

12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

22) Date de dépôt : 23.06.06.

30) Priorité :

43) Date de mise à la disposition du public de la demande : 28.12.07 Bulletin 07/52.

56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du présent fascicule*

60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

71) Demandeur(s) : PIERRE FABRE MEDICAMENT  
Société anonyme — FR.

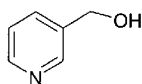
72) Inventeur(s) : BRUNE FREDERIQUE, DELHON  
ANDRE, GARDETTE JEAN, PATOISEAU JEAN  
FRANCOIS, MARTY ALAIN et SEVERAC ETIENNE.

73) Titulaire(s) :

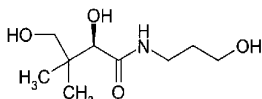
74) Mandataire(s) : REGIMBEAU.

54) ESTER DE DHA ET SON UTILISATION DANS LE TRAITEMENT ET LA PREVENTION DES MALADIES CARDIOVASCULAIRES.

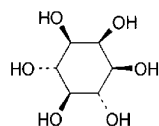
57) La présente invention concerne l'ester de l'acide docosahexaénoïque avec un alcool choisi parmi les vitamines ou provitamines du groupe B, avantageusement constitué par le nicotinol de formule suivante



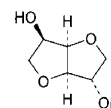
le panthénol de formule suivante



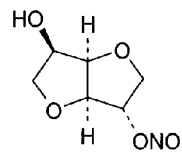
et l'inositol de formule suivante



ou avec l'isosorbide de formule suivante:



ou l'isosorbide mononitrate de formule suivante:



Elle concerne également leur procédé de préparation, une composition pharmaceutique les comprenant et son utilisation dans le traitement ou la prévention des maladies cardiovasculaires et en particulier de la fibrillation auriculaire.



La présente invention concerne les esters de l'acide docosahexaénoïque (DHA) avec les alcools choisis parmi les vitamines ou provitamines du groupe B telles que le nicotinol (B3), le panthénol (B5) ou avec l'inositol (B7), ou avec l'isosorbide ou l'isosorbide mononitrate, et en particulier le docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl, et leur utilisation en tant que médicament dans le traitement et la prévention des maladies cardiovasculaires.

10

Les acides gras polyinsaturés de la série des Omega 3, en particulier l'EPA et le DHA avantageusement purifiés et concentrés sous forme d'ester éthylique sont connus pour leur potentiel d'utilisation dans le traitement de certaines maladies cardiovasculaires et la modulation des facteurs de risques correspondants. En particulier, ils sont connus dans le traitement de l'hyperlipidémie, de l'hypercholestérolémie et de l'hypertension. Les essais cliniques conduits avec des formulations contenant une forte concentration en ester éthylique d'EPA et de DHA sur des patients qui avaient souffert d'un infarctus du myocarde ont démontré leur efficacité en réduisant la mortalité et en particulier la mort subite. Ces résultats ont été en partie attribués à un effet de stabilisation des membranes cellulaires des cardiomyocytes ventriculaires, ce qui empêche l'apparition d'arythmie maligne en présence de myocytes ischémiques comme dans les patients après un infarctus ou dans des modèles expérimentaux qui reproduisent de telles conditions.

Par ailleurs, il est également connu selon la demande de brevet WO 2004/047835 que les esters éthyliques de DHA et d'EPA peuvent être utilisés pour prévenir la fibrillation auriculaire. Toutefois, de façon surprenante, les inventeurs de la présente demande ont découvert que le DHA et l'EPA n'avaient pas le même effet sur la fibrillation auriculaire, le DHA ayant un effet bien plus important sur la fibrillation auriculaire que l'EPA. Ainsi, il est plus intéressant d'utiliser le DHA seul qu'un mélange de DHA et d'EPA dans le traitement de la fibrillation

30

auriculaire et sans doute dans le traitement de la majorité des maladies cardiovasculaires.

Les vitamines ou provitamines du groupe B ont les avantages liés à leur fonction. En particulier, le nicotinol est l'alcool dérivé de l'acide nicotinique (vitamine B3).

5 Il est converti rapidement en acide nicotinique dans le corps humain.

L'acide nicotinique appelé aussi niacine est une vitamine hydrosoluble du groupe B qui peut être synthétisée à partir du tryptophane. Cependant les doses thérapeutiques efficaces à des fins hypocholestérolémiantes et hypolipidémiantes sont supérieures aux quantités synthétisées par l'organisme et une supplémentation  
10 orale s'avère indispensable dans une visée hypocholestérolémiante et/ou hypotriglycéridémiante. En terme de mécanisme d'action, on suspecte que l'acide nicotinique inhibe la libération d'acides gras libres à partir de tissus adipeux, ce qui entraîne une diminution de l'apport en acides gras au niveau du foie. Moins d'acides gras étant estérifiés en triglycérides, moins sont ils à être incorporés dans  
15 les lipoprotéines de basse densité LDL ce qui entraîne une baisse du LDL-cholestérol. Il a aussi été noté que l'acide nicotinique permet d'augmenter de manière non négligeable les taux de HDL-cholestérol, certainement par inhibition du catabolisme de cette forme HDL-cholestérol.

En particulier l'acide nicotinique possède un fort effet vasodilatateur périphérique.  
20 Ainsi, l'injection intraveineuse du nicotinol après sa conversion en acide nicotinique entraînera une vasodilatation favorable à une baisse de la tension artérielle.

L'acide nicotinique est largement utilisé dans les thérapies hypocholestérolémiantes et hypolipidémiantes.

25 Il est aussi indiqué que l'acide nicotinique peut être associé à des inhibiteurs d'HMG Co-A réductase, tel que des statines par exemple, dans les cas où l'abaissement du cholestérol par ces inhibiteurs d'HMG Co-A réductase ne s'est pas avéré suffisant. Une telle association peut être bénéfique lorsque l'on souhaite tirer parti des effets de chacun des composés, en particulier la baisse du LDL-  
30 cholestérol en ce qui concerne les statines et la hausse du HDL-cholestérol en ce

qui concerne l'acide nicotinique. D'autre part, l'acide nicotinique est adapté au traitement des dyslipidémies mixtes et est ainsi capable d'influer tant sur les taux de cholestérol que sur les taux de triglycérides.

