



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(19) **RU** (11) **2 451 672** (13) **C2**

(51) МПК
C07D 213/30 (2006.01)
C07D 493/04 (2006.01)
A61K 31/465 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2008152248/04, 22.06.2007

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
22.06.2007

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
23.06.2006 FR 0605649

(43) Дата публикации заявки: 27.07.2010 Бюл. № 21

(45) Опубликовано: 27.05.2012 Бюл. № 15

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: JP 60034947 A, 22.02.1985. HARVEY D. J. BIOMEDICAL MASS SPECTROMETRY, т.11, №7, 1984, с.340-347. HUMEAU C. ET AL. JOURNAL OF MOLECULAR CATALYSIS B. ENZYMATIC, т.5, №1-4, 1998, с.19-23. TORRES DE PINEDO A. ET AL. TETRAHEDRON, т.61, №32, 2005, с.7654-7660. M/BRIGODIOT ET AL. JOURNAL OF POLYMER SCIENCE, т.33, 1995, с.2691-2698. WO (см. прод.)

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на национальной фазе: 23.01.2009

(86) Заявка РСТ:
EP 2007/056277 (22.06.2007)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/147899 (27.12.2007)

Адрес для переписки:

191186, Санкт-Петербург, а/я 230, "АРС-ПАТЕНТ", пат. пов. В.В.Дощечкиной

(72) Автор(ы):

БРУНЕ Фредерик (FR),
ДЕЛЬОН Андре (FR),
ГАРДЕТТ Жан (FR),
ПАТОСО Жан-Франсуа (FR),
МАРТИ Ален (FR),
СЕВЕРАК Этьен (FR)

(73) Патентообладатель(и):

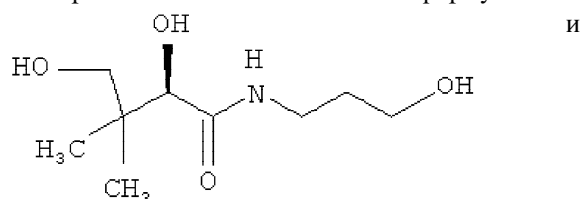
ПЬЕР ФАБР МЕДИКАМЕНТ (FR)

(54) ЭФИРЫ ДОКОЗАГЕКСАЕНОВОЙ КИСЛОТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ПРЕДУПРЕЖДЕНИЯ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТОГО ЗАБОЛЕВАНИЯ

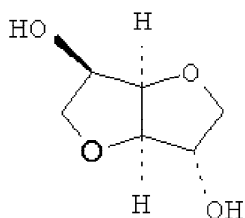
(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к сложному эфиру докозагексаеновой кислоты со спиртом, способу его получения и фармацевтической композиции, применяемым в качестве лекарственного средства для предупреждения и лечения сердечно-сосудистых заболеваний. Указанный спирт

выбирают из пантенола формулы:



инозитола формулы:



Способ получения сложного эфира заключается в трансэтерификации этилового эфира докозагексаеновой кислоты с одним из указанных спиртов. 3 н. и 7 з.п. ф-лы, 5 табл., 1 ил., 5 пр.

(56) (продолжение):

2004091603 A1, 28.10.2004. US 2003050341 A1, 13.03.2003. WO 2004047835 A1, 10.06.2004. RU 2142468 C1, 10.12.1999. RU 97119627 A, 27.08.1999.

R U 2 4 5 1 6 7 2 C 2

R U 2 4 5 1 6 7 2 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
C07D 213/30 (2006.01)
C07D 493/04 (2006.01)
A61K 31/465 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01)
A61P 7/02 (2006.01)
A61P 9/00 (2006.01)
A61P 9/06 (2006.01)
A61P 9/10 (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)

(12) ABSTRACT OF INVENTION

(21)(22) Application: 2008152248/04, 22.06.2007

(24) Effective date for property rights:
22.06.2007

Priority:

(30) Convention priority:
23.06.2006 FR 0605649

(43) Application published: 27.07.2010 Bull. 21

(45) Date of publication: 27.05.2012 Bull. 15

(85) Commencement of national phase: 23.01.2009

(86) PCT application:
EP 2007/056277 (22.06.2007)

