

發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 96122472

C07D 213/30 (2006.01)

※ 申請日期： 96.6.22

※IPC 分類：

A61K 31/465 (2006.01)

C07C 57/03 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

二十二碳六烯酸(DHA)酯類及其治療及預防心血管疾病之用途

DHA ESTERS AND USE THEREOF IN TREATMENT AND PREVENTION OF CARDIOVASCULAR DISEASE

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

皮爾法伯製藥公司 / PIERRE FABRE MEDICAMENT

代表人：(中文/英文)

羅塞 皮瑞克 / ROUSSEAU, PIERICK

住居所或營業所地址：(中文/英文)

法國波爾洛內畢朗寇·亞貝爾剛斯區 45 號

45, place Abel Gance 92100 BOULOGNE BILLANCOURT FRANCE

國 籍：(中文/英文)

法國 / FRANCE

三、發明人：(共 6 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 布朗 弗瑞德里克 / BRUNE, FREDERIQUE

2. 戴爾宏 安德烈 / DELHON, ANDRE

3. 加戴特 珍 / GARDETTE, JEAN

4. 派托塞 珍 F. / PATOISEAU, JEAN FRANCOIS

5. 馬堤 亞倫 / MARTY, ALAIN

6. 塞維瑞克 艾堤納 / SEVERAC, ETIENNE

國 籍：(中文/英文)

1.-6. 法國 / FRANCE

四、聲明事項：

主張專利法第二十二條第二項 第一款或 第二款規定之事實，其事實發生日期為：。

申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1. 法國、 2006/06/23、 06/05649

無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

主張專利法第三十條生物材料：

須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

不須寄存生物材料者：

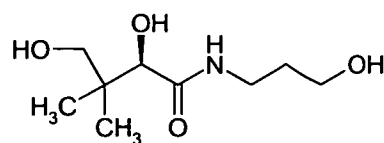
所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

五、中文發明摘要：

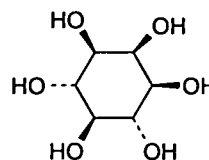
本發明係有關於一種二十二碳六烯酸酯，具有一擇自於該維生素B群或維生素原中之醇類，較佳地包含有：



，泛醇，該化學式如下：

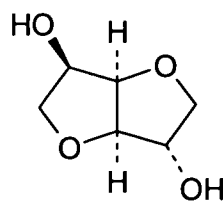


及肌醇，該化學式如下：



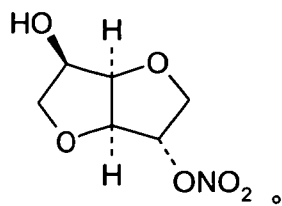
，或具有

異山梨醇，該化學式如下：



或異山梨醇單硝酸酯，該化

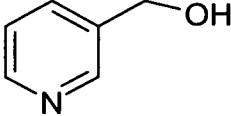
學式如下：

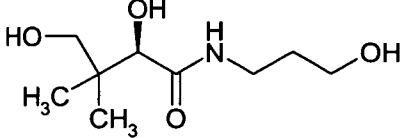


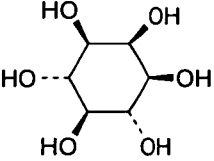
其亦有關於製備包含有該物之一藥學組成物之一方法，並使用該物於治療或預防心血管疾病，特別是心房肌纖維顫動。

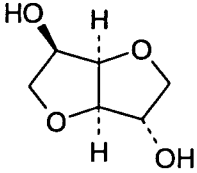
六、英文發明摘要：

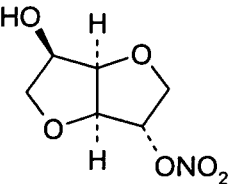
the present invention relates to a docosahexaenoic acid ester with an alcohol chosen among the group-B vitamins or provitamins, advantageously comprised by:

nicotinyl alcohol of the following formula: , panthenol

of the following formula:  and inositol of the

following formula:  or with isosorbide of the following

formula:  or isosorbide mononitrate of the following

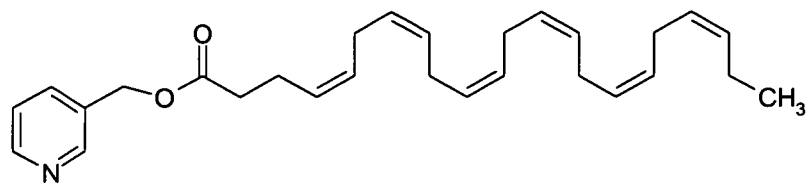
formula: .

It also relates to a method of preparation of same, a pharmaceutical composition comprising same and the use of same in the treatment or prevention of cardiovascular disease, in particular auricular fibrillation.

