

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 032261

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2019.04.30

(21) Номер заявки

201791845

(22) Дата подачи заявки

2016.03.18

(51) Int. Cl. A61K 31/05 (2006.01)

C07C 37/07 (2006.01)

C07C 37/84 (2006.01)

C07C 39/225 (2006.01)

C12P 7/22 (2006.01)

(54) СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТВЕРДЫХ ФОРМ МЕНАХИНОЛОВ

(31) 102015000009450

(56) EP-A1-2060256

(32) 2015.03.20

JP-A-2006083132

(33) ИТ

JP-A-2003137716

(43) 2018.02.28

(86) РСТ/ИВ2016/051528

(87) WO 2016/151447 2016.09.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ГНОСИС С.п.А. (ИТ)

(72) Изобретатель:

Бьянки Давиде, Дали Симона,
Миралья Никколо, Трентин
Антонелла, Кольцани Федерика,
Боллини Франческа, Понционе Чезаре
(ИТ)

(74) Представитель:

Поликарпов А.В., Соколова М.В.,
Путинцев А.И., Черкас Д.А., Игнатьев
А.В. (РУ)

(57) Раскрыты способы получения твердых форм менахинолов путем химического или ферментативного восстановления менахинона. Указанные твердые формы обладают высокой стабильностью к окислению, что обеспечивает эффективное применение менахинола в большинстве типичных фармацевтических композиций, где используется витамин K2.

B1

032261

032261

B1

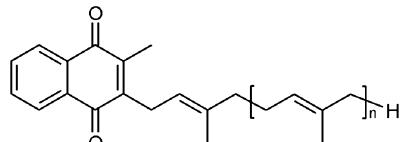
Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способам получения твердых форм менахинолов (восстановленная форма менахинонов), отличающимся особенно высокой стабильностью к окислению, за счет чего обеспечивается их реально эффективное применение в предупреждении сердечно-сосудистых расстройств, в костном метаболизме и в воспалительных процессах, в которые вовлечен витамин К.

Предшествующий уровень техники

Менахиноны представляют собой семейство молекул, которые в целом составляют компоненты витамина K2.

В их наиболее распространенной окисленной форме менахиноны имеют общую формулу (I)



(I)

где n представляет собой 0 или целое число от 1 до 11.

Они отличаются по количеству изопреновых единиц (часть молекулы, показанная в скобках в формуле I), число которых может варьировать от 0 до 11, хотя в наиболее распространенных формах оно варьирует от 4 до 7 и относится к менахинону-4 (МК4), МК5, МК6 и МК7 соответственно. Менахиноны МК4 и МК7 являются самыми многочисленными, и являются теми двумя, которые доступны на рынке диетических продуктов.

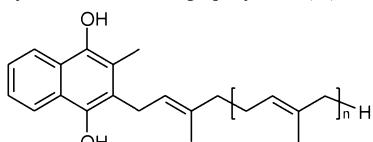
Главными пищевыми источниками витамина K2 являются яйца, молочные продукты, печень и ферментированная соя.

Терапевтическое применение витамина K, и в особенности витамина K2, описано в нескольких патентах и научных публикациях, начиная от применения в сердечно-сосудистой области (M.K. Shea et al., Am. J. Clin. Nutr. (2009), 89: 1-9) до применения в костном метаболизме (M.H.J. Knapen et al., Osteoporos Int (2013), 24:2499-2507). Более недавние применения витамина K относятся к области воспаления (M.K. Shea et al., Am. J. Epidemiol. (2008); 167(3): 313-320).

Однако кишечная абсорбция различных форм витамина K после перорального употребления либо в пище, либо в качестве пищевой добавки не является очень высокой вследствие в высокой степени липофильной природы молекулы.

Введение витамина K2 в его восстановленной форме менахинола, представляющего собой намного более гидрофильную молекулу, как полагают, увеличивает абсорбцию этого витамина, что уже было продемонстрировано для структурно подобной молекулы убихинола, представляющего собой восстановленную форму убихинона (M. Evans et al., J. Funct. Foods (2009), 1(2); 240).

Менахинолы представлены следующей общей формулой (II):



(II)

где n является таким, как определено выше.

Однако менахинолы являются очень нестабильными и склонны к очень быстрому повторному окислению до менахинонов под действием атмосферного кислорода или мягких окислителей. Стабильность восстановленной формы витамина K2 трудно обеспечить даже в инертной бескислородной среде, как в случае выделенного высушенного твердого вещества, которое хранят герметично в атмосфере азота.

Фармацевтические и нутрицевтические композиции, содержащие менахинол формулы (II) в качестве активного ингредиента, описаны в EP 2060256 A1, где менахинол получают путем восстановления раствора менахинона в органическом растворителе с помощью водного раствора восстановителя с последующим разделением фаз и выделением менахинола из органической фазы.