Le panthénol est l'alcool dérivé de l'acide pantothénique, plus connue sous le nom de vitamine B5. Dans l'organisme, le panthénol se transforme en acide pantothénique qui devient alors une partie importante du composé « coenzyme A », qui est particulièrement intéressant dans le métabolisme cellulaire. En effet, il prend part au métabolisme des lipides, des glucides et des protides. Le panthénol participe également à la formation de l'acétylcholine et des stéroïdes de la surrénale. Il intervient également dans la détoxification des corps étrangers et dans la résistance aux infections.

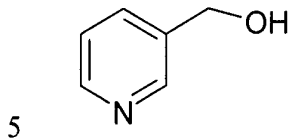
L'inositol ou vitamine B7 mobilise les graisses en évitant leur accumulation. Elle possède également un effet anxiolytique. Elle tonifie le système nerveux et le foie. Elle permet également de diminuer le taux de cholestérol dans le sang. Elle est impliquée dans l'augmentation de l'activité de la sérotonine, le contrôle de la concentration en calcium intracellulaire, la maintien du potentiel membranaire des cellules et l'assemblage du cytosquelette.

L'isosorbide, en particulier l'isosorbide mononitrate est un puissant vasodilatateur périphérique.

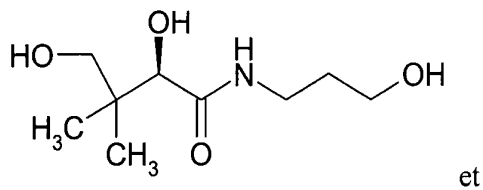
De façon surprenante les inventeurs ont découverts que les esters de l'acide docosahexaénoïque (DHA) avec les alcools choisis parmi les vitamines ou provitamines du groupe B telle que le nicotinol (B3), le panthénol (B5) et l'inositol (B6), ou avec l'isosorbide ou l'isosorbide mononitrate, et en particulier le docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl (ester de l'acide docosahexaénoïque (DHA) avec le nicotinol), avaient également une activité intéressante sur les maladies cardiovasculaires.

La présente invention a donc pour objet un ester de l'acide docosahexaénoïque avec un alcool Ester de l'acide docosahexaénoïque avec un alcool choisi parmi les vitamines ou provitamines du groupe B, avantageusement constitué par

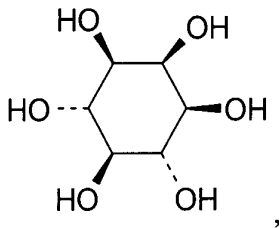
- le nicotinol de formule suivante :



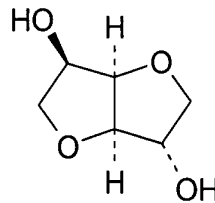
- le panthénol de formule suivante :



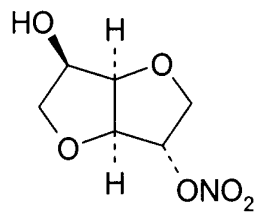
- l'inositol de formule suivante :



10 ou avec l'isosorbide de formule suivante :

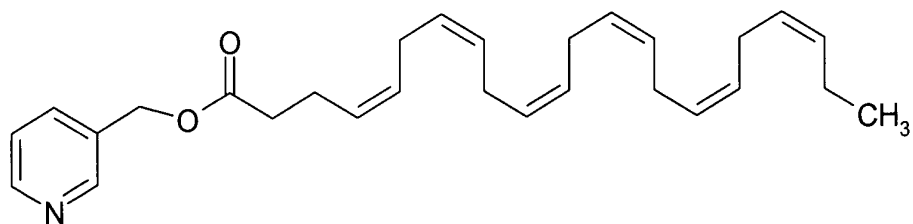


ou l'isosorbide



mononitrate de formule suivante :

Avantageusement l'ester selon la présente invention est le docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl de formule générale (1) suivante :



(1)

La présente invention concerne en outre un procédé de préparation de l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la présente invention, et en particulier du docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl (1) selon la présente invention, par transesterification de l'ester éthylique d'acide docosahexaénoïque avec l'alcool choisi dans le groupe constitué par le nicotinol, le panthénol, l'isosorbide, l'isosorbide mononitrate et l'inositol, avantageusement avec le nicotinol.

La transesterification peut être réalisée par des procédés bien connus de l'homme du métier.

Avantageusement la transesterification selon la présente invention est réalisée en présence d'un catalyseur. De façon avantageuse, ce catalyseur est un carbonate de métaux alcalins ou alcalino-terreux, avantageusement le  $K_2CO_3$ . Avantageusement le ratio molaire carbonate de métaux alcalins ou alcalino-terreux /ester éthylique de DHA est compris dans la gamme de 1-6/1. De façon avantageuse, le ratio molaire alcool/ester éthylique de DHA est compris dans la gamme 1-6/1, de façon encore plus avantageuse le ratio molaire nicotinol/ ester éthylique de DHA est compris dans la gamme 1-6/1. Avantageusement la réaction de transesterification est réalisée dans un solvant, avantageusement choisi parmi le dioxane ou le THF, de façon avantageuse, il s'agit du THF. De façon avantageuse, le THF est dégazé par bullage d'azote. De façon encore plus avantageuse, le milieu réactionnel est chauffé à reflux, avantageusement pendant au moins 14h.

Dans un autre mode particulier de réalisation de l'invention le catalyseur du procédé de transesterification selon la présente invention est une lipase, avantageusement la lipase de *Candida antarctica*. En particulier la lipase est une