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 () 圖。(無)

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

(1)

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關於二十二碳六烯酸(DHA)酯類，具有擇
自於該維生素B群或維生素原中之醇類諸如菸醇(B3)、泛醇
5 (B5)或肌醇(B7)、或異山梨醇或異山梨醇單硝酸酯，及特別
是吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，及使用該物為一藥
物以治療及預防心血管疾病。

【先前技術】

該Ω3多不飽和脂肪酸，特別是較佳地經純化及濃縮為
10 乙基酯形式之EPA及DHA，係已知其等在某些心血管疾病
治療及在相關風險因素調節之潛在用途。特別是，已知其
等在高脂血症、高膽固醇血症及高血壓的治療。在患有一
心肌梗塞之病患身上，以含有高濃度之EPA及DHA乙基酯
類之配方進行臨床試驗，顯示出其降低死亡率的有效性，
15 特別是猝死。這些結果一部分可歸功於對心室心肌細胞之
細胞膜產生一穩定作用，其可預防存有局部缺血之肌細胞
出現惡性心律不整，這類細胞可見於梗塞後之病患或重現
相同條件之實驗模型上。

此外，依照已知之專利申請案WO 2004/047835，DHA
20 及EPA乙基酯類可被使用在預防心房肌纖維顫動。然而，
令人驚訝地，該申請案之發明者發現到DHA及EPA在心房
肌纖維顫動並無相同作用：在心房肌纖維顫動，DHA比EPA
有一更強大的作用。因此，單獨使用DHA比使用DHA及EPA
混合物在心房肌纖維顫動的治療為更佳地，且無容置疑

地，在極多數心血管疾病的治療。

該維生素B群及維生素原的優勢與其功能有關。特別是，菸醇是來自菸酸(維生素B3)的醇類衍生，其可在人體內迅速地轉換為菸酸。

- 5 菸酸，亦稱做菸鹼酸，是一水溶性B群維生素，可自色氨酸中合成。然而，以降低膽固醇及油脂為目的之有效治療劑量係高過人體合成之數量。因此，以降低膽固醇及/或甘油三酸酯為目標時，則必須提供一口服補充。

10 依據作用機制，係推測菸酸抑制游離脂肪酸自脂肪組織中釋出，導致脂肪酸到肝的供應下降。因為越少的脂肪酸酯化成為甘油三酸酯，就越少量會被併入低密度脂蛋白(LDL)裡，因此降低LDL膽固醇的濃度。菸酸亦曾被提過能明顯地增加HDL膽固醇的濃度，極有可能藉由抑制HDL膽固醇其形式之代謝。

- 15 特別是，菸酸有一強力周邊血管擴張劑的作用。因此，靜脈注射的菸醇在其轉換成菸酸後，可導致血管擴張作用而有利於降低動脈血壓。

菸酸可廣泛地被使用在降低膽固醇及脂質的治療。

20 亦已知菸酸能與HMG-輔酵素A還原酵素抑制劑結合，諸如他汀類藥物(statins)，例如，在降低膽固醇的實例中，只藉由這些HMG-輔酵素A還原酵素抑制劑是無法充分證明之。當搜查各化合物其效用之益處時，特別是以他汀類藥物降低LDL膽固醇及以菸酸提升HDL膽固醇，諸如這樣之結合能帶來優勢。此外，菸酸適用於混合型血脂異常

的治療，且因此能同時影響膽固醇及甘油三酸酯的濃度。

泛醇是泛酸的醇類衍生物，泛酸即更為一般習知之維生素B5。在體內，泛醇能轉化成為泛酸。泛酸接著變成化合物輔酵素A其一重要部分，輔酵素A在細胞代謝上有特別的影響。實際上，其參與油脂、碳水化合物及蛋白質的代謝作用。泛醇亦參與乙醯膽鹼及腎上腺類固醇的形成。其亦作用在外來物的解毒及對傳染病的抵抗。

肌醇(維生素B7)使脂肪流通是藉由預防其堆集。其亦有一消懼劑之作用，其能刺激神經系統及肝臟，其能降低血液膽固醇濃度。其係與增加血管收縮素活動，控制細胞內的鈣離子濃度，維持細胞膜電位及細胞骨架集合有關。

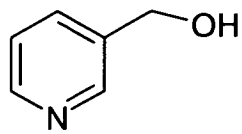
異山梨醇，特別是異山梨醇單硝酸酯，為一強力的周邊血管舒張劑。

令人驚訝地，該發明者發現到二十二碳六烯酸(DHA)酯類，具有一擇自於該維生素B群或維生素原中之醇類，諸如菸醇(B3)、泛醇(B5)及肌醇(B7)、或具有異山梨醇或異山梨醇單硝酸酯，特別是吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯(二十二碳六烯酸(DHA)酯，具有菸醇)，亦對心血管疾病有著重大效力的影響。

