



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110478342 A

(43)申请公布日 2019.11.22

(21)申请号 201910864506.X

A61P 29/00(2006.01)

(22)申请日 2013.05.09

(30)优先权数据

61/645,281 2012.05.10 US

(62)分案原申请数据

201380036376.1 2013.05.09

(71)申请人 索卢泰克斯NA有限责任公司

地址 美国佛罗里达

(72)发明人 G·L·班南伯格 C·N·塞罕

F·莫雷诺埃热亚

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 邵华一

(51)Int.Cl.

A61K 31/202(2006.01)

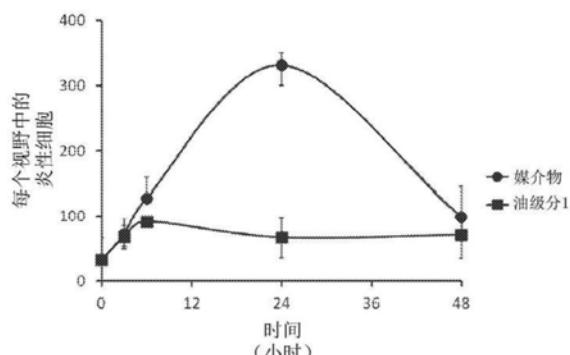
权利要求书1页 说明书23页 附图8页

(54)发明名称

含有天然专门促消退介质及其前体的具有抗炎活性的油

(57)摘要

本发明包括含有或富集专门促消退介质(SPM)或SPM前体的、具有抗炎或刺激消退活性的油，所述专门促消退介质(SPM)或SPM前体源自从含有长链 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的生物体(诸如鱼、甲壳类动物、藻类和软体动物)得到的油。本发明还包括用于生产这些油的方法，和所述油用于营养补剂、药物制剂和化妆品制剂的用途，所述营养补剂、药物制剂和化妆品制剂可以用于治疗炎性病症。



1. 含有专门促消退介质(SPM)或SPM前体的天然来源的油的级分,其中所述SPM或SPM前体包含14-HDHA、18-HEPE、10-HDHA、4-HDHA和17-HDHA乙酯中的至少一种,且其中所述17-HDHA乙酯存在的量是约100mg/L至约110mg/L,且其中所述级分具有抗炎和刺激消退活性。

## 含有天然专门促消退介质及其前体的具有抗炎活性的油

[0001] 本申请是申请日为2013年5月9日、申请号为201380036376.1、发明名称为“含有天然专门促消退介质及其前体的具有抗炎活性的油”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本申请要求2012年5月10日提交的美国临时专利申请号61/645,281的优先权，其内容明确地通过引用并入。其中引用的所有参考文献明确地通过引用并入。

### 技术领域

[0003] 本发明一般地涉及天然产物、炎症、病理学和医学的领域。更具体地，本发明涉及从天然来源得到的专门促消退介质(SPM)和SPM前体，和它们在用于改善炎症和具有炎症性组分的疾病的营养补剂以及药物和化妆品制剂中的用途。

### 背景技术

[0004] 炎症是动物做出的一种复杂生物应答，其尝试除去或中和病原体、刺激剂或细胞损伤，并开始受损组织的愈合。炎症的经典身体征状包括痛(疼痛)、灼热(热)、红(发红)、肿(肿胀)和功能丧失(功能缺失)。炎症应答的起始与多形核白细胞(嗜中性粒细胞)、单核细胞和组织巨噬细胞的活化有关。这些细胞的活化会启动由各种小分子和肽介导的促炎症性信号传递事件的级联，所述小分子和肽包括前列腺素、白三烯、趋化因子和细胞因子以及活化的补体因子。这些信号传递事件刺激细胞的趋化性、内皮渗透性、血管舒张、感觉神经的刺激和凝固的活化，这又会导致炎症的身体征状。重要的是，现在理解，炎症的终止(即消退)也是炎症应答的一个主动调节部分，其涉及细胞和分子事件的协调集合，以便恢复组织结构和功能。

[0005] 尽管炎症是有益的且实际上是良好的健康所必需的，但是它也可以出差错和造成疾病。例如，缺血后的再灌注损伤(例如，在心肌梗塞或缺血性中风中)会刺激急性炎症应答，该应答可以损伤组织。并且，当除去原始刺激以后正常炎症应答不能终止(消退)时，慢性炎症可以接着发生。慢性炎症会损伤健康组织，并且可以造成或加重许多不同疾病，包括、例如，动脉粥样硬化和血管系统的其它疾病、哮喘、痤疮、银屑病、类风湿性关节炎、慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化、炎性肠病和不同种类的自身免疫病。慢性炎症还已经与II型糖尿病、肥胖、阿尔茨海默氏病和癌症关联。

[0006] 现在公认炎症的消退构成一个主动生理学过程，该过程形成炎症应答的一个组成部分。随着炎症性渗出物的消失以及适当组织结构和功能的恢复，消退由几种不同的分子和细胞机制介导。这些包括：炎症性细胞因子的清除和代谢破坏；抗炎介质诸如转化生长因子- $\beta$ 、白介素-10、膜联蛋白A1和脂氧素A4的形成；促炎症性的嗜中性粒细胞的细胞凋亡；免疫调节性的单核细胞/巨噬细胞和嗜酸性粒细胞的主动募集；和炎症性白细胞的胞葬作用和流出。特别有关的是，已经发现，共同地命名为专门促消退介质(SPM)的物质家族是消退的中枢调节剂。SPM具有有效的抗炎活性(即它们会减少嗜中性粒细胞浸润)，主动地刺激炎症性渗出物的除去和消失，促进感染的清除，和刺激伤口愈合。SPM是在炎症性损伤的消退渗出物中鉴别出的一类新近表征的脂质介质，并且包含长链多不饱和脂肪酸的酶促氧化衍

生物,所述长链多不饱和脂肪酸是诸如 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸( $\omega$ -3PUFA)、二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA)。SPM对特定G蛋白偶联受体具有有效激动活性,由此活化炎症消退的不同方面。SPM由长链 $\omega$ -3PUFA-衍生的脂质介质的几个不同家族组成:消退素、保护素和maresin-它们中的每一种的成员通过刺激内源性消退机制来控制炎症的持续时间和强度(Bannenberg和Serhan,2010)。

[0007] SPM的生物合成涉及一个或两个分子的分子氧向多不饱和脂肪酸中的位置掺入和立体特异性掺入,所述掺入由底物-和位置-选择性的脂肪酸加氧酶诸如环加氧酶II型脂氧化合酶(当被阿司匹林乙酰化时)和几种细胞色素P450氧化酶催化。当前最好地理解的充当SPM形成的底物的PUFA是EPA和DHA。

[0008] SPM的内源性形成的第一步涉及长链 $\omega$ -3PUFA以立体化学上确定的方式的酶促氧化,从而导致特定脂肪酸氢过氧化物的形成。脂肪酸氢过氧化物可以经由几种生物合成途径转化成SPM。第一种途径是过氧羟基的还原,以形成对应的单羟基化的脂肪酸。这些单羟基化产物中的一些充当随后酶促氧化的中间体前体,以形成二羟基化的和三羟基化的SPM。例如,17-羟基-二十二碳六烯酸(17-HDHA),即15-脂氧合酶催化的与DHA的氧化产物,是4种不同的三羟基化消退素RvD1、RvD2、RvD3和RvD4的形成的底物。以此方式,17-HDHA可以被视作SPM前体。在一个不同的生物合成途径中,首先形成的脂肪酸氢过氧化物可以酶促地重排以形成环氧化物,并且此后酶促地水解,以形成二羟基化的产物。这样的二羟基化的脂质介质的例子是保护素D1和maresin 1。

[0009] EPA和DHA因而构成动物和人类体内的内源性底物,从它们进行体内形成,以形成EPA-和DHA-衍生的消退素(分别是所谓的E-系列和D-系列消退素)和DHA-衍生的保护素和maresin,它们是在体内具有有效抗炎和消退活化活性的二羟基化的和三羟基化的EPA和DHA衍生物(Bannenberg和Serhan,2010)。消退素、保护素和maresin是SPM,并且充当内源性受体配体或变构调节剂以有效地活化细胞应答,所述应答协调地活化抗炎作用并且促进、刺激和触发炎症的消退。此外,现在还已知EPA和DHA的几种酶促地形成的环氧化物衍生物本身同样具有有效的抗炎活性(Wagner,2011),并且被视作这里的SPM。先前文献还已经描述了呈它们的游离羧酸形式的几种PUFA-衍生的脂质介质在鳟鱼和鲚鱼的细胞和组织中的存在(Pettitt,1989;Hong,2005;Oh,2011;Raatz,2011)。SPM的形成内源性地发生在生物体内,在几种组织和细胞类型中,且发生在细胞内。SPM形成的底物是游离羧酸形式的EPA和DHA;这些游离脂肪酸已经被磷脂酶从含有EPA和DHA的膜磷脂中释放。先前描述了在动物或人类的体外可以发现在活生物体的细胞或组织内天然地形成的SPM。

[0010] 现在已经通过化学合成方法合成了几种SPM。合成的SPM已经成为描绘由动物体内的细胞形成的SPM的化学结构和活性的手段。并且,已经通过化学合成方法合成了SPM的结构类似物。合成形式的SPM的优点是它们的被良好控制的纯度。但是,SPM的化学合成是一个技术上挑战性的且昂贵的过程,因为难以得到对于生物活性而言重要的精确立体化学和双键几何形状。因此,非常感兴趣的是,接近并得到大量天然生物活性形式的SPM。

[0011] 与本发明特别有关的是,一些单羟基化的和环氧化的(epoxygenated)衍生物构成具有比EPA和DHA更有效的抗炎活性的生物合成中间体,因为它们在几种SPM的生物合成中是比EPA和DHA本身更接近的中间体。这些中间体前体因此被视作SPM前体。

[0012] 重要的是,应当指出,几种其它的长链 $\omega$ -3PUFA,诸如二十二碳五烯酸( $\omega$ -3),也

可以被相同的加氧酶转化成氧合的衍生物,其中一些衍生物具有显著的抗炎活性。还存在长链 $\omega$ -6PUFA-衍生的抗炎的和刺激消退的(促消退的)脂质介质,诸如通过2个酶促氧合步骤从花生四烯酸形成的脂氧素A4,通过环加氧酶(其产生具有有效抗炎活性的脱水产物)从花生四烯酸形成的前列腺素D2,和从二十二碳五烯酸( $\omega$ -6)衍生出的具有抗炎活性的脂质介质。在这方面重要的是理解,象EPA和DHA一样,花生四烯酸也是一种必需的长链PUFA,并且通常存在于也含有长链 $\omega$ -3脂肪酸的所有生物体中。

[0013] 尽管现在已知几种SPM的化学结构,并且已经在不同的炎症实验模型中稍微详细地研究了它们的抗炎和促消退活性,但是尚未开发出用于抑制或消退炎症的含有SPM的营养补剂、化妆品制剂或经批准的药物制剂。

[0014] 因为增加的EPA和DHA的血液水平与降低的心血管疾病发病率和发展心血管疾病的倾向有关,所以含有 $\omega$ -3PUFA的油的口服补充逐渐被用于改善炎症,具有某种程度的成功。普遍认为饮食长链 $\omega$ -3PUFA的抗炎潜力与EPA和DHA的组织水平的增加有关。通常认为增加EPA和DHA的内源性水平如下有利于抗炎状态:竞争从 $\omega$ -6PUFA花生四烯酸(AA)衍生出的活化炎症的类花生酸类的内源性形成,具有低得多的炎症效能和效力的EPA-和DHA-衍生的3-系列前列腺素和血栓烷的形成,和调节免疫细胞功能的在膜结构域和膜蛋白内的生物物理学变化。但是,最近的研究已经证实,长链 $\omega$ -3PUFA充当内源性SPM的酶促形成的内源性底物,其充当自身活性物质以在功能上拮抗炎症且其主动地促进消退。EPA和DHA充当自身活性物质(其驱动炎症的消退)的形成的生理学底物的这种最近认识,提供了长链 $\omega$ -3PUFA对于人健康而言的重要性质的更新理解。现在充分确定,增加的含有EPA和DHA的食品的消耗会增加这些 $\omega$ -3PUFA的组织水平。近年来,已经证实,EPA和DHA的饮食补充实际上允许一些EPA-和DHA-衍生的氧合脂质介质在人类中的内源性形成的可测量的增加(Anita, 2005; Shearer, 2010; Mas, 2012)。

[0015] 含有 $\omega$ -3双键的长链多不饱和脂肪酸由藻类和其它微生物天然地形成,从而形成长链 $\omega$ -3脂肪酸(诸如EPA和DHA)的转移的生体营养链的基础(Gladyshev, 2013)。哺乳动物依赖于通过饮食源(主要通过含有显著EPA和DHA组织水平的鱼的消费,所述鱼又从食物链得到这些必需的PUFA)对EPA和特别是DHA的充分供给。包括人类在内的哺乳动物可以从 $\alpha$ -亚麻酸内源性地合成EPA和DHA,但是,该转化的效率非常有限,并且对于EPA和DHA的需求而言是不足的。含有EPA和DHA的食品的饮食摄入以及具有含显著EPA和DHA水平的油的饮食补充,目前被视作得到日常摄入的适当方式,其可以显著地增加长链 $\omega$ -3PUFA的水平,并由此得到增加的降低炎症反应和疾病的强度和持续时间的能力。

[0016] 饮食需求随着年龄和生命阶段而变化,并且因此,EPA和DHA对于人健康而言的必需性质是条件性的。避免人类对长链 $\omega$ -3PUFA的大量需要对天然食物链的依赖和增长人类对长链 $\omega$ -3PUFA充足的总体需求,生物技术的新进展已经允许制备例如转基因植物和微生物,它们被赋予生物合成能力以形成长链 $\omega$ -3PUFA诸如EPA和DHA(Petrie, 2012)。

[0017] 目前通过制剂的消费来实现含有长链 $\omega$ -3PUFA的油的饮食补充,所述制剂包括许多不同的呈现。目前采用的油绝大部分(以消费的体积计)由从鱼提取的含有EPA和DHA的油组成,在所述鱼中,秘鲁鲚鱼占大部分。其它油包括从例如鲑鱼和鲔鱼提取的那些油。存在多种可得到的不同级别的油,其范围从已经经过冷榨且已经经历非常少步骤仅从油清除存在于油中的有色或有味物质的油,到已经为得到特定长链 $\omega$ -3脂肪酸经过选择性浓缩的

油。含有适当浓度的长链 $\omega$ -3PUFA(通常至多大约30%)或具有通过蒸馏增加至大约55%的浓度的鱼油,被广泛地用在营养补剂中,所述营养补剂用于治疗例如高甘油三酯血症和用于血管和眼健康。从鱼油制成的长链 $\omega$ -3PUFA浓缩物(其目前可以在制药产业的工业规模生产)的一个好例子含有97%的乙酯形式的EPA。

[0018] 涉及脂质化学的一般方法、与油和脂肪酸有关的工业方法、以及常规药物科学,描述在:(Remington, 2005; Martinez, 2007; Gunstone和Padley, 1997; Shahidi, 2005)。