- forme immobilisée. De façon avantageuse, il s'agit de la Novozyme® commercialisée par Novo Nordisk. De façon avantageuse la réaction a lieu dans un milieu exempt de solvant, ou dans un solvant tel que le 2-méthyl 2-butanol ou l'acétonitrile, de façon avantageuse dans un milieu exempt de solvant dans le cas du nicotinol et dans un solvant dans le cas du panthénol. Avantageusement dans le cas de l'inositol le solvant utilisé est un solvant ionique polaire tel que le 1-butyl-3méthylimidazolium BF<sub>4</sub> ou le 1-butyl-3méthylimidazolium C(CN)<sub>2</sub>. Avantageusement la réaction a lieu à une température supérieure à la température ambiante, de façon avantageuse à 60°C.
- 10 Avantageusement, l'éthanol est éliminé au cours de la réaction, de façon avantageuse sous vide ou par bullage d'azote, de façon encore plus avantageuse par bullage d'azote. Ceci permet d'accroître le taux de conversion, d'accélérer la réaction et d'éliminer la réaction parasite d'hydrolyse.
- De façon avantageuse, le ratio molaire alcool/ ester éthylique de DHA est compris entre 1 et 5, de façon avantageuse entre 1,5 et 4,5.
- 15 Avantageusement le temps de réaction est compris entre 1 heure et 100 heures, avantageusement entre 1 heure et 72 heures, de façon avantageuse entre 1 heure et 48 heures, de façon encore plus avantageuse entre 1 heure et 3 heures.
- 20 Dans un autre mode de réalisation particulier du procédé selon la présente invention, la réaction de transesterification a lieu dans un solvant anhydre, ou dans un solvant non anhydre mais en présence d'un piège à eau tel que par exemple le chlorure de lithium, MgCl<sub>2</sub> ou le gel de silice, ou sans solvant en atmosphère sèche. Ceci permet d'éliminer la réaction parasite d'hydrolyse.
- 25 De façon avantageuse, la réaction de transesterification a lieu sur de l'ester éthylique d'acide docosahexaénoïque pur (au moins 95% de pureté disponible commercialement ou purifié par des méthodes bien connues de l'homme du métier à partir d'un mélange d'ester éthylique d'acides gras) ou sur un mélange contenant
- 30 au moins 70% en mole d'ester éthylique de DHA. Dans le cas où l'ester éthylique

de DHA utilisé est un mélange, il conviendra de purifier l'ester obtenu suite à la réaction de transesterification.

La présente invention concerne en outre une composition pharmaceutique  
5 comprenant l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la présente invention, et en particulier le docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl selon la présente invention, et au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

Les compositions pharmaceutiques selon la présente invention peuvent être formulées pour l'administration aux mammifères, y compris l'homme. La  
10 posologie varie selon le traitement et selon l'affection en cause. Ces compositions sont réalisées de façon à pouvoir être administrées par voie orale, sublinguale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, transdermique, locale ou rectale. Dans ce cas l'ingrédient actif peut être administré sous formes unitaires d'administration, en mélange avec des supports pharmaceutiques classiques, aux animaux ou aux  
15 êtres humains. Les formes unitaires d'administration appropriées comprennent les formes par voie orale telles que les comprimés, les gélules, les poudres, les granules et les solutions ou suspensions orales, les formes d'administration sublinguale et buccale, les formes d'administration sous-cutanée, topique, intramusculaire, intraveineuse, intranasale ou intraoculaire et les formes  
20 d'administration rectale.

Lorsque l'on prépare une composition solide sous forme de comprimés, on mélange l'ingrédient actif principal avec un véhicule pharmaceutique tel que la gélatine, l'amidon, le lactose, le stéarate de magnésium, le talc, la gomme arabique, la silice ou analogues. On peut enrober les comprimés de saccharose ou d'autres  
25 matières appropriées ou encore on peut les traiter de telle sorte qu'ils aient une activité prolongée ou retardée et qu'ils libèrent d'une façon continue une quantité prédéterminée de principe actif.

On obtient une préparation en gélules en mélangeant l'ingrédient actif avec un diluant et en versant le mélange obtenu dans des gélules molles ou dures.

Une préparation sous forme de sirop ou d'éllixir peut contenir l'ingrédient actif conjointement avec un édulcorant, un antiseptique, ainsi qu'un agent donnant du goût et un colorant approprié.

5 Les poudres ou les granules dispersibles dans l'eau peuvent contenir l'ingrédient actif en mélange avec des agents de dispersion ou des agents mouillants, ou des agents de mise en suspension, de même qu'avec des correcteurs du goût ou des édulcorants.

10 Pour une administration rectale, on recourt à des suppositoires qui sont préparés avec des liants fondant à la température rectale, par exemple du beurre de cacao ou des polyéthylène glycols.

Pour une administration parentérale (intraveineuse, intramusculaire etc.), intranasale ou intraoculaire, on utilise des suspensions aqueuses, des solutions salines isotoniques ou des solutions stériles et injectables qui contiennent des agents de dispersion et/ou des agents mouillants pharmacologiquement compatibles.

15 Le principe actif peut être formulé également sous forme de microcapsules, éventuellement avec un ou plusieurs supports additifs.

Avantageusement, la composition pharmaceutique selon la présente invention est destinée à une administration par voie orale ou intraveineuse, de façon avantageuse 20 par voie intraveineuse dans le cas des traitements post-infarctus.

La composition pharmaceutique selon la présente invention peut comprendre d'autres principes actifs conduisant à un effet complémentaire ou éventuellement synergique. Avantageusement la composition pharmaceutique ne comprend pas d'ester d'EPA.

25

La présente invention concerne de plus l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la présente invention, et en particulier le docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl selon la présente invention, ou la composition pharmaceutique selon la présente invention pour son utilisation en tant que médicament.

30

La présente invention concerne en outre l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la présente invention, et en particulier le docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl selon la présente invention, ou la composition pharmaceutique selon la présente invention pour son utilisation en tant que médicament destiné à la prévention et/ou  
5 au traitement des maladies cardiovasculaires, avantageusement choisies parmi l'arythmie auriculaire et/ou ventriculaire, la tachycardie et/ou la fibrillation ; à la prévention et/ou au traitement de maladies représentées par des défauts de la conduction électrique des cellules du myocarde ; à la prévention et/ou au traitement de facteurs de risques multiples de maladies cardiovasculaires, avantageusement  
10 choisis parmi l'hypertriglycéridémie, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'hyperlipidémie, les dyslipidémies, avantageusement les dyslipidémies mixtes, et/ou l'hyperactivité de facteur VII de coagulation sanguine ; au traitement et/ou à la prévention primaire ou secondaire de maladies cardiovasculaires dérivant de l'arythmie auriculaire et/ou ventriculaire, de la tachycardie, de la fibrillation et/ou  
15 de défauts de la conduction électrique induits par l'infarctus du myocarde, avantageusement de la mort subite ; et/ou au traitement post-infarctus.

La présente invention concerne enfin l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la présente invention, et en particulier le docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl  
20 selon la présente invention, ou la composition pharmaceutique selon la présente invention pour son utilisation en tant que médicament destiné à la prévention et/ou au traitement de la fibrillation auriculaire.