Описание графических материалов

Фиг. 1: восстановление менахинона до менахинола.

Фиг. 2: термограмма DSC (дифференциальная сканирующая калориметрия) аморфной формы восстановленного витамина K2-(МК7), полученного согласно примеру 1.

Фиг. 3: термограмма DSC, зарегистрированная на образце восстановленного витамина K2-(МК7) (полиморфные формы), полученного согласно примерам 3, 4 и 5.

Фиг. 4: термограмма DSC образца восстановленного витамина K2 (МК7) (полиморф с высокой температурой плавления), полученного согласно примеру 2.

Фиг. 5: термограмма DSC образца восстановленного витамина K2 (МК7) (форма с высокой температурой плавления) после перекристаллизации согласно примеру 6.

Фиг. 6: спектр FTIR (инфракрасная спектроскопия с Фурье-преобразованием) образца восстановленного кристаллического витамина K2 (МК7), полученного согласно примеру 2 или 6.

Описание изобретения

В первом аспекте изобретение относится к твердым формам менахинола, имеющим неожиданную стабильность к окислению в стандартных условиях и в условиях кристаллического напряжения, что позволяет эффективно использовать менахинол в наиболее распространенных композициях, где используется витамин K2.

Указанные формы получены путем восстановления менахинона до менахинола, как показано на фиг. 1.

В одном из воплощений этого первого аспекта изобретения твердая форма представляет собой кристаллическую форму менахинола формулы (II), полученную путем восстановления менахинона формулы (I) дитионитом натрия с последующей кристаллизацией из воды.

Восстановление осуществляют в двухфазной системе, состоящей из несмешивающегося с водой растворителя, такого как этилацетат, бутилацетат, метилтетрагидрофуран, дихлорметан или дихлорэтан, предпочтительно, этилацетат, и водного раствора дитионита натрия, предпочтительно имеющего pH в диапазоне от 3 до 8. Восстановление осуществляют при температуре в диапазоне от 2 до 75°C, предпочтительно от 20 до 25°C. Концентрация дитионита натрия в водном растворе предпочтительно варьирует от 0,5 до 10% мас./об., тогда как концентрация в двухфазной системе вода + растворитель предпочтительно варьирует от 1/10 до 1/100, где указанные соотношения предпочтительно являются соотношениями между массой витамина и общим объемом (растворитель + вода).

По завершении восстановления растворитель удаляют путем выпаривания, предпочтительно выпаривания при низком давлении, с получением водной суспензии, содержащей твердое вещество, где соотношение между твердым веществом и водой может варьировать от 1/5 до 1/100, и где менахинол кристаллизуется из водной фазы за счет охлаждения до температуры ниже 25°C, предпочтительно до температуры от 2 до 8°C, наиболее предпочтительно от 2 до 4°C.

Затем твердую кристаллическую форму менахинола по изобретению выделяют фильтрацией, действуя при тех же температурах, что и для кристаллизации.

За фильтрацией может следовать промывка твердого вещества 1-10%-ным раствором аскорбиновой кислоты и заключительная сушка при температуре, не превышающей 40°C.

Кристаллизация может быть осуществлена в отсутствие других солей или в присутствии вплоть до 1 M NaCl, растворенного в водной фазе.

Кристаллическая форма менахинола (II), полученная таким образом, может быть перекристаллизована путем растворения в этаноле и перекристаллизации путем добавления водного раствора аскорбиновой кислоты при температуре ниже 25°C, предпочтительно при температуре, варьирующей от 2 до 8°C, и еще более предпочтительно от 2 до 4°C.

В конкретном воплощении указанного первого аспекта изобретения кристаллическая форма менахинола относится как к менахинолу-7 (соединение формулы (II), где n=6), так и к менахинолу-4 (соединение формулы (II), где n=3).

В частности, изобретение относится к восстановленной кристаллической форме менахинола-7, имеющей профиль DSC, где эндотермический пик присутствует при температуре, равной или большей, чем 75°C, как показано, например, на фиг. 4, и спектр FTIR, как показано на фиг. 6, где присутствуют типичные полосы поглощения: широкий пик при 3340-3350 cm^{-1} , три типичные полосы при 2964, 2916, 2851 cm^{-1} ; острые пики при 1599, 1504, 1326, 1182, 1149, 1096, 1046, 980, 950 и 752 cm^{-1} .

Изобретение также относится к смеси полиморфных форм менахинола-7, полученной путем восстановления менахинона-7, имеющего профиль DSC с эндотермическим пиком при температуре, равной или большей чем 78,4°C, и вторым эндотермическим событием в диапазоне 39-45°C, как показано, например, на фиг. 3.

