

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780022820.9

[51] Int. Cl.

A61K 31/465 (2006.01)

A61K 31/232 (2006.01)

C07C 67/02 (2006.01)

C07C 69/587 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月1日

[11] 公开号 CN 101472590A

[22] 申请日 2007.6.22

[21] 申请号 200780022820.9

[30] 优先权

[32] 2006.6.23 [33] FR [31] 0605649

[86] 国际申请 PCT/EP2007/056277 2007.6.22

[87] 国际公布 WO2007/147899 英 2007.12.27

[85] 进入国家阶段日期 2008.12.18

[71] 申请人 皮埃尔法布雷医药公司

地址 法国布洛涅-比扬库尔

[72] 发明人 F·布鲁恩 A·德洛霍

J·加尔德特 J·F·帕图苏

A·马蒂 E·塞韦拉克

[74] 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

代理人 程伟

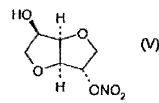
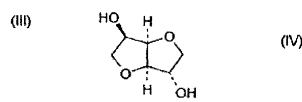
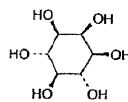
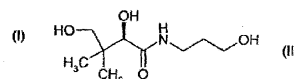
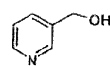
权利要求书 3 页 说明书 14 页 附图 1 页
按照条约第 19 条的修改 2 页

[54] 发明名称

DHA 酯类及其治疗和预防心血管疾病的用途

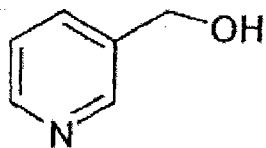
[57] 摘要

本发明涉及二十二碳六烯酸与优选选自下列的 B 族维生素或维生素原的醇：右列结构式 (I) 的烟酰胺醇、右列结构式 (II) 的泛醇、右列结构式 (III) 的肌醇，或与右列结构式 (IV) 的异山梨醇或右列结构式 (V) 的单硝酸异山梨醇形成的二十二碳六烯酸酯。本发明还涉及上述物质的制备方法，包含上述物质的药物组合物和上述物质用于治疗或预防心血管疾病尤其是心房纤维性颤动的用途。

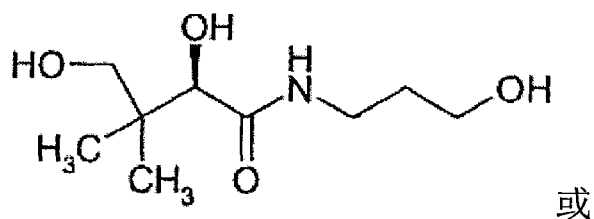


1、一种二十二碳六烯酸酯，该酯由二十二碳六烯酸与优选选自下列的 B 族维生素或维生素原的醇：

-下列结构式的烟酰胺醇：

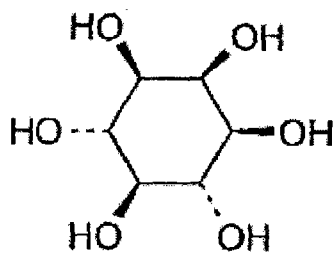


-下列结构式的泛醇：

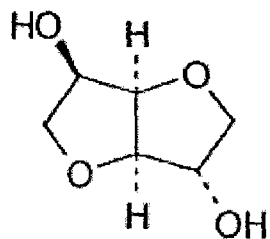


或

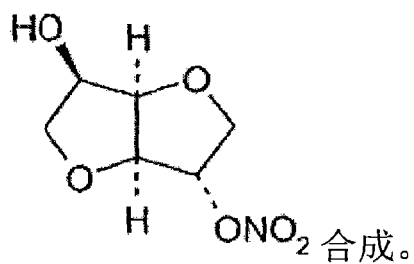
-下列结构式的肌醇：



或与下列结构式的异山梨醇：

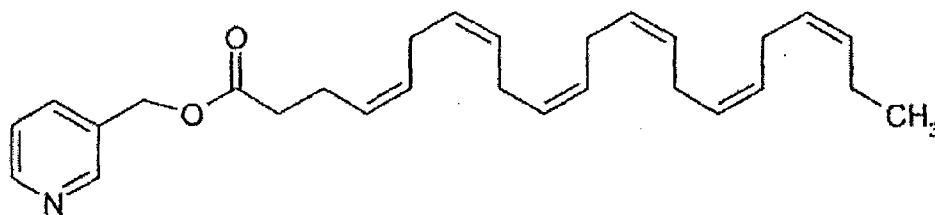


或下列结构式的单硝酸异山梨醇：



合成。

2、根据权利要求1所述的二十二碳六烯酸酯，其中酯是下列结构通式(1)的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯：



(1)

。

3、一种制备权利要求1或权利要求2所述的二十二碳六烯酸酯的方法，该方法通过二十二碳六烯酸乙酯与选自烟酰醇、泛醇、异山梨醇、单硝酸异山梨醇或肌醇的醇，优选与烟酰醇，之间的酯交换作用而进行。

4、根据权利要求3所述的方法，其中所述方法在催化剂存在下进行。

5、根据权利要求4所述的方法，其中催化剂是脂酶，优选南极假丝球菌脂酶。

6、根据权利要求5所述的方法，其中乙醇在反应过程中被去除，优选通过氮气起泡去除。

7、根据权利要求5或权利要求6所述的方法，其中反应在无水溶剂或在干燥空气中无溶剂条件下发生。

8、一种包含权利要求1或权利要求2所述的二十二碳六烯酸酯，优选权利要求2所述的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，和至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

