的合成

花生四烯酸(图1b-1g)的氢过氧化衍生物分别从图1a的酶催化反应获得,或做为图1a自身氧化的混合物。图1b-1g自身氧化混合物的成分按比例依赖于反应条件而变化,它们可以由硅胶高效液相色谱分离。图1b-1g的氢过氧化物的还原,或单独地或做为混合物生成图1h-1m相应的醇。通过用各种试剂包括相应的烷基或芳

基次卤酯 (ROX) 的处理, 这些化合物可被转变成图 1n (R-烷基或芳基) 相应的过氧化物, 它们具有如图 1b-1g 氢过氧化物和图 1h-1m 醇的同样取代类型。图 1h-1m 醇或图 1n 过氧化物的混合物也能够用高效液相色谱分离。

在相似的方式中, 其它天然产生的不饱和脂肪酸 (如 22:6(n-3)), 和修饰的脂肪酸如图 1o-1x (Y=H) 以及由有关的除花生四烯酸外的酸精制加工制备的化合物也能够用于制备类似于图 1b-1n 的图 1o-1x (Y=OOH, OH, OOR) 的氢过氧化、羟基和过氧化衍生物, 其中图 1b-1n 的取代类型由烯丙基氧化测定。图 1o 到图 1p (Y=H) 的酸可以通过图 1a 相应醛的醇醛缩合制备, 图 1p 也可以通过相同醛或相应卤化物的 Wittig 反应制备, 而图 1q 的酸可以通过相应 C19 醛或卤化物的 Wittig 反应制备。图 1r 的酸可以通过图 1a 相应酯的醇醛缩合制备, 而图 1s-1x 通过醚或硫醚经亲核取代或金属催化的偶联反应合成获得, 图 1v-1x 的硫醚可以被氧化成相应亚砷或砷。图 1y 和图 1z 的氨基酸衍生物可以通过相应脂肪酸 (图 1a) 分别与甘氨酸及天冬氨酸缩合获得。

羟基β-氧杂脂肪酸的合成



试剂

β-氧杂脂肪酸 (1, 3) - 从相应脂肪醇通过乙酸铯催化与重氮乙酸酯缩合合成。

三苯基膦 - Aldrich Chemical Company

磷酸二氢钾 - Ajax Chemicals

大豆 15-脂肪氧合酶 - Aldrich Chemical Company

所有溶剂用前重蒸。

制备薄层层析在含石膏的 Merck Silica Gel 60 PF₂₅₄: Art. 7749 上进行。

步骤

羟基 β -氧杂脂肪酸 2 和 4

相应脂肪酸 1 和 3 (约 50mg) 在 30°C 溶于磷酸缓冲液 (0.1M, pH=9.0, 约 45ml)。加入溶于磷酸缓冲液 (约 5ml) 的大豆 15-脂肪氧合酶 (约 8mg) 并鼓泡氧气到搅拌溶液 10 分钟。加入溶于二氯甲烷 (约 50ml) 的三苯基膦 (约 50mg) 随后加入乙酸 (0.2M, 约 20ml), 溶液在 0°C 搅拌 20 分钟。粗反应混合物用二氯甲烷萃取, 生成的萃取物在干燥氮气流下浓缩。残留物用硅胶制备薄层层析纯化, 用乙酸乙酯/己烷/乙酸 (80:20:0.1) 洗脱, 得到油状相应羟基 β -氧杂脂肪酸 2 或 4。

Z, Z, E-(13-羟基-6, 9, 11-十八碳三烯氧基) 乙酸 (2)

[16'-OH- β -氧杂 21:3(n-6)]

¹H n. m. r. (300MHz, CDCl₃) δ 0.89 (3H, t, J6.8 Hz, C18'-H₃), 1.25-1.45 (10H, m, C3'-H₂, C4'-H₂, C15'-H₂, C16'-H₂, C17'-H₂), 1.59-1.73 (2H, m, C2'-H₂), 2.01-2.12 (4H, m, C5'-H₂, C14'-H₂), 2.81 (2H, t, J5.8Hz, C8'-H₂), 3.52-3.60 (2H, m, C1'-H₂), 4.10 (2H, s, C2-H₂), 4.20 (1H, dt, J6.0, 6.7Hz, C13'-H), 5.29-5.45 (3H, m, C6'-H, C7'-H, C9'-H), 5.70 (1H, dd, J6.7, 15.2Hz, C12'-H), 5.99 (1H, dd, J10.9Hz, C10'-H), 6.55 (1H, dd, J10.9, 15.2Hz, C11'-H)。

Z, E, Z-(13-羟基-9, 11, 15-十八碳三烯氧基) 乙酸 (4)

[16'-OH- β -氧杂 21:3(n-6)]

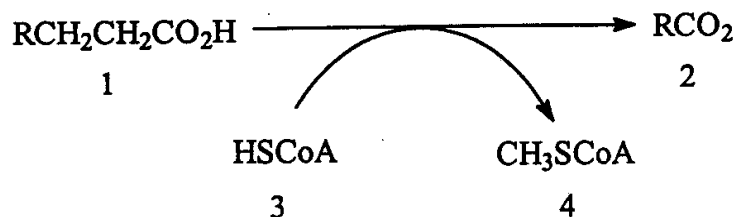
¹H n. m. r. (300MHz, CDCl₃) δ 0.95 (3H, t, J7.6 Hz, C18'-H₃), 1.17-1.40 (10H, m, C3'-H₂, C4'-H₂, C5'-H₂, C6'-H₂, C7'-H₂), 1.48-1.63 (2H, m, C2'-H₂), 1.99-2.12 (2H, m, C8'-H₂), 2.13-2.22 (2H, m, C14'-H₂), 2.28-2.37 (2H, m, C17'-H₂), 3.44-3.50 (2H, m, C1'-H₂), 3.80-3.92 (2H, s, C2'-H₂), 4.14-4.20 (1H, dt, J6.4, 14.9Hz, C13'-H), 5.30-5.60 (3H, m, C9'-H, C15'-H, C16'-H), 5.67 (1H, dd, J6.4, 14.9Hz, C12'-H), 5.95 (1H, dd, J11.1, J11.1Hz, C10'-H), 6.49 (1H, dd, J11.1,

