

Efnasmíðar á handhverfuhreinum stöðubundnum díasyl afleiðum 1-*O*-alkyl-*sn*-glýseróla með ómega-3 fitusýrum

Carlos D. Magnússon, Anna Valborg Guðmundsdóttir og Guðmundur G. Haraldsson

Raunvísindastofnun Háskólans

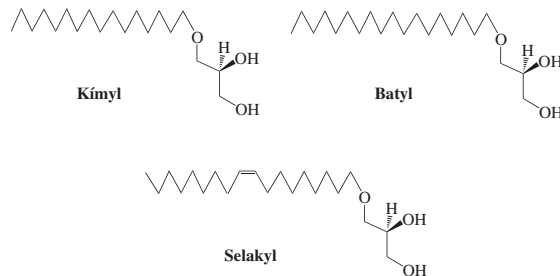
Vefútgáfa: 22. desember 2006

Ágrip – Handhverfuhrein eterlípið af gerð 1-*O*-alkyl-2,3-díasyl-*sn*-glýseróla skipað EPA eða DHA fitusýru í *sn*-2 stöðu og miðlungslangri, mettaðri fitusýru í *sn*-3 stöðu, hafa verið smíðuð úr handhverfuhreinu (*R*)-2,3-ísóprópyliden-*sn*-glýseróli. Lípasa ásamt hefðbundnum lífrænum aðferðum var beitt við innleiðingu fitusýra á glýseról hlutann. 1-*O*-alkyl-*sn*-glýseról með alkylkeðjunum hexadekyl, oktadekyl og *cis*-9-oktadekenyl voru útbúin úr (*R*)-2,3-ísóprópyliden-*sn*-glýseróli og viðeigandi alkylbrómíði og í kjölfarið fylgdi sýruhvatað vatnsrof á ísóprópyliden verndarhópi. Kyrrsettur *Candida antarctica* lípasi var síðan notaður til að innleiða miðlungslangar fitusýrur staðvendið í *sn*-3 stöðu glýseról hlutans með hjálp vínýl estera af fitusýrunum. Loks voru n-3 (ómega-3) fitusýrurnar EPA og DHA innleiddar í *sn*-2 stöðu á mildan hátt með EDCI sem tengimiðil og DMAP sem hvata. Algjör staðvendni fékkst við innleiðingu fitusýranna og fengust heimtur 90% eða hærri úr hverju skrefi heildarefnasmíðinnar.

1. Inngangur

Eterlípið af gerð 1-*O*-alkyl-2,3-díasyl-*sn*-glýseróla eru einkennandi fyrir lýsi brjósksfiska eins og hákarla og skata og getur hlutfall þeirra orðið allt að 90% af lýsínu [1]. 1-*O*-alkyl-*sn*-glýseról hafa mikla líffræðilega virkni og fást til dæmis með vatnsrofi á 1-*O*-alkyl-2,3-díasyl-*sn*-glýserólum. 1-*O*-alkyl-glýseról hafa sýnt ónæmisstyrkjandi áhrif í krabbameinssjúklingum [2], krabbameinshemjandi áhrif *in vitro* [3], þau auka frjósemi sæðisfruma *in vitro* og *in vivo* [4,5] og auka flæði krabbameinslyfja og fúkalyfja gegnum blóðheilahemilinn [6]. Ennig hafa forlyf verið smíðuð úr 1-*O*-alkyl-*sn*-glýserólum og notuð gegn HIV-1 veirunni með góðum árangri *in vitro* [7]. 1-*O*-alkyl-*sn*-glýseról eru forverar fósfoeterlípiða í frumum. Þau eru tekin upp í frumur og þeim komið fyrir í frumuhimnum, aðallega á formi 1-*O*-alkyl-2-asil-*sn*-glýseró-3-fósfoólíns, eða þeim breytt í blóðflöguvirkja (platelet activating factor, PAF). Slík fósfoeterlípið spila margvísleg hlutverk í boðskiptaferlum fruma og almennt í verkunarmáta 1-*O*-alkyl-glýseróla.