Sans être lié par la théorie, il semble que l'ester de l'acide docosahexaénoïque  
25 selon la présente invention, et en particulier l'ester docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl selon la présente invention, libère dans le corps l'alcool et le DHA, et en particulier le nicotinol et le DHA dans le cas du docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl, via une activité esterasique. Ainsi l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la présente invention semble avoir la même activité qu'un mélange de DHA  
30 et d'alcool. Ainsi, si cet alcool est une vitamine ou une provitamine du groupe B,

l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la présente invention aura le même effet qu'un mélange de DHA et de vitamine ou provitamine du groupe B. Par ailleurs il semble que, dans le cas du docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl, le nicotinol soit transformé dans l'organisme en acide nicotinique. Ainsi le docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl selon la présente invention semble avoir la même activité qu'un mélange de DHA et d'acide nicotinique. L'avantage de l'effet vasodilatateur de l'acide nicotinique est la meilleure distribution du DHA en périphérie, en particulier en cas d'injection par voie intraveineuse du docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl, après conversion du nicotinol en acide nicotinique.

10

L'invention sera mieux comprise en référence à la figure et aux exemples qui suivent.

La figure 1 représente le pourcentage de consommation de DHA-EE en fonction du temps pour les exemples 3.1 (tube ouvert), 3.2 (sous vide) et 3.3 (sous bullage d'azote) lors de la réaction de transesterification en présence de 200 mg de Novozyme à 60°C avec un ratio alcool /ester de 3.

15

Les exemples suivants sont donnés à titre indicatif non limitatif.

**Exemple 1 : Synthèse du docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl en utilisant le  $K_2CO_3$**

20

1 g (2,8mmol) de docosahexaénoate d'éthyle (pureté supérieure à 95% - fournisseur : Interchim) sont placés dans 5ml de THF dégazé par bullage d'azote en présence de 1,53 g (11 mmol) de  $K_2CO_3$  broyé et 1,06 ml (10,9 mmol) de nicotinol (pureté supérieure à 98%-fournisseur : Acros). Le milieu réactionnel est chauffé à reflux pendant 7h puis 0,76g (5,5 mmol) de  $K_2CO_3$  sont ajoutés et le chauffage est poursuivi pendant 7h.

25

Après refroidissement, le milieu réactionnel est repris par de l'eau puis extrait à l'acétate d'éthyle. Les phases organiques sont séchées sur  $MgSO_4$ , filtrées puis concentrées à sec. Le résidu obtenu est purifié par chromatographie flash sur silice

30

(gradient  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 \rightarrow \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{acétate d'éthyle}$  : 90/10 pendant 15mn). Une huile claire est isolée (0,84g, rendement 71%).

CCM gel de silice 60 F 254 Merck,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-AcOEt}$  :90-10,  $R_f=0,35$ .

## 5 **Exemple 2 : Synthèse du docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl en utilisant une lipase**

Toutes les réactions sont réalisées dans un réacteur de type discontinu agité (agitation magnétique) et à la température optimale de chaque enzyme.

10 Les produits utilisés sont :

-Un mélange d'esters éthyliques enrichi à 70% en ester éthylique de DHA (DHA-EE) (commercialisé par Croda Chemical ltd) qui sera appelé « mélange d'esters DHA-EE 70% »

15 - Le Novozyme®, forme immobilisée de la lipase de *Candida antarctica*, commercialisée par Novo Nordisk.

- Le nicotinol

Le milieu réactionnel est soit :

- un milieu sans solvant qui fait intervenir uniquement les substrats.

- un milieu organique faisant intervenir différents solvants

20 Les solvants utilisés dans ce milieu organiques sont :

- le 2-méthyl 2-butanol (2M2B), solvant moyennement polaire qui peut permettre la solubilisation conjointe de composés hydrophobes comme les esters d'acides gras polyinsaturés et de composés hydrophiles tels que le nicotinol ou

25 - l'acétonitrile, pour les mêmes raisons que le 2M2B.

Les conditions réactionnelles sont rassemblées dans le tableau 1 suivant :

*Tableau 1 : Conditions réactionnelles testées pour la trans-estérification des esters DHA-EE 70% avec le nicotinol.*

<b>Alcool</b>	<b>Milieu</b>	<b>[Esters DHA-EE 70%] (M)</b>	<b>[Alcool] (M)</b>	<b>Volume total (ml)</b>	<b>Ratio molaire Alcool / esters</b>
Nicotinol	Organique (2M2B et Acétonitrile)	0,43	0,64	12	1,5
	Sans Solvant	1,5	4,5	3,5	3

Chaque condition a été incubée avec 200mg de Novozyme à 60°C. Des réactions en 2M2B réalisées à l'air libre (sous sorbonne) ont été testées à 60°C avec 200mg de Novozyme.

Des prélèvements de 500µL sont effectués régulièrement jusqu'à la fin des réactions. Le processus réactionnel est arrêté par centrifugation pendant 5 minutes à 13000 tours par minute, ce qui permet le retrait de l'enzyme immobilisée du milieu.

Tous les échantillons sont conservés à 4°C jusqu'à analyse.

Des réactions témoins sans enzyme et des réactions témoins sans cosubstrat (nicotinol) ont été menées en parallèle.

Les analyses sont réalisées en utilisant deux méthodes HPLC (Agilent 1100 séries), suivant les paramètres ci-dessous :

#### Méthode 1

- Colonne Zorbax SB-C18 (4,6mm x 25cm)
- Température : 40°C
- Débit 1 ml/min,
- Eluant : Méthanol/Acide acétique 0,02%
- Détection : Réfractométrie
- Durée de la séquence : 15 minutes.

## Méthode 2

- Colonne Zorbax SB-C18 (4,6mm x 25cm)
- Température : 40°C
- Débit 3 ml/min,
- 5 • Eluant : Acétonitrile/Acétone (50/50)
- Détection : Réfractométrie
- Durée de la séquence : 15 minutes.

Les échantillons prélevés lors des différentes réactions sont préalablement dilués jusqu'à obtention d'une concentration inférieure à 100mM dans un mélange  
 10 méthanol/acide acétique 0,02% dans le cas de la méthode 1 et dans de l'acétone dans le cas de la méthode 2.