14. 9Hz, C11'-H)。

新的脂肪酸对脂酰-辅酶 A-氧化酶作用的影响

脂肪酸的 β -氧化

β -氧化是脂肪酸 (1) 主要的氧化代谢归宿, 其净过程特征为脂肪酸碳链两个碳原子的降解, 并伴随等摩尔量的乙酰-辅酶 A 产生 (图式 1)。



图式 1

脂酰-辅酶 A-氧化酶

β -氧化途径的第一步由脂酰-辅酶 A-氧化酶控制。在过氧化物酶体中, 脂酰-辅酶 A-氧化酶催化脂酰-辅酶 A 硫酯与氧反应产生烯酰辅酶 A 硫酯。在过氧化物酶存在下, 伴随产生的过氧化氢被循环回氧, 并相对于每摩尔氧化的脂酰-辅酶 A-硫酯净生成一摩尔水。

新的脂肪酸

期望 β -位含有一个封闭基团的脂肪酸对 β -氧化的通常过程为惰性的。因此合成了在 β -位含有杂原子的新脂肪酸。用于本研究的化合物为花生四烯氧乙酸 [β -氧杂 23: 4 (n-6)], γ -亚麻氧乙酸 [β -氧杂 21: 3 (n-6)], 亚麻氧乙酸 [β -氧杂 21: 3 (n-3)], 和花生四烯硫乙酸 [β -硫杂 23: 4 (n-6)]。还研究了花生四烯硫丙酸 [γ -硫杂 22: 4 (n-6)] 的氧化以评价脂肪酸 γ -位的封闭基团对 β -氧化的影响。

脂酰-辅酶 A 氧化酶实验

节细菌 (Arthrobacter) 的脂酰-辅酶 A 氧化酶从 Boehringer Mannheim 以稳定片剂形式得到, 并普遍与脂酰-辅酶 A 合成酶一起使用来测量血清或血浆中的游离

酸。

实验原理

在脂酰-辅酶 A 合成酶 (acyl CS) 的存在下, 游离脂肪酸被 5' -三磷酸腺苷 (ATP) 和辅酶 A (CoA) 转化为脂酰-辅酶 A (脂酰-CoA), 导致产生 5' -单磷酸腺苷 (AMP) 和焦磷酸盐。

脂酰-CoA 在脂酰-CoA-氧化酶 (ACOD) 的存在下与氧 (O_2) 反应, 形成 2, 3-烯酰-辅酶 A (烯酰-CoA), 同时产生过氧化氢。

生成的过氧化氢 (H_2O_2) 在过氧化酶 (POD) 存在下把 4-氨基安替比林 (4-AA) 和 2, 4, 6-三溴-3-羟基苯甲酸 (TBHB) 转变为红色染料。在 546nm 可见光区测定该染料。

实验步骤

波长: 546nm

微量样品池: 1 cm 光程

温度: 25°C ($\pm 1^\circ\text{C}$)

实验体积: 1.15 ml

反应混合物的测量隔绝空气

加入到样品池:

1.00 ml	反应混合液	KH_2PO_4 (87 mmol/l), Mg^{2+} (1.3 mmol/l), ATP (1.5 mmol/l), CoA (0.26 mmol/l), POD (21.7 kU/l), 脂酰 CS (165 U/l)
---------	-------	--

0.05 ml 游离脂肪酸样品溶液

[空白测试用 0.05 ml 蒸馏水代替]

样品混合并在 25°C 加热约 10 分钟。随后加入:

0.05 ml N-乙基 顺丁烯二酰亚胺溶液 (0.86 mmol/l)

在加入:

0.05 ml ACOD 溶液 (8.7 kU/l)

后, 于 546 nm 测定溶液的吸光值 (A_{546})。

在 $t=$ 反应混合液中加入 ACOD 后 10 秒钟时, 测定 20 分钟内溶液在 546 nm 可见吸光值的变化。

实验定标/鉴定

样品浓度依赖性

用以下浓度测定花生四烯酸 (20:4 (n-6), 10):

4.3 mM, 2.1 mM, 0.99 mM, 0.49 mM, 0.25 mM 和 0 mM (空白)。

图 1 中各图的测试显示速度对脂肪酸浓度的依赖性。

酶 (ACOD) 浓度依赖性

用如下脂酰-CoA 氧化酶浓度测定在 0.99 mM 浓度的花生四烯酸 (20:4 (n-6), 10) 样品溶液。

200 kU/l, 100 kU/l 和 50 kU/l。

图 2 中各图的测试显示速度对酶 (ACOD) 浓度的依赖性。

新脂肪酸的测试

用浓度 100 kU/l 的脂酰-CoA 氧化酶测试浓度分别为 1.0 mM, 1.0 mM, 1.0 mM, 1.0 mM 和 1.1 mM 的新化合物溶液。

图 3 - 6 各图的分别测试表明 β -氧杂化合物和 β -硫杂化合物都不是脂酰-CoA 氧化酶的底物 (图 11A)。

新化合物对通过脂酰-CoA 氧化酶的花生四烯酸代谢的影响

含有等摩尔浓度花生四烯酸 (10) 及各新化合物的样品溶液用 100 kU/l 浓度的脂酰-CoA 氧化酶进行测定。

实验显示新化合物对脂酰-CoA 氧化酶摄取花生四烯酸没有影响。

而且，含有新化合物与花生四烯酸相对浓度为 4：1 和 16：1 的样品被测定后表明对脂酰 - CoA 氧化酶摄取花生四烯酸没有可观的影响（未示）。

脂肪酸对氨基酸的共价偶联

多不饱和脂肪酸 (1.80 mmol), HOSu (0.41g, 3.60mmol) 和氨基酸叔丁基酯 (3.60mmol) 一起溶于二甲基甲酰胺 (3mL)，并且该混合物在冰浴中冷却。加入溶于 DMF (0.3mL) 的二环己基碳二亚胺 (0.44g, 2.16mmol) 和 N-甲基吗啡啉 (0.73g, 7.20mmol)。该混合物搅拌 20 小时，此后仍存留一些未反应的多不饱和脂肪酸。再加入 DCC (0.10g)，混合物再搅拌 20 小时。滤去 DCU，通过反相 HPLC 分离产物。纯化的产物浓缩成油状并加入三氟乙酸 (30 ml)。搅拌 1 小时后蒸除三氟乙酸，剩下的产物为棕色油状，再将其溶于 CH₃CN (6 ml)，并用反相 HPLC 纯化。得到的纯组分合并，浓缩并冷冻干燥（在叔丁醇中），剩下棕色油状的产物。