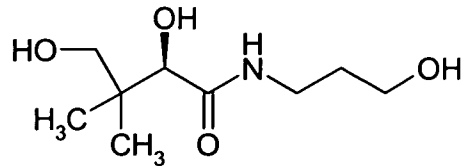
20 【發明內容】

因此，本發明係有關於一種二十二碳六烯酸酯，具有一擇自於該維生素B群或維生素原中之醇類，較佳地包含有：

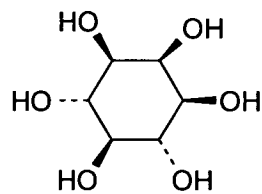
-菸醇，該化學式如下：



-泛醇，該化學式如下：

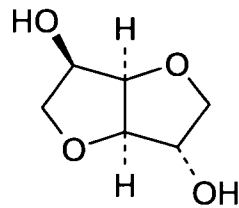


-肌醇，該化學式如下：

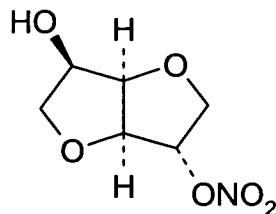


5

或異山梨醇，該化學式如下：

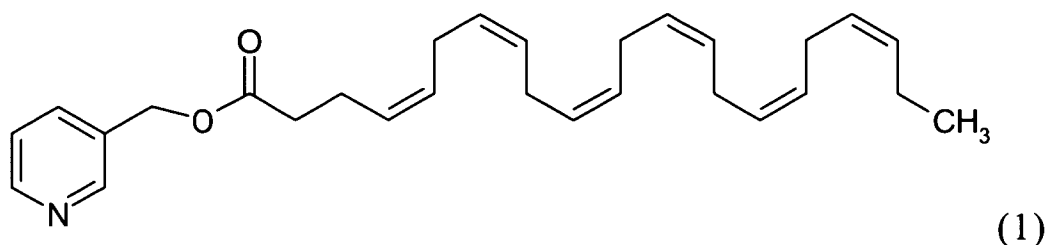


或異山梨醇單硝酸酯，該化學式如下：



10

較佳地，依照本發明該酯係為吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，其化學通式(1)如下：



本發明亦係與一種依照本發明製備該二十二碳六烯酸酯之方法有關，特別是依照本發明之該吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯(1)，為二十二碳六烯酸乙基酯類及一擇自於包含下列群組中醇類作轉酯作用：菸醇、泛醇、異山梨醇、異山梨醇單硝酸酯及肌醇，與菸醇為較佳地。

轉酯作用可由熟習該技術領域之人士以習知方法進行。

依據本發明，轉酯作用之進行，在有一催化劑存在下為較佳地。較佳地，催化劑為鹼金屬碳酸鹽或鹼土碳酸鹽，較佳地為 K_2CO_3 。鹼金屬碳酸鹽或鹼土碳酸鹽及DHA乙基酯之莫耳比，其較佳地範圍為1/1到6/1，更較佳地，菸醇及DHA乙基酯之莫耳比的範圍為1/1到6/1。較佳地，轉酯作用可在一溶劑中進行，較佳地擇自二氧雜環或THF；較佳地選擇為THF。THF可用氮起泡法排除。THF由氮起泡法除氣為較佳地。更較佳地，該反應混合物可用回流法加熱，至少14個小時為較佳地。

在本發明之另一具體實施例中，該依照本發明該轉酯作用之方法中該催化劑為一脂肪酵素，較佳地為南極假絲酵母(*Candida Antarctica*)脂肪酵素。特別是該脂肪酵素為固定形式。較佳地，該脂肪酵素是由諾和諾德(Novo Nordisk)所賣之諾維信[®](Novozyme[®])。較佳地，該反應發生在一沒有溶劑之介質，或在有一溶劑諸如2-甲醇-2-丁醇或乙腈，較佳地，在菸醇範例中，係發生在一沒有溶劑之環境，及在泛醇範例中有一溶劑存在。較佳地，在肌醇範例中，該

第 96122472 號專利申請案說明書替換本

101.9.28

使用溶劑為一離子極性溶劑諸如 1-丁基-3-甲基咪唑BF₄ 或 1-丁基-3-甲基咪唑(CN)₂。該反應發生在一高於室溫之溫度，較佳地為 60°C。

較佳地，在該反應進行時移除乙醇，以真空乾燥機及
5 氮起泡法為較佳地，用氮起泡法為更佳地。這樣一來可增加轉換率，加速反應及排除寄生的水解反應。

較佳地，醇類及 DHA 乙基酯之該莫耳比介於 1 到 5，更較佳地，為介於 1.5 到 4.5。

較佳地，該反應進行時間介於 1 到 100 個小時，介於 1 到
10 72 個小時為較佳地，介於 1 到 48 個小時為較佳地，介於 1 到 3 個小時為更佳地。

在本發明之另一具體實施例中依照本發明之該方法，該轉酯作用反應發生在一無水溶劑中，在一存有水阱的非無水溶劑諸如，例如，氯化鋰、MgCl₂ 或矽膠，或在無溶劑
15 之乾燥環境中。如此一來可排除寄生的水解反應。

較佳地，該轉酯作用反應發生係與純化的二十二碳六烯酸乙基酯(純度為至少 95%，可買到商品化或由熟習該技術領域之人士以習知方法從乙酸乙酯脂肪酸混合物中純化)或與包含有至少 10% 莫耳 DHA 乙基酯之混合物。若是使用
20 一混合物之 DHA 乙基酯，建議純化該酯以得到後續之轉酯作用反應。

本發明亦係有關於一包含有依照本發明之該二十二碳六烯酸酯之藥學組成物，特別是依照本發明之該吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，及至少一種之藥學上可接受的

賦形劑。

依照本發明之該藥學組成物可配製以投藥於哺乳動物，包括人。依照治療及研究之疾病而劑量不同。這些組成物其製備法係依投藥如口腔、舌下、皮下、肌內、靜脈內、透膚，局部或直腸途徑。在這種情況下，該有效成分
5 能依單位劑量形式或依傳統藥學上載劑投藥於動物或人。適合的單位劑量投藥形式包括有口服途徑形式諸如片劑、明膠膠囊、粉劑、顆粒及口服溶液或懸浮液，經舌下及口服形式、皮下、局部、肌內、靜脈內、鼻內或眼內投藥形
10 式及直腸投藥形式。