## Résultats et discussion :

Lors de la réaction de trans-estérification deux espèces apparaissent au cours de la  
 15 réaction. La première est éluée à 4,15 minutes, et correspond au produit d'hydrolyse de l'ester, et le second à 4,85 minutes dans les conditions d'analyse. Ce dernier composé correspondrait au produit de la trans-estérification entre les esters DHA-EE 70% et le Nicotinol. Ici, un seul produit est attendu, le nicotinol ne présentant qu'un unique hydroxyle primaire.

20 Les pourcentages de conversion obtenus dans les différentes conditions réactionnelles sont donnés dans le tableau 2 suivant :

25 *Tableau 2: Pourcentage de conversion obtenu lors de la trans-estérification des esters éthyliques DHA-EE 70% avec le nicotinol (\* : le tube est, dans ce cas, laissé ouvert pour permettre l'évaporation de l'éthanol produit en cours de réaction).*

Conditions réactionnelles	Pourcentage de conversion des DHA-EE en DHA-Nicotinol
Acétonitrile	31% en 72h

2M2B	47% en 48h
2M2B à l'air libre*	<b>60% en 118h</b>
Sans Solvant	11% en 72h
Sans Solvant à l'air libre*	<b>100% en 72h</b>

Les taux de conversion sont accrus lorsque les réactions sont effectuées à l'air libre, l'éthanol produit est évaporé ce qui déplace l'équilibre réactionnel vers la synthèse de DHA-Nicotinol. Ces réactions de trans-estérification s'accompagnent d'un fort  
5 noircissement du mélange réactionnel.

Les produits d'hydrolyse apparaissent préférentiellement lorsque le 2M2B est employé en tant que solvant de réaction. Cependant une faible réaction d'hydrolyse est également présente en milieu sans solvant. Ceci laisse penser que de l'eau est aussi présente dans le nicotinol utilisé ou que l'humidité ambiante engendre cette  
10 réaction parasite.

La faisabilité des réactions de trans-estérification des esters DHA-EE 70% le nicotinol a été démontrée. Celles-ci présentent des taux de conversion intéressants, proche ou supérieur de 90%, notamment lorsque l'éthanol produit en cours de réaction est retiré du milieu réactionnel. Cependant une réaction d'hydrolyse due à  
15 la présence d'eau dans les solvants utilisés et/ou à l'humidité ambiante parasite ces synthèses.

Il semble intéressant d'essayer de s'affranchir de la réaction parasite d'hydrolyse observée. On pourra utiliser par exemple des solvants totalement anhydres. Il est également possible de conduire ces mêmes réactions en présence de « piège à eau »  
20 (Chlorure de Lithium,  $MgCl_2$ , gel de silice par exemple) pour éliminer toute possibilité d'hydrolyse.

Pour la réaction de synthèse des esters Nicotinol-DHA, l'éthanol produit en cours de réaction apparaît comme un élément limitant des réactions. Son retrait déplace l'équilibre réactionnel vers la synthèse des esters considérés. Ainsi, il convient  
25 d'optimiser ce retrait notamment en envisageant d'effectuer les synthèses sous une

pression réduite. Ceci permettrait une évaporation rapide de l'éthanol et donc une augmentation des vitesses de réaction.

5 **Exemple 3: Synthèse du docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl en utilisant une lipase :optimisation de la trans-estérification : évaporation de l'éthanol produit en cours de réaction et arrêt des brunissements oxydatifs.**

10 La réaction de synthèse similaire à celle de l'exemple 2 a été réalisée en utilisant les mêmes produits de départ (nicotinol, mélange d'esters DHA-EE 70%, Novozyme) dans un milieu sans solvant à 60°C en présence de 200mg de Novozyme avec un ratio alcool/ ester =3. Le réacteur utilisé est le même que celui de l'exemple 2 et les méthodes d'analyses sont les mêmes.

**Exemple 3.1 :**

15 La seule différence par rapport à l'exemple 2 est que la réaction a été réalisée dans un récipient ouvert (Tube ouvert).

Résultats (figure 1) :

La réaction de transesterification est « lente » : totale en près de 80h. Il y a présence de brunissements oxydatifs. Une hydrolyse parasite « forte » est présente .

20

**Exemple 3.2 :**

La seule différence par rapport à l'exemple 2 est que la réaction a été réalisée sous vide.

Résultats (figure 1) :

25 Il y a accélération de la réaction par rapport à l'exemple 3.1 mais elle est toujours « lente » : totale en près de 48h.

Il y a en outre persistance des brunissements oxydatifs et de l'hydrolyse parasite.

**Exemple 3.3 :**

La seule différence par rapport à l'exemple 2 est que la réaction a été réalisée sous bullage d'azote .

Résultats (figure 1) :

- 5 Il y a une accélération très importante de la réaction qui devient totale en moins de 3h en raison d'un entraînement instantané de l'éthanol produit en cours de réaction et d'un mélange amélioré.

On remarque l'absence de brunissements oxydatifs.

L'hydrolyse parasite est fortement diminuée.

10

**Exemple 4 : Synthèse de l'ester de DHA avec le panthénol en utilisant une lipase**

- 15 Les conditions expérimentales et d'analyses sont les mêmes que dans l'exemple 2 à part les différences suivantes :

Les conditions réactionnelles sont rassemblées dans le tableau 3 suivant :

*Tableau 3 : Conditions réactionnelles testées pour la trans-estérification des esters DHA-EE 70% avec le panthénol.*

Alcool	Milieu	[Esters DHA-EE 70%] (M)	[Alcool] (M)	Volume total (ml)	Ratio molaire Alcool / esters
Panthénol	Organique (2M2B et Acétonitrile)	0,43	1,28	12	3

20

Résultats et discussion :

Deux espèces sont éluées à 3,9 minutes et à 4,14 minutes dans les conditions d'analyse. Le panthénol possède deux alcools primaires. Il pourrait donc être

envisagé la production de plusieurs produits (trois maximum). Cependant, lors du témoin sans co-substrat (panthénol), le pic à 4,14 minutes apparaît. Celui-ci correspondrait donc à une hydrolyse des esters éthyliques liée à la présence d'eau dans le solvant utilisé. Cette réaction n'est observée qu'en présence de l'enzyme.

- 5 Par conséquent seul le premier pic correspondrait à la synthèse d'esters panthénol-DHA.