表 1

新脂肪酸的直接抗疟活性

化合物	EC50 (μM)
β -氧杂 21: 3 (n-6)	<30
β -氧杂 21: 3 (n-3)	30
β -氧杂 21: 4 (n-3)	40
β -硫杂 21: 3 (n-6)	30-50
β -硫杂 21: 3 (n-3)	30-35
β -氧杂 25: 6 (n-3)	<60
γ -硫杂 22: 9 (n-6)	45
γ -硫杂 22: 3 (n-6)	45
β -氧杂 23: 4 (n-6)	<30
β -硫杂 23: 4 (n-6)	15-30
γ -硫杂 24: 4 (n-6)	15
β -硫杂 25: 6 (n-3)	25
α -羧甲基- β -硫杂 23: 4 (n-6)	50
16-OH- β -氧杂 21: 3 (n-6)	50
16-OH- β -氧杂 21: 3 (n-3)	40

表 2

脂肪酸激活中性白细胞介导的抗疟活性

化合物	相对于 22: 6 在 16 μ M 的百分抑制率
β -氧杂 21: 3 (n-3)	45
β -氧杂 21: 4 (n-3)	85
β -硫杂 21: 3 (n-6)	85
β -硫杂 21: 3 (n-3)	73
β -硫杂 23: 4 (n-6)	150
γ -硫杂 24: 4 (n-6)	91
β -硫杂 25: 6 (n-3)	47
16-OH- β -氧杂 21: 3 (n-6)	33

表 3

MP8, MP11, MP14 对 KI 氯喹耐药株 *P. FALCIPARUM* 的作用

化合物	百分生长抑制率
氯喹	12.4
β -硫杂 23: 4 (n-6)	97
γ -硫杂 24: 4 (n-6)	97
β -硫杂 25: 6 (n-3)	98

表 4

脂肪酸对促细胞分离剂诱导的末梢血单核细胞繁殖的作用

化合物	20 μ M PUFA 诱导的繁殖百分抑制率
β -氧杂 21: 3 (n-6)	17
β -硫杂 21: 3 (n-3)	28
β -硫杂 25: 6 (n-3)	97
16-OH- β -氧杂 21: 3 (n-6)	50

表 6

PUFA 对金黄色葡萄球菌诱导的由末梢血单核细胞生产的干扰素 γ 的作用

化合物	百分抑制率 (20 μ M PUFA)
β -氧杂 21: 3 (n-6)	89
β -硫杂 21: 3 (n-6)	45
β -氧杂 25: 6 (n-3)	44
β -氧杂 23: 4 (n-6)	89
β -硫杂 23: 4 (n-6)	64
β -硫杂 25: 6 (n-3)	96
16-OH- β -氧杂 21: 3 (n-6)	77
16-OH- β -氧杂 21: 3 (n-3)	65