9、根据权利要求1或权利要求2所述的二十二碳六烯酸酯，或根

据权利要求 8 所述的药物组合物，用作药物的用途。

10、根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的二十二碳六烯酸酯，或根据权利要求 8 所述的药物组合物，用作预防和/或治疗优选涉及心脏节律的，优选选自房性和/或室性心律失常、心动过速和/或纤维性颤动的心血管疾病的药物的用途；用作预防和/或治疗以心肌细胞电传导缺陷为代表的疾病的药物的用途；用作预防和/或治疗优选选自高甘油三酯血症、高胆固醇血症、高血压病、高脂血症、血脂异常，优选混合性血脂异常的心血管疾病的多种危险因素，和/或第 VII 因子在凝血过程中活性亢进的药物的用途；用作治疗和/或初级或二级预防源于心脏节律障碍的心血管疾病，如心肌梗死，优选猝死，引起的心房和/或心室心律失常、心动过速、纤维性颤动和/或电传导缺陷的药物的用途；和/或用作梗死后治疗的药物的用途。

11、根据权利要求 1 或权利要求 2 所述的二十二碳六烯酸酯，或根据权利要求 8 所述的药物组合物，用作预防和/或治疗心房纤维性颤动的药物的用途。

DHA 酯类及其治疗和预防心血管疾病的用途

本发明涉及二十二碳六烯酸 (DHA) 与选自如烟酰胺醇 (B3)、泛醇 (B5) 或肌醇 (B7) 的 B 族维生素或维生素原的醇或与异山梨醇或单硝酸异山梨醇形成的二十二碳六烯酸酯, 特别是吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯, 和上述物质作为治疗和预防心血管疾病的药物的用途。

已知 ω -3 多不饱和脂肪酸, 特别是优选以乙酯的形式纯化和浓缩的 EPA 和 DHA, 在治疗某些心血管疾病和调控相应的危险因素方面的潜在用途。特别是, 已知其可用于治疗高脂血症、高胆固醇血症和高血压病。将含有高浓度 EPA 和 DHA 乙酯的配方药物用于心肌梗死患者的临床试验表明, 这些配方药物可有效降低死亡率和特别地, 猝死率。这些结果部分归因于该药对于心室心肌细胞的细胞膜具有的稳定性效应, 该稳定性效应可预防在缺血心肌中出现恶性心律失常, 正如在梗死后患者或在再现梗死条件的实验模型中所见到的那样。

此外, 根据专利申请 WO 2004/047835, 已知 DHA 和 EPA 乙酯还可用于预防心房纤维性颤动。然而, 令人惊讶的是, 本申请的发明人已发现, DHA 和 EPA 对于心房纤维性颤动的效应不同: 与 EPA 相比, DHA 对于心房纤维性颤动具有更好的效应。因此, 对于治疗心房纤维性颤动, 毫无疑问, 对于治疗绝大多数心血管疾病, 与使用 DHA 和 EPA 的混合物相比, 单独使用 DHA 更优选。

B 族维生素包括属于明显不同化学类别的水溶性分子, 但所有 B 族维生素的主要功能是在代谢过程中的任何环节调控酶的活性。将这些维生素命名为: 硫胺素 (B1)、核黄素 (B2)、烟酸 (B3)、泛酸 (B5)、吡哆醇 (B6)、生物素 (B8)、叶酸 (B9) 和氰钴维生素 (B12)。

B 族维生素和维生素原具有涉及其功能的优势。特别是, 烟酰胺醇是来自烟酸 (维生素 B3) 的醇。它在人体内迅速转化成烟酸。

烟酸, 也称为尼克酸, 是一种可由色氨酸合成的水溶性 B 族维生

素。然而，用于降低胆固醇和脂类目的的有效治疗剂量均高于体内合成的数量。因此，已证明口服补充烟酸对于降低胆固醇和/或甘油三酯是必要的。

说到作用机理，烟酸是否通过抑制脂肪组织释放游离脂肪酸，从而使供应到肝脏的不饱和脂肪酸减少而发挥上述作用，对于这一点尚有疑义。由于更少的脂肪酸酯化形成甘油三脂，参与合成低密度脂蛋白(LDL)的甘油三酯减少，因此使 LDL 胆固醇水平降低。还注意到，烟酸能够显著增加 HDL 胆固醇水平，最有可能是通过抑制这种形式的 HDL 胆固醇的分解。

特别是，烟酸具有很强的外周血管扩张效应。因此，静脉注射烟酰醇在其转化成烟酸后产生有益的血管扩张效应从而降低动脉压。

烟酸广泛用于降低胆固醇和脂类的治疗。

还表明，例如，在已证明使用 HMG-CoA 还原酶抑制剂不足以降低胆固醇的条件下，烟酸可与 HMG-CoA 还原酶抑制剂联合使用，如与他汀类联合使用。当欲获得每一种化合物的有益效应时，特别是当欲用他汀类降低 LDL 胆固醇水平并用烟酸提高 HDL 胆固醇水平时，如此联合使用是有益的。此外，由于烟酸既能影响胆固醇水平也能影响甘油三酯水平，因此适于治疗混合性血脂异常。