Algengustu alkylkeðjur 1-*O*-alkyl-*sn*-glýseróla í lýsi hákarla eru mettuðu keðjurnar C_{16:0} og C_{18:0} og einómettaða keðjan C_{18:1} og nefnast þau kimyl, batyl og selakyl alkohól, sbr. mynd 1. Þetta eru hendnar sameindir með raunskipan *S* um hendna kolefnið á glýseról hlutanum. Einnig er einómettaða C_{16:1} keðjan býsna algeng í lýsi hákarla og fer í sumum tilvikum upp fyrir þær fyrrnefndu. EPA og DHA eru ómega-3 fitusýrur sem eru einkennandi fyrir fitu úr sjávarfangi [8]. EPA er forveri eikósanóíða sem hafa m.a. áhrif á æðavíkk-



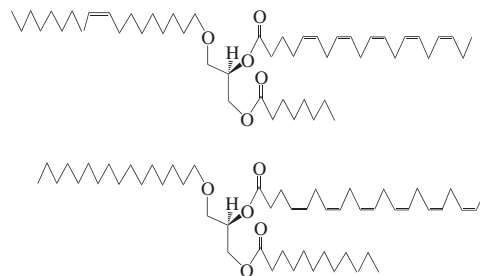
Mynd 1. Bygging algengustu eterlípið alkohólanna í hákarllýsi, kimyl, batyl og selakyl alkohóla.

un og bólgumyndun. EPA og DHA veita vörn gegn ýmsum hjarta- og æðasjúkdómum með því að lækka blóðfitu, koma reglu á hjartsláttartíðni, koma í veg fyrir kekkjun blóðflagna og minnka framleiðslu bólguvaldandi eikósanóíða [9]. Áhrif þessara fitusýra á bólgumyndun hafa verið nýtt við meðhöndlun á bólgusjúkdómum á borð við iktsýki og sáraristilbólgu [10, 11]. Rannsóknir hafa einnig leitt í ljós jákvæð áhrif EPA og DHA á heilastarfsemina og hafa þessar fitusýrur verið notaðar við meðhöndlun á geðklofa og þunglyndi [12, 13].

Tilgangur rannsókna sem hér er lýst var að sameina öll þau jákvæðu áhrif sem 1-*O*-alkyl-*sn*-glýserólin og fjölómettuðu fitusýrurnar (PUFA) EPA og DHA bjóða upp á, með því að smíða eterlípið af gerð 1-*O*-alkyl-2,3-díasy-*sn*-glýseróla skipuð EPA eða DHA í miðstöðu og miðlungslanga fitusýru (MCFA) í endastöðu glýseról hlutans. Til að ráða við slík verkefni og forðast notkun verndarhópa, sem leiða til lægri heimtana og aukinnar fyrirhafnar, voru notaðir lípasar sem að öllu jöfnu taka eingreind alkohól í endastöðu glýseróls fram yfir þau tvígreindu í miðstöðu [14, 15]. Þrjú handhverfuhrein afbrigði 1-*O*-alkyl-*sn*-glýseróla með náttúrulegri raunskipan *S* voru smíðuð, þ.e kímyl, batyl og selakyl alkohól með alkylkeðjunum C_{16:0}, C_{18:0} og C_{18:1}. Síðan var miðlungslöngu fitusýrunum (C₈, C₁₀ eða C₁₂) komið fyrir í endastöðu þeirra og loks EPA eða DHA komið fyrir í miðstöðu. Slík handhverfuhrein eterlípið sem skipuð eru ómega-3 fitusýru eru mjög dýrmæt efni sem gætu haft ný og áhugaverð áhrif á lífsstarfsemina. Ástæðan fyrir notkun á miðlungslöngum fitusýrum tengist miklum áhuga á stöðubundnum lípiðum, t.d. þríglýseríðum skipuðum lífvirkum fjölómettuðum fitusýrum í miðstöðu og miðlungslöngum mettuðum fitusýrum í endastöðum [15]. Dæmi um slíkar hendnar eterlípiðafleiður með náttúrulegri skipan *R* gefur að líta á mynd 2.

2. Niðurstöður og umræður

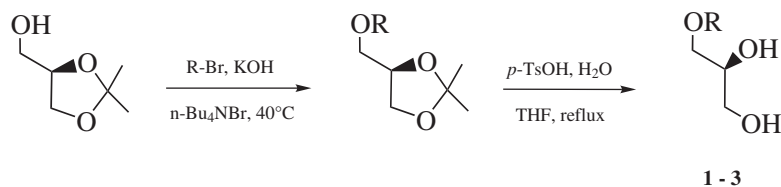
Hin stöðubundnu 1-*O*-alkyl-2,3-díasy-*sn*-glýseról eterlípið voru smíðuð í fjögurra skrefa efnasmíði á sama hátt og lýst var áður [16] fyrir smíðar á sams konar rasemískum stöðubundnum eterlípiðum. Hér er því um beint framhald þeirrar vinnu að ræða og er vísað til þeirrar greinar hvað varðar nákvæmari lýsingar á aðferðum og eðli þeirra. Í fyrsta skrefinu var Williamson etersmíði beitt, þar sem 1-*O*-alkyl-*sn*-glýseról eterafleiðurnar **1-3** voru smíð-