说明书附图



图1a

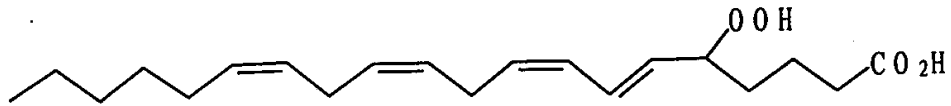


图1b

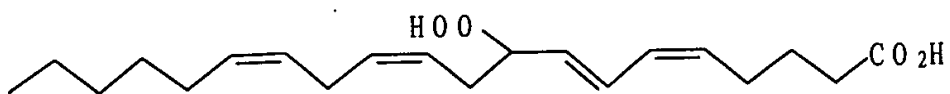


图1c

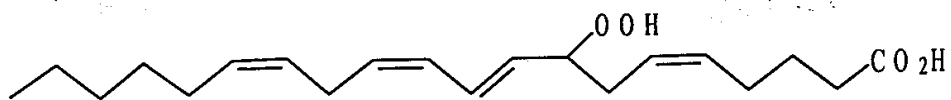


图1d

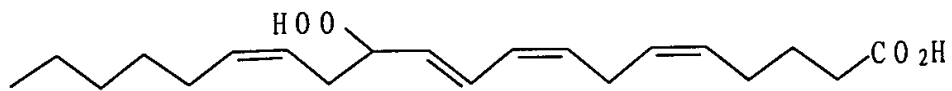


图1e

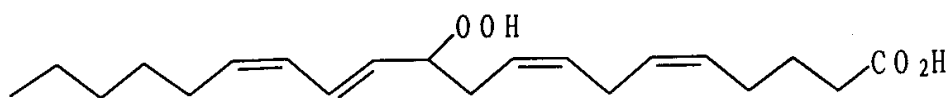


图1f

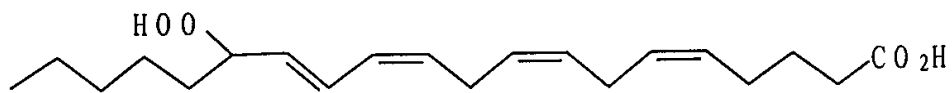


图1g

图 1

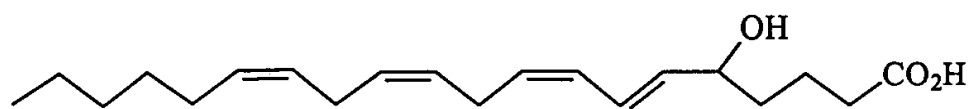


图1h

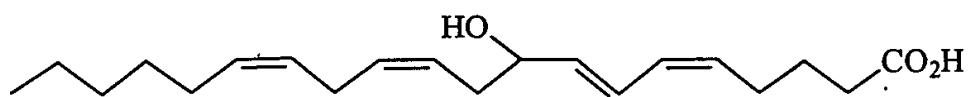


图1i

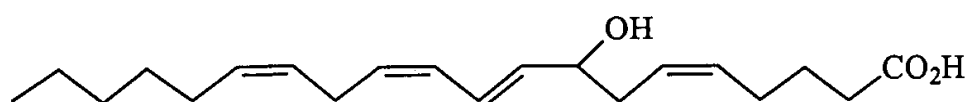


图1j

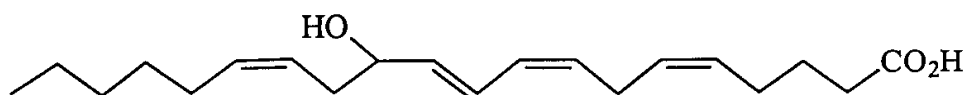


图1k

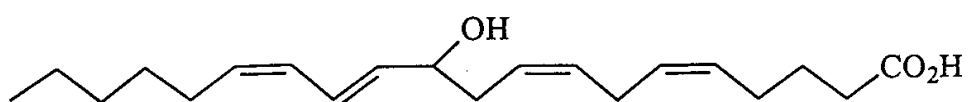


图1l

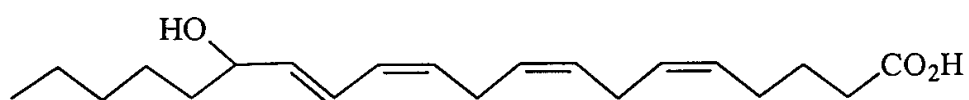


图1m

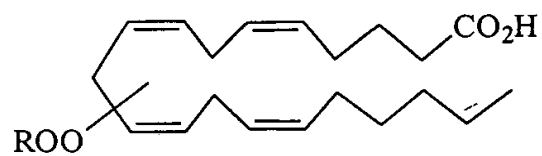


图1n

图 1 (继续)

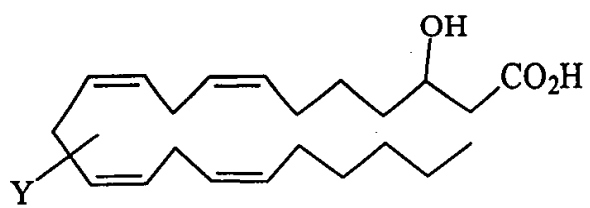


图1o

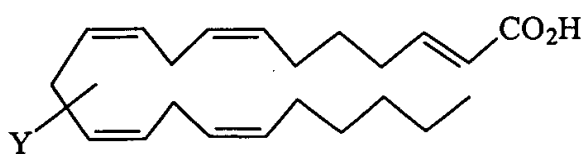


图1p

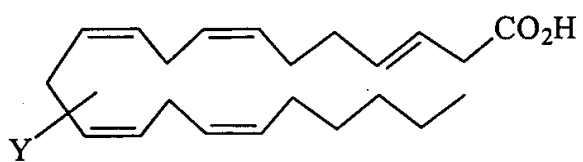


图1q

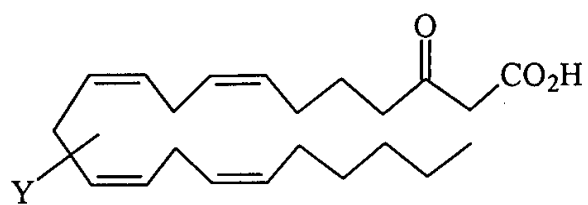


图1r

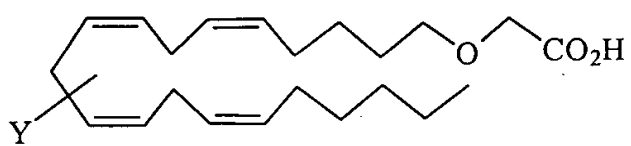


图1s

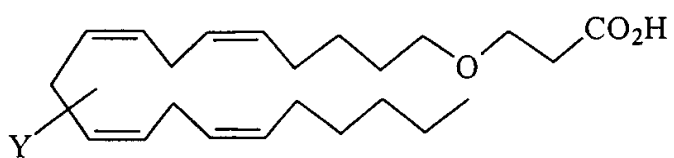


图1t

图 1 (继续)

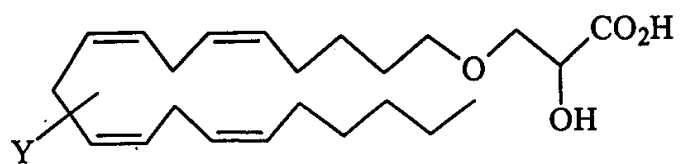


图1u

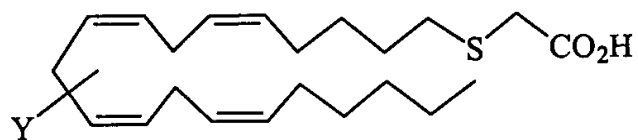


图1v

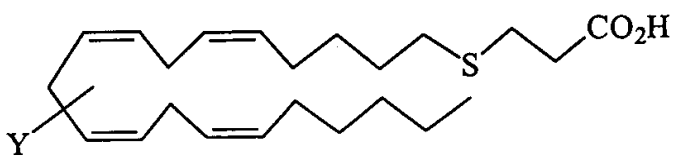


图 1w

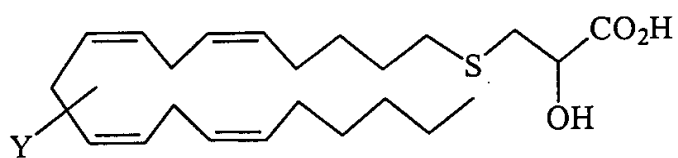


图 1x

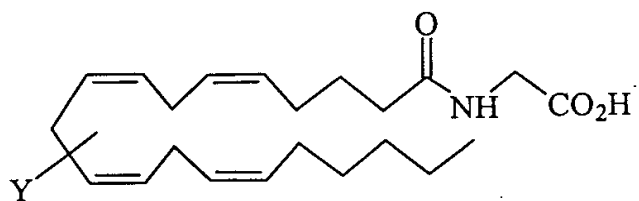


图1y

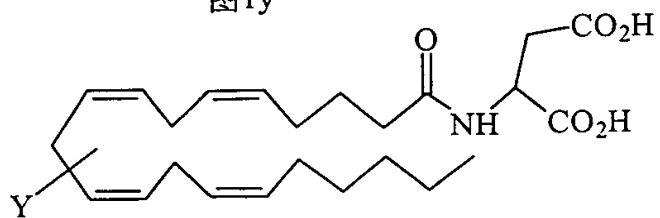


图1z

图 1 (继续)