泛醇是由泛酸衍生的醇，通常称为维生素 B5。在体内，泛醇转化为泛酸。泛酸然后成为对于细胞代谢特别重要的复合物辅酶 A 的重要组成部分。事实上，辅酶 A 参与脂类、碳水化合物和蛋白质代谢。泛醇还参与乙酰胆碱和肾上腺皮质类固醇的形成。它还参与对外源性物质的解毒作用和抗感染作用。

肌醇（维生素 B7）通过预防脂肪的积累从而起到脂肪动员作用。肌醇还具有抗焦虑效应，它刺激神经系统和肝脏并能降低血胆固醇水平。它参与增加血清素的活性，调控细胞内钙离子浓度，维持细胞膜电位和细胞骨架的组装。

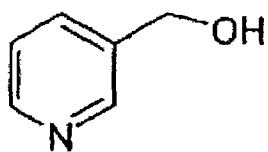
异山梨醇，特别是单硝酸异山梨醇，是有效的外周血管扩张剂。

令人惊讶的是，本发明的发明人发现，二十二碳六烯酸（DHA）与选自 B 族维生素或维生素原的如烟酰醇（B3）、泛醇（B5）和肌醇

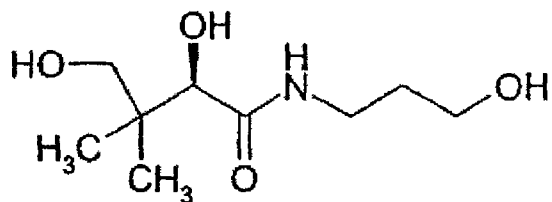
(B7) 的醇形成的酯，或与异山梨醇或单硝酸异山梨醇形成的酯，特别是吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯（二十二碳六烯酸（DHA）与烟酰醇形成的酯），对于心血管疾病也具有显著的活性。

因此，本发明涉及二十二碳六烯酸与优选下列的选自 B 族维生素或维生素原的醇合成的二十二碳六烯酸酯：

-下列结构式的烟酰醇：

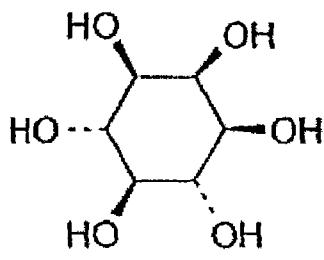


-下列结构式的泛醇：

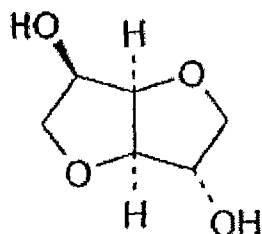


或

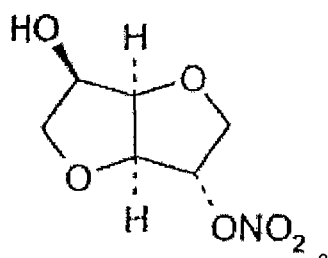
-下列结构式的肌醇：



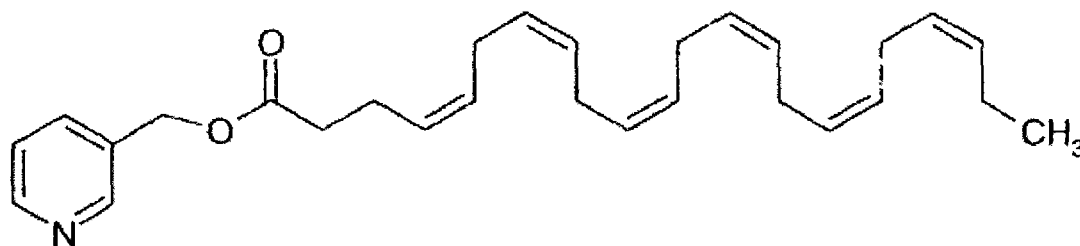
-或与下列结构式的异山梨醇：



-或下列结构式的单硝酸异山梨醇：



优选的是，根据本发明的酯是下列通式（1）的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯：



(1)

本发明还涉及根据本发明的二十二碳六烯酸酯的制备方法，特别是根据本发明的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯（1）的制备方法，该方法通过二十二碳六烯酸乙酯与选自烟酰醇、泛醇、异山梨醇、单硝酸异山梨醇或肌醇的醇，优选与烟酰醇，的酯交换作用而进行。

酯交换作用通过本领域技术人员公知方法进行。

根据本发明的酯交换作用优选在催化剂存在下进行。这种催化剂优选是碱金属碳酸盐或碱土金属碳酸盐，优选 K_2CO_3 。碱金属碳酸盐或碱土金属碳酸盐与 DHA 乙酯的摩尔比的范围优选是 1/1 至 6/1。醇与 DHA 乙酯的摩尔比的范围优选是 1/1 至 6/1，甚至更优选的是，烟酰醇与 DHA 乙酯的摩尔比的范围是 1/1 至 6/1。酯交换反应优选在选自二噁烷或 THF 的，优选 THF 的溶剂中进行。THF 优选用氮气起泡除水。甚至更优选的是，将反应混合物进行优选至少 14 小时的加热回流。

在本发明的另一具体实施方式中，根据本发明的酯交换方法的催化剂是脂酶，优选是南极假丝酵母脂酶。特别是，脂酶是固定的形式。优选的脂酶是诺和诺德公司出售的 Novozyme[®]。反应优选在无溶剂的介质中进行或在如 2-甲基-2-丁醇或乙腈中进行，在用烟酰醇作反应物的条件下优选在无溶剂的介质中进行，并且在用泛醇作反应物的条件下优选在溶剂中进行。在用肌醇作反应物的条件下，使用的溶剂优选是离子极性溶剂，如 1-丁基-3-甲基咪唑化 BF_4 或 1-丁基-3-甲基咪唑化 $C(CN)_2$ 。反应优选在高于室温的温度下进行，优选在 60°C 进行。