В другом воплощении указанного первого аспекта изобретения твердую форму менахинола формулы (II) получают путем ферментативного восстановления менахинона формулы (I).

Для этой цели могут быть использованы клеточные суспензии микроорганизма рода *Bacillus*, в частности, указанный микроорганизм может быть выбран из *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* и *Bacillus licheniformis*; или рода *Pseudomonas*, в частности *Pseudomonas putida*; или рода *Escherichia*, в частности вида *Escherichia coli*; или рода *Enterobacter*, в частности *Enterobacter aerogenes*, полученные традиционными способами. Как правило, клетки микроорганизмов выращивают в подходящей культурной среде, такой как LB 2x с добавлением глюкозы в концентрации 2-6 г/л, при 28-37°C. По окончании роста культурный бульон центрифугируют и клетки промывают фосфатным буфером с pH 7,4 и повторно суспенсируют в фосфатном буфере с pH 7,4 с добавлением 0,5-2,5 г/л сукциниата натрия и 2-6 г/л глюкозы с получением клеточной суспензии в конечной концентрации 5-15 г/л.

Ферментативное восстановление обычно осуществляют путем смешивания четырех объемов полученной таким образом клеточной суспензии, предпочтительно, в концентрации 10 г/л, с одним объемом раствора менахинона в смешивающемся с водой растворителе, предпочтительно, в концентрации

0,6-1,4 г/л. Смешивающийся с водой растворитель предпочтительно выбран из группы этанола, метанола, изопропанола, ацетона, THF (тетрагидрофурана), метил-THF, диметилформамида, диметилацетамида и диметилсульфоксида. Полученную таким образом реакционную смесь инкубируют при 28-32°C, предпочтительно при 30°C, при перемешивании с защитой от света, как правило, в течение времени инкубирования, варьирующего от 2 до 12 ч, в зависимости от используемой концентрации клеток. По завершении инкубирования реакционную массу, содержащую твердую форму менахинола по изобретению, замораживают и подвергают сублимационной сушке.

Полученные таким образом лиофилизаты могут быть ресуспендированы в двухфазной смеси, содержащей воду и по меньшей мере один из несмешивающихся с водой органических растворителей, описанных ранее, отфильтрованы, и указанные фильтраты могут быть выделены путем кристаллизации, как описано выше и далее проиллюстрировано в примере 2.

Альтернативно, реакционная масса, содержащая восстановленный витамин K2, может быть отфильтрована, растворена в двухфазной смеси, содержащей воду и по меньшей мере один из несмешивающихся с водой органических растворителей, описанных ранее, и может быть выделена путем кристаллизации, как описано ранее и проиллюстрировано в примере 2.

Изобретение также относится к фармацевтическим и нутрицевтическим композициям, содержащим описанные твердые формы.

Изобретение также относится к применению твердых форм, описанных выше, для изготовления лекарственных средств для лечения и/или предупреждения сердечно-сосудистых расстройств и нарушений костного метаболизма, а также воспалительных состояний, в которые вовлечен витамин K.

Восстановленные твердые формы общей формулы (II) по изобретению обладают большей биодоступностью, чем соответствующие менахиноны общей формулы (I), как предполагают, исходя из экспериментов по абсорбции *in vitro*, осуществленных на монослое клеток Caco-2.

Изобретение далее проиллюстрировано следующими примерами.

Пример 1 (сравнительный). Получение восстановленного аморфного витамина K2 (МК7).

0,25 г витамина K2 (МК7) с экспериментально доказанной чистотой более 97% растворяют в 20 мл THF в атмосфере азота. К указанному раствору добавляют 0,26 г цинка и реакционную массу, поддерживаемую в атмосфере азота, нагревают до флегмообразования. Раствор анализируют посредством HPLC (высокоэффективная жидкостная хроматография), чтобы убедиться в том, что витамин был полностью восстановлен. По прошествии 23 ч реакционную массу фильтруют, чтобы обеспечить удаление цинкового порошка, и фильтрат концентрируют досуха *in situ* в вакууме. Этот процесс дает 0,26 г бледно-розового масла, которое склонно к отверждению со временем с образованием воскообразного твердого вещества. Анализ HPLC показывает, что хроматографическая чистота по отношению к витамину K2 (МК7) снижена до 96,5% (окислено 3,5%).

Соответствующие тесты на стабильность изложены в табл. 1.

Таблица 1

Данные о стабильности образца полиморфа с низкой температурой плавления (аморфный образец) витамина K2 (МК7). Данные выражены в виде процента от исходного количества восстановленной формы

Время (дни)	Восстановленная форма (t/t ₀ %)
0	100%
3	4%

На фиг. 2 показана термограмма DSC, зарегистрированная на образце аморфного витамина K2 (МК7), полученного согласно представленному примеру.