Les pourcentages de conversion obtenus dans les différentes conditions réactionnelles sont donnés dans le tableau 4 suivant :

- 10 *Tableau 4: Pourcentage de conversion obtenu lors de la trans-estérification des esters éthyliques DHA-EE 70% avec le panthénol (\* : le tube est, dans ce cas, laissé ouvert pour permettre l'évaporation de l'éthanol produit en cours de réaction).*

Conditions réactionnelles	Pourcentage de conversion des DHA-EE en DHA-Panthénol
Acétonitrile	68% en 136h
2M2B	76% en 115h
2M2B à l'air libre*	<b>88% en 96h</b>

- 15 Il apparaît que le pourcentage de conversion des esters DHA-EE 70% est accru lorsque la réaction est effectuée à l'air libre. En effet, dans cette condition, l'éthanol produit en cours de réaction est évaporé. L'équilibre réactionnel est ainsi déplacé vers la synthèse des esters panthénol-DHA. De plus, ces valeurs de conversion sont certainement sous-évaluées du fait de l'évaporation conjointe du
- 20 solvant 2M2B (effet de concentration du milieu). Ces réactions de trans-estérification s'accompagnent de plus d'un fort noircissement du mélange réactionnel.

La faisabilité des réactions de trans-estérification des esters DHA-EE 70% avec le panthénol a été démontrée. Celles-ci présentent des taux de conversion intéressants,

proche ou supérieur de 90%, notamment lorsque l'éthanol produit en cours de réaction est retiré du milieu réactionnel. Cependant une réaction d'hydrolyse due à la présence d'eau dans les solvants utilisés et/ou à l'humidité ambiante parasite ces synthèses.

- 5 Il semble intéressant d'essayer de s'affranchir de la réaction parasite d'hydrolyse observée. On pourra utiliser par exemple des solvants totalement anhydres. Il est également possible de conduire ces mêmes réactions en présence de « piège à eau » (Chlorure de Lithium,  $MgCl_2$ , gel de silice par exemple) pour éliminer toute possibilité d'hydrolyse.
- 10 Pour la réaction de synthèse des esters Panthénol-DHA, l'éthanol produit en cours de réaction apparaît comme un élément limitant des réactions. Son retrait déplace l'équilibre réactionnel vers la synthèse des esters considérés. Ainsi, il convient d'optimiser ce retrait notamment en envisageant d'effectuer les synthèses sous une pression réduite. Ceci permettrait une évaporation rapide de l'éthanol et donc une
- 15 augmentation des vitesses de réaction.

**Exemple 5 : résultats comparatifs de l'action de l'EPA et du DHA sur le courant potassique ultrarapide et donc sur la fibrillation auriculaire**

- 20 Le potentiel d'action cardiaque est l'unité électrique de base des cellules excitables cardiaques et représente l'activité de plusieurs types de canaux ioniques responsables des différentes phases du potentiel d'action. A différents territoires cardiaques correspondent différents types de potentiel d'action permettant ainsi une
- 25 activité séquentielle et coordonnée de ces territoires. A ce titre, les canaux potassiques de type  $Kv1.5$ , codés par le gène  $KCNA5$ , sont exprimés seulement au niveau des oreillettes et sont responsables du courant potassium  $I_{Kur}$  (ultra rapide) qui intervient dans la repolarisation du potentiel d'action auriculaire. Cette
- 30 expression très localisée de  $Kv1.5$  en fait une cible de choix dans le traitement de la fibrillation auriculaire, pathologie au cours de laquelle des modifications du potentiel d'action auriculaires sont observées.

Ainsi, les effets de DHA et EPA sur le courant  $I_{Kur}$  ont été étudiés. Pour cela l'isoforme humaine du canal hKv1.5 a été transfectée de façon stable dans des cellules HEK 293 (cellules humaines de rein embryonnaires) et le courant résultant de l'activité de ces canaux a été étudié par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière.

## Matériel et méthodes

### Entretien de la lignée cellulaire.

Les cellules HEK 293-hKv1.5 sont cultivées dans des conditions standard (37°C, incubateur à 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) dans des boites Falcon jusqu'à 80% de confluence. Elles sont ensuite décollées etensemencées dans des boites de pétri de 35mm contenant le milieu de culture suivant : DMEM (Invitrogen), 10% de sérum de bœuf fœtal (Invitrogen), un mélange Penicilline-Streptomycine-Glutamine (Invitrogen) à respectivement 100 U/ml, 100 µg/ml et 0,25 mg/ml, et 1,25 mg/ml de généticine comme antibiotique de sélection.

### Electrophysiologie.

L'étude de  $I_{Kur}$  a été réalisée par la technique de patch-clamp en configuration cellule entière à température ambiante (19-22°C). Le milieu intrapipette contient (en mM) : K-Aspartate 125, KCl 20, EGTA 10, HEPES 5, Mg-ATP 5, MgCl<sub>2</sub> 1, pH 7,3 (KOH). Le milieu extracellulaire contient (en mM) : NaCl 140, HEPES 20, D(+)-glucose 5, KCl 5, CaCl<sub>2</sub> 2, MgCl<sub>2</sub> 1, pH 7,4 (NaOH).

$I_{Kur}$  est induit toutes les 15 secondes par des pulses dépolarisants de durée 300 ms à +60 mV à partir d'un potentiel de maintien de -80 mV, suivi d'une repolarisation à -50 mV. L'amplitude du pic de courant est déterminée comme le maximum de courant obtenu durant les 100 premières ms du pulse dépolarisant. L'amplitude de courant de fin de pulse est déterminée quant à elle pendant les 20 dernières ms du pulse dépolarisant.

### Produits.

Le DHA et l'EPA proviennent de Sigma. Les solutions stocks (10 mM) sont préparées dans l'éthanol et la concentration finale de solvant est de 0,25%.

## Résultats

Ils sont rassemblés dans le tableau 5 suivant.