[0019] 鱼油工业目前制备许多不同的含有EPA和DHA的油等级。也从其它生物体(诸如磷虾、乌贼、藻类、酵母、原生动物)和从转基因植物提取含有EPA和DHA的油,所述转基因植物被赋予编码酶的基因,所述酶允许生物合成EPA和DHA和其它长链 $\omega$ -3PUFA诸如十八碳四烯酸(SDA)。在市场上可得到的用于人消费的制剂包括油本身、包囊的油、乳剂和稳定化的粉剂。在所有情况下,目的是提供饮食添加物和药物成分,它们用于给人类提供足够高的剂量以辅助增加EPA和DHA的内源性组织水平。尽管EPA和DHA相对快速地吸收和再分布进特定细胞类型中,但是可以测量循环中的血小板和脂蛋白(在24小时内),普遍接受的是,EPA和DHA在口服消费以后的健康促进作用需要大量时间,这是由于以下假定的需求:增加的EPA和DHA的组织水平需要积累,并且需要在数周至数月内每天摄入至少数百毫克EPA和DHA的剂量。

[0020] 提供EPA和DHA作为用于降低炎症反应以及预防和治疗炎性病症的必需营养物的需要的一个特征是,通过饮食食物摄入和特殊补充得到的EPA和DHA向SPM的内源性酶促转化是一个多步骤的酶促过程,其包括:磷脂酶对磷脂-结合的EPA和DHA的释放,继之以由特定脂肪酸加氧酶催化的一个或多个酶促氧化反应以形成有活性的SPM。这些过程在健康条件下适当地起作用,但是,低EPA和DHA组织水平以及身体组织中长链多不饱和脂肪酸向SPM的有限或不足转化,被认为会促进、诱发炎性病症和增大的炎症反应或成为它们的基础。

## 发明内容

[0021] 本发明是基于以下惊人发现:专门促消退介质(SMP)和SPM前体存在于从含有长链 $\omega$ -3PUFA的生物体提取的油中。使用包括下述步骤的方法,可以生产含有至少一种SPM或SPM前体且具有抗炎或刺激消退(促消退)活性的油:测量SPM或SPM前体在含有长链 $\omega$ -3PUFA的油(诸如粗制的、精制的或浓缩的含有长链 $\omega$ -3脂肪酸的油)中的存在或水平,将所述油分级分离(fractionate)成多个级分,测量油级分的抗炎或刺激消退活性,和任选地重复这3个步骤,以得到含有或富含至少一种SPM或SPM前体且具有抗炎或刺激消退活性的油。SPM和SPM前体可以以可皂化物质的形式存在。此外,所述油可以含有长链 $\omega$ -3PUFA,诸如EPA和DHA。

[0022] 可以用于这样的分级分离的技术包括提取和分离方法。用于得到含有或富含SPM和SPM前体的油的特别重要的技术是采用二氧化碳作为溶剂的超临界流体萃取(SFE)和超临界流体色谱法(SFC)。有效量的这些油向受试者的施用构成减少炎症或刺激炎症消退的方法。所述油可以用于制备营养补剂、药物制剂和化妆品制剂,其包含有效量的具有抗炎或刺激消退活性的油。这些补剂和制剂因而构成可以大量制备的抗炎和促消退组合物,且不需要加入昂贵的化学合成的SPM。

[0023] 尽管与本文描述的那些类似或等效的方法和材料都可以用于实践或试验本发明,

但是下面描述了适合的方法和材料。在本文中提及的所有专利、专利申请和出版物通过引用整体并入。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。另外,下面讨论的特定实施方案仅仅是示例性的,且无意成为限制性的。本领域技术人员考虑到本发明的描述会明白本发明的其它方面。

## 附图说明

[0024] 从结合附图做出的下述详细描述,将会更清楚地理解本发明的上述和其它目的、特征和优点,在附图中:

[0025] 图1A-H显示了口服施用一系列连续洗脱的油级分(分别编号1-8)以后对通过脂多糖(LPS)的皮下(s.c.)施用诱导的小鼠中皮下地发生的急性炎症性变化的影响,所述油级分通过中间体长链 $\omega$ -3PUFA-乙酯浓缩物(含有70%的组合的EPA-乙酯(EE)和DHA-EE)的工业规模SFC分级分离得到。

[0026] 图2显示了中间体长链 $\omega$ -3PUFA-乙酯浓缩物(含有70%的组合的EPA-EE和DHA-EE)的工业规模SFC分级分离的连续洗脱的油级分中,多不饱和脂肪酸EPA和DHA的乙酯化和可皂化形式的不同单羟基化衍生物的相对丰度。编号1-8的级分与如在图1中所示的试验抗炎活性的那些相同。

[0027] 图3A.显示了中间体长链 $\omega$ -3PUFA-乙酯浓缩物(含有70%的组合的EPA-EE和DHA-EE)的工业规模SFC的几种连续洗脱的油级分(对应于如在图1和2中所示的相同级分)中的D-系列消退素前体17-HDHA的乙酯的浓度。

[0028] 图3B.显示了发现在级分1中富含的17-HDHA-乙酯的手性高效液相色谱法-三级四级杆质谱分析的结果,进行该分析以确定碱性水解以后得到的乙酯油级分1-8中的立体异构体17S-HDHA和17R-HDHA的相对丰度(上图)。

[0029] 图4显示了在通过腹膜内施用酵母膜提取物酵母多糖A诱导的腹膜炎症的鼠模型中,通过管饲法施用的油级分1和17S-HDHA的抗炎效应。

[0030] 图5A-C证实了几种特定的SPM和SPM前体在不同油级分中的存在。

[0031] 图6A-B表明,通过长链 $\omega$ -3PUFA浓缩物的SFC分级分离,可以实现特定SPM和SPM前体的选择性富集。

[0032] 图7显示了通过含有SPM前体的油刺激的炎症的消退。

## 具体实施方式

[0033] 已经发现,在从天然来源(包括鱼、甲壳类动物(磷虾)、藻类(生产长链 $\omega$ -3PUFA的藻类)、软体动物)和从含有长链 $\omega$ -3PUFA的其它生物体衍生出的油中含有SPM和SPM前体。这允许从天然来源生产具有抗炎和刺激消退活性的、故意含有或富集一种或多种专门促消退介质(SPM)和SPM前体的油,以及含有这些油的营养补剂、药物制剂和化妆品制剂,和使用这样的补剂和制剂通过抑制炎症或刺激炎症的消退而治疗或预防炎性病症和与炎症有关的疾病的方法。下述的实施方案解释了这些方法和组合物的代表性实施例。尽管如此,从这些实施方案的描述,基于下面提供的描述,可以做出和/或实践本发明的其它方面。除非另有定义,在本文中使用的所有技术术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。

[0034] 本发明的第一方面由具有抗炎或刺激消退活性的油形成,特征在于,它们含有或富集至少一种SPM或SPM前体,其中所述SPM或SPM前体源自从含有长链 $\omega$ -3脂肪酸的生物体得到的油。

[0035] 在本发明中使用的术语“富集”表示含有专门促消退介质(SPM)和/或SPM前体的油,它含有的SPM和/或SPM前体的水平高于制备它的来源。

[0036] 在本发明中使用的术语“专门促消退介质(SPM)”表示PUFA-衍生的酶促氧合衍生物,其具有有效的抗炎和消退活化活性,且其充当炎症应答的内源性调节剂以使发炎的组织恢复至它的不发炎的和健康的状态。SPM充当内源性受体配体或变构调节剂以有效地活化细胞应答,所述细胞应答协同地活化抗炎作用以及促进、刺激和触发炎症的消退。

[0037] 在本发明中使用的术语“SPM前体”表示PUFA的酶促地氧合的衍生物,其需要额外的酶反应才能将它转化成SPM。与对应的PUFA底物本身相比,SPM前体是SPM的内源性形成的更接近的底物。

[0038] 这些油含有或富集至少一种SPM或SPM前体,所述SPM或SPM前体源自从含有长链 $\omega$ -3PUFA的生物体(优选鱼、甲壳类动物、藻类和软体动物)或其它含有长链 $\omega$ -3PUFA的生物体(诸如其它海洋生物体、植物、微生物生物体和被赋予形成长链 $\omega$ -3多不饱和脂肪酸的能力的转基因生物体)提取的油。

[0039] 可以存在于从天然来源提取的油中的SPM包括下述:

[0040] 消退素E1 (RvE1;5S,12R,18R-三羟基-二十碳-6Z,8E,10E,14Z,16E-五烯酸),

[0041] 18S-消退素E1 (18S-RvE1;5S,12R,18S-三羟基-二十碳-6Z,8E,10E,14Z,16E-五烯酸),

[0042] 20-羟基-RvE1 (5S,12R,18R,20-四羟基-二十碳-6Z,8E,10E,14Z,16E-五烯酸),

[0043] 消退素E2 (RvE2;5S,18-二羟基-二十碳-6E,8Z,11Z,14Z,16E-五烯酸),

[0044] 消退素E3 (RvE3;17,18R-二羟基-二十碳-5Z,8Z,11Z,13E,15E-五烯酸),

[0045] 18S-消退素E3 (18S-RvE3;17,18S-二羟基-二十碳-5Z,8Z,11Z,13E,15E-五烯酸),

[0046] 17,18-环氧-二十碳-5Z,8Z,11Z,13E,15E-五烯酸,

[0047] 脂氧素A5 (LXA5;5S,6R,15S-三羟基-二十碳-7E,9E,11Z,13E,17Z-五烯酸),

[0048] 15-表-脂氧素A5 (LXA5;5S,6R,15R-三羟基-二十碳-7E,9E,11Z,13E,17Z-五烯酸),

[0049] maresin 1 (MaR1;7R,14S-二十二碳-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-六烯酸),

[0050] 7S-maresin 1 (7S-MaR1;7S,14S-二十二碳-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-六烯酸),

[0051] 7S,14S-二HDHA (7S,14S-二羟基-二十二碳-4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸),

[0052] 保护素D1 (PD1;10R,17S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-六烯酸),

[0053] 10S,17S-HDHA (10S,17S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-六烯酸),

[0054] 14S,21S-二HDHA (14S,21S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸),

[0055] 14S,21R-二HDHA (14S,21R-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸),

[0056] 14R,21S-二HDHA (14R,21S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸),

[0057] 14R,21R-二HDHA (14R,21R-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸),

[0058] 13S,14S-环氧-DHA (13S,14S-环氧-二十二碳-4Z,7Z,9E,11E,16Z,19Z-六烯酸),

[0059] 16,17S-二HDHA (16,17S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,14E,19Z-六烯酸),

- [0060] 16,17-环氧-DHA (16,17-环氧-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,14E,19Z-六烯酸) ,  
[0061] 消退素D1 (RvD1;7S,8R,17S-三羟基-二十二碳-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-六烯酸) ,  
[0062] 消退素D2 (RvD2;7S,16R,17S-三羟基-二十二碳-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-六烯酸) ,  
[0063] 消退素D3 (RvD3;4S,11R,17S-三羟基-二十二碳-5Z,7E,9E,13Z,15E,19Z-六烯酸) ,  
[0064] 消退素D4 (RvD4;4S,5,17S-三羟基-二十二碳-6E,8E,10Z,13Z,15E,19Z-六烯酸) ,  
[0065] 消退素D5 (RvD5;7S,17S-二羟基-二十二碳-5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-六烯酸) ,  
[0066] 消退素D6 (RvD6;4S,17S-二羟基-二十二碳-5E,7Z,10Z,14Z,16E,19Z-六烯酸) ,  
[0067] 阿司匹林-触发的消退素D1 (AT-RvD1;7S,8R,17R-三羟基-二十二碳-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-六烯酸) ,  
[0068] 阿司匹林-触发的消退素D2 (AT-RvD2;7S,16R,17R-三羟基-二十二碳-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-六烯酸) ,  
[0069] 阿司匹林-触发的消退素D3 (AT-RvD3;4S,11,17R-三羟基-二十二碳-5Z,7E,9E,13Z,15E,19Z-六烯酸) ,  
[0070] 阿司匹林-触发的消退素D4 (AT-RvD4;4S,5,17R-三羟基-二十二碳-6E,8E,10Z,13Z,15E,19Z-六烯酸) ,  
[0071] 阿司匹林-触发的消退素D5 (AT-RvD5;7S,17R-二羟基-二十二碳-5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-六烯酸) ,  
[0072] 阿司匹林-触发的消退素D6 (AT-RvD6;4S,17R-二羟基-二十二碳-5E,7Z,10Z,14Z,16E,19Z-六烯酸) ,  
[0073] 7S,17S-二HDPA n-3 (7S,17S-二羟基-二十二碳-8E,10Z,13Z,15Z,19Z-五烯酸 ( $\omega$ -3))  
[0074] 脂氧素A<sub>4</sub> (LXA<sub>4</sub>;5S,6R,15S-三羟基-二十碳-7E,9E,11Z,13E-四烯酸) ,  
[0075] 15-表-脂氧素A<sub>4</sub> (15-表-LXA<sub>4</sub>;5S,6R,15R-三羟基-二十碳-7E,9E,11Z,13E-四烯酸) ,  
[0076]  $\delta$ 12-前列腺素J<sub>2</sub> ( $\delta$ 12-PGJ<sub>2</sub>;11-氧化-15S-羟基-前列腺素-5Z,9,12E-三烯酸 (11-oxo-15S-hydroxy-prosta-5Z,9,12E-trienoic acid))  
[0077] 15-脱氧- $\delta$ 12,14-前列腺素J<sub>2</sub> (15-脱氧- $\delta$ 12,14-PGJ<sub>2</sub>;11-氧化-前列腺素-5Z,9,12E,14E-四烯酸 (11-oxo-prosta-5Z,9,12E,14E-tetraenoic acid))  
[0078] 11(12)-环氧-二十碳四烯酸 (11(12)-EpETE;11(12)-环氧-二十碳-5Z,8Z,14Z,17Z-四烯酸)  
[0079] 17(18)-环氧-二十碳四烯酸 (17(18)-EpETE;17(18)-环氧-二十碳-5Z,8Z,11Z,14Z-四烯酸)  
[0080] 19(20)-环氧-二十二碳五烯酸 (19(20)-EpDPE;19(20)-环氧-二十二碳-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-五烯酸)  
[0081] 10S,17S-HDPA n-6 (10S,17S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13Z,15E-五烯酸) ,  
[0082] 7,17-ROPA n-6 (7,17-二羟基-二十二碳-4Z,8E,10Z,13Z,15E-五烯酸) ,