Mynd 2. Dæmi um stöðubundin eterlípið með náttúrulegri skipan: (*R*)-2-eikósapentaenóyl-3-oktanóyl-1-*O*-*cis*-9-oktadekenylglýseról (efri) og (*R*)-2-dókósaheksenóyl-3-dódekanóyl-1-*O*-hexadekanóylglýseról (neðri)

aðar á vernduðu formi með því að hvarfa handhverfuhreint ísóprópyliden verndað glýseról ((*R*)-2,3-ísóprópyliden-*sn*-glýseról) við hexadekylbrómíð (**1**), oktadekylbrómíð (**2**) og *cis*-9-oktadekenylbrómíð (**3**) í viðurvist malaðs kalíum hydroxíðs sem basa, ásamt tetra-*n*-bútylammoníum brómíði sem ferjuhvata, án notkunar leysis við 35°C. Bygging 1-*O*-alkyl-2,3-ísóprópyliden-*sn*-glýseról milliefnanna var sannkennd, en þau voru yfirleitt ekki einangruð, heldur vatnsrofin beint með súrri vatnslausn í THF. Þannig fengust hrein (*S*)-kímyl, (*S*)-batyl og (*S*)-selakyl alkohól **1-3** í 80-82% heimtum. Þetta jafngildir ágætisheimtum (um og yfir 90%) í hvoru þessara skrefa. Atburðarásinni er lýst á mynd 3.

Í þriðja skrefinu var kyrrsettum *Candida antarctica* lípasa beitt til að hvata esterun hinna miðlungslöngu fitusýra í endastöðu **1-3**. Vínýl esterar kaprýlsýru (**a**, C_{8:0}), kaprísýru (**b**, C_{10:0}) og lársýru (**c**, C_{12:0}) voru notaðir í díklórmetani sem leysi. Hvörfin voru látin ganga fyrst við 20°C í 1 klst og síðan við 0-4°C í allt að 5 klst. Þannig fengust 1-*O*-alkyl-3-*sn*-glýserólin **1a-c**, **2a-c** og **3a-c** með raunskipan *R* á hreinu formi í 90-96% heimtum eftir kristöllum úr *n*-hexani eða petroleum eter, nema í tilfelli **3a** sem fékkst sem hreinn vökvi eftir fjarlægingu leysis og vínýl estersins með eimingu undir lofttæmi. Í fjórða og síðasta skrefi voru hinar dýrmætu EPA og DHA fitusýrur innleiddar í miðstöðu **1a-c**, **2a-c** og **3a-c** og til þess var 1-(3-dímetylamínóprópyl)-3-etylkarbódíimíð (EDCI) tengimiðill notaður ásamt 4-(dímetylamínó)pyridíni (DMAP) sem hvata í díklórmetani sem leysi og hvörfin látin ganga við herbergishita í 17 klst. Hin hreinu stöðubundnu 1-*O*-alkyl-2,3-díasy-*sn*-glýseról lokaefni **4a-c**, **5a-c**, **6a-c**, **7a-c**, **8a-c** og **9a-c** með



R = C₁₆H₃₃ (**1**); C₁₈H₃₇ (**2**) and C₁₈H₃₅ (**3**)



1a-c; R = C₁₆H₃₃

2a-c; R = C₁₈H₃₇

3a-c; R = C₁₈H₃₅

4a-c; PUFA : EPA ; R : C₁₆H₃₃

5a-c; PUFA : DHA ; R : C₁₆H₃₃

6a-c; PUFA : EPA ; R : C₁₈H₃₇

7a-c; PUFA : DHA ; R : C₁₈H₃₇

8a-c; PUFA : EPA ; R : C₁₈H₃₅

9a-c; PUFA : DHA ; R : C₁₈H₃₅

MCFA = C₇H₁₅ (**a**); C₉H₁₉ (**b**); C₁₁H₂₃ (**c**)

PUFA = EPA eða DHA

Mynd 3. Skematísk mynd er sýnir heildarefnasmíði stöðubundinna eterlípríða með náttúrulegri skipan úr handhverfuhreinu (*R*)-sólketali sem upphafsefni.

raunskipan *R*, fengust sem gulleitar olíur í 90-96% heimtum eftir að myndefnablöndunni hafði verið rennt gegnum stutta kísilgelsúlu í hreinu díklórmetani sem ferðafasa. Mynd 3 sýnir efnaferlin sem koma við sögu í þriðja og fjórða skrefinu. Sannkenning á byggingu og staðfesting á hreinleika **1-3**, **1a-c**, **2a-c**, **3a-c** og lokamyndefna fengust með hágæða ¹H og ¹³C kjarnarófsmælingum (NMR), IR litrófsgreiningu og ljósvirknimælingu.