當一固態組成物以片劑形式製備時，該主要有效成分係與一藥學的載劑，諸如明膠、澱粉、乳糖、硬脂酸鎂、滑石，阿拉伯膠、矽石或類似物混合。片劑可包覆上蔗糖或其它適合之材料或以能延遲或延展效力的方式處理之，
15 因此它們可持續地釋放有效劑量之預定量。

要得到一明膠膠囊配製品可混合該有效成分及一稀釋劑，然後將該混合物灌入軟式或硬式明膠膠囊中。

一糖漿或醃劑形式之製劑，可包含有該有效成分與甜味劑、防腐劑在一起，亦可包含有一調味劑及一適合的著
20 色劑。

能分散在水中之粉劑或顆粒，可包含有該有效成分之混合物其含離散劑、濕潤劑或懸浮劑，亦可含味覺矯味劑或甜味劑。

塞劑，可與在直腸溫度融化之結合劑一起製備，例如，

諸如可可豆脂或聚乙二醇，可使用在直腸投藥。

使用在腸胃外(靜脈內、肌內等等)、鼻內或眼內之投藥，係為包含有藥理上相容之離散劑及/或濕潤劑之水狀懸浮、等張鹽溶液或無菌可注射的溶液。

- 5 該有效成分亦可被配製為微膠囊形式，可任擇一或更多之添加劑。

較佳地，依照本發明之該藥學組成物投藥方式係經由口腔或靜脈內途徑。在梗塞後治療範例時，經靜脈內途徑為較佳地。

- 10 依照本發明之該藥學組成物可包括其他有效成分以提高一互補或可能之加乘效應。較佳地，該藥學組成物不包括EPA酯。

- 本發明亦係與依照本發明之該二十二碳六烯酸酯有關，特別是依照本發明之該吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，或依照本發明之該藥學組成物，作為一藥物使用。
- 15

- 本發明亦係與依照本發明之該二十二碳六烯酸酯有關，特別是依照本發明之該吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，或依照本發明之該藥學組成物，作為一藥物使用以預防及/或治療心血管疾病，其較佳地擇自心房及/或心室心律不整、心搏過速及/或肌纖維顫動；在預防及/或治療如心肌細胞之電流傳導失常；在預防及/或治療多種心血管疾病的高風險因素，較佳地擇自於高三酸甘油酯血症、高膽固醇症、高血壓、高血脂症、血脂異常、較佳地混合血脂異常，及/或者在血液凝固時第七因素過度活動VII；治療及/
- 20

或初級或次級預防心房及/或心室心律不整、心搏過速、肌纖維顫動及/或因心肌梗塞誘導之電流傳導失常，較佳地為猝死；及/或為梗塞後治療。

最後，本發明係與依照本發明之該二十二碳六烯酸酯
5 有關，特別是依照本發明之該吡啶基-3-基甲基二十二碳六
烯酸酯，或依照本發明之該藥學組成物，作為一藥物使用
以預防及/或心房肌纖維顫動。

無理論根據，依照本發明之該二十二碳六烯酸酯，特
別是該吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯，似乎是經由酯
10 解酵素作用，在體內釋放出醇類及DHA，特別是在吡啶基
-3-基甲基二十二碳六烯酸酯範例中的菸醇及DHA。因此，
依照本發明之該二十二碳六烯酸酯似乎與一DHA及醇類混
合物有一樣之作用。因此，如果此醇係為一維生素B群或維
生素原，依照本發明之該二十二碳六烯酸酯將與DHA及一
15 維生素B群或維生素原之混合物有相同之效用。在吡啶基
-3-基甲基二十二碳六烯酸酯範例中，其亦似乎有菸醇在體
內轉換為菸酸。因此，依照本發明之該吡啶基-3-基甲基二
十二碳六烯酸酯似乎是與DHA及菸酸之一混合物有相同之
作用。菸酸之血管擴張劑效用的優點係為DHA在末梢區域
20 最令人滿意之分佈，特別是在靜脈注射吡啶基-3-基甲基二
十二碳六烯酸酯，菸醇在轉換後變為菸酸的範例中。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

用下述參考資料的圖及實施例，以進一步了解本發明。

第1圖係描述在該轉酯作用反應期間，以DHA-EE消耗百分比對時間作一函數，實施例3-1(開管)、3-2(在真空之下)及3-3(在氮起泡法下)，存有200 mg諾維信[®](Novozyme[®])，
5 在60°C，醇類對酯之比率為3。

下述為非特定之實施例。

實施例1：使用K₂CO₃合成吡啶基-3-基甲基二十二碳六
烯酸酯

1g(2.8 mmol)的乙基二十二碳六烯酸酯(純度高於
10 95%；由Interchim供應)被放置在5ml的THF中，在存有
1.53g(11mmol)K₂CO₃及1.06 ml(10.9mmol)菸醇(純度高於
95%；由Acros提供)下，用氮起泡法除氣。該反應混合物係
在回流狀況下加熱7小時，然後加入0.76 g(5.5 mmol)K₂CO₃
並再持續加熱7小時。

15 在冷卻後，將該反應混合物溶於水中，然後用乙酸乙
酯萃取。該有機相位用MgSO₄乾燥、過濾然後濃縮至無水。
所得之該濾渣用矽石快速色層分析法純化(CH₂Cl₂→90/10
CH₂Cl₂/乙酸乙酯梯度，15分鐘)。可分離到一透明油狀物
(0.84g,產量71%)。