图 2

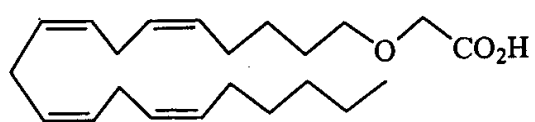


图2a

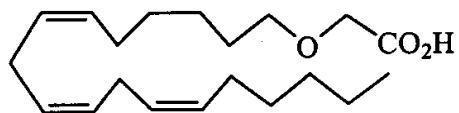


图2b



图2c

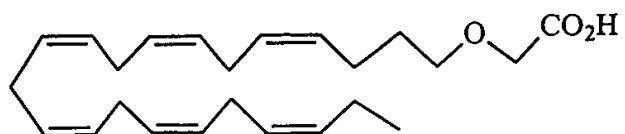


图2d

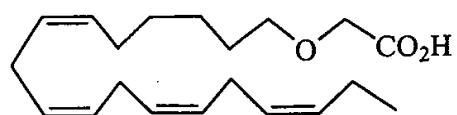


图2e

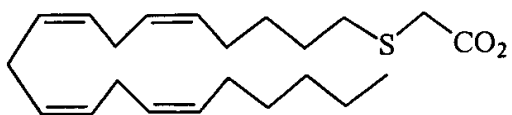


图2f

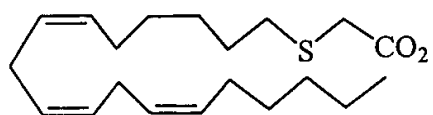


图2g

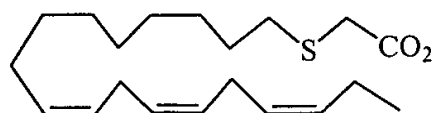


图2h

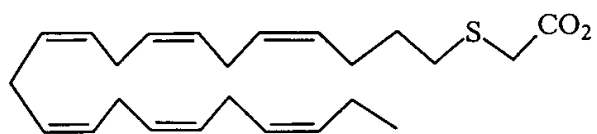


图2i

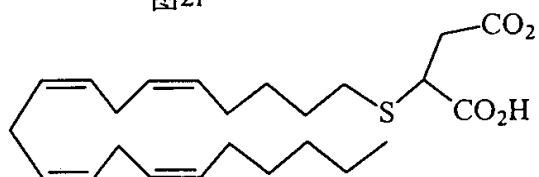


图2j

图 2 (继续)

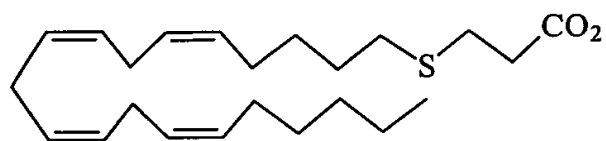


图2k

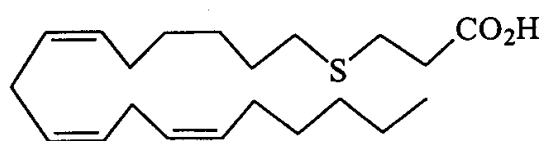


图2l

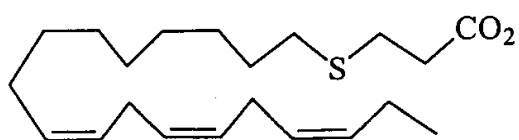


图2m

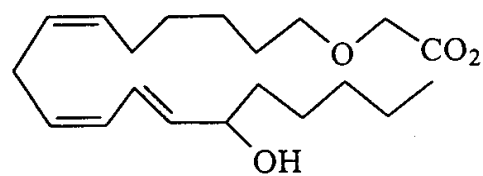


图2n

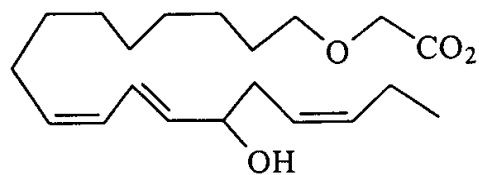
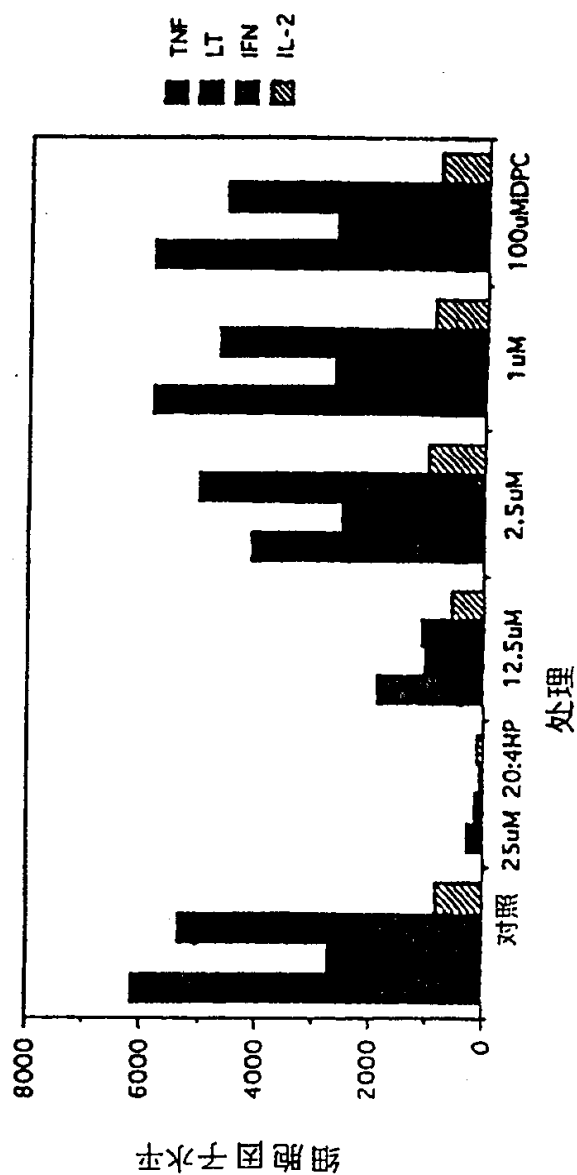