优选去除反应中的乙醇，优选在真空下或通过氮气起泡去除，甚

至更优选通过氮气起泡去除反应中的乙醇。去除反应中的乙醇可使转化率增加，反应加速，并且去除了伴生的水解反应。

醇与 DHA 乙酯的摩尔比优选是 1 至 5，优选是 1.5 至 4.5。

反应优选进行 1 小时至 100 小时，优选 1 小时至 72 小时，优选 1 小时至 48 小时，更优选是 1 小时至 3 小时。

在根据本发明的方法的另一具体实施方式中，酯交换反应在无水溶剂中，在如氯化锂、 $MgCl_2$ 或硅胶的脱水剂存在的非无水溶剂中进行或在干燥空气中不需溶剂进行。这样去除伴生的水解反应。

酯交换反应优选用纯二十二碳六烯酸乙酯（纯度至少 95%，可购得或通过本领域技术人员所熟知的方法从乙酯脂肪酸混合物中纯化获得）或用包含至少 70% 摩尔的 DHA 乙酯的混合物进行。在所用的 DHA 乙酯是混合物的情况下，建议将所获酯纯化后再进行酯交换反应。

本发明还涉及包含根据本发明的二十二碳六烯酸酯，特别是包含根据本发明的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，和至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

可配制根据本发明的药物组合物以用于哺乳动物包括人的给药。剂量可根据谈及的治疗和疾病的不同而不同。这些组合物可制成可经下列途径给药的形式：口服、舌下含化、皮下、肌肉注射、静脉注射、经皮、局部或直肠给药。在这种情况下，活性成分可以单位剂量的形式或以与传统药物载体形成混合物的形式施用于动物或人类。适合的单位剂量的给药形式包括经口的形式如片剂、明胶胶囊剂、粉剂、颗粒剂和口服液或混悬液，舌下含服和口服的给药形式，皮下、局部、肌肉注射、静脉注射、滴鼻或滴眼的给药形式和直肠给药形式。

当固体组合物以片剂形式制备时，将主要活性成分与如明胶、淀粉、乳糖、硬脂酸镁、滑石、阿拉伯树胶、二氧化硅或类似物的药物载体混合。可将片剂涂上蔗糖或其他合适的物质或将其处理成具有延迟或延长的活性并按照预定剂量连续释放活性成分的形式。

明胶胶囊制剂可通过将活性成分与稀释剂混合，然后将获得的混合物装入软或硬明胶胶囊中获得。

糖浆或酞剂形式的制剂能包含活性成分连同甜味剂、防腐剂、增香剂和合适的着色剂。

能在水中分散的粉剂或颗粒剂能包含活性成分与分散剂、湿润剂或悬浮剂以及矫味剂或甜味剂的混合物。

与在直肠温度下融化的粘结剂如可可脂、聚乙二醇一同制成的栓剂用于直肠给药。

用于肠外（静脉注射、肌肉注射等）、鼻腔或眼内给药的剂型是包含药学上相容的分散剂和/或湿润剂的含水混悬液、等渗盐水或灭菌注射溶液。

活性成分还可任选地与一种或多种添加剂配制成微胶囊的形式。

根据本发明的药物组合物优选经口或静脉途径给药，在梗死后治疗时优选经静脉途径给药。

根据本发明的药物组合物能包括产生互补或可能的协同效应的其他活性成分。药物组合物优选不包括 EPA 酯。

本发明还涉及根据本发明的二十二碳六烯酸酯，特别是根据本发明的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，或根据本发明的药物组合物，用作药物的用途。

本发明还涉及根据本发明的二十二碳六烯酸酯，特别是根据本发明的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，或根据本发明的药物组合物，用作预防和/或治疗优选涉及心律（优选心律失常或传导障碍）的，优选选自房性和/或室性心律失常、心动过速和/或纤维性颤动的，心血管疾病的药物的用途；用作预防和/或治疗以心肌细胞电传导缺陷为代表的疾病的药物的用途；用作预防和/或治疗优选选自高甘油三酯血症、高胆固醇血症、高血压病、高脂血症、血脂异常的，优选混合性血脂异常和/或凝血过程中第 VII 因子机能亢进的，多种心血管疾病危险因素的药物用途；用作治疗和/或初级或二级预防源自节律障碍的心血管疾病，如心肌梗死导致的房性和/或室性心律失常、心动过速、纤维性颤动和/或电传导缺陷，优选猝死的药物的用途；和/或梗死后治疗的药物的用途。

节律障碍包含，特别是窦房结病变如窦性心动过速；房性心律失常，如房性期前收缩、规律性房性心动过速或心房纤维性颤动；交界性心动过速，如阵发性交界性心动过速或预激综合征；或室性心律失常，如室性早搏、室性心动过速或心室纤维性颤动。

传导障碍包括，特别是心动过缓。

最后，本发明涉及根据本发明的二十二碳六烯酸酯，特别是根据本发明的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯或根据本发明的药物组合物，用作预防和/或治疗心房纤维性颤动的药物的用途。