Пример 2. Получение восстановленного кристаллического витамина K2 (МК7).

5 г витамина K2 (МК7) с экспериментально доказанной чистотой более 97% растворяют в 250 мл этилацетата.

К этому раствору, поддерживаемому в атмосфере азота при интенсивном перемешивании, добавляют водный раствор дитионита натрия (250 мл, 4,76 г дитионита натрия), доведенный до pH 4 с помощью серной кислоты. Раствор анализируют посредством HPLC, чтобы гарантировать, что витамин был полностью восстановлен. Реакция завершается по прошествии 3 ч. Реакционную массу концентрируют в вакууме при 40°C до получения водной суспензии. Указанную суспензию охлаждают до 4°C и затем фильтруют через воронку Бюхнера, отфильтрованный осадок промывают 1%-м водным раствором аскорбиновой кислоты с получением влажного твердого вещества, которое сушат при 40°C в вакууме (85-10 мбар (850-100 Па) в течение ночи).

После сушки получают 4 г восстановленного витамина K2 (МК7). Анализ HPLC показывает, что хроматографическая чистота по отношению к витамину K2 (МК7) снижена до 98,5% (окислено 2,5%), KF = 5,0%.

Тесты на стабильность изложены в табл. 2.

Таблица 2

Данные о стабильности образца кристаллического полиморфа витамина K2 (МК7) с высокой температурой плавления, выраженные в виде процента от исходного количества восстановленной формы

Упаковка	T = 0	T=1 месяц	T=2 месяца	T=3 месяца
алюм/вакуум	100%	95,4%	98,9%	97,9%

Пример 3. Получение восстановленного витамина K2 (МК7) (смесь полиморфов).

1 г витамина K2 (МК7) с доказанной чистотой более 97% растворяют в 60 мл этилацетата.

К этому раствору, поддерживаемому в атмосфере азота при интенсивном перемешивании, добавляют водный раствор дитионита натрия (60 мл, 2,4 г дитионита натрия), доведенный до pH 4 с помощью серной кислоты. Раствор анализируют посредством HPLC, чтобы гарантировать, что витамин был полностью восстановлен. Реакция завершается по прошествии 3 ч. Реакционную массу помещают в делильную воронку, и две фазы разделяют, поддерживая верхнюю фазу в атмосфере азота. Указанную фазу переносят в роторный испаритель и немедленно помещают в вакуум для удаления растворителя досуха (40°C, 10 мбар, до получения маслянистого остатка). Затем к маслянистому остатку добавляют 100 мл водного раствора аскорбиновой кислоты и смесь поддерживает в атмосфере азота при интенсивном перемешивании в течение 5-30 мин при температуре 20-25°C. Затем смесь фильтруют через воронку Бюхнера при комнатной температуре (20-25°C); отфильтрованный остаток промывают 1%-м водным раствором аскорбиновой кислоты с получением 0,5 г восстановленного витамина K2 (МК7). Анализ HPLC показывает, что хроматографическая чистота по отношению к витамину K2 (МК7) снижена до 81,6% (окислено 18,4%).

Анализ DSC показывает присутствие двух эндотермических пиков при 43,7 и 76,3°C.

Пример 4. Получение восстановленного витамина K2 (МК7) (смесь полиморфов).

1 г витамина K2 (МК7) восстанавливают посредством процедур, описанных в примере 1. 100 мл воды добавляют к маслянистому остатку, поддерживая реакционную массу при перемешивании и в атмосфере азота при 20-25°C. Затем образовавшуюся суспензию (темно-розового цвета) фильтруют в атмосфере азота с получением твердого вещества, соответствующего восстановленному витамина K2 (МК7) (чистота HPLC по отношению к витамину K2 (МК7) 81,6%, окислено 18,4%).

Тесты на стабильность приведены в табл. 3.

Таблица 3

Данные о стабильности образца смеси полиморфных форм витамина K2 (МК7)

Время (дни)	% восстановленного витамина	% окисленного витамина
0	81,58%	18,41%
3	76,24%	23,67%
6	63,16%	36,69%
10	48,27%	51,48%
11	47,04%	52,67%
12	38,44%	61,09%

Анализ DSC обнаруживает присутствие двух эндотермических пиков при 43,6 и 78,4°C (фиг. 3).

Пример 5. Получение восстановленного витамина K2 (МК7) (смесь полиморфов).