20 矽石膠體 TLC 60 F 251 默克 (Merck)，90/10
CH₂Cl₂/AcOEt，Rf=0.35。

實施例2：使用脂肪酵素合成吡啶基-3-基甲基二十二碳
六烯酸酯

所有反應係在一不連續之混合反應器(磁性混合)中，在

各酵素之合適溫度下執行。

所使用之產品係為：

- 濃縮 70%DHA 乙基酯 (DHA-EE) 之一乙基酯類混合物
(禾大化學有限公司 (Croda Chemical Ltd.) 賣出)，之後稱為
5 「70% DHA-EE 酯混合物；」

- 諾維信[®] (Novozyme[®])，固定形式之南極假絲酵母脂肪酵素，由諾和諾德 (Novo Nordisk) 所賣；

- 菸醇。

該反應混合物亦係為：

10 - 無溶劑僅使用該受質之一介質；或
- 使用各類溶劑之一有機介質。

使用在此有機介質之該溶劑係為：

- 2-甲醇-2-丁醇 (2M2B)，為一溫和之極性溶劑，可使
諸如多不飽和的脂肪酸酯類之忌水性化合物及諸如菸醇之
15 親水性化合物同時溶解；或

- 乙腈，其理由與 2M2B 相同。

該反應條件係總結於下述第 1 表中：

第 1 表：70% DHA-EE 酯類及菸醇之轉酯作用之反應條件測試。

醇類	介質	[70%DHA-EE 酯類] (M)	[醇類]	總體積 (ml)	醇類/酯類 莫耳比
菸醇	有機的 (2M2B 乙腈)	0.43	0.64	12	1.5
	無溶劑	1.5	4.5	3.5	3

20 各條件係與 200 mg 的諾維信[®] (Novozyme[®]) 在 60°C 培養。在 2M2B 中進行之反應係為在大氣中 (在排氣罩下) 測

試，在 60°C 與 200mg 的諾維信[®](Novozyme[®])。

定期取出 500 μ l 樣品直到該反應完成。抑制該反應之方法係為用離心法，5 分鐘，轉速 13,000 rpm，以便將固定酵素自介質中移除。直到分析前，所有樣品存放在 4°C。

- 5 同時進行無酵素之對照反應及無輔-受質(菸醇)之對照反應。

分析之執行係依照下述參數，使用兩種 HPLC 方法(使用 Agilent 1100 系列儀器)：

方法 1：

- 10 - Zorbax SB-C18 管柱(4.6 mm x 25 cm)
- 溫度：40 °C
- 流速：1 ml/min
- 溶析液：0.02% 甲醇/醋酸
- 測定：折射測定法
15 - 運作期間：15 分鐘

方法 2：

- Zorbax SB-C18 管柱(4.6 mm x 25 cm)
- 溫度：40 °C
- 流速：3 ml/min
20 - 溶析液：50/50 乙腈/丙酮
- 測定：折射測定法
- 運行期間：15 分鐘

在不同反應進行時取出之樣品，預先稀釋到低於 100 mM 之一濃度，稀釋液在方法 1 範例中用 0.02% 甲醇/醋酸一

混合液，及在方法2範例中用丙酮來。

結果與討論

在該轉酯作用反應中出現二種類型。在分析條件下，在4.15分鐘時，第一種被沖提出，並相當於該酯水解作用產物，第二種是在4.85分鐘中提出。後者的化合物相當於70% DHA-EE酯類及菸醇間轉酯作用之產物。這此，預期只有一種產物，如同菸醇只有一單獨一級羥基。

各類的反應條件下所得到之轉換百分比表示在下述第2表：

10 第2表：70% DHA-EE酯類及菸醇之轉酯作用進行時所得之轉換百分比(*：在範例中，在反應期間，該管為打開以允許該乙醇產物蒸發。)

反應條件	DHA-EE變成DHA-菸醇之轉換百分比
乙腈	31%在72小時
2M2B	47%在48小時
2M2B在大氣下	60%在118小時
無溶劑	11%在72小時
無溶劑在大氣下	100%在72小時

15 當該反應在大氣中進行時，有較高轉換率；該乙醇產物蒸發而使得該反應之平衡趨向合成DHA-菸醇。這些轉酯作用反應伴有該反應混合物大量變黑。

20 當使用2M2B為反應溶劑時，水解作用產物會優先出現。然而，一微弱的水解作用亦存在於一無溶劑之介質中。因此，似乎係使用之菸醇仍存有水分或周圍溼氣導致這寄生反應。

70% DHA-EE酯類及菸醇之轉酯作用反應的可行性已

被證明，而這樣的反應展現出接近或大於90%有利的轉換率，特別是當該反應進行時，將乙醇產物自該反應混合物中移除。然而，因為使用之該溶劑中存有水分及/或周圍溼氣，使一寄生水解反應干擾了這些合成。

- 5 因此，嘗試除掉該觀察到之寄生水解反應看起來似乎是有影響。例如，使用完全無水溶劑。其亦可以在存有一水阱(例如，氯化鋰、 $MgCl_2$ 或矽膠)下進行相同反應，以排除可能的水解。

 在該菸醇-DHA酯合成反應中，該反應進行時乙醇產物
10 似乎是限制該反應的一個要素。其移除可改變該反應之平衡而趨向所欲之酯類合成。因此，使這個移除達最佳化係為合適的，而值得注意地是在減壓狀態時的合成。這允許乙醇快速蒸發並因此增加反應速率。