- [0083] 7,14-HDPA n-6 (7,14-二羟基-二十二碳-4Z,8E,10Z,12Z,16Z-五烯酸) ,  
 [0084] 10S,17S-HDPA n-6 (10S,17S-二羟基-二十二碳-7Z,11E,13Z,15E,19Z-五烯酸) ,  
 和  
 [0085] 7,17-HDPA n-6 (7,17二羟基-二十二碳-8E,10Z,13Z,15E,19Z-五烯酸) 。  
 [0086] 在实施例1-3中显示了这些化合物在油和油级分中的存在的例子。  
 [0087] 可以在从天然来源提取的油中存在或富集的SPM的前体包括下述。在实施例1-3中显示了这些化合物在油和油级分中的存在的例子。

|        |               |  |
|--------|---------------|--|
|        | 5S-HEPE       | (5S-羟基-二十碳-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-五烯酸);       |
|        | 11S-HEPE      | (11S-羟基-二十碳-5Z,8Z,12E,14Z,17Z-五烯酸);      |
|        | 12S-HEPE      | (12S-羟基-二十碳-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-五烯酸);      |
|        | 12R-HEPE      | (12R-羟基-二十碳-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-五烯酸);      |
|        | 15S-HEPE      | (15S-羟基-二十碳-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-五烯酸);      |
|        | 18S-HEPE      | (18S-羟基-二十碳-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-五烯酸);      |
|        | 18R-HEPE      | (18R-羟基-二十碳-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-五烯酸);      |
| [0088] | 4S-HDHA       | (4S-羟基-二十二碳-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-六烯酸);  |
|        | 7S-HSHA       | (7S-羟基-二十二碳-4Z,8E,10Z,13Z,16Z,19Z-六烯酸);  |
|        | 10S-HDHA      | (10S-羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13Z,16Z,19Z-六烯酸); |
|        | 11S-HDHA      | (11S-羟基-二十二碳-4Z,7Z,9E,13Z,16Z,19Z-六烯酸);  |
|        | 14S-HDHA      | (14S-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸); |
|        | 14R-HDHA      | (14R-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸); |
|        | 17S-HDHA      | (17S-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-六烯酸); |
|        | 17R-HDHA      | (17R-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-六烯酸); |
|        | 20S-HDHA      | (20S-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-六烯酸); |
|        | 17S-HDPAn- 6  | (17S-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,13Z,15E-五烯酸);     |
|        | 14S -HDPAn- 6 | (14S-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,16Z-五烯酸);     |
|        | 10S-HDPAn- 6  | (10S-羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13Z,16Z-五烯酸);     |
| [0089] | 17S-HDPAn- 3  | (17S-羟基-二十二碳-7Z,10Z,13Z,15E,19Z-五烯酸);    |
|        | 14S-HDPAn- 3  | (17S-羟基-二十二碳-7Z,10Z,12E,16Z,19Z-五烯酸);    |
|        | 10S-HDPAn- 6  | (10S-羟基-二十二碳-7Z,11E,13Z,16Z,19Z-五烯酸);    |
|        | 15S-HETE      | (15S-羟基-二十碳-5Z,8Z,11Z,13E-四烯酸); 和/或      |
|        | 15R-HETE      | (15R-羟基-二十碳-5Z,8Z,11Z,13E-四烯酸)。          |

[0090] 除了前述以外,从下述 $\omega$ -3PUFA或 $\omega$ -6PUFA中的任一种衍生出的SPM和SPM前体可以存在或富集于从天然来源提取的油中。这些脂肪酸可以通过酶促氧化而产生SPM前体和

SPM。

[0091] 表1

| 脂肪酸名称         | 化学名称                                  |
|---------------|---------------------------------------|
| 十六碳三烯酸(HTA)   | 16:3 (n-3)全顺式-7,10,13-十六碳三烯酸          |
| a-亚麻酸(ALA)    | 18:3 (n-3)全顺式-9,12,15-十八碳三烯酸          |
| 十八碳四烯酸(SDA)   | 18:4 (n-3)全顺式-6,9,12,15-十八碳四烯酸        |
| 十九碳四烯酸        | 19:4 (n-3)全顺式-7,10,13,16-十九碳四烯酸       |
| 二十碳三烯酸        | 20:3 (n-3)全顺式-11,14,17-二十碳三烯酸         |
| [0092] 二十碳四烯酸 | 20:4 (n-3)全顺式-8,11,14,17-二十碳四烯酸       |
| 二十碳五烯酸(EPA)   | 20:5 (n-3)全顺式-5,8,11,14,17-二十碳五烯酸     |
| 二十一碳五烯酸       | 21:5 (n-3)全顺式-6,9,12,15,18-二十一碳五烯酸    |
| 二十二碳五烯酸(DPA)  | 22:5 (n-3)全顺式-7,10,13,16,19-二十二碳五烯酸   |
| 二十二碳六烯酸(DHA)  | 22:6 (n-3)全顺式-4,7,10,13,16,19-二十二碳六烯酸 |
| 二十四碳五烯酸       | 24:5 (n-3)全顺式-9,12,15,18,21-二十四碳五烯酸   |
| 二十四碳六烯酸       | 24:6 (n-3)全顺式-6,9,12,15,18,21-二十四碳六烯酸 |

[0093] 除了列出的SPM和SPM前体的例子以外,可以预见到,上述多不饱和脂肪酸的其它单-、二-和三-羟基化的和环氧化的衍生物可以具有抗炎和促消退活性,并且可以被发现存在和富集于从含有长链ω-3PUFA的生物体得到的油中,所述生物体包括鱼、甲壳类动物、藻类、软体动物和海洋生物体、植物、微生物生物体、以及被赋予形成长链ω-3PUFA的酶促能力的转基因生物体。同样地,可以在这样的油中鉴别和富集已知的SPM和新的SPM的其它前体。另外,SPM和SPM前体可以作为酯和酰胺存在。所述酯可以是天然酯诸如甘油三酯、甘油二酯、甘油单酯和磷脂,以及在工业过程中制备的酯,尤其是以乙酯的形式,所述工业过程通常用在鱼油工业中以允许从粗制的和精制的鱼油浓缩EPA和DHA。

[0094] 采用提取和分离方法,例如,蒸馏技术和色谱分级分离技术和分离技术,可以富集或浓缩可存在于从含有长链ω-3PUFA的生物体得到的油中的任何SPM、SPM前体、或SPM和SPM前体的混合物。

[0095] 本发明已经发现,且已知的现有技术不曾预料到,SPM和SPM前体可以作为可皂化物质存在于粗制油中,随后衍生出的精制油中,和其中已经以乙酯形式浓缩长链ω-3PUFA(诸如EPA和DHA)的水平的油。例如,在实施例2(图5A)中证实,从鲚鱼提取的广泛地采用的粗制油(其被视作ω-3工业的良好起始原料,因为它相对富含EPA和DHA)含有D-系列消退素RvD1和RvD2(均以酰化形式)。作为含有长链ω-3PUFA的油与乙醇的酯交换的结果,可皂化形式的SPM或SPM前体也可以作为乙酯存在,以得到脂肪酸-乙酯油,该油可以采用用于ω-3PUFA-乙酯浓缩和纯化的特定蒸馏、萃取和色谱工业规程进行浓缩和分级分离。例如,许多可以充当SPM前体的单羟基化的脂质介质以可皂化形式存在于从鲚鱼油、鲔鱼肝油制备的乙酯化的ω-3浓缩物中和从软体动物和鱼的混合物制备的乙酯ω-3浓缩物中(图2、3A、图3B、5C、6A和6B)。存在于长链ω-3PUFA油的乙酯浓缩物中的酯化形式的SPM前体和SPM本身

的存在证实,这些SPM前体和SPM最初以酰化形式存在于粗制的海洋生物油和从其提取粗制油的生物体中。在精制油与乙醇的酯交换过程中,这些酰化的SPM前体和SPM也被酯交换成对应的乙酯。该发现具有非常重要的且意外的性质,因为不知道SPM和SPM前体以酰化形式存在于用于制备含有 $\omega$ -3PUFA的油的生物体的细胞和组织中,所述油被制备用作例如营养补剂和药物成分。本发明的该方面不排除SPM和SPM前体作为游离羧酸在含有长链 $\omega$ -3PUFA的油中的存在或富集,所述游离羧酸是以前在文献中描述的在细胞和生物体内从长链 $\omega$ -3PUFA底物形成的SPM和SPM前体的化学形式。另外,含有SPM或SPM前体的油可以含有长链 $\omega$ -3PUFA,诸如EPA和DHA。

[0096] 本发明的另一个方面是一种用于生产油的方法,所述油具有抗炎或刺激消退活性且含有可测量水平的SPM和/或SPM前体。所述方法包括下述步骤:i) 测量SPM或SPM前体在含有长链 $\omega$ -3PUFA的油中的存在或浓度。这可以是例如粗制的、精制的或浓缩的含有长链 $\omega$ -3PUFA的油;ii) 将所述油分级分离成多个级分;iii) 测量所述级分的抗炎或刺激消退活性;iv) 和,任选地,重复所述3个步骤,以便得到具有抗炎或刺激消退活性且含有或富集至少一种SPM或SPM前体的油。

[0097] 测量SPM和SPM前体在油中的存在,允许评估或计量要分级分离的油的适合性,以便得到这样的油:其含有至少一种SPM或SPM前体,具有合乎需要的SPM和SPM前体的组合,或其富集至少一种SPM或SPM前体。通过分析化学技术,诸如液相色谱法与电喷射电离串联质谱法联用(LC/ESI-MS/MS)和气相色谱法/质谱法(GC/MS)(Yang, 2011),可以确定SPM和SPM前体在给定的样品或级分中的存在和绝对水平。可能使用的用于检测和/或定量SPM和SPM前体的其它技术包括免疫测定,诸如由Cayman Chemical Company(Ann Arbor, MI)销售的消退素D1 ELISA测定和Neogen Corporation的LXA<sub>4</sub>和AT-LXA<sub>4</sub>测定试剂盒。

[0098] 将粗制的、精制的或浓缩的含有长链 $\omega$ -3PUFA的油分级分离为多个级分,允许生产这样的油:其含有比其它级分更高浓度的至少一种SPM或SPM前体,或含有期望的SPM或SPM前体的组合。油的分级分离可以用分离和提取方法实现。因为存在于得自天然来源的油中的SPM和/或SPM前体随从其中得到所述粗制油的天然来源而异,所以不同的方法将产生用于成品制备的不同油中的SPM和SPM前体的不同组合物。

[0099] 几种提取和分离技术可用于得到含有或富集至少一种SPM或SPM前体的油。这样的技术可以作用于在其中分离出SPM和/或SPM前体的分子形式,诸如在鱼和植物油中的甘油三酯,或存在于磷虾油中的磷脂和甘油三酯,或在转化成不同的化学形式以后,特别是脂肪酸乙酯。由脂肪酸乙酯组成的油随后可以用于制备改造的甘油三酯或含有高水平的游离脂肪酸的组合物。通过一种技术或几种技术的组合,可以从作为起始原料的这里提及的含有长链 $\omega$ -3PUFA的粗制油得到含有SPM和/或SPM前体的油。将在下文中解释合适的方法。

[0100] 提取方法包括:将含有长链 $\omega$ -3PUFA的原料(例如,鱼、磷虾、乌贼或藻类)加热至最高95°C的温度。该热处理步骤会产生含有水和脂肪的“预压榨”液体。随后在130-170巴压力的压榨(在热处理中得到的剩余固体材料)和伴随的用螺旋压榨机的压榨会产生压榨液体。可以将预压榨液体和压榨液体组合(“压榨水”),然后供料进2-相倾析器中以除去固体并得到澄清的“压榨水”。通过在分离器中离心,将压榨水“脱油”,从而产生浑浊油。然后可以借助于另一个使用分离器的离心步骤将浑浊油“精制”,以得到“粗制的”油。一种替代方法采用两相倾析器替代螺旋压榨机,这会通过从含有油的流体直接分离固体而简化该方

法,通过油分离器从所述固体分离油(精制)。在第三种方法中,使用倾析器将热凝固的原料直接分离成固体、水和油。然后可以用分离器精制油,以除去痕量的水。在分离过程中的温度维持在95°C至98°C之间。优选地,将热的施用限于从热凝固的蛋白和水分离脂肪所需的最短时间。通过这些提取方法中的任一种得到的粗制油中的大多数SPM和/或SPM前体是呈酰化形式,作为在甘油酯和磷脂内的酯,和作为酰胺。

[0101] 通过化学“提纯”方法,可以清洁粗制油。该步骤包括:用碱溶液和酸溶液洗涤油以便中和油,用分离器分离以从油除去水性洗液,热水洗涤,用硅藻土、活性炭或硅胶对油的“漂白”处理,随后过滤以便通过吸附除去杂质(诸如有色的类胡萝卜素、金属、污染物),和真空干燥。通常,在提纯过程中维持95°C至98°C之间的温度。可以施加另一个除臭步骤,其包括将油加热至最高200°C以除去挥发性的物质。

[0102] 可替换地,可能使用冷萃取技术得到含有SPM和/或SPM前体的油。

[0103] 油的冬化是这样的方法:其使油以受控的速率冷却,从而允许不同脂质基于熔点差异的差别结晶——从而允许分离不同的脂质类别。该分离技术可以用于从含有较高含量的SPM和/或SPM前体或其酰化形式的脂质(经常是甘油三酯)级分中分离富含饱和脂肪酸的蜡类和脂质。

[0104] 一种或多种分子蒸馏技术也可能用于该目的。分子蒸馏方法包括薄膜蒸馏、擦膜蒸馏和短路径蒸馏。在薄膜蒸发和蒸馏中,通过密闭容器内的旋转风扇或滚筒产生油膜。通过低压条件和加热的组合施加,实现不同脂质组分的差别蒸发,从而允许目标脂质级分(即,含有较高SPM和/或SPM前体水平的那些级分)的相对富集。在擦膜蒸馏中,用旋转桶将油在加热的表面上主动擦成膜。

[0105] 短路径蒸发蒸馏是一种分子蒸馏技术,其通过在进行蒸发或蒸馏的容器内引入内部冷凝器,对于对空气氧化敏感的化合物的分级分离而言是特别有用的。象薄膜蒸发和蒸馏一样,在减压和加热下进行分级分离。在该构型中的压力损失减少,并且通过该技术可以实现更低或更短的加热时间。短路径蒸馏工厂包括供给罐、蒸发器、真空泵、脱气器、滚筒、热交换器、冷凝器、热调节罐以及连续的且封闭的回路。

[0106] 可以以连续次序进行分子蒸馏步骤,以从油浓缩一定范围的结构上类似的脂肪酸,得到目标油级分。与分子蒸馏互补的另一种技术是真空精馏,其包括在较高接触时间不便时实现较高浓度水平的外部回流方法。借助于选择性的沉淀步骤,通过加入选择性地络合饱和与单不饱和脂肪酸的脲,可以进一步浓缩油中的脂肪酸。其它浓缩技术包括采用阳离子和阴离子交换树脂的离子交换。可以允许基于分子大小和重量进行选择性浓缩的另一种技术是超滤。

[0107] 对于SPM和SPM前体的提取而言特别有用的一种提取技术是超临界流体萃取(SFE)。超临界流体萃取工厂包括供给罐、泵、溶剂罐、连续且闭合的回路、萃取柱、大气罐和分离器。通过达到压力和温度的特定组合,可以使流动相达到它的超临界点以上。在逆流条件下通常采用SFE,由此达到稳态,从而允许选择性地富集从萃取柱的顶部或底部洗脱的组分。SFE允许选择性富集。SFE因而允许制备这样的油:其为后续分离技术的合适起始原料,所述后续分离技术用于选择性地分离和纯化各种脂肪酸,例如作为它们的对应乙酯,从而允许浓缩直到可以接近几乎纯度的水平。