图2o

20: 4HP通过PHA刺激的PBMC对细胞因子产生的剂量相关性影响



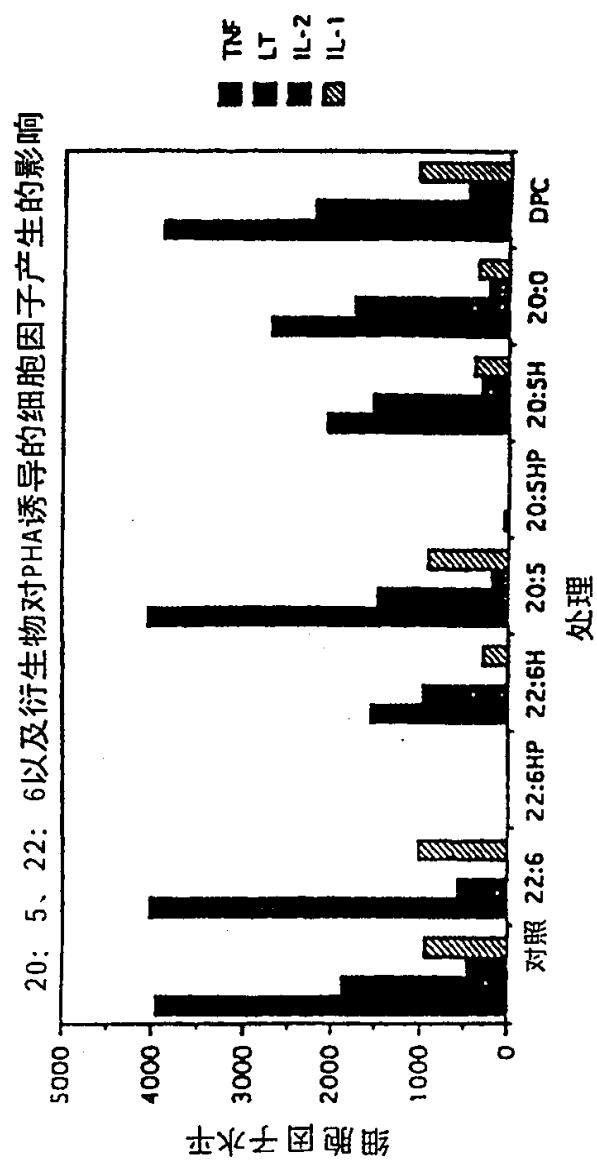


图4

脂肪酸对E-选择素在HUVEC上表达的影响