不希望受缚于理论，根据本发明的二十二碳六烯酸酯，特别是根据本发明的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，似乎是在体内释放醇和DHA，特别是当使用吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯时，其经酯酶活性释放烟酰醇和DHA。因此，根据本发明的二十二碳六烯酸酯似乎具有与DHA和醇的混合物相同的活性。因此，如果醇是B族维生素或维生素原，根据本发明的二十二碳六烯酸酯具有与DHA和B族维生素或维生素原的混合物相同的效应。当使用吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯时，也是如此，烟酰醇在体内转化成烟酸。因此，根据本发明的吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯似乎具有与DHA和烟酸的混合物相同的活性。烟酸的血管舒张效应的优势可使DHA令人满意地分布于外周血管，特别是静脉注射吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，烟酰醇转化成烟酸以后更是如此。

参考下列附图和实施例可更好地理解本发明。

图1代表实施例3.1（开放试管）、3.2（真空）和3.3（氮气起泡）中使用200mg Novozyme[®]，60℃，醇与酯的比例是3的条件进行酯交换反应过程中DHA-EE的功能随时间消耗的百分数。

下列是非限制性实施例。

实施例1：用K₂CO₃合成吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯

在1.53 g（11 mmol）磨碎的K₂CO₃和1.06 ml（10.9 mmol）烟酰醇（纯度大于98%；Acros提供）存在下，将1g（2.8 mmol）乙基二十二碳六烯酸酯（纯度大于95%；Interchim提供）置于氮气起泡除水的5 ml THF中。将反应混合物回流加热7小时，而后加入0.76 g（5.5 mmol）K₂CO₃，继续加热7小时。

冷却后，将反应混合物用水提取并用乙酸乙酯萃取。有机相用MgSO₄干燥，过滤然后浓缩成干品。获得的残留物用二氧化硅快速色

谱法纯化 ($\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow 90/10 \text{ CH}_2\text{Cl}_2/\text{乙酸乙酯}$, 梯度层析 15 分钟)。分离得到透明油状物质 (0.84g, 产率 71%)。

硅胶 TLC 60 F 254 默克, 90/10 $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, $R_f=0.35$ 。

实施例 2: 用脂酶合成吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯

所有反应在对于每种酶是适宜的温度下在不连续混合反应器 (磁力混合) 中进行。

所用产品是:

-DHA 乙酯(DHA-EE)含量高达 70%的乙酯混合物(Croda Chemical Ltd.所售), 因此称其为“70% DHA-EE 酯混合物”。

-Novozyme[®], 南极假丝酵母脂酶的固定形式, 诺和诺德所售;

-烟酰醇

反应混合物是下列之一:

-无溶剂仅用底物的介质; 或

-使用各种溶剂的有机介质。

在有机介质中使用的溶剂有:

-2-甲基-2-丁醇(2M2B), 一种温和的极性溶剂, 可使如多不饱和脂肪酸酯的疏水化合物和如烟酰醇的亲水化合物联合增溶溶解; 或

-乙腈, 与 2M2B 作用相同。

反应条件概括在表 1 中:

表 1: 用于测定烟酰醇与 70% DHA-EE 酯之间的酯交换作用的反应条件

醇	介质	[70% DHA-EE 酯](M)	[醇]	总体积 (ml)	醇/酯 摩尔比
烟酰醇	有机介质 (2M2B 和乙腈)	0.43	0.64	12	1.5
	无溶剂	1.5	4.5	3.5	3

每种条件与 200mg Novozyme[®]于 60°C 孵育。用 2M2B 的反应在开放空气 (在通风橱内) 中与 200 mg Novozyme[®]于 60°C 孵育进行。

直到反应结束, 常规取样 500 μl 。反应过程通过于 13000 rpm 离心 5 分钟淬灭, 以从介质中取出固定的酶。所有样品贮存于 4°C 直至被分析。

不加酶的对照反应和 不加共同底物 (烟酰醇) 的对照反应平行进

行。

通过使用两种 HPLC 方法（用 Agilent 1100 系列装置）根据下列参数进行分析：

方法 1

- Zorbax SB-C18 柱 (4.6 mm×25 cm)
- 温度：40℃
- 流速：1 ml/min
- 洗脱液：0.02% 甲醇/乙酸
- 检测：折光法
- 运行时间：15 分钟

方法 2

- Zorbax SB-C18 柱(4.6 mm×25 cm)
- 温度：40℃
- 流速：3 ml/min
- 洗脱液：50/50 乙腈/丙酮
- 检测：折光法
- 运行时间：15 分钟

预先将在各种反应中取出的样品用 0.02%甲醇/乙酸混合物（方法 1）和用丙酮（方法 2）稀释至低于 100mM 的浓度。

结果和讨论：

在酯交换反应中出现两种物质。第一种物质在 4.15 分钟时洗脱下来，并对应于酯水解产物，第二种物质在分析条件下在 4.85 分钟时洗脱下来。后一种化合物对应于 70% DHA-EE 酯和烟酰胺醇之间的酯交换作用的产物。这里，当烟酰胺醇仅有一个伯醇羟基时，仅期望得到一种产物。

在各种反应条件下获得的转化百分数列于下表 2：

表 2：在 70% DHA-EE 乙酯和烟酰胺醇之间的酯交换作用中获得的转化百分数（*：在这种情况下，试管保持开放状态以使反应过程中产生的乙醇蒸发）。

反应条件	DHA-EE 转化成为 DHA-烟酰胺醇的转化百分数
乙腈	于 72 小时内，31%

2M2B	于 48 小时内, 47%
2M2B 于开放空气中*	于 118 小时内, 60%
无溶剂	于 72 小时内, 11%
无溶剂于开放空气中*	于 72 小时内, 100%