[0108] 色谱技术可用于实现各种乙酯化脂肪酸的显著分离水平,且适合用于得到选择性

地富集SPM和SPM前体的油。这些包括通过高压操作进行的常规色谱法、移动带色谱法、逆流色谱法和超临界流体色谱法(SFC)。一种高压色谱法采用水性溶剂和有机溶剂的混合物，所述混合物在高压下被泵送穿过含有固定相的柱。所述固定相可以具有不同的极性和颗粒大小和几何形状。通过选择流动相、固定相、温度的最佳组合，可以实现可接受的脂肪酸-乙酯的分离。

[0109] 超临界流体色谱法(SFC)采用超临界流体(经常是二氧化碳)作为溶剂和流动相。通过经由压力和温度小心地调节超临界流体密度，可以优化用于分离样品内的各种脂质的洗脱条件。该技术的优点是，采用接近环境温度且在色谱规程中排除氧以消除非故意氧化的风险。设备包括供给容器、泵、流动相罐、连续且闭合的回路、色谱柱、大气罐和分离器。SFC允许脂肪酸-乙酯的色谱分离。流动相由于在环境压力和温度为气体而容易地从最终油级分除去。

[0110] 用于通过含有长链 $\omega$ -3PUFA的油的分级分离得到含有SPM和/或SPM前体的油的优选技术是超临界流体萃取(SFE)和超临界流体色谱法(SFC)。这些技术可以任选地用一个或多个其它分级分离步骤补充，所述其它分级分离步骤允许富集一种或多种确定的SPM和/或SPM前体。下面描述了实施例。可以采用SFE和SFC条件的下述范围：在27–60°C之间的温度范围，在80–180巴之间的压力范围，使用硅胶、改性硅胶、反相、手性和银化(argentated)固定相，和10–800的溶剂/进料比(Kg/Kg)。

[0111] SFE和SFC的组合允许富集一种或几种特定的SPM和/或SPM前体。此外，分离SPM和/或SPM前体的能力允许重组特定油级分以便得到通用范围的比率和组合。

[0112] 采用非常专门的富集技术诸如手性分离和金属-亲和色谱法诸如使用固定化银盐的银化色谱法，可以进行额外色谱步骤。

[0113] 作为用于制备含有或富集SPM和/或SPM前体的油的技术的结果，这些分子的化学形式通常是下述之一：乙酯，当存在于 $\omega$ -3浓缩物中时；在粗制油和精制油的典型甘油酯和磷脂内酰化；或作为溶解在油中的游离羧酸存在。SPM和SPM前体的其它化学形式可以存在于粗制油和精制油中，诸如酰胺。在另一个实施方案中，根据已知方法，可以进一步转化SPM和SPM前体分子。例如，可以用甘油三酯或磷脂再次转酯化(化学地或酶促地)含有SPM-乙酯的油以分别形成改造的甘油三酯或磷脂。还可以水解酯化的SPM和SPM前体以得到对应的游离脂肪酸形式作为盐或共轭酸。

[0114] 在一个特定实施方案中，本发明此外可以最终允许将天然存在的SPM和/或SPM前体纯化至同质性或接近同质性(例如，按重量计超过80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的纯度)。

[0115] 此外，可以组合源自相同或不同的含有长链 $\omega$ -3PUFA的生物体的粗制油，并用作随后富集规程的起始原料以得到含有SPM和SPM前体的油。

[0116] 含有与其它级分相比更高浓度的至少一种SPM或SPM前体或含有期望的SPM或SPM前体的组合的级分的抗炎或刺激消退活性的确定，将会确立所述油用于制备治疗性抗炎或刺激消退组合物的有用性。这可以优选地在体内在炎症实验模型中进行，所述炎症实验模型允许评估抗炎效力和效能或测量油级分的消退活性(Bannenberg, 2005)。为此目的可以采用体外模型和细胞模型，以便测量抗炎或促消退活性对体内炎症应答的特定细胞或分子方面。

[0117] 本发明的另一个方面是，故意制备含有或富集SPM和SPM前体的油，其具有抗炎和消退增强活性，可以用于在受试者中减轻炎症或刺激炎症消退，所述方法包括施用有效量的油的步骤。所述油可以用于治疗炎症或与炎症有关的疾病，或预防炎症或与炎症有关的疾病。油的分级分离允许得到具有特定抗炎或刺激消退活性的油。通过分级分离可以实现功能分化，一些油级分具有抗炎活性和/或刺激消退的(促消退的)活性，其它油级分不具有显著的抗炎活性，和/或甚至可以得到具有促炎症活性的油级分。因此，通过分级分离得到的特定油具有明确地调节炎症应答的能力。

[0118] 含有天然SPM、SPM前体、或SPM和/或SPM前体的混合物的特定油和油级分可以特别好地适合于治疗或预防特定炎性病症。例如，可能选择含有或富集特定SPM和/或SPM前体、或超过一种SPM或SPM前体的组合的油用于治疗类风湿性关节炎，这基于证实以下内容的研究：对于治疗类风湿性关节炎而言，这些特定分子是比当前使用的含有 $\omega$ -3PUFA的油或其它SPM、SPM前体、或SPM和/或SPM前体的混合物、或已知抗炎药更有益的。基于研究，可能选择其它含有SPM和/或SPM前体的油用于制备组合物，所述组合物用于治疗不同的炎性病症，例如，哮喘。该方法包括以下步骤：给所述受试者施用有效量的油，所述油含有或富集至少一种SPM或SPM前体且具有抗炎或刺激消退活性。

[0119] 含有SPM和/或SPM前体的油可能进一步包含载体或赋形剂。

[0120] 在本发明中使用的术语“受试者”或“患者”表示动物，包括哺乳动物，优选人类。

[0121] 在本发明中使用的术语“施用”或“给药”在本文中用于表示给受试者或患者直接地施用油或含油的组合物，这将会给受试者的或患者的身体递送有效量的活性化合物或物质。

[0122] 在本发明中使用的术语“有效量”或“有效地……的量”是指，足以治愈或至少部分地改善病症、疾病或它的并发症的征状的量。

[0123] 本发明的另一个方面包括含有SPM或SPM前体的抗炎或刺激消退油，其中这些油也含有长链 $\omega$ -3PUFA。这些可以是EPA和DHA，以及其它长链 $\omega$ -3PUFA诸如十八碳四烯酸或二十二碳五烯酸。

[0124] 本发明的另一个方面涉及营养补剂、药物制剂和化妆品制剂的制备，其包含有效量的含有或富集SPM和SPM前体的油，所述油具有抗炎或消退增强活性，得自含有长链 $\omega$ -3PUFA的生物体。得到含有或富集一种或多种天然地存在的SPM和/或SPM前体且具有抗炎或刺激消退活性的油或油级分以后，所述油可以用于制备营养补剂、药物制剂或化妆品制剂。

[0125] 在本发明中使用的术语“药学上可接受的”表示这样的化合物、物质、组合物、补剂、制剂和/或剂型：其在合理的医学判断范围内，适合用于与人类和动物的组织接触，而没有过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题并发症，与合理的收益/风险比相称。

[0126] 除了含有SPM和/或SPM前体的油以外，营养补剂和药物和化妆品制剂可能含有其它成分。例如，在优选的实施方案中，将含有SPM和/或SPM前体的油混合、溶解、乳化(例如，在水包油乳剂、油包水乳剂或双乳剂中)，或悬浮于基体或基质中。所述基体或基质可以是例如食用油诸如含有 $\omega$ -3PUFA的油，含有高水平的EPA或DHA、或EPA和DHA的混合物的 $\omega$ -3PUFA浓缩物，或适合用于消费或施用的另一种食用油。所述基体或基质也可能是水或水性缓冲液。也可能在脂质体、纳米颗粒或微米颗粒中制备含有SPM和/或SPM前体的油。

[0127] 为了增加贮存期限，所述补剂和制剂还可能含有一种或多种稳定剂，包括抗氧化

剂诸如一种或几种生育酚、抗坏血酸和抗坏血酸基-脂肪酸衍生物,和常用于稳定饮食油的其它抗氧化剂,诸如迷迭香提取物。所述油此外可能包装在容器中,所述容器使向氧、热和入射光的暴露最小化。这些条件将通过阻止或限制双键的氧化和异构化而特别地增强SPM和SPM前体的稳定性。大批(bulk)油或配制油的稳定性也将受益于这些条件,因为SPM和SPM前体被溶解在油中,所述油含有显著水平的对氧化敏感的PUFA。

[0128] 所述补剂和制剂还可能包括一种或多种活性成分诸如阿司匹林、其它的非甾体类抗炎药、维生素、抗氧化剂、类黄酮、矿物质、痕量元素、脂肪酸、番茄红素、S-腺苷基甲硫氨酸、橄榄油刺激醛、白藜芦醇、紫檀芪、生物活性蛋白和肽诸如菠萝蛋白酶、寡糖、硫代葡萄糖酸盐和植物提取物诸如齿叶乳香(*Boswellia serrata*) ,山竹子、辣椒、姜黄根、姜、茶叶、印度楝树(neem) 和/或柳树树皮提取物。成分不限于这里提及的例子。

[0129] 可以制备特定营养补剂以支持特定健康状况,包括鱼油、磷虾油或长链 $\omega$ -3PUFA浓缩物,其补充了含有SPM或SPM前体的油,以及葡糖胺和软骨素(用于关节炎),或补充了锌、叶黄素和玉米黄素(用于眼健康)。

[0130] 包含含有SPM和SPM前体的油的其它营养补剂是多维生素制剂、运动营养物、强化的鱼油胶囊剂、口腔健康护理产品诸如牙膏和漱口液、和用作食品(诸如糊状食品、调味品、烹饪油、零食、营养饮料、软凝胶、口香糖和在婴儿配方中的)的特殊油。

[0131] 本文描述的油可能与一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂一起包含,以制备可以通过多种途径施用的药物制剂,所述途径包括口服、直肠、阴道、局部、透皮、舌下、皮下、静脉内、肌肉内、吹入法、鞘内和鼻内施用。用在本发明中的合适制剂可以参见:Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, Pa., 第17版(1985)。

[0132] 可以将活性成分与赋形剂混合,用赋形剂稀释,和/或装入例如胶囊、小药囊、纸或其它容器形式的载体内。当赋形剂用作稀释剂时,它可以是固体、半固体或液体物质,用作活性成分的溶媒、载体或介质。所述制剂可以是以下形式:片剂、丸剂、散剂、锭剂、小药囊、扁囊剂、酏剂、混悬剂、乳剂、溶液剂、糖浆剂、气雾剂(固体或在液体介质中)、软膏剂、软和硬明胶胶囊、栓剂、无菌注射溶液、用于鼻内施用的无菌液体(例如,喷雾装置)或无菌包装粉末。制剂还可包括:润滑剂例如滑石粉、硬脂酸镁和矿物油;湿润剂;乳化剂和助悬剂;防腐剂例如苯甲酸甲酯和苯甲酸羟基丙酯;甜味剂和矫味剂。可以配制本发明的补剂和制剂,从而在通过采用本领域已知的规程施用给患者以后提供活性成分的快速、持续或延迟释放。

[0133] 为了制备固体制剂诸如片剂,将所述油与药物赋形剂混合以形成固体预制剂组合物,其含有化合物的均匀混合物。可将片剂或丸剂包衣或以其它方式复合,得到提供长效作用优点的剂型。例如,片剂或丸剂可以包含内剂量和外剂量组分,后者是前者的外壳形式。两种组分可被肠溶层隔开,所述肠溶层用于阻止在胃中崩解,以使内组分完整通过十二指肠或延迟释放。多种物质可用于此类肠溶层或包衣,此类物质包括多种高分子酸,和高分子酸与诸如虫胶、鲸蜡醇和醋酸纤维素等物质的混合物。

[0134] 液体形式的制剂包括混悬液和乳剂。所述制剂可以被包囊,制备成胶体,引入脂质体的腔中,或掺入脂质体的层中。液体制剂也可以由油本身组成,所述油可以被包囊。

[0135] 优选地将所述油配制在活性油和它的成分的单位剂型中。给受试者或患者施用的

量将随以下因素变化：施用的内容、施用的目的（诸如预防或治疗）、受试者或患者的状态、施用方式等，它们都是在合格的医师、营养学家和药剂师的技能范围内。在治疗用途中，以足以治愈或或至少部分地抑制疾病及其并发症的征状的量，将制剂施用给已患疾病的患者。对于该应用而言的有效量将取决于所治疗的疾病状态和主治临床医师的判断，该判断取决于诸如疾病的严重程度、患者的年龄、体重和一般状况等。

[0136] 特定药物制剂可以是：口服摄入用于治疗具有炎症性组分的疾病的包囊油，持续释放制剂，用于治疗痤疮、银屑病、湿疹、红斑痤疮等的局部制剂，基于乳化油的静脉内制剂（其可用作临床营养物和胃肠外药物），脂质体制品，和组织靶向的递送系统，吸入制剂，和可以注射进中枢神经系统中的制剂。

[0137] 另一个实施方案是含有SPM和SPM前体且具有抗炎或刺激消退活性的油制剂，其作为化妆品、美容产品和营养化妆品。这些制剂包括化妆产品、皮肤湿润剂、和特殊局部乳膏剂诸如晒斑和晒黑软膏剂。具体地，所述油是抗炎性的和刺激消退性的，且含有SPM和SPM前体，可能构成抵消施用部位处的刺激和炎症的化妆品。

#### [0138] 使用方法

[0139] 本发明表征了治疗具有炎性病症或具有炎症性组分的疾病的受试者（例如，人类、狗、猫、马、牛、山羊、猪、鱼和其它动物）的方法，所述方法包括：以有效地治愈、治疗和/或减轻受试者中的炎症的量和剂量计划，给所述受试者施用本文描述的油、补剂和制剂中的一种或多种。含有SPM和/或SPM前体的油的治疗用途主要涉及许多可能的失调、障碍和疾病（其在它们的病原学或征状中包括炎症方面）中的任一种的治疗或预防。此外，所述用途可以包括据报道通过增加的EPA/DHA或鱼油摄取会改善的病症和疾病（例如，高甘油三酯血症、心律失常或抑郁症）。炎性病症的例子包括心血管疾病（例如，动脉粥样硬化、高血压、高胆甾醇血症、高甘油三酯血症、内皮低反应性、心脏梗塞、脑卒中）、代谢综合征的方面（例如，胰岛素敏感性的损失、肥胖、脂肪肝、胆汁淤积）、神经变性疾病（阿尔茨海默氏病、帕金森病、多发性硬化、失用症）、特应性反应/变态反应、癌症、骨关节炎、类风湿性关节炎、炎症性疼痛、痤疮、银屑病、红斑痤疮、哮喘、急性肺损伤、慢性阻塞性肺疾病、囊性纤维化、脓毒症、变应性鼻炎、鼻窦炎、牙周炎、炎性肠病、克罗恩氏病、黄斑变性、干眼综合征、胃溃疡形成、癌症和自身炎症性障碍。本文描述的油也可以适合用于治疗不同形式的急性和慢性疼痛以及对物理和化学刺激的超敏反应。本文描述的油也可能用于治疗由血管生成调节异常、血小板聚集和凝固、骨生长、组织愈合、血压调节、血细胞生成和脂质体内稳态造成的病症。本文描述的油也可能用于减轻炎症的肉眼可见的和身体的征象，诸如肿胀、水肿、发红、发热、疼痛和炎症性疾病。