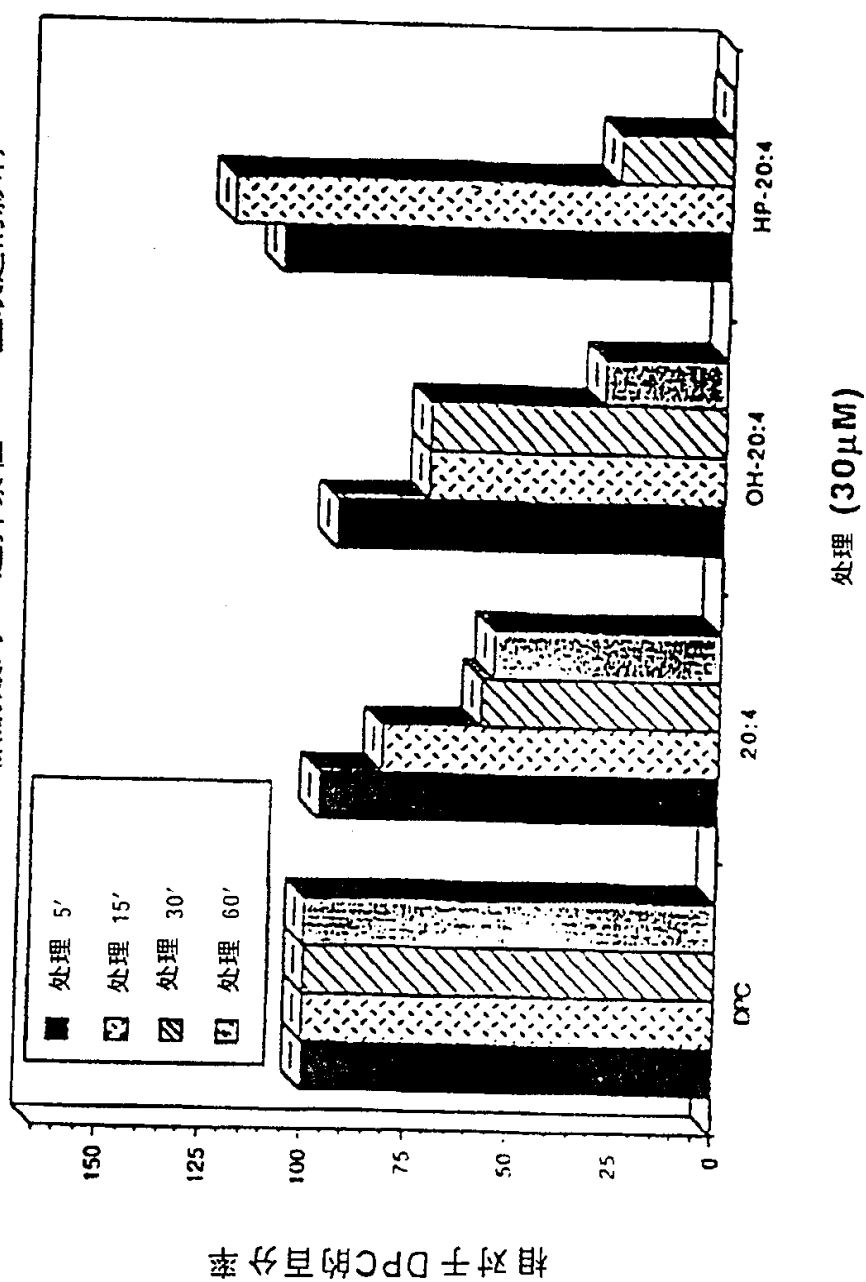


图5

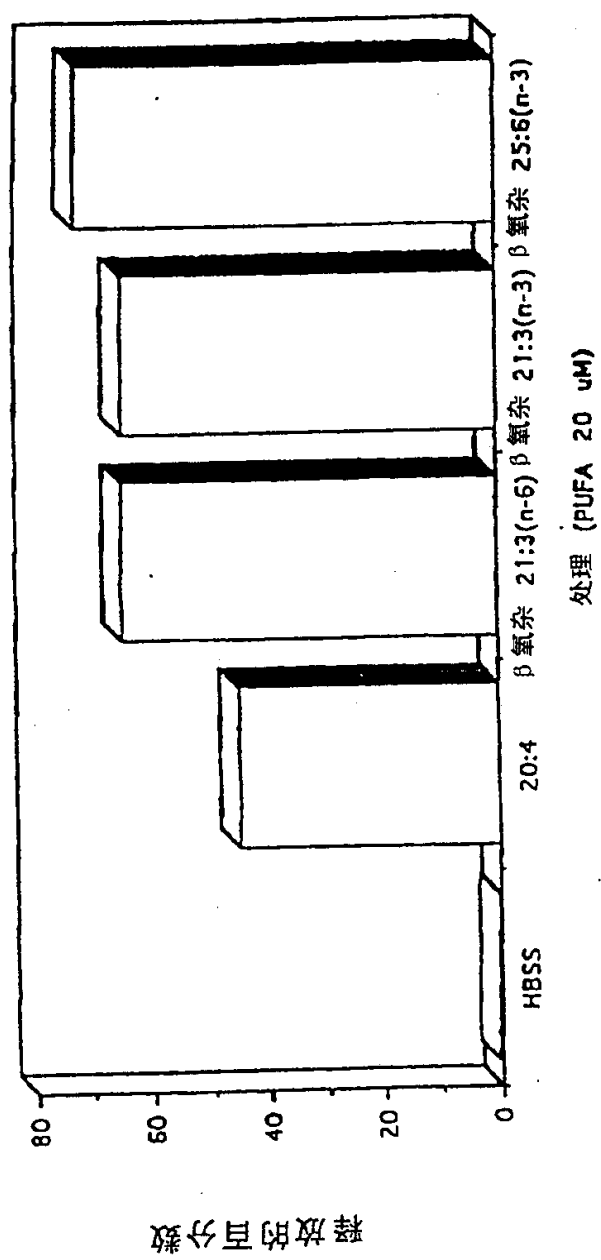


图 6

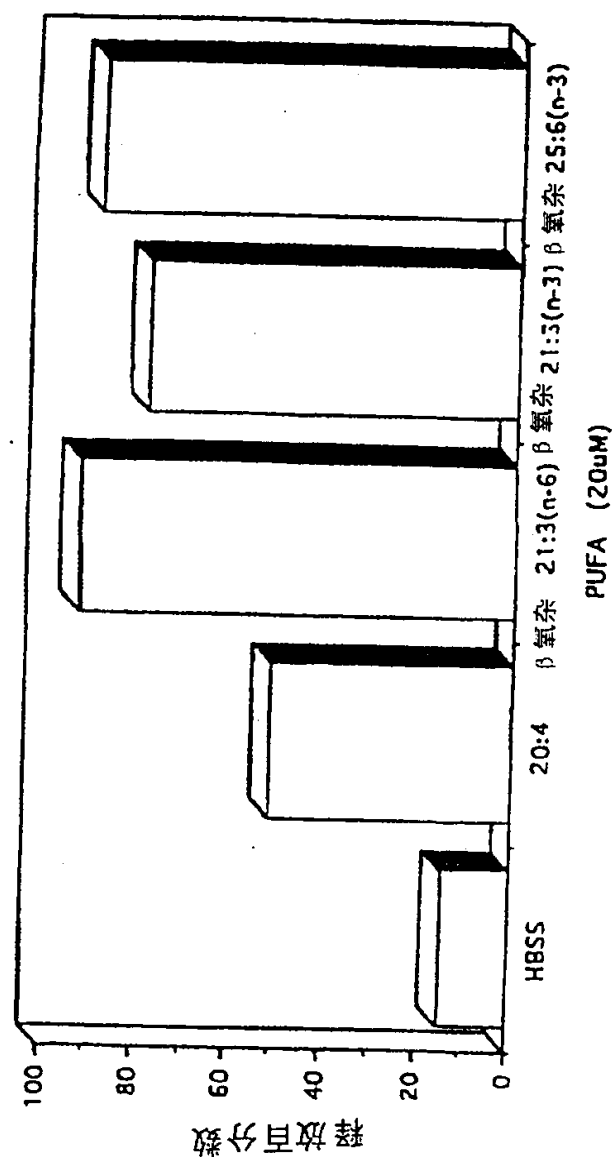


图7