Tekist hefur með þrýðilegum árangri að smíða 1-*O*-alkyl-*sn*-glýserólin **1-3** handhverfuhrein með náttúrulegri raunskipan *S* í ágætum heimtum með því að nota malað kalíum hydroxíð sem basa, ásamt ferjuhvatanum tetra-*n*-bútylammoníum brómíði (n-Bu₄NBr). Um kosti þess að nota malað kalíum hydroxíð sem basa og ferjuhvötun brómíðsins hefur verið fjallað ítarlega [16].

Candida antarctica lípasinn sýndi mikla staðvendni gagnvart endastöðu 1-*O*-alkyl-*sn*-glýserólanna **1-3** við þessar aðstæður þar sem hinir hvarfgjörnu og hraðvirku ógagnhverfu vínýl esterar miðlungslöngu fitusýranna ásamt hinu lága hitastigi 0-4°C léku stórt hlutverk [15]. Hvarfið er ógagnhverft, þar sem enól farhópurinn sem myndast við umester-

unina, ráphverfist yfir í ókjarnsækið asetaldehyð. Lágt hitastig hvarfsins minnkar líkurnar á að röng staðhverfa myndist af völdum asyl umröðunar (e. acyl migration), sem felur í sér að fitusýran getur flust á milli nærliggjandi hydroxýl hópa eins og í glyseról hluta efnanna **1a-c**, **2a-c** og **3a-c**. Með þessum hætti tókst að stjórna innleiðingu fitusýranna **a**, **b** og **c** algjörlega staðvendið í endastöðu 1-*O*-alkyl-*sn*-glýserólanna **1-3**.

Við innsetningu EPA og DHA í miðstöðu voru heldur engar vísbendingar um asyl umröðun þrátt fyrir notkun á DMAP, sem talið er geta valdið asyl umröðun [17]. DMAP er hvati og gegnir mikilvægu hlutverki við myndun asylpýridíníum katjónar sem hvarfast við hydroxýl hópin í milliefnunum **1a-c**, **2a-c** og **3a-c** [18]. EDCI er mjög heppilegur tengimiðill sem hefur verulega kosti umfram aðra sambærilega tengimiðla eins og DCC [14, 15]. EDCI hefur hlaðinn amínóhóp sem auðveldar uppvinnslu hvarfsins umtalsvert þar sem auðvelt er að hreinsa burt umframmagn af EDCI og úreaafleiðu þess á kísilgelsúlu. NMR tæknin kom að verulegum notum við að stjórna og fylgja eftir staðvendni í ensímskrefinu og lokaskrefinu. Að lokum má geta þess að sömu aðferðafræði hefur einnig ver-

ið beitt til efnafræði 3-O-alkyl-*sn*-glýseróla úr handhverfuhreinu (S)-1,2-ísóprópyliden-*sn*-glýseróli, þ.e. handhverfum þeirra efna sem fjallað er um hér að framman [19].

Þakkir

Rannsóknasjóði Háskólans er þakkað fjárstuðningur við verkefnið, Novozyme í Danmörku er þakkað fyrir lípasann og Pronova Biocare í Noregi fyrir hin hreinu EPA og DHA. Sigríði Jónsdóttur á Raunvísindastofnun Háskólans er þakkað fyrir NMR mælingar.

Summary: Enantiopure structured ether lipids of 1-O-alkyl-2,3-diacyl-*sn*-glycerol type, possessing pure EPA or DHA at the mid-position and pure medium-chain fatty acid at the end-position, were synthesized in four steps by a chemoenzymatic approach starting from (R)-2,3-isopropylidene-*sn*-glycerol. The syntheses of the three 1-O-alkyl-*sn*-glycerols, (S)-chimyl, (S)-batyl and (S)-selachyl alcohols were accomplished by Williamson ether synthesis between (R)-2,3-isopropylidene-*sn*-glycerol and hexadecyl-, octadecyl- and cis-9-octadecenyl bromides, respectively, and a subsequent deprotection of the isopropylidene protective group under mild acidic conditions. The third step involved a superb regioselectivity of an immobilized *Candida antarctica* lipase to introduce the medium-chain fatty acids exclusively into the end-position of the glycerol backbone. Finally, EDCI coupling agent and DMAP as a catalyst were exploited to bring about the introduction of pure EPA or DHA into the remaining mid-position.