[0140] 由于它们含有具有抗炎和促消退活性的长链 $\omega$ -3PUFA-衍生的脂质介质，本文描述的油此外可以避免增加长链 $\omega$ -3PUFA的组织水平的需要，这些物质可以在饮食补充以后在受试者体内从它们形成。

[0141] 本文描述的油也可能施用给具有增加的或异常的炎性标志物水平的受试者，所述炎性标志物是诸如高敏C-反应蛋白(hs-CRP)、血清淀粉样蛋白A、红细胞沉降率、可溶性粘附分子（例如，E-选择素、P-选择蛋白、细胞内粘附分子-1、血管细胞粘附分子-1）、细胞因子（例如，白介素-1 $\beta$ 、-6、-8和-10和肿瘤坏死因子- $\alpha$ ）、纤维蛋白原和/或活化的白血细胞（例如，具有增加的还原氧和氮物质产生速率的白细胞；非球形嗜中性粒细胞，和具有增加

的空泡形成的单核细胞)。在这点上,本发明的补剂和制剂可能用于使这些炎症性标志物中的一种或多种的水平降低至少99%、95%、90%、80%、70%、60%或50%;或将这些水平降低至认为正常的范围内。

[0142] 所述补剂和制剂也可以施用给受试者来预防炎症。

[0143] 实施例

[0144] 实施例1:通过工业规模超临界流体色谱法对 $\omega$ -3PUFA乙酯油的分级分离允许富集SPM的酯化前体和制备具有不同抗炎活性的不同油级分。

[0145] 为了评价在用于工业规模制备EPA-乙酯和DHA-乙酯浓缩物的超临界流体色谱法(SFC)中得到的不同脂肪酸-乙酯油级分的抗炎活性,建立了皮下无菌炎症的鼠模型,其允许测量口服地施用的油级分对炎症应答的促炎症阶段的影响。通过含有70%的组合的EPA-EE和DHA-EE的中间体长链 $\omega$ -3脂肪酸-乙酯浓缩物的分级分离,通过工业规模SFC生产了8个连续洗脱的油级分,所述浓缩物又通过工业规模超临界流体萃取(SFE)得到。以下述方式进行SFC分级分离。给预先用氮气覆盖的原料罐装入长链 $\omega$ -3PUFA乙酯浓缩物。如果必要的话,将罐内容物加热,并使温度稳定在大约20-40°C之间。通过使油穿过色谱柱,对油进行逐批处理。泵送重量在7.5-9.5kg之间的油体积,调节压力和温度在约110-135巴和20-40°C。同时在110-130巴和43.5-45.5°C之间泵送二氧化碳。将2个流( $\omega$ -3浓缩物和二氧化碳)注射到色谱柱的头上,在98-102巴之间的压力和43.5-45.5°C之间的温度流入。利用构成要通过色谱柱(其填充了改性硅胶固定相)分离的油的组分的保留差异,收集不同的级分。单个分级分离运行的总洗脱时间是40-85分钟。将洗脱物收集于在2-20分钟之间持续的连续洗脱级分中。流动相(超临界二氧化碳)和进料( $\omega$ -3浓缩物)之间的比率是600-850Kg溶剂/Kg进料。

[0146] 为了引发炎症,将大肠杆菌脂多糖(LPS;血清型127:B8,通过三氯乙酸萃取进行纯化,Sigma-Aldrich)作为单次剂量(5毫克/千克,在200微升体积的无菌盐水中)皮下进小鼠(9周龄且重量为大约30克的CD1小鼠,购自Charles River company)的背后侧。通过嗜中性粒细胞酶髓过氧化物酶对鲁米诺的转化发射的生物发光(Gross,2009),非侵袭性地测量嗜中性粒细胞向炎症部位中的浸润,从而允许评估在6小时时间段内的炎症性变化。炎症皮下模型的采用允许嗜中性粒细胞活性的可再现的生物发光测量,以便能够在试验物施用后测量嗜中性粒细胞活性的统计上显著的变化。在使用LPS之前30分钟,通过反映口服施用途径(口服(p.o.))的管饲法,施用100微升媒介物对照(无菌盐水)、吲哚美辛(剂量:10毫克/千克)、或通过SFC得到的8种油级分之一。使用非甾体类抗炎化合物吲哚美辛作为阳性对照,以证实可以抑制由LPS诱导的炎症应答。图1A-H显示了通过中间体长链 $\omega$ -3脂肪酸-乙酯浓缩物(含有70%的组合的EPA-EE和DHA-EE)的工业规模SFC分级分离得到的一系列连续洗脱的油级分(分别编号1-8)对通过皮下(s.c)施用脂多糖(LPS)诱导的小鼠中皮下地发生的急性炎症性变化的影响。空心圆圈:通过皮下LPS诱导的炎症(n=40)。空心正方形:在皮下LPS之前30分钟口服10mg/kg的吲哚美辛(n=6)。空心三角形:100微升的分别在图A-H中描绘的每种油级分编号1-8,各自在LPS之前30分钟通过管饲法施用1次(每个试验的油级分,n=6)。值为平均值土平均值标准误差。如下指示炎症中的统计上显著的差异(Student氏t-检验;P<0,05):\*(在LPS之前施用的油级分相对于在LPS之前施用的媒介物),#(在LPS之前施用的吲哚美辛相对应于在LPS之前施用的媒介物),和†(在LPS之前施用的油级分相对应于在LPS之前施用的媒介物)。

LPS之前施用的吲哚美辛)。

[0147] 如在图1中所示,与接受盐水来替代吲哚美辛的小鼠( $n=40$ )相比,吲哚美辛在3小时之后将LPS诱导的炎症抑制了26%,且在6小时之后抑制了44% (独立观察的数目 $n=40$ )。重要的是,含有高水平的长链 $\omega$ -3PUFA-乙酯的乙酯油的SFC分级分离,允许生产在口服施用以后对炎症具有显著不同活性的不同油级分(对于每种试验的油级分, $n=5$ )。3种油级分在口服施用以后诱导了抗炎作用。油级分1在LPS诱导的炎症开始以后3小时使炎症显著减少了61%,且在6小时时减少了82% (图1A)。油级分7在3小时以后使炎症显著减少了49% (图1G)。油级分8在90分钟以后使炎症显著减少了66% (图1H)。油级分2、3、4和6没有显著改变LPS刺激的炎症应答(图1,分别是图B、C、D和F)。重要的是,几种油级分的抗炎作用具有比广泛使用的抗炎化合物吲哚美辛本身显著更高的效力,即油级分1和8。此外,油级分1的显著抗炎活性也指向刺激消退活性,其在6小时以后已经主动使嗜中性粒细胞性炎症应答恢复至接近无炎症状态。工业规模SFC分级分离允许得到足够的功能分化,使得一种油级分3在最早的时间点增强炎症,即在90分钟超过嗜中性粒细胞活性的倍增,此后嗜中性粒细胞性应答程度正常化至在媒介物治疗的动物中观察到的应答。这指出,该油可以促进对细菌传染性刺激的更快速炎症应答。总之,结果证实,通过富含长链 $\omega$ -3PUFA的油的分级分离,可能获得对炎症应答具有不同活性的油级分,并且在口服施用以后得到具有显著抗炎活性的油级分。

[0148] 针对它们的SPM生物合成前体以及SPM本身的相对或绝对水平,分析了已经评价它们的抗炎活性的相同油级分。通过加入丁羟甲苯将所有油稳定化,以便避免非故意氧化。用于分离SPM及其前体的油级分的液-液萃取没有揭示可测量水平的PUFA的任何单-、二-和三-羟基化的衍生物(诸如EPA、DHA或AA)的存在。但是,当通过碱性水解(10M NaOH,搅拌,3小时,在20°C)而水解油时,检测到显著数目的从EPA、DHA和AA衍生出的脂质介质。图2显示了在中间体长链 $\omega$ -3脂肪酸-乙酯浓缩物(含有70%的组合的EPA-EE和DHA-EE)的工业规模SFC分级分离的连续洗脱的油级分中,多不饱和脂肪酸EPA和DHA的不同单羟基化衍生物的乙酯化和可皂化形式的相对丰度。编号1-8的级分与如在图1中所示的试验抗炎活性的那些相同。值为与每种PUFA衍生物对应的离子跃迁的质谱记录的峰面积的双份测量的平均值。在这些油级分中没有发现可测量水平的相同PUFA衍生物的对应游离脂肪酸形式(缩写:HEPE,羟基-二十碳五烯酸;HDHA,羟基-二十二碳六烯酸)。由于这些油级分源自于EPA-EE和DHA-EE的工业规模浓缩和纯化中采用的乙酯化油,测量的脂质介质是乙酯本身。几种测量的化合物被称作SPM形成的中间体前体,诸如4-羟基-二十二碳六烯酸(4-HDHA;4-羟基-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-二十二碳六烯酸)和18-羟基-二十碳五烯酸(18-HEPE;18S-羟基-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-二十碳五烯酸)。18-HEPE是E-系列消退素的形成的前体,且已知4-HDHA在血管增生性视网膜病变中具有抗炎和组织保护作用,并且可以充当4-HDHA-衍生的SPM的前体。各种测量的SPM前体有差别地分布在通过SFC得到的不同油级分中。该观察结果指示,常用的含有 $\omega$ -3PUFA的油的分级分离可以允许制备这样的油:其含有不同PUFA-衍生的脂质介质的确定存在、组合和水平。

[0149] DHA的一种衍生物,17-羟基-二十二碳六烯酸(17-HDHA;17-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-六烯酸),作为SPM生物合成的前体(即作为具有有效的抗炎和消退炎症生物活性的D-系列消退素RvD1、RvD2、RvD3和RvD4的形成的中枢前体)是重要的。图3A显

示了中间体长链 $\omega$ -3脂肪酸-乙酯浓缩物(含有70%的组合的EPA-EE和DHA-EE)的工业规模SFC的几种连续洗脱的油级分中的17-HDHA乙酯的浓度,所述油级分对应于如在图1和2中所示的相同级分。使用内部标准品和LC-三级四极杆质谱法,定量作为连续洗脱的SFC油级分中的可皂化物质的17-HDHA-乙酯。值为平均值土平均值标准误差( $n=3$ 个单独的色谱分离,一式两份地测量)。结果表明,17-HDHA-乙酯被富集在第一洗脱级分中,达到大约110mg/1(0.01% w/v)的浓度。在这些级分中没有发现可测量水平的对应游离脂肪酸形式的17-HDHA。在几批SFC-分级分离的该中间体长链 $\omega$ -3脂肪酸-乙酯浓缩物(其通过工业规模超临界流体萃取(SFE)来生产)的第一油级分中的17-HDHA水平的测量已经指示,在该级分中的17-HDHA的浓度范围位于30-110mg/1的范围内。这表明,可以设计特定工业规模分级分离步骤以将特定SPM和SPM前体富集进确定的油级分中。

[0150] 重要的是,确定存在于富含 $\omega$ -3PUFA的油中的这些SPM前体具有天然起源如这些物质溶解在其中的PUFA-乙酯本身。为此目的,进行了发现在级分编号1中富集的17-HDHA-乙酯的手性高效液相色谱法-三级四极杆质谱分析,以便确定立体异构体17S-HDHA和17R-HDHA的相对丰度(上图)。这里分析的油级分编号1与在图1、2和3A中所示的油级分编号1相同。观察的脂质介质与立体异构体的真实合成标准品(下图)的共迁移的评价以及通过三重四极杆质谱法对特定质量跃迁的选择性离子监测指示,级分1中的17-HDHA-乙酯是天然的S立体异构体。下图显示了17-HDHA、14-HDHA、7-HDHA和4-HDHA的立体异构体的真实合成标准品的保留时间。这里也显示了4-HDHA主要作为天然的S立体异构体存在。化学氧化不会引起存在于油级分1中的17-HDHA和4-HDHA,因为所述产物不是外消旋的。由于单羟基化的PUFA的S-立体异构体是由大多数脂氧合酶形成的天然形式的异构体,所以该油级分中的该立体异构体的存在指示,17-HDHA和4-HDHA具有天然起源,并且在整个工业过程中与长链 $\omega$ -3PUFA一起共提取和共纯化,直到进行SFC分级分离的步骤。此外,通过分离技术(诸如这里显示的超临界流体色谱法)实现的分级分离允许将天然起源的SPM和SPM前体选择成特定油级分的分级分离。

[0151] 关于17-HDHA,因此可能解释油级分1的抗炎活性(显示在图1A中),至少部分地由于该抗炎SPM前体向该油级分中的选择性富集。为了确定17-HDHA的抗炎作用和贡献,在众所周知的无菌炎症模型中确定了级分1的抗炎效应。图4显示了通过管饲法施用的油级分编号1在腹膜炎症的鼠模型中的抗炎效应,所述鼠模型通过腹膜内施用酵母膜提取物酵母多糖A来诱导。确定炎症开始以后4小时炎症性渗出物中的特定炎症细胞群体的选择性变化。在腹膜内注射0.1mg酵母多糖A之前30分钟,通过管饲法施用媒介物(100微升无菌盐水)、100微升油级分1或在无菌盐水中的1微克合成的17S-HDHA(Cayman Chemicals)。这里分析的油级分1与在图1、2和3中所示的级分编号1相同。4小时以后,回收炎症性渗出物,并通过采用特定荧光地标记的抗体的荧光活化细胞分选,确定炎症细胞的数目的变化和类型。值为67只单独小鼠的平均值土平均值标准误差。为了对比在用油级分1处理以后得到的炎症性渗出物细胞数目或与媒介物治疗的小鼠进行对比,用\*( $P<0.05$ )或#( $P<0.10$ )指示统计上显著的差异(Student氏t-检验)。如在图4中所示,油级分1的施用显著地降低了渗出物细胞的总数和多形核白细胞(PMN)的数目。通过口服施用(管饲法)17S-HDHA,再现了该抗炎效应。没有测量到单核细胞、巨噬细胞或淋巴细胞的统计上显著的变化。结果指示,在口服施用含有大约100mg/1(10微克在100微升中)17S-HDHA-乙酯的油级分1以后,抗炎效力非常类

似于合成的17S-HDHA的抗炎作用。此外,结果表明,油级分1在口服施用以后在2个不同的急性炎症小鼠模型(即酵母多糖引发的腹膜炎和由脂多糖诱导的皮下炎症)中具有全身性抗炎效力。

[0152] 实施例2:SPM和SPM前体在天然起源油中的存在

[0153] 图5A显示了2种消退素(消退素D1和消退素D2)作为可皂化物质在得自秘鲁鲹鱼的粗制“1812”鱼油中的存在。该油是含有大约18%EPA和12%DHA的普通原料。鲹鱼“1812”(18/12是指含有18%EPA和12%DHA的油)油是这样的 $\omega$ -3鱼油:其当前以最大体积在世界范围内用于制备具有增加的 $\omega$ -3PUFA EPA和DHA水平的精制鱼油和鱼油浓缩物。该油主要由甘油三酯组成,从而指示RvD1和RvD2可能主要在甘油三酯内被酰化。可替换地,或部分地,这些消退素也可以在存在于该油中的甘油二酯或甘油单酯、磷脂酸、磷脂或其它酯或酰胺物质内被酰化。在该油中没有发现可测量水平的游离羧酸形式的RvD1或RvD2。色谱图表明,已知具有非常有效的抗炎和刺激消退活性的SPM存在于含有长链 $\omega$ -3PUFA的油中,所述油被广泛地用在制备作为营养补剂和药物成分的含有长链 $\omega$ -3PUFA的油的工业中。