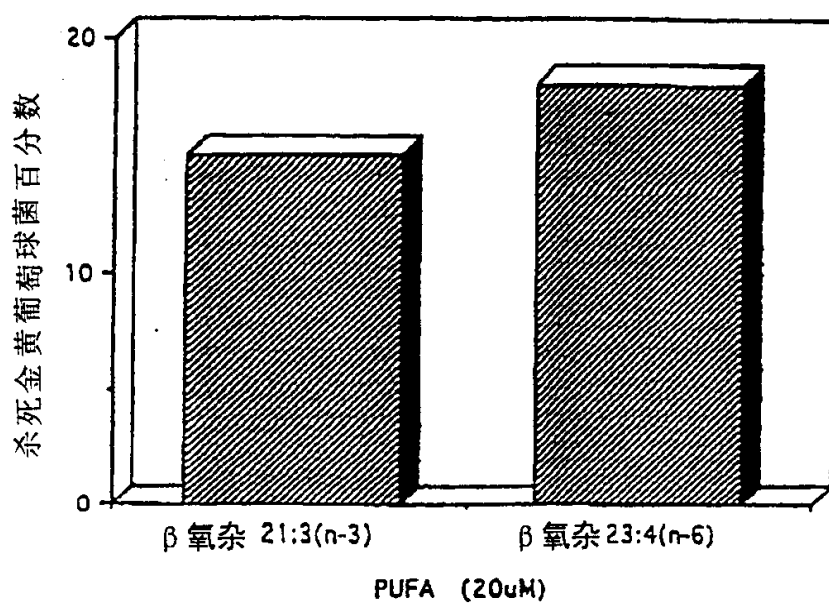


图 8

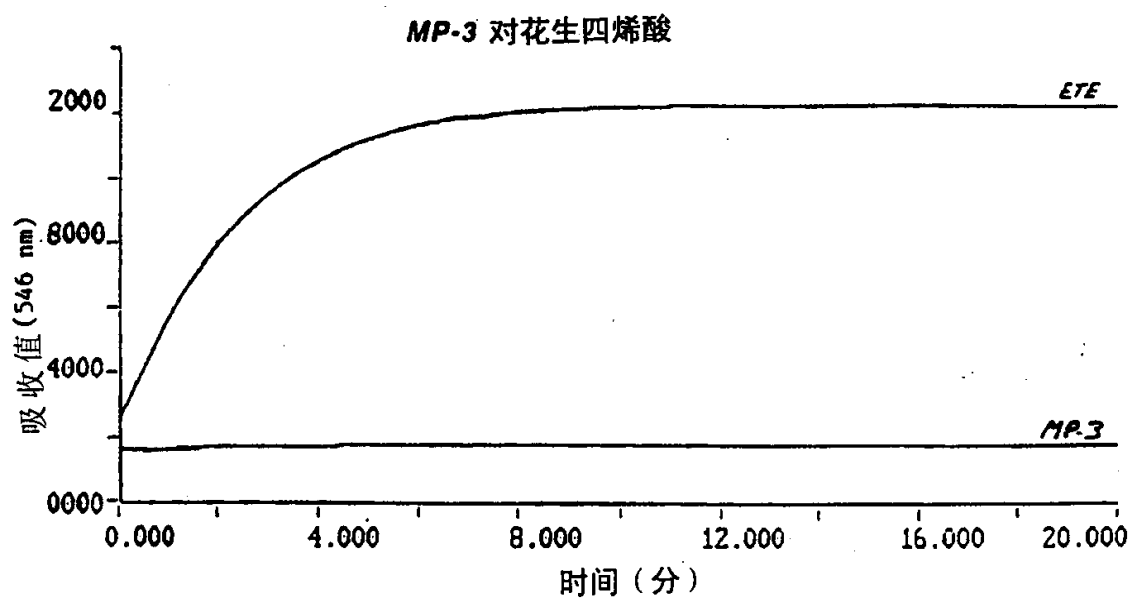


图9a

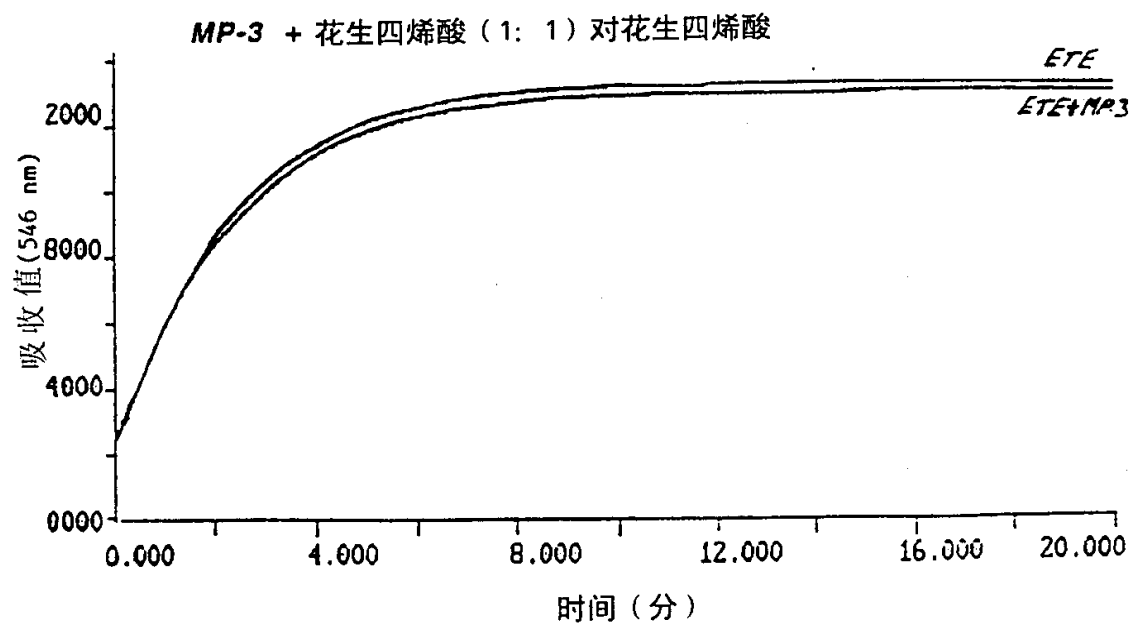


图9b