当反应在开放空气中进行时, 转化率较高; 产生的乙醇蒸发使得反应平衡向着合成 DHA-烟酰醇的方向转变。这种酯交换反应伴随着反应混合物严重地黑化。

当使用 2M2B 作为反应溶剂时, 水解产物优先出现。然而, 在无溶剂的介质中也出现弱的水解反应。因此, 这似乎是所用的烟酰醇中含有水或周围潮湿的空气造成的伴生反应。

已经证实 70% DHA-EE 酯与烟酰醇之间的酯交换反应的可行性并且该反应显示出接近或大于 90% 的优势性的转化率, 特别是当反应过程中产生的乙醇从反应混合物中去除时。然而, 由于所用溶剂中含水和/或周围潮湿的空气, 所产生的伴生水解反应会干扰这些合成反应。

因此似乎兴趣在于试图避免观察到的伴生的水解反应。例如使用完全无水的溶剂。还可能在脱水剂(例如氯化锂、 $MgCl_2$ 或硅胶)存在条件下进行同一反应以去除任何水解反应发生的可能性。

对于烟酰醇-DHA 酯合成反应而言, 反应过程中产生的乙醇似乎是限制反应进行的因素。去除乙醇可使反应平衡向合成所想要的酯的方向转变, 因此, 尤其当在减压条件下进行合成反应时, 建议优化去除乙醇的步骤。优化该步骤使得乙醇快速蒸发因此使反应速度加快。

实施例 3: 用脂酶合成吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯的反应; 酯交换反应的优化; 反应过程中产生的乙醇的蒸发和氧化褐变的去除。

使用相同的起始物(烟酰醇、70% DHA-EE 酯混合物、Novozyme[®]) 在无溶剂的介质中于 60°C 在 200 mg Novozyme[®] 存在条件下以醇与酯的比例是 3 进行与实施例 2 相似的合成反应。所用的反应器与实施例 2 相同, 并且合成方法也相同。

实施例 3.1:

与实施例 2 相比唯一的区别是反应在开放容器(开放试管)中进行。

结果(图 1):

酯交换反应是“慢”的，总共耗时接近 80 小时。出现氧化褐变。存在“强”伴生水解反应。

实施例 3.2:

与实施例 2 相比唯一的区别是反应在真空条件下进行。

结果 (图 1):

与实施例 3.1 相比反应加速，但依然是“慢”的，总共耗时接近 48 小时。

此外，依然存在氧化褐变和伴生水解反应。

实施例 3.3:

与实施例 2 相比唯一的区别是反应在氮气起泡条件下进行。

结果 (图 1):

由于反应的同时去除了反应过程中产生的和改进的混合物中的乙醇，反应的加速非常显著，使得反应总共耗时低于 3 小时。

注意到未出现氧化褐变现象。

伴生水解反应显著减少。

实施例 4: 使用脂酶合成 DHA 与泛醇形成的 DHA 酯

除下列有区别以外，实验和分析条件与实施例 2 相同:

下表 3 概括了反应条件:

表 3: 用于测定 70% DHA-EE 酯与泛醇的酯交换反应的反应条件。

醇	介质	[70% DHA-EE 酯] (M)	[醇]	总体积 (ml)	醇/酯 摩尔比
泛醇	有机介质 (2M2B 和乙腈)	0.43	1.28	12	3

结果和讨论:

在分析条件下，有两种物质分别在 3.9 分钟和 4.14 分钟被洗脱。泛醇有两个伯醇。因此，应设想产生数个（最多三个）产物。然而，对于无共同底物（泛醇）的对照而言，峰值出现在 4.14 分钟时。所述峰值可因此对应于与所用溶剂含水有关的乙酯水解作用。该反应仅在酶存在条件下才可被观察到。

作为结果的是，仅第一峰对应于泛醇-DHA 酯的合成反应。

下表 4 概括了在各种反应条件下获得的转化百分数:

表 4: 在 70% DHA-EE 乙酯与泛醇的酯交换反应过程中获得的转化百分数(*: 在这种情况下, 试管保持开放以使反应过程中产生的乙醇蒸发)。

反应条件	DHA-EE 转化成为 DHA-泛醇的百分数
乙腈	于 136 小时内, 68%
2M2B	于 115 小时内, 76%
2M2B 于开放空气中	于 96 小时内, 88%

当反应在开放空气中进行时, 70% DHA-EE 酯的转化百分数似乎增加。事实上, 在这种条件下, 反应过程中产生的乙醇蒸发了。反应平衡因此向泛醇-DHA 酯合成的方向转变。而且, 由于 2M2B 溶剂的联合蒸发(介质浓度效应), 这些转化值当然被低估了。这些酯交换反应也伴随着反应混合物的严重黑化。

已经证实了 70% DHA-EE 酯与泛醇之间的酯交换反应的可行性, 并且该反应显示出转化率接近或大于 90% 的优势, 特别是当去除了反应混合物中的反应过程中产生的乙醇的时候。然而, 由于所用的溶剂中含水和/或周围空气潮湿, 伴生水解反应干扰合成反应。