*Tableau 5 : % d'inhibition de  $I_{Kur}$  par DHA et EPA à différentes concentrations*

Concentration	DHA				
	Pic $I_{Kur}$		Fin de pulse $I_{Kur}$		n
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
1 $\mu$ M	8,2	6,3	10,1	5,8	5
3,2 $\mu$ M	10,9	6,9	14,5	6,5	5
5,6 $\mu$ M	15,4	4,8	33,7	7,8	6
10 $\mu$ M	22,6	4,0	78,0	4,2	6
25 $\mu$ M	58,1	13,6	86,5	3,4	5

Concentration	EPA				
	Pic $I_{Kur}$		Fin de pulse $I_{Kur}$		n
	Moyenne	SEM	Moyenne	SEM	
1 $\mu$ M	14,6	1,7	14,9	1,9	5
3,2 $\mu$ M	16,1	3,1	19,9	4,4	5
10 $\mu$ M	17,5	6,4	36,6	7,2	10
25 $\mu$ M	5,4	6,8	61,6	7,3	5

5

L'EPA diminue faiblement l'amplitude du pic de  $I_{Kur}$  (inhibition maximale de  $17,5 \pm 6,4\%$ ,  $n=10$ ,  $P<0,05$  à  $10 \mu$ M) et l'amplitude du courant de fin de pulse ( $61,6 \pm 7,3\%$ ,  $n=5$ ,  $P<0,05$  à  $25 \mu$ M).

DHA inhibe l'amplitude du pic de  $I_{Kur}$  avec un maximum de  $58,1 \pm 13,6\%$  ( $n=5$ ,  $P<0,005$ ) et celle du courant de fin de pulse de  $86,5 \pm 3,4\%$  ( $n=5$ ,  $P<0,005$ ) à  $25 \mu$ M.

## Conclusion :

Ces résultats montrent que l'application de DHA inhibe, plus fortement que l'EPA et de manière concentration-dépendante, le courant potassique  $I_{Kur}$  des canaux Kv1.5 humains transfectés dans les cellules HEK293. DHA agit préférentiellement sur le courant en fin de pulse, suggérant un effet sur l'inactivation des canaux Kv1.5. De plus, cet effet est accompagné d'une diminution du pic de  $I_{Kur}$

15

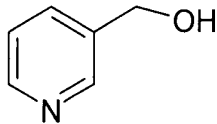
(contrairement à ce qui a été observé pour EPA) potentialisant l'inhibition par DHA de  $I_{Kur}$ .

Ces effets sur  $I_{Kur}$  indiquent une action bénéfique de DHA sur la fibrillation auriculaire.

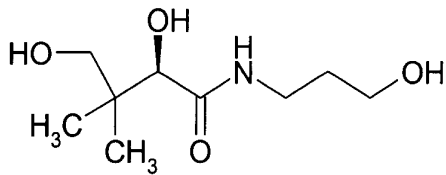
## REVENDICATIONS

1. Ester de l'acide docosahexaénoïque avec un alcool choisi parmi les vitamines ou provitamines du groupe B, avantageusement constitué par

5 - le nicotinol de formule suivante :

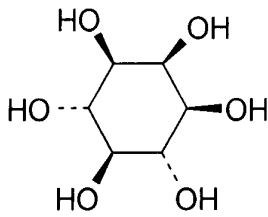


- le panthénol de formule suivante :

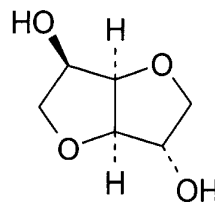


et

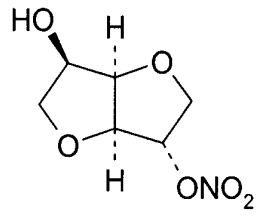
- l'inositol de formule suivante :



10



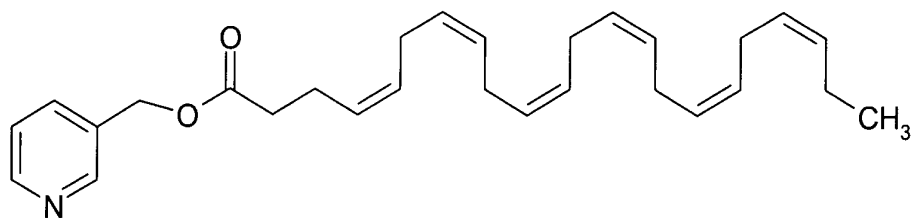
ou avec l'isosorbide de formule suivante :



mononitrate de formule suivante :

ou l'isosorbide

2. Ester de l'acide docosahexaénoïque selon la revendication 1 caractérisé en ce qu'il s'agit du docosahexaénoate de pyridin-3-ylmethyl de formule générale (1) suivante :



(1)

5

3. Procédé de préparation de l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la revendication 1 ou 2 par transesterification de l'ester éthylique d'acide docosahexaénoïque avec l'alcool choisi dans le groupe constitué par le nicotinol, le panthénol, l'isosorbide, l'isosorbide mononitrate et l'inositol, avantageusement avec le nicotinol.

10

4. Procédé selon la revendication 3 caractérisé en ce qu'il est réalisé en présence d'un catalyseur.

15 5. Procédé selon la revendication 4 caractérisé en ce que le catalyseur est une lipase, avantageusement la lipase de *Candida antartica*.

6. Procédé selon la revendication 5 caractérisé en ce que l'éthanol est éliminé au cours de la réaction, avantageusement par bullage d'azote.

20

7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 5 ou 6 caractérisé en ce que la réaction a lieu dans un solvant anhydre ou sans solvant en atmosphère sèche.

25 8. Composition pharmaceutique comprenant l'ester de l'acide docosahexaénoïque selon la revendication 1 ou 2, avantageusement le docosahexaénoate de pyridin-3-

ylmethyl selon la revendication 2, et au moins un excipient pharmaceutiquement acceptable.

5 9. Ester de l'acide docosahexaénoïque selon la revendication 1 ou 2 ou composition pharmaceutique selon la revendication 8 pour son utilisation en tant que médicament.

10 10. Ester de l'acide docosahexaénoïque selon la revendication 1 ou 2 ou composition pharmaceutique selon la revendication 8 pour son utilisation en tant que médicament destiné à la prévention et/ou au traitement des maladies cardiovasculaires, avantageusement choisies parmi l'arythmie auriculaire et/ou ventriculaire, la tachycardie et/ou la fibrillation ; à la prévention et/ou au traitement de maladies représentées par des défauts de la conduction électrique des cellules du myocarde ; à la prévention et/ou au traitement de facteurs de risques multiples de  
15 maladies cardiovasculaires, avantageusement choisis parmi l'hypertriglycémie, l'hypercholestérolémie, l'hypertension, l'hyperlipidémie, les dyslipidémies, avantageusement les dyslipidémies mixtes, et/ou l'hyperactivité de facteur VII de coagulation sanguine ; au traitement et/ou à la prévention primaire ou secondaire de  
20 maladies cardiovasculaires dérivant de l'arythmie auriculaire et/ou ventriculaire, de la tachycardie, de la fibrillation et/ou de défauts de la conduction électrique induits par l'infarctus du myocarde, avantageusement de la mort subite ; et/ou au traitement post-infarctus.