1 г витамина K2 (МК7) восстанавливают с помощью процедур, описанных в примере 2. После завершения восстановления реакционную массу концентрируют в вакууме (остаточное давление 10 мбар, внутренняя температура 25°C), и затем образованную молочно-белую суспензию фильтруют через воронку Бюхнера и промывают 1%-м раствором аскорбиновой кислоты. Полученное твердое вещество сушат в вакууме при 40°C в течение ночи (40°C, 5 мбар) с получением 0,76 г бледно-розового твердого вещества. Анализ HPLC показывает, что хроматографическая чистота по отношению к витамину K2 (МК7) снижена до 93,7% (окислено 6,3%), KF = 3,0%.

Анализ DSC обнаруживает присутствие двух эндотермических пиков при 43,7 и 79,8°C.

Пример 6.

2 г витамина K2 (МК7), полученного согласно процедурам, описанным в примере 2 (чистота Red Vit 96,5%), растворяют в 2 мл абсолютного этанола. Добавляют 10%-ный водный раствор аскорбиновой кислоты (100 мл) путем добавления по каплям к раствору, поддерживаемому при перемешивании и в атмосфере азота при 2-8°C.

Таким образом, витамин Е осаждается, и затем образовавшуюся суспензию фильтруют в атмосфере азота с получением твердого вещества, соответствующего витамину K2-(МК7) (чистота HPLC как витамин K2 (МК7) 96,3%, окислено 4,7%).

Пример 7.

0,3 г витамина K2 (МК7) восстанавливают с помощью процедур, описанных в примере 2. В конце реакции полученное твердое вещество повторно растворяют в этаноле (1,5 мл) и охлаждают до 5°C. Осаждающееся твердое вещество поддерживают при 5°C в атмосфере азота в течение 12 ч; затем осадок

фильтруют и сушат при 40°C в вакууме с получением 0,2 г желтовато-белого твердого вещества (чистота восстановленного витамина 10,7%, окислено 88,7%).

Пример 8.

Клетки *Bacillus subtilis* выращивали в среде LB 2x (казеинтриптон 20 г/л, экстракт дрожжей 10 г/л, поваренная соль 10 г/л), снабженной глюкозой (3 г/л), при 30°C в течение ночи. В конце роста культурный бульон центрифугировали, клетки промывали 50 мМ фосфатным буфером pH 7,4 и повторно супензировали в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,4 с добавлением сукциниата натрия (1 г/л) и глюкозы (5 г/л) с получением супензии клеток в конечной концентрации 10 г/л.

8 мл супензии смешивали с 2 мл раствора витамина K2-МК7, полученной в DMSO в концентрации 1 г/л. Полученную таким образом реакционную смесь продували инертным азотом и инкубировали при 30°C при перемешивании в течение 24 ч. Восстановление менахинона до менахинола проверяли с помощью анализа HPLC. Максимальную концентрацию витамина K2 (МК7) в восстановленной форме детектировали по прошествии 4 ч инкубирования, и она соответствует 93% присутствующего менахинона.

В конце инкубирования реакционную массу замораживали и подвергали сублимационной сушке.

Пример 9.

Реакционную массу (100 мл), содержащую 20 мг акт. витамина K2 (МК7), полученную согласно примеру 8, фильтруют через воронку Бюхнера для удаления биомассы. Остаток на фильтре промывают 20 мл водной смеси, содержащей DMSO (8/2), и объединяют с предыдущим фильтратом. К объединенному фильтрату добавляют 10 мл этилацетата в атмосфере азота. Полученный раствор концентрируют в вакууме при 5-10 мбар с получением водной супензии, которую охлаждают до 2-8°C. По прошествии 30 мин при перемешивании супензию фильтруют и полученное твердое вещество сушат при 40°C в вакууме (остаточное давление 10 мбар). Анализ HPLC, осуществленный на выделенном твердом веществе (12 мг), показывает чистоту 82% в восстановленном витамине и присутствии эндотермического пика (DSC) при 83,1°C.

Пример 10. Поглощение восстановленного или окисленного витамина K2 (МК7) на клеточном монослое клеток Caco-2 *in vitro*.

Клетки аденоакарциномы человека Caco-2 культивировали на проницаемой вставке, вставленной в лунку микропланшета, с образованием конфлюентного монослоя с барьерной функцией между апикальным и базально-латеральным отделением. Полную целостность монослоя определяли путем тестирования на отсутствие прохода Люцифера желтого, соединения с низкой проницаемостью. Образцы витамина K2 (МК7), альтернативно, в восстановленной форме (менахинол) или окисленной форме (менахинон), растворяли в этаноле и наносили на апикальное отделение, где 1%-й раствор этанола добавляли к буферу для инкубирования. Конечный раствор в ячейке для инкубирования фиксировали 100 мкМ витамина.