Heimildir

- [1] Wetherbee, B.M., Nichols, P. D. (2000). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B* **125**, 511-521.
- [2] Mangold, H.K., Paltauf, F. (1983). *Ether lipids, Biochemical and Biomedical aspects*, Academic press.
- [3] Pugliese, P.T., Jordan, K., Cedeberger, H., Brohult, J. (1998). *J. Altern. Complem. Med.* **4**, 87-99.
- [4] Cheminade, C, Gautier, V., Hichami, A., Alloume, P., Le Lannou, D., Legrand, A.B. (2002). *Biol. Reprod.* **66**, 421-428.
- [5] Mitre, R., Cheminade, C., Alloume, P., Legrand, P., Legrand, A.B. (2004). *Theriogenology* **62**, 1557-1566.
- [6] Erdlenbruch, B., Jendrossek, V., Eibl, H., Lakomek, M. (2000). *Experimental Brain Research* **135**, 417-42.
- [7] Hammond, J.L., Koontz, D.L., Bazmi, H.Z., Beadle, J.R., Hosteller, S.E., Kini, G.D., Aldern, K.A., Richman, D.D., Hosteller, K.Y., Mellors, J.W. (2001).

Antimicrobial Agents and Chemotherapy **45**, 1621-1628.

- [8] Stansby, M.E. (1990). *Fish Oils in Nutrition*, ed. M.E. Stansby, van Nostrand Reinhold, New York, Chapter 10, 268-288.
- [9] Holub, D.J., Holub, B.J. (2004). *Molecular and Cellular, Biochemistry* **263**, 217-225.
- [10] Kremer, J.M., Bigauette, J., Michalek, A.V., Timachalk, M.A., Lininger, L., Rynes, R.L., Huyck, C., Zieminski, J., Bartholomew, L.E. (1985). *Lancet* **325**, 184-187.
- [11] Stenson, W.F., Cort, D., Rodgers, J., Burakoff, R., DeSchryver-Kecsckemeti, K., Gramlich, L., Beeken, W. (1992). *Annals of Internal Medicine* **116**, 609-614.
- [12] Peet, M., Brind, J., Ramchand, C.N., Shah, S., Vankar, G.K. (2001). *Schizophrenia Research* **49**, 243-251.
- [13] Nemets, B., Stahl, Z., Belmaker, R.H. (2002). *Am. J. Psychiatry* **159**, 477-479.
- [14] Haraldsson, G.G., Halldorsson, A., Kulås, E. (2000). *J. Am. Oil Chem. Soc.* **77**, 1139.
- [15] Halldorsson, A., Magnússon, C.D., Haraldsson, G.G. (2003). *Tetrahedron* **59**, 9101-9109.
- [16] Magnússon, C.D., Halldorsson, A., Haraldsson, G.G. (2004). Efnasmíðar á stöðubundnum eterlípíðum með ómega-3 fjölmöttuðum fitusýrum. *Tímarit um raunvísindi og stærðfræði* **2**, 1. hefti, 21-25.
- [17] Pluckthun, A., Dennis, E.A. (1982). *Biochemistry* **21**, 1743-1750.
- [18] Xu, S., Held, I., Kempf, B., Mayr, H., Steglich, W., Zipse, H. (2005). *Chemistry – A European Journal* **11**, 4751-4757.
- [19] Sigmarsdóttir, U., Magnússon, C.D., Haraldsson, G.G. (2006). MS ritgerð Unnar Sigmarsdóttur, Háskóli Íslands.

Um höfundana: Carlos Davíð Magnússon er doktorsnemi í efnafræði við Háskóla Íslands. Anna Valborg Guðmundsdóttir er doktorsnemi við University of Toronto í Canada. Guðmundur G. Haraldsson er prófessor í lífrænni efnafræði við Háskóla Íslands.

Raunvísindastofnun Háskólans
Dunhaga 3
IS-107 Reykjavík
carlos@raunvis.hi.is

Móttekin: 5. maí 2006