25 11. Ester de l'acide docosahexaénoïque selon la revendication 1 ou 2 ou composition pharmaceutique selon la revendication 8 pour son utilisation en tant que médicament destiné à la prévention et/ou au traitement de la fibrillation auriculaire.

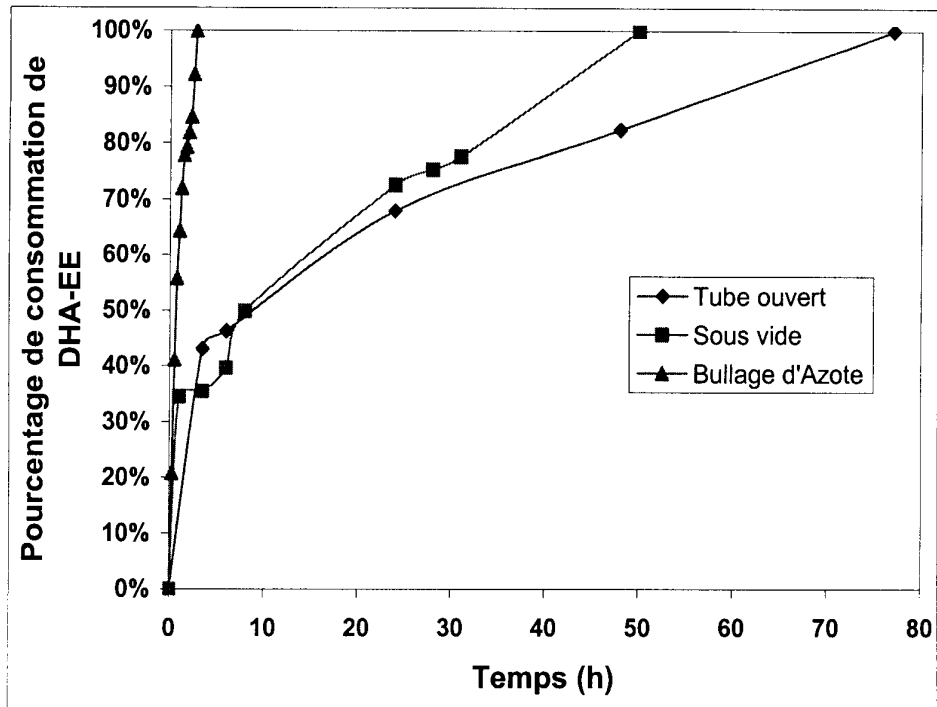


FIG. 1



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 684227  
FR 0605649

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	DATABASE CA [Online] CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; "3-Pyridylmethyl 4,7,10,13,16,19-docosaenoate" XP002419000 extrait de STN Database accession no. 1985:487779 * abrégé * -& JP 60 034947 A (TERUMO CORP., JAPAN) 22 février 1985 (1985-02-22) * abrégé *	1,2,8-10	A61K31/465 A61P9/00
X	HARVEY D J: "Picolinyl derivatives for the structural determination of fatty acids by mass spectrometry: Applications to polyenoic acids, hydroxy acids, di-acids and related compounds" BIOMEDICAL MASS SPECTROMETRY 1984 UNITED KINGDOM, vol. 11, no. 7, 1984, pages 340-347, XP009078567 * page 341 * * page 344 *	1,2	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)  A61K C07C
Y	HUMEAU C ET AL: "Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters" JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS - B ENZYMATIC 14 SEP 1998 NETHERLANDS, vol. 5, no. 1-4, 14 septembre 1998 (1998-09-14), pages 19-23, XP002418770 ISSN: 1381-1177 * page 20 *	3-7	
----- -/--			
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 février 2007		Renard, Delphine	
<p>CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS</p> <p>X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire</p>		<p>T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... &amp; : membre de la même famille, document correspondant</p>	

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 6



**RAPPORT DE RECHERCHE  
PRÉLIMINAIRE**

N° d'enregistrement  
national

établi sur la base des dernières revendications  
déposées avant le commencement de la recherche

FA 684227  
FR 0605649

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
Y	TORRES DE PINEDO A ET AL: "Efficient lipase-catalyzed synthesis of new lipid antioxidants based on a catechol structure" TETRAHEDRON, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL, vol. 61, no. 32, 8 août 2005 (2005-08-08), pages 7654-7660, XP004971216 ISSN: 0040-4020 * page 7656 *	3-7	DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
Y	M. BRIGODIOT ET AL.: "Enzyme-catalyzed synthesis of aliphatic polyesters in organic media: study of transesterification equilibrium shift and characterization of cyclic compounds" JOURNAL OF POLYMER SCIENCE: PART A: POLYMER CHEMISTRY, vol. 33, 1995, pages 2691-2698, XP002418771 * page 2693 - page 2694 *	3-7	
Y	WO 2004/091603 A (CLINIGENETICS [FR]; MARGUERIE GERARD [FR]; MALAUD ERIC [FR]; BISHAY KA) 28 octobre 2004 (2004-10-28) * revendications 1,5 *	8-11	
Y	US 2003/050341 A1 (BYDLON ROLAND J [US] ET AL) 13 mars 2003 (2003-03-13) * alinéa [0060]; revendications 40,50 *	8-11	
Y	WO 2004/047835 A (VICTORIX ASSETS LTD [VG]; ROGAN JADRANKA [AT]) 10 juin 2004 (2004-06-10) * revendication 1 *	8-11	
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
9 février 2007		Renard, Delphine	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS		T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons ..... & : membre de la même famille, document correspondant	
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire			

EPO FORM 1503 12.99 (P04C14) 6

**ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE  
RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 0605649 FA 684227**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.

Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du 09-02-2007

Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
JP 60034947 A	22-02-1985	JP 1044184 B JP 1558851 C	26-09-1989 16-05-1990
-----			
WO 2004091603 A	28-10-2004	AUCUN	
-----			
US 2003050341 A1	13-03-2003	AUCUN	
-----			
WO 2004047835 A	10-06-2004	AU 2003292080 A1 EP 1565177 A1	18-06-2004 24-08-2005
-----			