[0154] 得自不同的含有长链 $\omega$ -3PUFA的生物体的油的并行对比证实,17-HDHA作为可皂化物质存在于得自鲹鱼、鲔鱼、磷虾和藻类的油中,如在图5B中所示。证实了2种不同的粗制鲹鱼油(其通常用作用于制备含有EPA和DHA的鱼油和EPA-和DHA-乙酯浓缩物的起始原料)含有17-HDHA(18/12是指含有18%EPA和12%DHA的油,22/08是指含有22%EPA和8%DHA的油)。这2种示例性的粗制油含有至多30%的组合的EPA和DHA,但是在这里证实了这样的油也含有SPM前体17-HDHA。鲔鱼、磷虾和藻类油(由于它们的EPA和DHA含量也被广泛地用作饮食添加物)中的17-HDHA的测量结果证实,这些油也含有显著水平的17-HDHA。也在这些油中,测量的17-HDHA以可皂化物质形式存在,从而指示SPM前体的酰化性质。鲔鱼、磷虾和藻类油是商购可得的油。鲔鱼油是鲔鱼肝油。藻类油是得自甲藻Peridiniida目的含有DHA的藻类油。具体地,这些磷虾和藻类油提取自这样的生物体:其由于它们的相对较高的DHA含量而被故意地捕获或培养,并且在这里证实了其与测量的鱼油相比含有相对较高水平的17-HDHA。D-系列消退素的该前体的存在证实,可以生产具有确定的SPM或SPM前体水平的油,并且这样的油可以用于制备其中进一步富集这些化合物的油。

[0155] 许多SPM和SPM前体在得自鱼、藻类和磷虾的油中的存在的定性描绘,证实了特定SPM和SPM前体在所述油中的存在(图5C)。通过采用诊断跃迁和与商购可得的脂质介质标准品的共洗脱的液相色谱法-串联质谱法,测量了不同的SPM和SPM前体。检测到的所有化合物对应于存在于油中的可皂化物质,并且没有呈它们的游离羧酸形式的对应化合物是可测量的。例如,EPA-和DHA-衍生的单羟基化的SPM前体和SPM都存在于2种鱼油中,诸如精制的“18/12”鲹鱼油(含有18%EPA和12%DHA)和乙酯化的鲔鱼肝油。相反,DHA-衍生的脂质介质在从藻类提取的油中占优势,所述藻类由于它们的高DHA水平而进行培养。证实了磷虾油含有EPA-和DHA-衍生的单羟基化的脂质介质,但是EPA-衍生的化合物似乎比DHA-衍生的脂质介质更丰富。这也在有环氧化衍生物存在下得到反映,其中DHA-衍生的SPM 19(20)-环氧-二十二碳五烯酸(19(20)-EpDPE;19(20)-环氧-二十二碳-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-五烯酸)是藻类油中的主要环氧衍生物,且EPA-衍生的SPM 17(18)-环氧-二十碳四烯酸(17(18)-EpETE;17(18)-环氧-二十碳-5Z,8Z,11Z,14Z-四烯酸)和11(12)-环氧-二十碳四烯酸(11(12)-EpETE;11(12)-环氧-二十碳-5Z,8Z,14Z,17Z-四烯酸)在磷虾油中占优势。可以鉴别

感兴趣的次要组分,诸如针对其中发现存在双羟基化的DHA-衍生的脂质介质10S,17S-二羟基-二十二碳六烯酸(10S,17S-二HDHA;10S,17S-二羟基-二十二碳-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-六烯酸),以及7,17-二羟基-二十二碳五烯酸( $\omega$ -3)(7,17-二HDPA( $\omega$ -3);(7S,17S-二羟基-二十二碳-8E,10Z,13Z,15Z,19Z-五烯酸( $\omega$ -3))的鲔鱼肝油进行证实。还在所有试验油中检测到二十二碳五烯酸( $\omega$ -3)、17-酮-二十二碳五烯酸( $\omega$ -3)(17-酮-DPA)的氧代衍生物。得自不同含有长链 $\omega$ -3PUFA的生物体的油因而具有就SPM和SPM前体而言显著不同的组成。因而可能基于PUFA-衍生的脂质介质的含量来区分得自含有长链 $\omega$ -3PUFA的生物体的油,并构成有价值的基础,在该基础上决定哪种油可能用于通过分离和提取方法进一步分级分离以得到具有一种或多种SPM和SPM前体的确定存在、组合和富集水平的油。

[0156] 实施例3:SPM和SPM前体的富集

[0157] 图6A显示了从EPA、DHA和二十二碳五烯酸(DPA  $\omega$ -3)衍生出的4种示例性氧合脂质介质选择性分级分离在不同的油级分中。通过SFC分级分离成8个连续油级分的起始原料是含有56%的组合的EPA-EE+DHA-EE的脂肪酸-乙酯油。该油对应于从海洋生物体的混合物提取的粗制油制成的长链 $\omega$ -3乙酯浓缩物,所述混合物包括海生鱼(鲱鱼、沙丁鱼、鲱鱼、西鲱、胡瓜鱼、鲑鱼、鲔鱼和鳀鱼)和软体动物(乌贼、章鱼和墨鱼)。以下述方式进行SFC分级分离。给预先用氮气覆盖的原料罐装入 $\omega$ -3脂肪酸乙酯浓缩物。如果必要的话,将罐内容物加热,并使温度稳定在大约20-40°C之间。通过使该油穿过色谱柱,对油进行逐批处理。泵送重量在9.0-12kg之间的油体积,调节压力和温度在约110-135巴和20-40°C。同时在110-130巴和43.5-45.5°C之间泵送二氧化碳。将2个流( $\omega$ -3浓缩物和二氧化碳)注射到色谱柱的头上,在98-102巴之间的压力和43.5-45.5°C之间的温度流入。利用构成要通过色谱柱(其填充了改性硅胶固定相)分离的油的组分的保留差异,收集不同的级分。单个分级分离运行的总洗脱时间是40-85分钟。将洗脱物收集于在2-20分钟之间持续的连续洗脱级分中。流动相(超临界二氧化碳)和进料( $\omega$ -3浓缩物)之间的比率是600-850Kg溶剂/Kg进料。

[0158] 连续洗脱的油级分含有不同水平的几种SPM和SPM前体(图6A),如12-羟基-二十碳五烯酸(12-HEPE;12-羟基-二十碳-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-五烯酸)、14-羟基-二十二碳六烯酸(14-HDHA;14-羟基-二十二碳-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸)、19(20)-环氧-二十二碳五烯酸(19(20)-EpDPE)和17-酮-二十二碳五烯酸( $\omega$ -3)(17-酮-DPA( $\omega$ -3))所例证的。值是得自2个独立工业规模分级分离运行的每个油级分的2个样品的平均值,一式两份地测量。将结果表示为相对于分级分离的油的富集百分比。发现EPA-衍生的单羟基化的脂质介质12-HEPE主要存在于第二级分中(图6A)。发现DHA-衍生的SPM前体14-HDHA主要存在于第一级分中。可以将14-HDHA进一步氧化以形成例如14,21-二羟基-二十二碳六烯酸,已知其具有有效的伤口愈合活性。还可以将14-HDHA进一步氧化成7S,14S-二羟基-二十二碳六烯酸(7S,14S-二羟基-二十二碳-4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-六烯酸),其在嗜中性粒细胞性炎症中具有抗炎活性。发现环氧化的脂质介质19(20)-EpDPE(其为具有抗炎性能的DHA的细胞色素P450衍生物)选择性地富集在稍后的洗脱级分中,特别是在级分5中。发现二十二碳五烯酸( $\omega$ -3)的一种氧代衍生物17-酮-DPA( $\omega$ -3)富集在级分3-7中。结果指示,通过长链 $\omega$ -3PUFA乙酯浓缩物的SFC分级分离,可以实现EPA、DHA和DPA( $\omega$ -3)的一种或更具体的氧合衍生物的富集。所述化合物对应于可皂化的材料,且在油级分中不可测量对应的游离羧酸。

[0159] 图6B显示了当进一步分级分离含有70%的组合的EPA-EE和DHA-EE的中间体长链

$\omega$ -3脂肪酸-乙酯浓缩物的第一SFC级分时,17-HDHA-乙酯的进一步富集。亚分级分离的油对应于图1-3所示的油级分1,且其在以前已经被发现含有富集水平的乙酯形式的D-系列消退素前体17S-HDHA(图3A)。通过SFC进一步分级分离成在0-2分钟(级分1A)、2-7分钟(级分1B)和7-12分钟(级分1C)洗脱的3个亚级分,得到向级分1B中的额外富集。值是3个亚级分中的17-HDHA-乙酯(平均值±S.D.)的相对水平。结果指示,通过采用特定分离方法诸如SFC,可以实现特定SPM前体的进一步富集。

[0160] 实施例4:含有富集水平的SPM前体的油的刺激消退活性

[0161] 参考图7,该图显示了含有SPM前体的油刺激的炎症的消退。确定油级分1的刺激消退的(促消退的)活性作为含有SPM前体的油级分活化炎症消退的能力的一个例子。图7显示了评价的结果,其中通过皮下纤维蛋白凝块的组织化学来测量炎症细胞数目的变化,所述凝块在通过皮下施用LPS引发的炎症应答过程中形成。在通过皮下施用LPS开始炎症之前30分钟,通过管饲法将100微升体积的油级分1或媒介物(无菌盐水)施用给小鼠。这里采用的LPS诱导的炎症是与在实施例1中解释的相同的模型。油级分1是含有70%的组合的EPA-EE和DHA-EE的中间体长链 $\omega$ -3PUFA-乙酯浓缩物的工业规模SFC分级分离的第一洗脱级分,且是在实施例1-3中试验的相同级分。该油级分1对应于图1-3中所示的级分1,并且在以前发现含有富集水平的乙酯形式的D-系列消退素前体17S-HDHA。在炎症应答过程中在不同的时间点(3、6、24和48小时)分离皮下纤维蛋白凝块,并用4%甲醛在4°C固定24小时。在组织脱水以后,制备用于4微米厚石蜡切片显微术的载玻片,并在改进的Wright-Giemsa中染色。通过显微术在400倍放大率在每种条件的至少3个组织切片的2个部分的全目镜视野中计数炎症细胞。值是3个单独小鼠在每个时间点的每个目镜视野的平均总炎症细胞计数(平均值±S.D.)。对照小鼠中的炎症细胞浸润在LPS施用以后24小时达到最大值,此后至48小时炎症自发地消退。在已经通过管饲法接受油级分1的小鼠中,通过LPS诱导的皮下炎症几乎完全消退(图7)。在这里证实了富集SPM-前体的油级分(其已经被证实对炎症应答的早期嗜中性粒细胞性促炎症阶段具有显著抗炎作用(图1,图A))在口服施用以后也具有显著的刺激消退的(促消退的)活性。

[0162] 应当理解,尽管已经结合其详细描述描述了本发明,但是前述说明书意在只是说明性的,并且不限制本发明的范围,本发明的范围由随后的权利要求的范围限定。其它方面、优点和改变是在下述权利要求的范围内。

[0163] 参考文献

[0164] Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 201, 5, 713-722, 2005.

[0165] Bannenberg, G.\*, Chiang N\*, Ariel A, Anta M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol.* 174, 7, 4345-4355, 2005. (\*共有第一作者)

[0166] Bannenberg, G. Serhan, C.N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim. Biophys. Acta.* 1801, 12, 1260-1273, 2010.

- [0167] Frank D.Gunstone&Fred B.Padley(Editors).Lipid Technologies and Applications,CRC Press,第1版,1997.
- [0168] Gladyshev MI,Sushchik NN,Makhutova ON.Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land.Prostaglandins Other Lipid Mediat.2013,Mar 14.
- [0169] Gross S,Gammon ST,Moss BL,Rauch D,Harding J,Heinecke JW,Ratner L,Piwnica-Worms D.Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo.Nat.Med.15,4,455–461,2009.
- [0170] Hong S,Tjonahen E,Morgan EL,Lu Y,Serhan CN,Rowley AF.Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins-Mediator lipidomic analysis.Prostaglandins Other Lipid Mediat.78,1-4,107–116,2005.
- [0171] Martinez,J.L. (Editor) .Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds,CRC Press,第1版,2007.
- [0172] Mas E,Croft KD,Zahra P,Barden A,Mori TA.Resolvins D1,D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3fatty acid supplementation.Clin.Chem.58,10,1476–1484,2012.
- [0173] Oh SF,Vickery TW,Serhan CN.Chiral lipidomics of E-series resolvins: aspirin and the biosynthesis of novel mediators.Biochim.Biophys.Acta.1811,11,737–747,2011.
- [0174] Petrie JR,Shrestha P,Zhou XR,Mansour MP,Liu Q,Belide S,Nichols PD,Singh SP.Metabolic engineering plant seeds with fish oil-like levels of DHA.PLoS One 7,11,e49165,2012.
- [0175] Pettitt TR,Rowley AF,Secombes CJ.Lipoxins are major lipoxygenase products of rainbow trout macrophages.FEBS Lett.259,1,168–170,1989.
- [0176] Raatz SK,Golovko MY,Brose SA,Rosenberger TA,Burr GS,Wolters WR,Picklo MJ Sr.Baking reduces prostaglandin,resolvin, and hydroxy-fatty acid content of farm-raised Atlantic salmon (*Salmo salar* ).J.Agric.Food Chem.59,20,11278–11286,2011.
- [0177] Remington.The Science and Practice of Pharmacy,Lippincott Williams& Wilkins,第21版,2005.
- [0178] Shahidi,F(Ed) ,Bailey's Industrial Oil and Fat Products,Vol.1-6,John Wiley&Sons Inc.,第6版,2005.
- [0179] Shearer GC,Harris WS,Pedersen TL,Newman JW.Detection of omega-3oxylipins in human plasma and response to treatment with omega-3acid ethyl esters.J.Lipid Res.51,8,2074–2081,2010.
- [0180] Wagner K,Inceoglu B,Hammock BD.Soluble epoxide hydrolase inhibition, epoxygenated fatty acids and nociception.Prostaglandins Other Lipid Mediat.96,1-4,76–83,2011.

[0181] Yang R, Chiang N, Oh SF, Serhan CN. Metabolomics-lipidomics of eicosanoids and docosanoids generated by phagocytes. Curr. Protoc. Immunol Ch.14, Unit 14, 26, 2011.