 實施例3:使用脂肪分解酵素合成吡啶基-3-基甲基二十
15 二碳六烯酸酯；轉酯作用最適化；該反應進行時乙醇產物之蒸發作用及氧化烘焦之脫去作用

 一與實施例2相似之合成反應，其執行為使用該同樣起始產物(菸醇、10% DHA-EE酯混合物、諾維信[®](Novozyme[®]))
 在一沒有溶劑之介質，60°C時，在存有200 mg諾維信
20 [®](Novozyme[®])，醇類與酯類比率為3。該使用之反應器與實施例2相同，該分析方法亦相同。

 實施例3.1：

 實施例2比較，唯一的差別係該反應是在一個開啟容器(開管)中執行。

結果(第1圖)：

該轉酯作用反應為「緩慢」，總需近乎80個小時。存有氧化烘焦。存有「強烈的」寄生水解。

實施例3.2：

- 5 與實施例2比較，唯一的差別係該反應是在真空之下執行。

結果(第1圖)：

與實施例3.1比較，該反應為「加速度」，但仍為「緩慢」，總需近乎48個小時。

- 10 此外，存有氧化烘焦及寄生水解。

實施例3.3：

與實施例2比較，唯一的差別係該反應是在氮起泡法下執行。

結果(第1圖)：

- 15 該反應有非常顯著地速度增加，總需少於3 個小時，因能瞬間移除該反應進行之乙醇產物及一改良混合物。

記錄到無氧化烘焦。

寄生水解明顯地減少。

實施例4：使用一脂肪酵素及泛醇以合成DHA酯類

- 20 該實驗及分析條件與實施例2相同，除了下述差別外：

反應條件係總結於下述第3表中：

第3表：測試70% DHA-EE酯類及泛醇之轉酯作用之反應條件。

醇類	介質	[70%DHA-EE 酯類] (M)	[醇類]	總體積	醇類/酯類 莫耳比
泛醇	有機的(2M2B 及乙腈)	0.43	1.28	12	3

結果與討論：

在分析條件下，有二種類型在3.9分鐘及4.14分鐘被洗脫而出。泛醇有二個一級醇。因此可預期有數個產品(最多為三個)。然而，在無輔-受質(泛醇)的對照組中，出現該4.14分鐘的波峰。因此上述的波峰似乎對應乙基酯水解作用，其係與所使用溶劑存有水分而有關連。這反應只見於該酵素存在下。

結論為，只有第一波峰對應泛醇-DHA酯合成。

各類的反應條件下所得到之轉換百分比總結在下述第4表：

第4表：70% DHA-EE酯類及泛醇之轉酯作用進行時所得之轉換百分比(*：在範例中，在反應期間，該管為打開以允許該乙醇產物蒸發。)

反應條件	DHA-EE變成DHA-泛醇之轉換百分比
乙腈	68%在136小時
2M2B	76%在115小時
2M2B在大氣中	88%在96小時

當該反應在大氣中進行時，似乎是可增加70% DHA-EE酯類之轉換百分比。實際上，在這條件下，該反應進行時之該乙醇產物蒸發。因此，該反應之平衡趨向合成泛醇-DHA酯類。此外，這些轉換數值確定是估計過低，因為有2M2B溶劑之同時蒸發(介質濃縮效應)。這些轉酯作用反應亦伴有該反應混合物大量變黑。

70% DHA-EE酯類及泛醇之轉酯作用反應的可行性已被證明，而這樣的反應展現出接近或大於90%有利的轉換率，特別是當該反應進行時，將乙醇產物自該反應混合物

中移除。然而，因為使用之該溶劑中存有水分及/或周圍溼氣，使一寄生水解反應干擾了這些合成。

因此，嘗試除掉觀察到之該寄生水解反應看起來似乎是有影響。例如，使用完全無水溶劑。其亦可以在存有一水阱(例如，氯化鋰、 $MgCl_2$ 或矽膠)下進行相同反應，以排除可能的水解。

在該泛醇-DHA酯合成反應中，該反應進行時乙醇產物似乎是限制該反應的一個要素。其移除可改變該反應之平衡而趨向想要之合成酯類。因此，使這個移除達到最佳化係為可行的，而值得注意地是在減壓狀態時的合成。這允許乙醇快速蒸發並因此增加反應速率。

實施例5：比較EPA及DHA在超快速鉀電流(ultrarapid potassium current)及心房肌纖維顫動之作用結果

心臟動作電位係為激發之心臟細胞其基本電位單位，數種離子通道之動作係造成該動作電位不同階段的原因。不同種類的動作電位對應不同的心臟部位，因此允許這些部位有順序及配合之動作。為此理由，Kv 1.5的鉀通道，由KCNA5 基因編碼，只表現在心房組織，係造成超快速鉀電流(I_{kur})的原因，其作用在心室動作電位之再極化。這高度定域表現之Kv 1.5為實際上選擇治療心房肌纖維顫動之目標。其病狀為可觀察到心房動作電位改變。

因此，研究DHA及EPA在 I_{kur} 效用。為此目的，將人類異構Kv 1.5通道(hKv 1.5)以穩定的方式轉染到HEK 293(人胚胎腎臟)細胞裡，並使用一全細胞全自動膜片鉗