因此, 目的似乎是试图避免所观察到的伴生水解反应。例如可以使用完全无溶剂的介质。还可能在脱水剂(例如氯化锂、 $MgCl_2$ 或硅胶)存在条件下进行这些同一反应以去除水解反应发生的任何可能性。

对于泛醇-DHA 酯的合成反应而言, 反应过程中产生的乙醇似乎是限制反应进行的因素。乙醇的去除使得反应平衡向目的酯的合成转变。因此, 建议优化乙醇的去除步骤, 尤其是在减压条件下进行合成反应时。优化该步骤使乙醇得以快速蒸发因此使反应速度加快。

实施例 5: EPA 和 DHA 对超高速钾电流的作用及因此对心房纤维性颤动的作用的比较性结果。

心肌动作电位是兴奋的心肌细胞的基本电单位, 并代表形成动作电位的各个时相的数个类型离子通道的活性。不同类型的动作电位对应于不同的心脏区域, 因此可使其在这些区域顺序和协调地活动。因为这个原因, $K_v 1.5$ 钾通道, $KCNA5$ 基因编码, 仅在心房组织表达, 并且形成在心房动作电位复极化过程中起作用的超高速钾电流 (I_{kur})。已经观察到心房纤维性颤动中心房动作电位发生改变, 高度局限化表

达的 $I_{Kv 1.5}$ 实际上是心房纤维性颤动治疗过程中可供选择的靶标。

因此, 本发明研究了 DHA 和 EPA 对 I_{kur} 的效应。为此, 将人 $Kv 1.5$ 通道的同分异构体 (h $Kv 1.5$) 稳定转染 HEK 293 细胞 (人胚胎肾细胞), 并且当前结果是来自用全细胞膜片钳技术对这些通道的活性进行的研究。

材料和方法

细胞系的传代培养

将 HEK 293-h $Kv 1.5$ 细胞在标准条件 (37°C, 细胞培养箱设定成 95% O_2 和 5% CO_2) 下用 Falcon 培养皿培养直至 80% 融合。然后将这些细胞移除, 并接种在含有下列培养基的 35mm 带盖培养皿中: DMEM (Invitrogen); 10% 胎牛血清 (Invitrogen); 100U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素和 0.25mg/ml 谷氨酰胺 (Invitrogen) 的混合物; 并用 1.25mg/ml 遗传霉素[®] (Geneticin[®]) 作为选择性抗生素。

电生理学

用全细胞膜片钳技术在室温条件 (19-22°C) 下研究 I_{kur} 。吸管培养基包含: 125mM K-天冬氨酸、20mM KCl、10mM EGTA、5mM HEPES、5mM Mg-ATP、1mM $MgCl_2$, pH 7.3 (KOH)。细胞外培养基包含: 140mM NaCl、20mM HEPES、5mM D(+)-葡萄糖、5mM KCl、2mM $CaCl_2$ 、1mM $MgCl_2$, pH 7.4 (NaOH)。

每 15 秒从 -80mV 静息电位给予 +60mV 去极化电脉冲 300ms, 接着 -50mV 复极化诱导 I_{kur} 。电流峰值的幅度是在去极化电脉冲的第一个 100ms 内获得的最大电流建立的。在电脉冲结束时电流的幅度是在去极化电脉冲的最后 20ms 内确定的。

试剂

DHA 和 EPA 由 Sigma 提供。贮存液 (10mM) 用乙醇制备, 并且该溶剂的最终浓度是 0.25%。

结果:

下表 5 概括了实验结果。

表 5: 各种浓度的 DHA 和 EPA 对 I_{kur} 的抑制百分数。

DHA	
I_{kur} 峰值	电脉冲结束时 I_{kur}

浓度	均值	SEM	均值	SEM	n
1 μ M	8.2	6.3	10.1	5.8	5
3.2 μ M	10.9	6.9	14.5	6.5	5
5.6 μ M	15.4	4.8	33.7	7.8	6
10 μ M	22.6	4.0	78.0	4.2	6
25 μ M	58.1	13.6	86.5	3.4	5

EPA					
I_{kur} 峰值			电脉冲结束时 I_{kur}		
浓度	均值	SEM	均值	SEM	n
1 μ M	14.6	1.7	14.9	1.9	5
3.2 μ M	16.1	3.1	19.9	4.4	5
10 μ M	17.5	6.4	36.6	7.2	10
25 μ M	5.4	6.8	61.6	7.3	5

EPA 使 I_{kur} 峰值幅度 (10 μ M 时达到最大抑制程度: $17.5 \pm 6.4\%$, $n=10$, $p<0.05$) 和电脉冲末期电流幅度 (25 μ M 时, $61.6 \pm 7.3\%$, $n=5$, $p<0.05$) 轻微下降。

25 μ M DHA 对于 I_{kur} 峰值幅度的最大抑制程度是 $58.1 \pm 13.6\%$ ($n=5$, $p<0.005$), 对于电脉冲末期电流幅度的最大抑制程度是 $86.5 \pm 3.4\%$ ($n=5$, $p<0.005$)。

结论:

这些结果显示, 与 EPA 相比, 应用 DHA 对转染人 Kv 1.5 通道的 HEK 293 细胞的超高速钾电流 (I_{kur}) 的抑制更强, 并呈浓度依赖性。DHA 优选作用于电脉冲末期电流, 提示其对 Kv 1.5 通道的失活效应。而且, 该效应伴随着 I_{kur} 峰值的下降 (与用 EPA 观察到的相反), 实现 DHA 对 I_{kur} 的抑制作用。