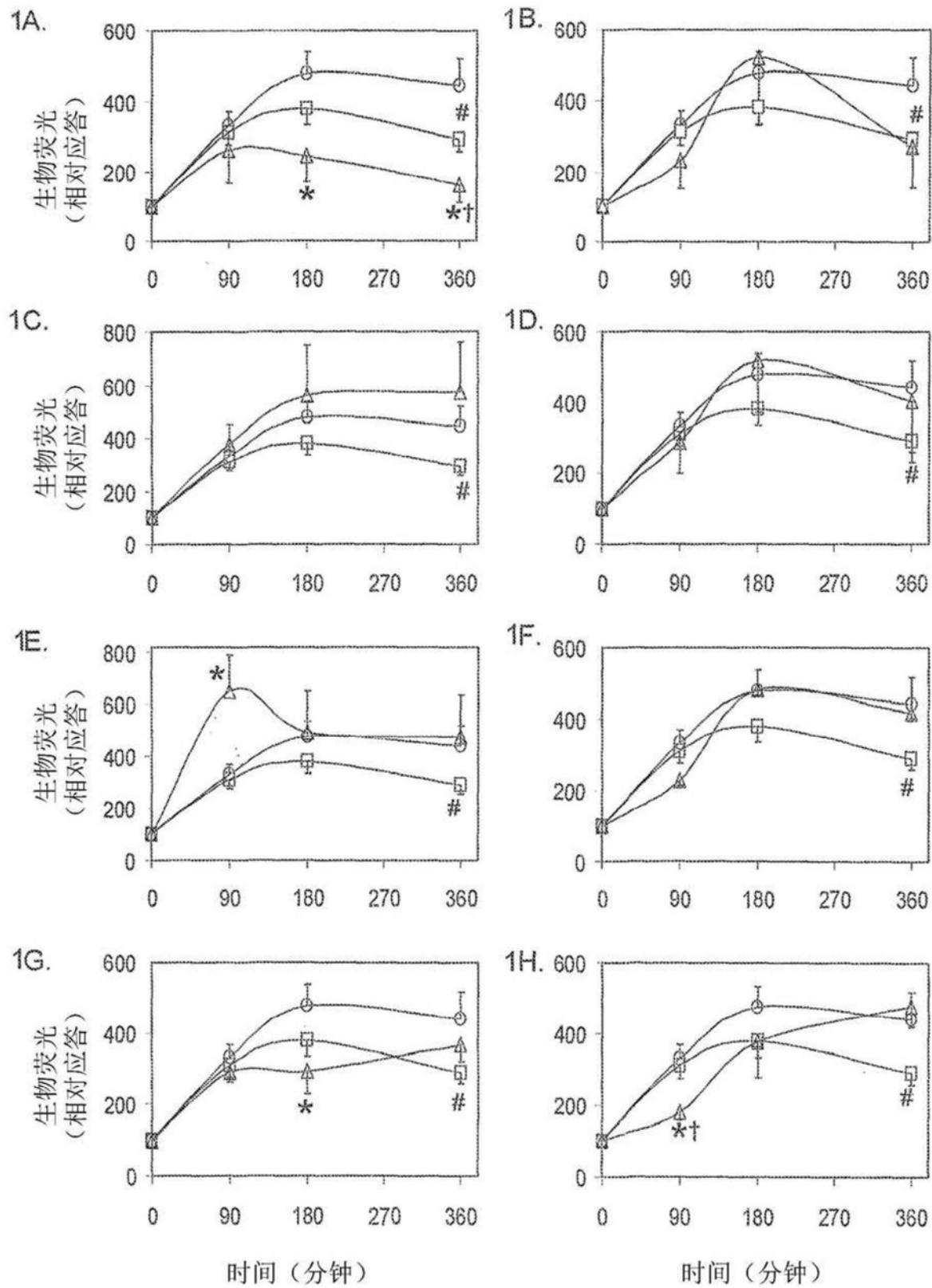


图1

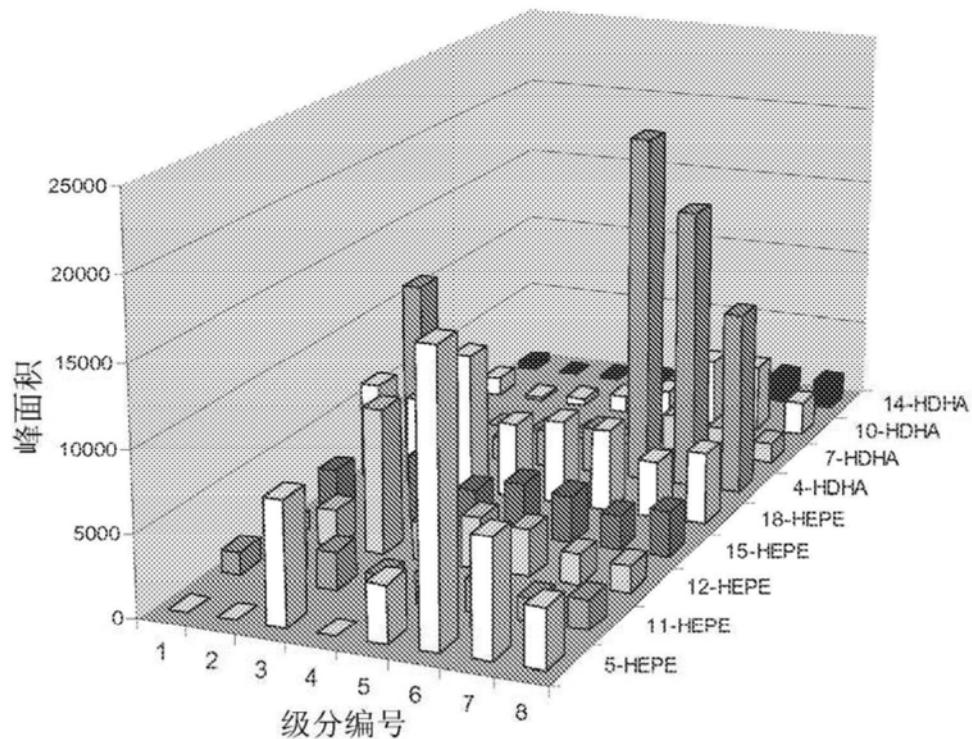


图2

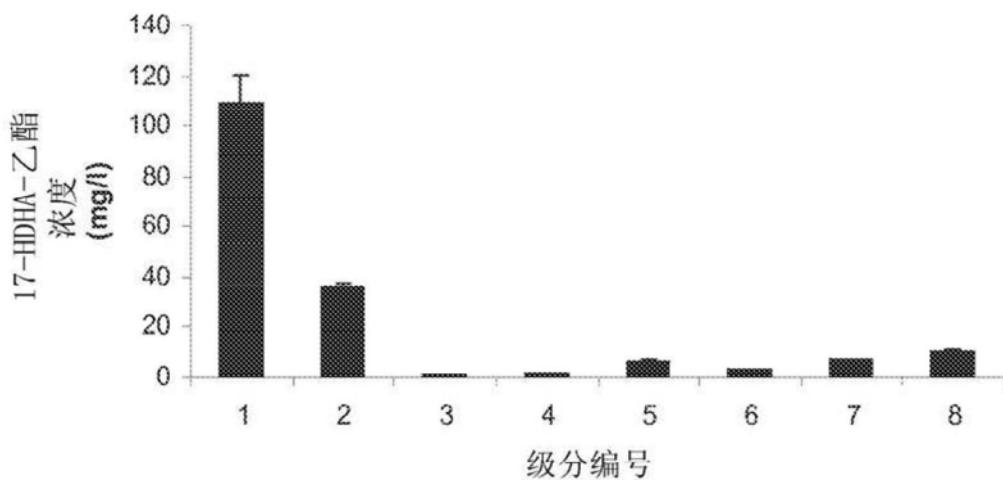


图3A

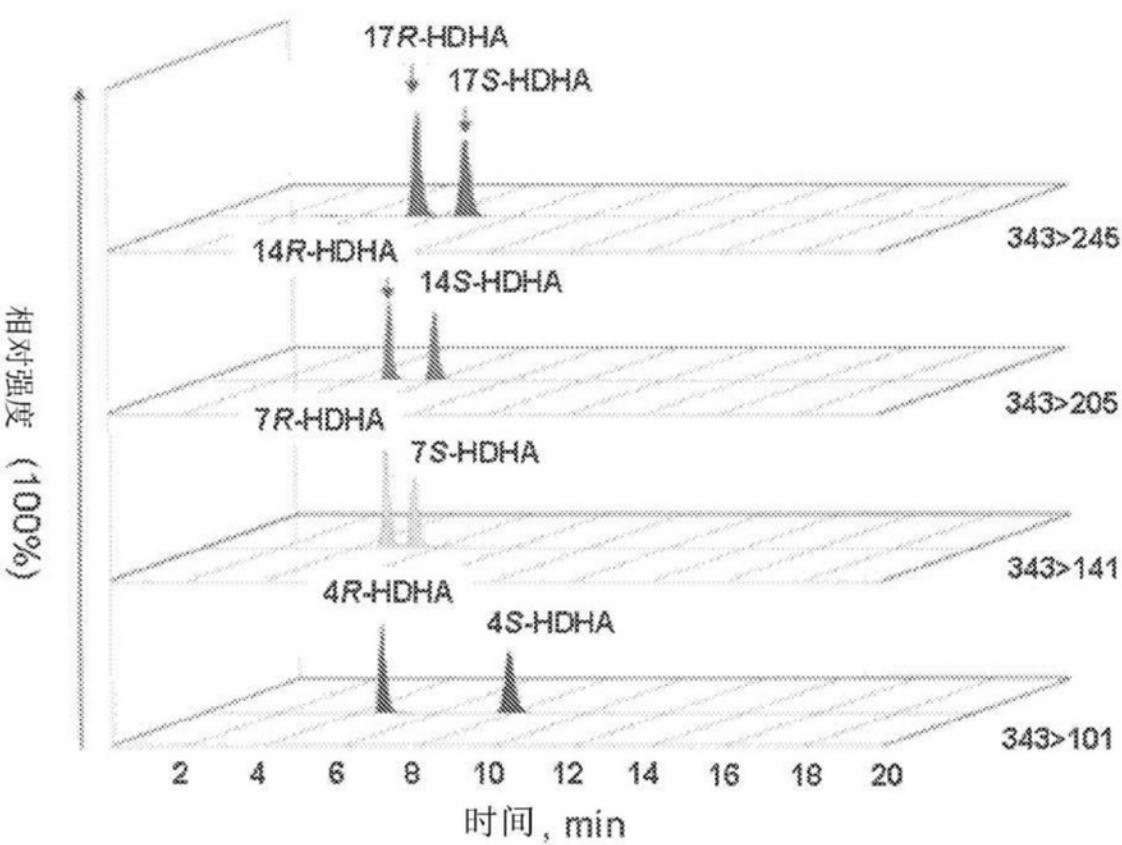
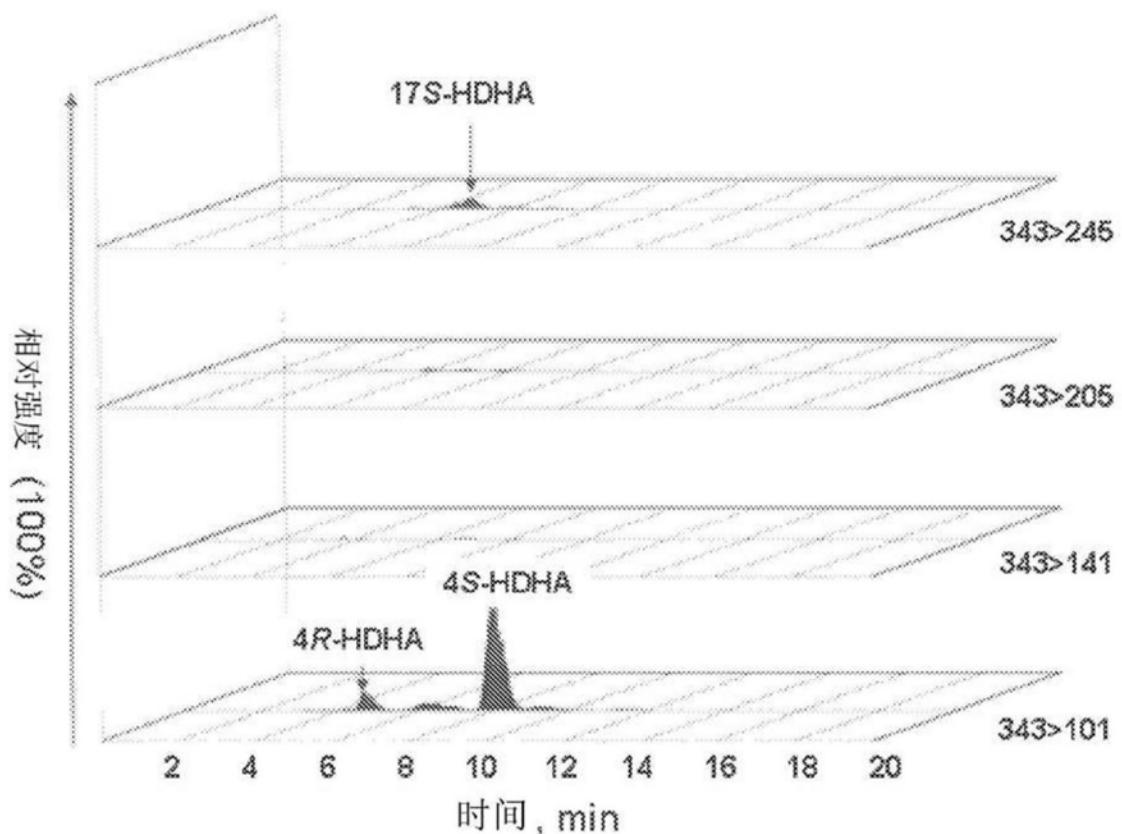