(patch-clamp)技術來研究由這些通道動作所造成之電流。

材料與方法

細胞株之培養

HEK 293-hKv 1.5細胞在標準條件下生長(37°C, 培養箱
5 設為95% O₂及5% CO₂), 在法可(Falcon)培養盤中直到80%細胞聚集(confluence)。然後將其移置到35mm培養皿中培養, 含有下述之培養基: DMEM(Invitrogen)、10%胎牛血清(Invitrogen)、-100U/ml青黴素、100 μg/ml鏈黴素及0.25 mg/ml麩醯胺(Invitrogen)之混合物; 及1.25mg/ml抗生素
10 G418(Geneticin[®])以作為篩選用之抗生素。

電生理學

在室溫下(19-22 °C), 使用全細胞全自動膜片鉗技術研究I_{kur}。該吸量管培養基含有: 125 mM K-天門冬胺酸、20 mM KCl、10 mM EGTA、5 mM HEPES、5 mM Mg-ATP、1
15 mM MgCl₂, pH 7.3(KOH)。該細胞外培養基含有: 140 mM NaCl、20 mM HEPES、5 mM D(+)-葡萄糖、5 mM KCl、2 mM CaCl₂; 1 mM MgCl₂, pH 7.4(NaOH)。

每15秒誘發I_{kur}, 係用保持電位-80mV, 時程300 ms、去極化到+60mV之脈衝, 接著用-50 mV再極化。該電流波
20 峰之振幅定義係為該去極化脈衝之最初100ms期間所得之最大電流。其末端脈衝之電流振幅係為測定該去極化脈衝之最後20ms。

試劑

DHA及EPA係由Sigma供應。用乙醇製備庫存溶液(10

mM)，該溶劑最終濃度為0.25%。

結果：

結果總結於下述第5表。

5 第5表：DHA與EPA在多種濃度下，其 I_{kur} 之抑制百分比。

濃度	DHA				樣品數
	波峰 I_{Kur}		末端脈衝		
	平均值	標準誤	平均值	標準誤	
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

濃度	EPA				樣品數
	波峰 I_{Kur}		末端脈衝		
	平均值	標準誤	平均值	標準誤	
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些微地降低波峰 I_{kur} 之振幅(最大抑制為 $17.5 \pm 6.4\%$ 、 $n=10$ 、 $p<0.05$ 在 10μ M)及末端脈衝之電流振幅($61.6 \pm 7.3\%$ 、 $n=5$ 、 $p<0.05$ 在 25μ M)。

DHA抑制波峰 I_{kur} 之振幅(最大抑制為 $58.1 \pm 13.6\%$ ($n=5$ 、 $p<0.05$)及其末端脈衝之電流振幅 $86.5 \pm 3.4\%$ ($n=5$ 、 $p<0.005$) $在25 \mu$ M時。

結論：

15 這些結果顯示出在該申請案中以人類Kv 1.5通道轉染HEK 293細胞之超快速鉀電流 I_{kur} ，DHA抑制係比EPA更加

有力地，且其方式為一濃度相關。DHA較佳地作用在末端脈衝之電流，暗示在Kv 1.5通道上有一去活性效用。此外，這效用係伴隨著DHA經由波峰 I_{kur} 下降(在EPA有相反觀測)，DHA有效抑制 I_{kur} 。

- 5 在這些 I_{kur} 上的效用，指出在心房肌纖維顫動上，DHA可有一有益作用。

【圖式簡單說明】

- 第1圖係描述在該轉酯作用反應期間，以DHA-EE消耗百分比對時間作一函數，實施例3-1(開管)、3-2(在真空之下)
10 及3-3(在氮起泡法下)，存有200 mg諾維信[®](Novozyme[®])，在60°C，醇類對酯之比率為3。

【主要元件符號說明】

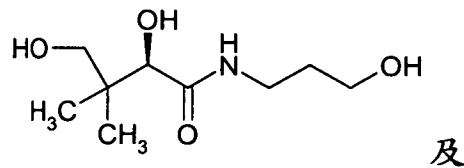
(無)