В конце инкубационного периода слой клеток удаляли из вставки и гомогенизировали, и гомогенат центрифугировали. Количество витамина, присутствующее в надосадочной жидкости, определяли посредством HPLC. Затем пеллет после центрифугирования повторно супензировали в 1 мл воды, и к супензии добавляли 1,5 мл изопропанола и 2,5 мл гексана. После перемешивания образованную органическую фазу вновь анализировали посредством HPLC на концентрацию витамина K2 (МК7). Сумму двух значений использовали для расчета количества витамина, поглощенного клеточным слоем.

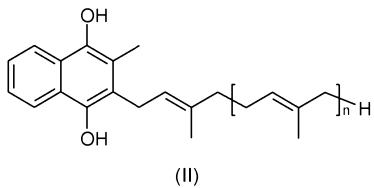
Найденные значения, выраженные как мкг витамина на 1 г гомогената, указывают на небольшой, но значительно больший захват в случае применения витамина K2 (МК7) в восстановленной форме, как показано в табл. 4.

Таблица 4
Поглощение восстановленного или окисленного витамина K2 (МК7) на монослое клеток Caco-2 *in vitro*

Инкубирование	Vосстановленный	Окисленный
	витамин	витамин
	мкг/г гомогената	мкг/г гомогената
лунка 1	0,8	0,4
лунка 2	1,6	0,5
лунка 3	1,0	0,6
лунка 4	0,8	0,7
Среднее	1,1	0,6
Стандартное	0,4	0,1
отклонение		

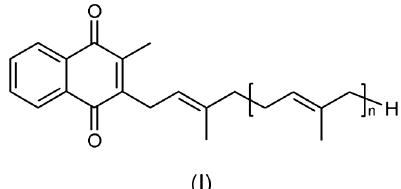
ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ получения кристаллической формы менахинола формулы (II)



где n представляет собой 0 или целое число от 1 до 11, включающий следующие стадии:

а) восстановление менахинона формулы (I)



где n является таким, как определено выше,

в двухфазной системе, состоящей из несмешивающегося с водой растворителя и водного раствора дитионита натрия;

б) удаление указанного растворителя путем выпаривания;

в) охлаждение и фильтрование водной фазы, полученной на стадии б), при температуре ниже 25°C, с получением кристаллической формы менахинола формулы (II).

2. Способ по п.1, где стадию а) осуществляют при температуре от 2 до 75°C, предпочтительно от 20 до 25°C.

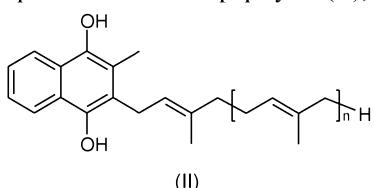
3. Способ по п.1 или 2, где раствор дитионита натрия имеет pH от 3 до 8.

4. Способ по пп.1-3, дополнительно включающий промывку кристаллической формы, полученной на стадии в), раствором аскорбиновой кислоты с последующей сушкой кристаллов при температуре, не превышающей 40°C.

5. Способ по пп.1-4, где в соединении формулы (II) n равен 6.

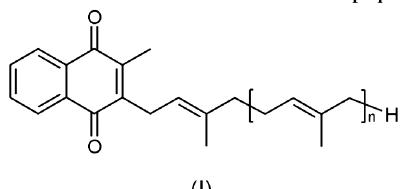
6. Способ по пп.1-4, где в соединении формулы (II) n равен 3.

7. Способ получения твердой формы менахинола формулы (II),



где n представляет собой 0 или целое число от 1 до 11,

включающий ферментативное восстановление менахинона формулы (I)



где n является таким, как определено выше,

где ферментативное восстановление осуществляют с использованием микроорганизма рода *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Escherichia* или *Enterobacter*.

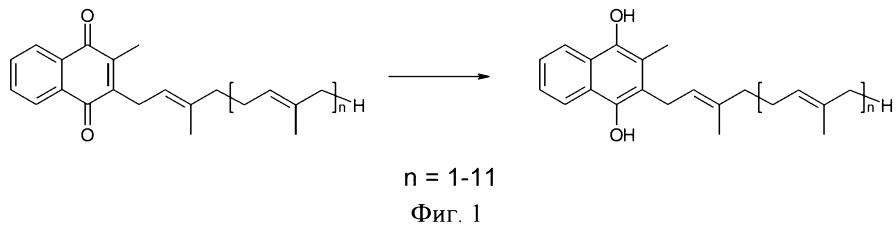
8. Способ по п.7, где ферментативное восстановление осуществляют с использованием микроорганизма рода *Bacillus*, предпочтительно выбранного из *Bacillus subtilis*, *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* и *Bacillus licheniformis*.

9. Способ по п.7, где ферментативное восстановление осуществляют с использованием микроорганизма рода *Pseudomonas*, в частности *Pseudomonas putida*; или рода *Escherichia*, в частности *Escherichia coli*; или рода *Enterobacter*, в частности *Enterobacter aerogenes*.