图3B

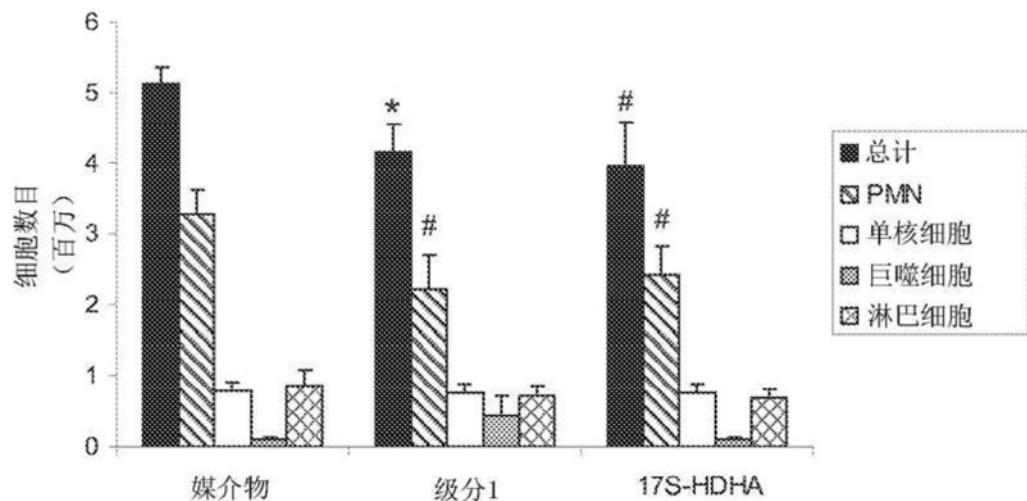


图4

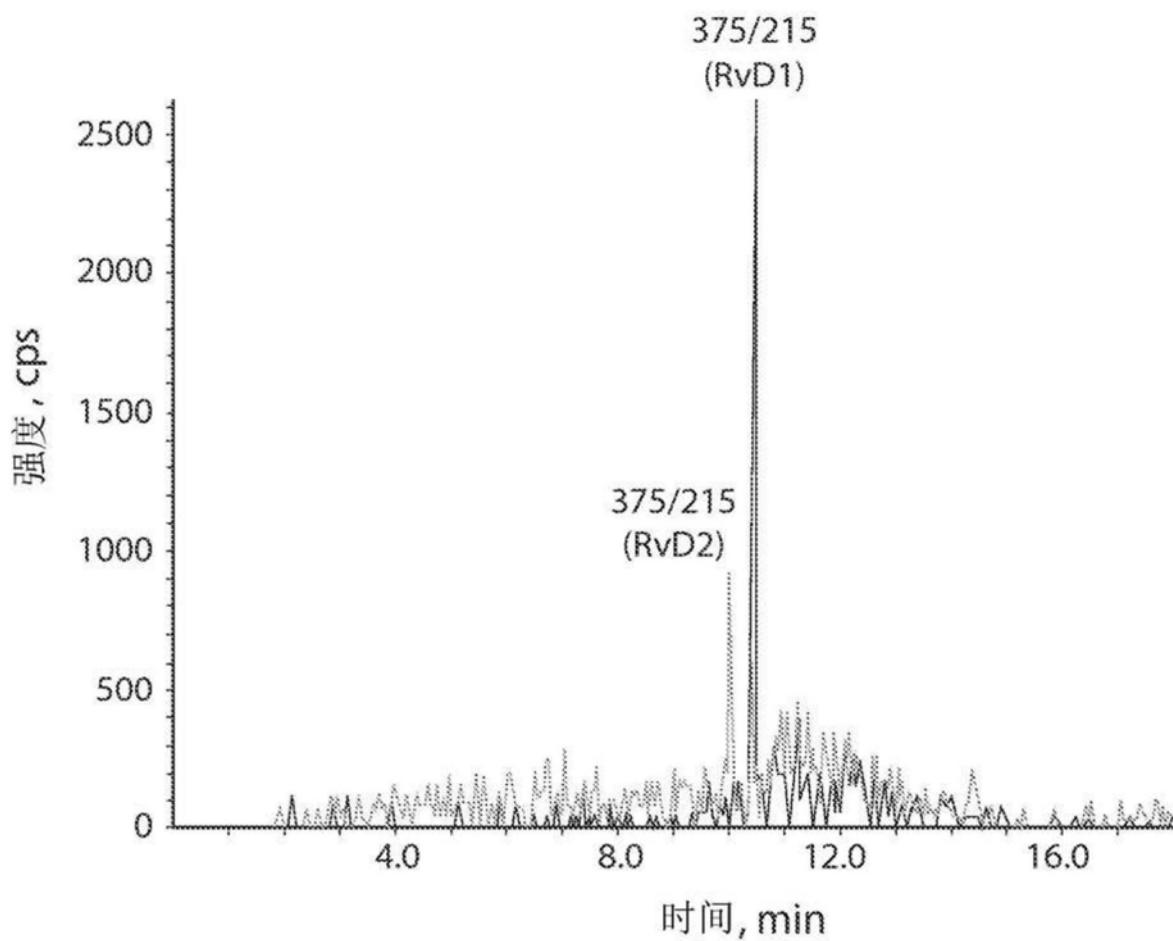


图5A

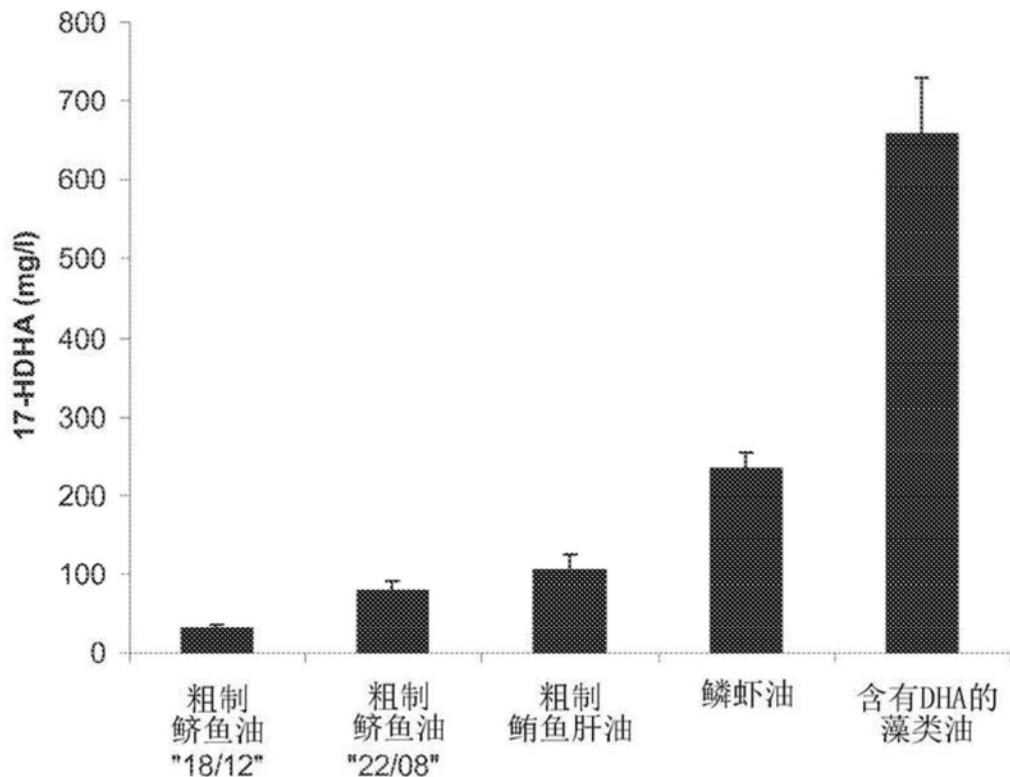


图5B

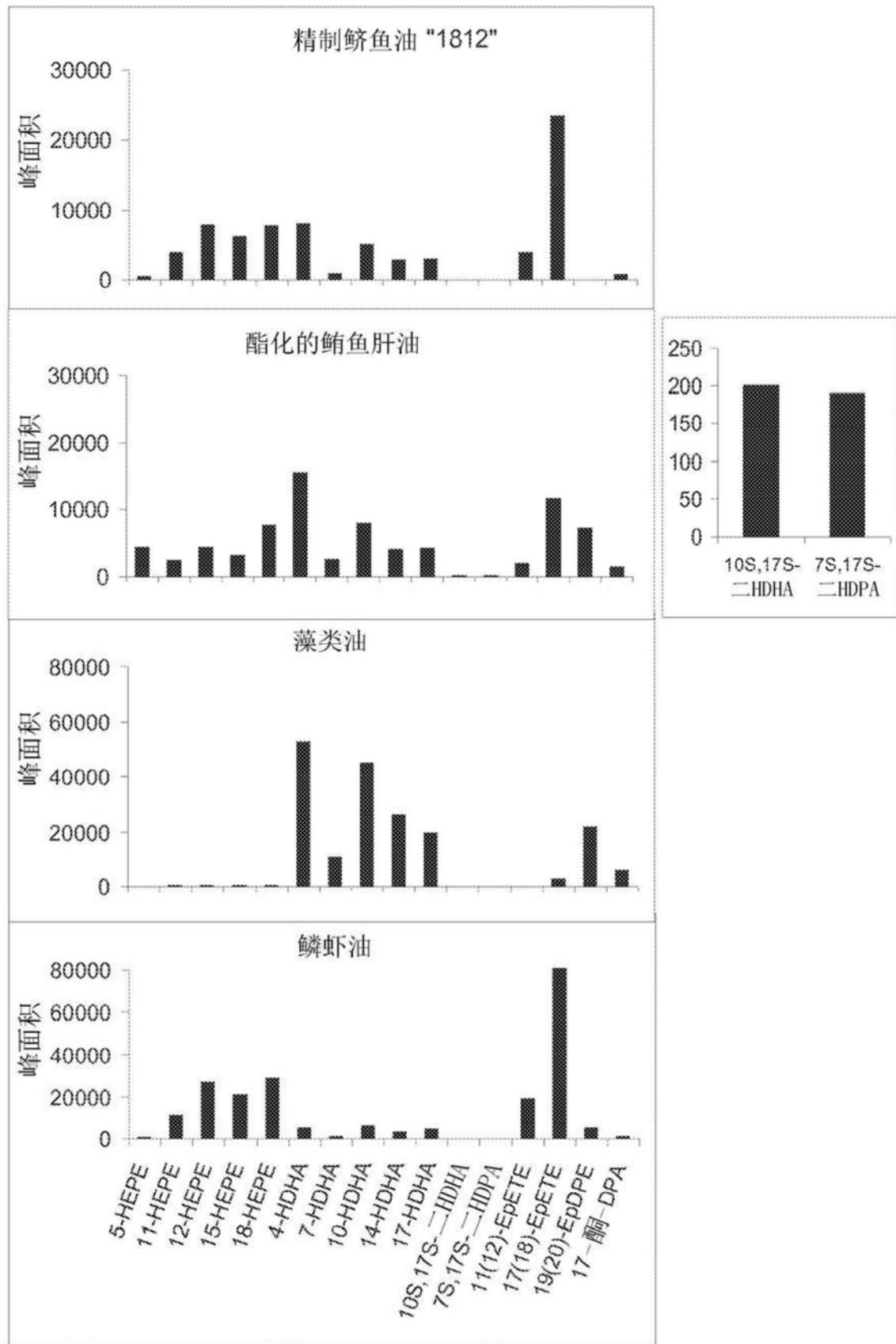


图5C

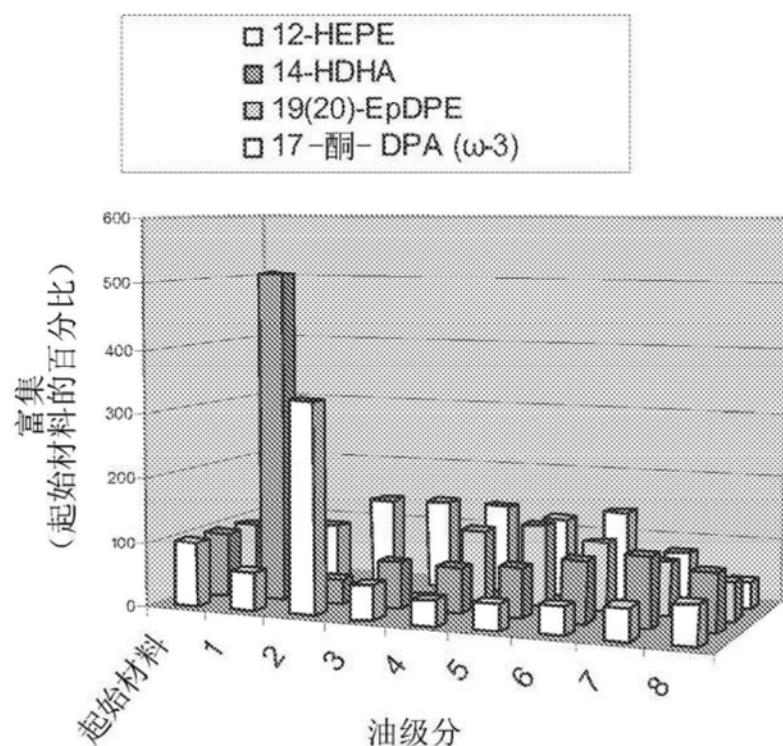


图 6A

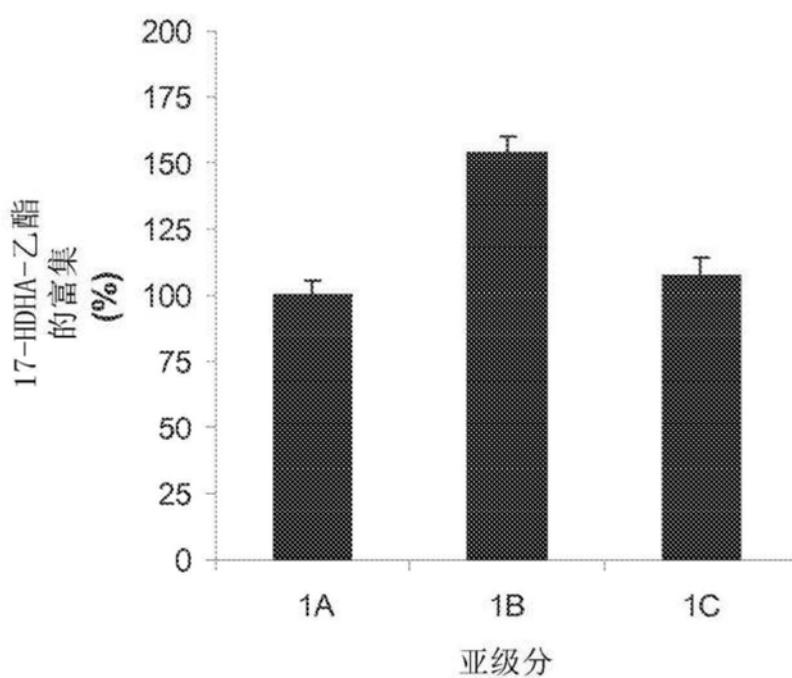


图 6B

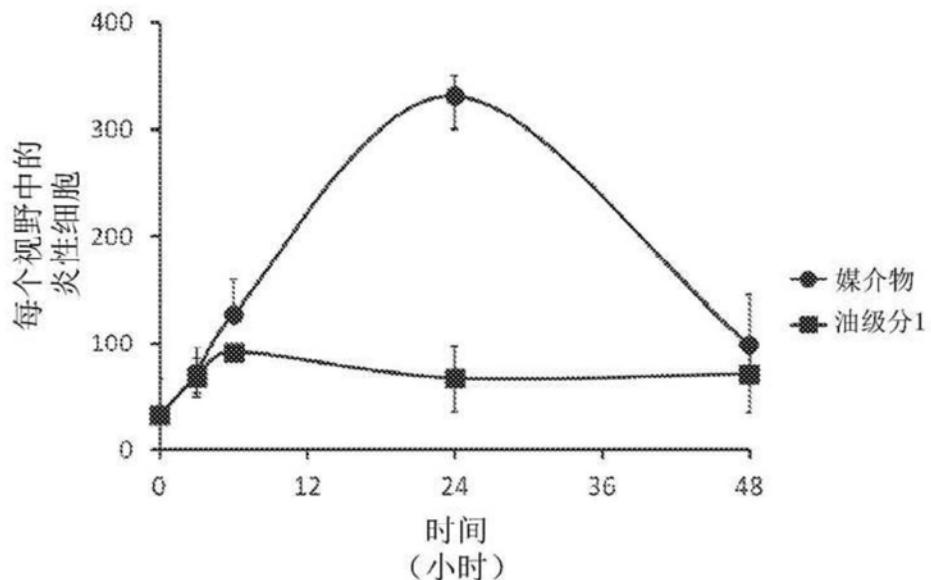


图7