第 96122472 號專利申請案申請專利範圍替換本

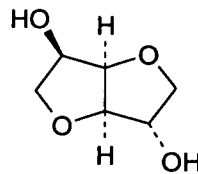
十、申請專利範圍：

1. 一種具有一擇自於由下述所構成的群組中之醇類的二十二碳六烯酸酯：

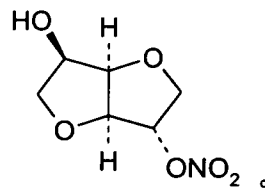
-泛醇，其化學式如下：



或異山梨醇，其化學式如下：



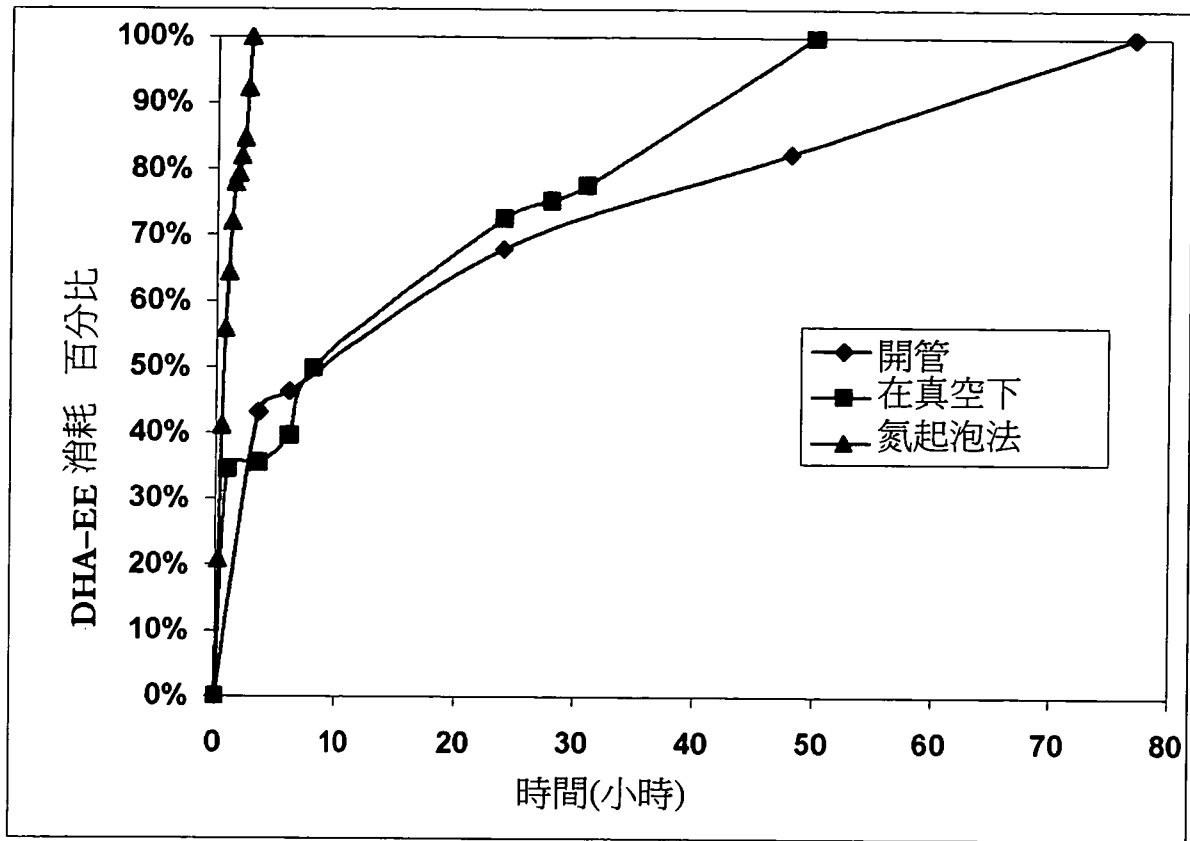
以及異山梨醇單硝酸酯，其化學式如下：



2. 一種具有泛醇之二十二碳六烯酸酯。
3. 一種製備如申請專利範圍第1或2項之二十二碳六烯酸酯之方法，該方法為將二十二碳六烯酸乙基酯與醇類作轉酯作用，該醇類係擇自於由下述所構成之群組中：泛醇、異山梨醇及異山梨醇單硝酸酯。
4. 如申請專利範圍第3項之方法，其中所述方法在實施時存有催化劑。
5. 如申請專利範圍第4項之方法，其中該催化劑是脂肪分解酵素。

6. 如申請專利範圍第5項之方法，其中乙醇在反應時會被移除。
7. 如申請專利範圍第5或6項之方法，其中該反應發生在一無水溶劑或在無溶劑的乾燥大氣中。
8. 一種藥學組成物，其包含有如申請專利範圍第1或2項之二十二碳六烯酸酯，以及至少一種藥學上可接受的賦形劑。
9. 一種如申請專利範圍第1或2項之二十二碳六烯酸酯或如申請專利範圍第8項之藥學組成物於製備一藥物的用途。
10. 一種如申請專利範圍第1或2項之二十二碳六烯酸酯或吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯或如申請專利範圍第8項之藥學組成物於製備一藥物的用途，該藥物係用以預防及/或治療與心律有關的心血管疾病；用以預防及/或治療如心肌細胞之電流傳導失常；用以預防及/或治療多種心血管疾病的高風險因素，該等因素係擇自於高三酸甘油酯血症、高血壓、高血脂症、血脂異常；用以治療及/或初級或次級預防衍生自心律病症的心血管疾病；及/或用於梗塞後治療。
11. 一種如申請專利範圍第1或2項之二十二碳六烯酸酯或吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯或如申請專利範圍第8項之藥學組成物於製備一藥物的用途，該藥物係用以預防以及/或治療心房肌纖維顫動。
12. 如申請專利範圍第1或2項之二十二碳六烯酸酯或吡啶

- 基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯或如申請專利範圍第8項之藥學組成物用於如申請專利範圍第10項的用途，其中與心律有關的心血管疾病係擇自於心房及/或心室心律不整、心搏過速及/或肌纖維顫動。
13. 如申請專利範圍第1或2項之二十二碳六烯酸酯或吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯或如申請專利範圍第8項之藥學組成物用於如申請專利範圍第10項的用途，其中衍生自心律病症的心血管疾病係心房及/或心室心律不整、心搏過速、肌纖維顫動及/或心肌梗塞誘導之電流傳導失常。
14. 如申請專利範圍第1或2項之二十二碳六烯酸酯或吡啶基-3-基甲基二十二碳六烯酸酯或如申請專利範圍第8項之藥學組成物用於如申請專利範圍第13項的用途，其中該藥物係用於治療及/或初級或次級預防猝死。



第 1 圖