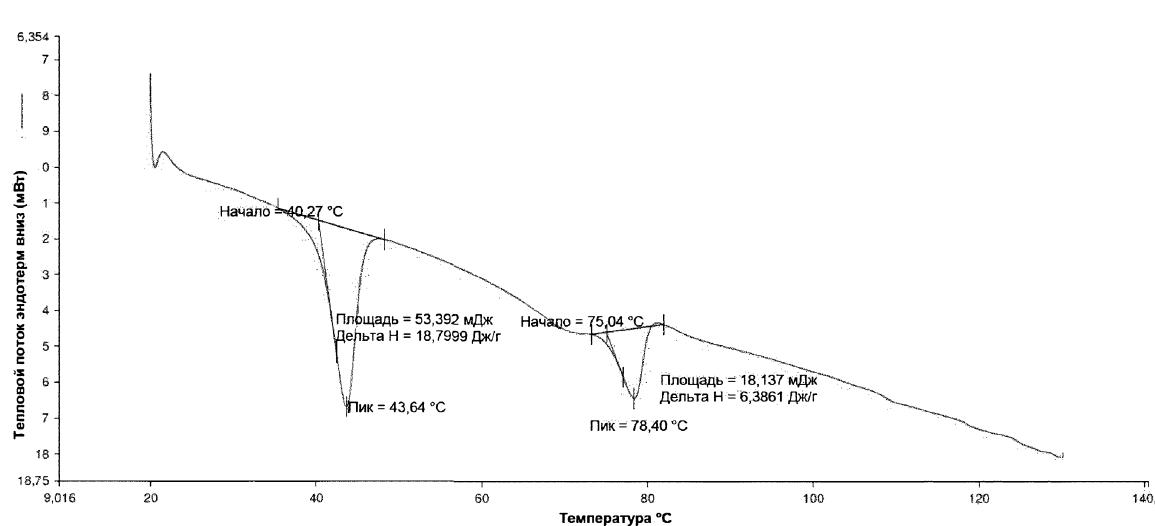
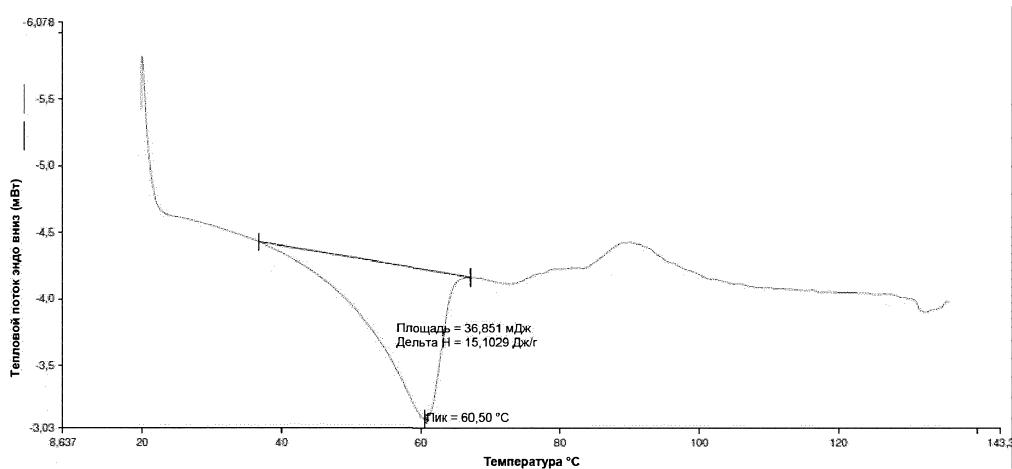
10. Способ по пп.8 и 9, где суспензию указанного микроорганизма приводят в контакт с раствором менахинона формулы (I) в смешивающемся с водой растворителе.