这些对于 I_{kur} 的效应提示了 DHA 对于心房纤维性颤动的有益作用。

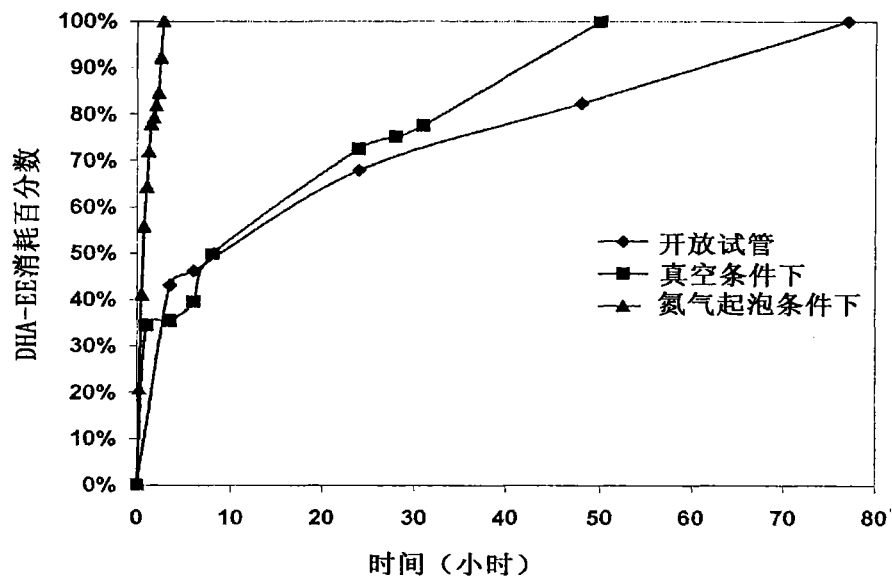
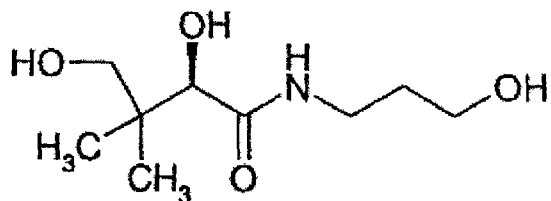


图 1

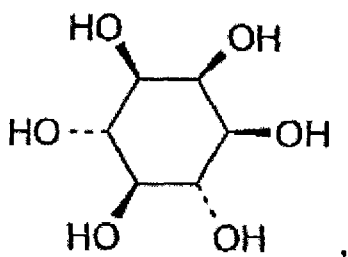
1、一种二十二碳六烯酸酯，该酯由二十二碳六烯酸与选自下列的醇：

-下列结构式的泛醇

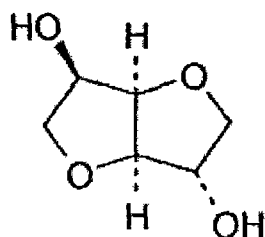


或

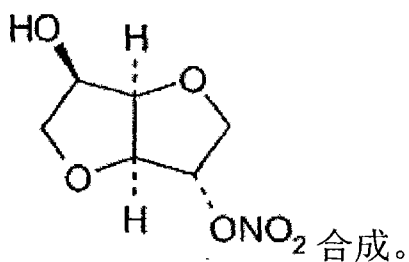
-下列结构式的肌醇



或与下列结构式的异山梨醇：



或下列结构式的单硝酸异山梨醇：



2、一种制备权利要求1所述的二十二碳六烯酸酯的方法，该方法通过二十二碳六烯酸乙酯与选自泛醇、异山梨醇、单硝酸异山梨醇或肌醇的醇之间的酯交换作用进行。

3、根据权利要求2所述的方法，其中所述方法在催化剂存在下进行。

4、根据权利要求3所述的方法，其中催化剂是脂酶，优选是南极假丝球菌脂酶。

5、根据权利要求4所述的方法，其中乙醇在反应过程中被去除，优选通过氮气起泡去除。

6、根据权利要求4或权利要求5所述的方法，其中反应在无水溶剂中或在干燥空气中无溶剂条件下发生。

7、一种包含权利要求1所述的二十二碳六烯酸酯和至少一种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

8、根据权利要求1所述的二十二碳六烯酸酯或根据权利要求7所述的药物组合物，用作药物的用途。

9、根据权利要求1所述的二十二碳六烯酸酯或吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，或根据权利要求7所述的药物组合物，用作预防和/或治疗涉及心脏节律的，优选选自房性和/或室性心律失常、心动过速和/或纤维性颤动的心血管疾病的药物的用途；用作预防和/或治疗以心肌细胞电传导缺陷为代表的疾病的药物的用途；用作预防和/或治疗选自高甘油三酯血症、高胆固醇血症、高血压病、高脂血症、血脂异常，优选混合性血脂异常的心血管疾病的多种危险因素的药物用途；用作治疗和/或初级或二级预防源于心脏节律障碍的心血管疾病，如心肌梗死，优选猝死，引起的心房和/或心室心律失常、心动过速、室颤和/或电传导缺陷的药物的用途；和/或用作梗死后治疗的药物的用途。

10、根据权利要求1所述的二十二碳六烯酸酯，或吡啶-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，或根据权利要求7所述的药物组合物，用作预防和/或治疗心房纤维性颤动的药物的用途。