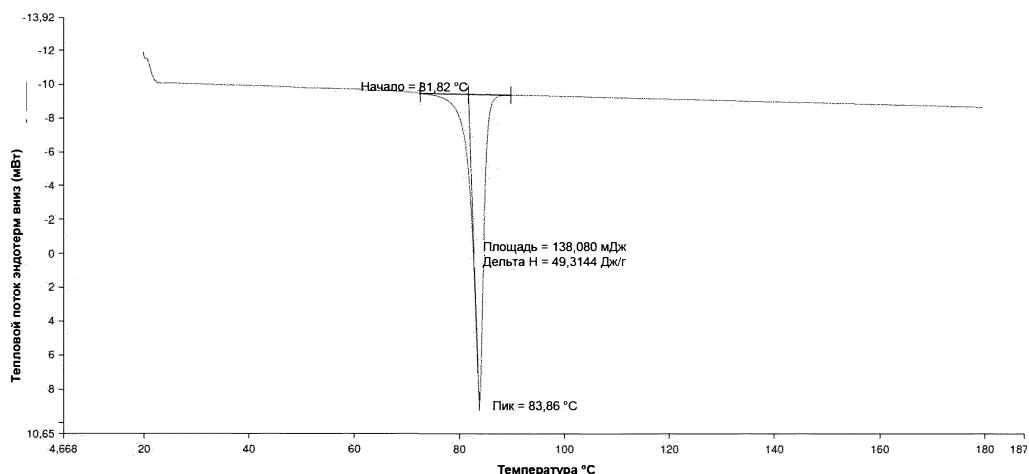
11. Способ по пп.8-10, дополнительно включающий сублимационную сушку восстановительной смеси.

12. Способ по пп.8-10, где восстановительную смесь фильтруют и разбавляют в двухфазной смеси, содержащей воду и несмешивающийся с водой растворитель, с последующим удалением указанного растворителя путем выпаривания и путем охлаждения и фильтрации полученной таким образом водной фазы при температуре ниже 25°C, предпочтительно при температуре от 2 до 8°C, еще более предпочтительно от 2 до 4°C.

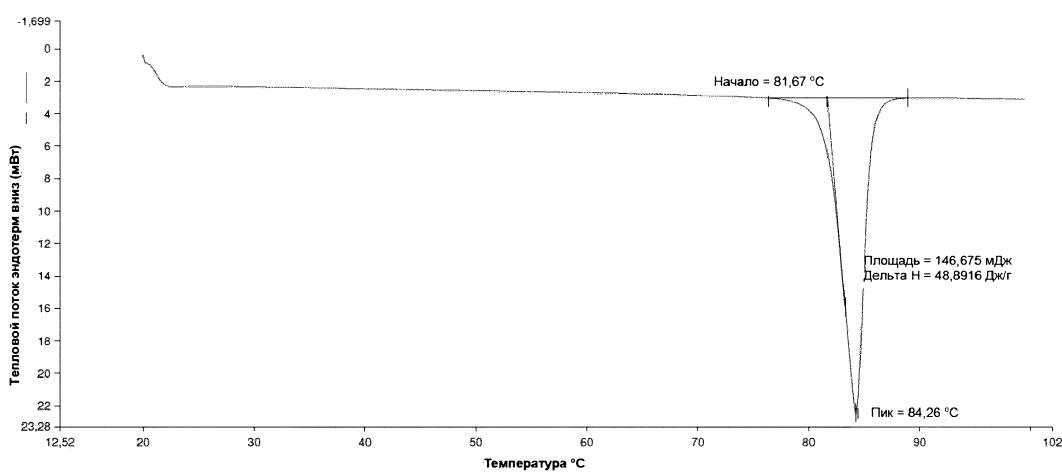


Фиг. 1

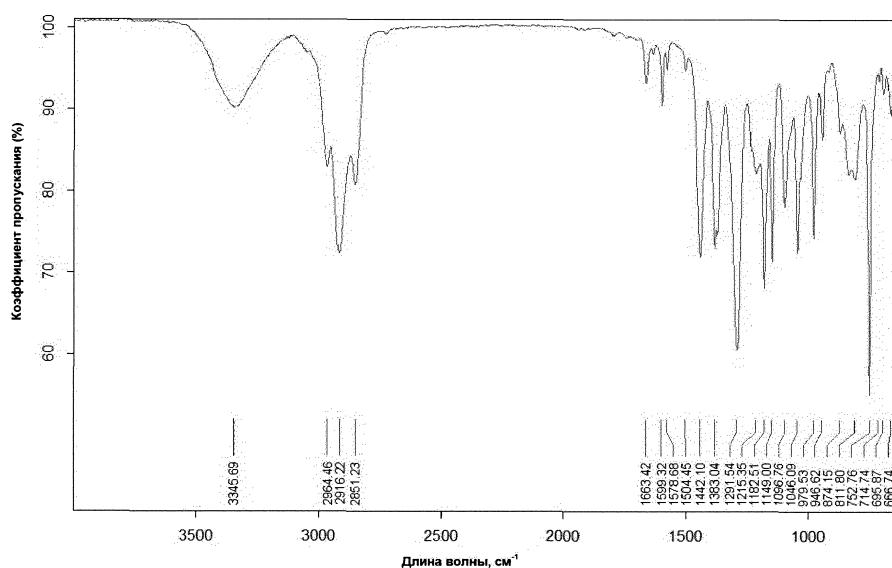




ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6



Евразийская патентная организация, ЕАПО

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2