(87) PCT publication:
WO 2007/147899 (27.12.2007)

Mail address:

191186, Sankt-Peterburg, a/ja 230, "ARS-PATENT", pat. pov. V.V.Doshchekinoj

(72) Inventor(s):

**BRUNE Frederik (FR),
 DEL'ON Andre (FR),
 GARDETT Zhan (FR),
 PATOSO Zhan-Fransua (FR),
 MARTI Alen (FR),
 SEVERAK Eht'en (FR)**

(73) Proprietor(s):

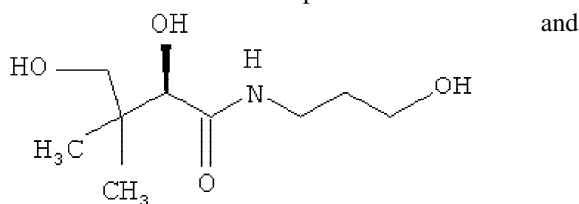
P'ER FABR MEDIKAMENT (FR)

(54) DOCOSAHEXAENOIC ACID ETHERS AND THEIR APPLICATION FOR TREATMENT AND PREVENTION OF CARDIOVASCULAR DISEASES

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: this invention relates to a compound ether of docosahexanoic acid and an alcohol, its production method and a pharmaceutical composition applied as a medication for prevention and treatment of cardiovascular diseases. The said alcohol is selected from pentanol with formula:



inositol with formula  . The

compound ether production method consists in transesterification of docosahexanoic acid ethyl ether with one of the said alcohols.

EFFECT: development of a pharmaceutical composition applied as a medication for production for cardiovascular diseases treatment and prevention.

10 cl, 5 tbl, 1 dwg, 5 ex

RU 2 451 672 C2

RU 2 451 672 C2

Настоящее изобретение относится к сложным эфирам докозагексаеновой кислоты (DHA) со спиртами, выбранными из витаминов или провитаминов группы В, такими как никотиниловый спирт (В3), пантенол (В5) или инозитол (В7), или изосорбида или изосорбида мононитрата, и, в частности, к пиридин-3-илметилдокозагексаноату, и их применению в качестве лекарственного средства для лечения и предупреждения сердечно-сосудистых заболеваний.

Полиненасыщенные жирные кислоты Омега-3, в частности, ЕРА (эйкозапентаеновая кислота) и DHA, предпочтительно очищенные и концентрированные в виде этилового эфира, известны благодаря их потенциальному применению для лечения некоторых сердечно-сосудистых заболеваний и для модуляции соответствующих факторов риска. В частности, они известны для лечения гиперлипидемии, гиперхолестеринемии и гипертензии. Клинические испытания, проведенные с препаратами, содержащими высокую концентрацию этилового эфира ЕРА и DHA, на пациентах, страдающих инфарктом миокарда, показали их эффективность в снижении смертности и, в частности, внезапной смерти. Эти результаты приписывались отчасти стабилизирующему эффекту на клеточные мембраны кардиомиоцитов желудочков, которые предотвращают возникновение злокачественной аритмии в присутствии ишемических миоцитов, как наблюдается у пациентов после инфаркта или в экспериментальных моделях, которые воспроизводят такие условия.

Кроме того, согласно патентной заявке WO 2004/047835 также известно, что этиловые эфиры DHA и ЕРА могут быть использованы для предотвращения фибрилляции предсердий. Однако неожиданно авторы настоящей заявки обнаружили, что DHA и ЕРА оказывают неодинаковый эффект на фибрилляцию предсердий: DHA оказывает гораздо больший эффект на фибрилляцию предсердий, чем ЕРА. Таким образом, для лечения фибрилляции предсердий и, конечно, для лечения большинства сердечно-сосудистых заболеваний более предпочтительно использовать одну DHA, а не смесь DHA и ЕРА.

Витамины группы В охватывают водорастворимые молекулы, принадлежащие к сильно различающимся химическим классам, но которые все обладают в качестве основной функции способностью контролировать активность ферментов в процессе обмена веществ в организме. Эти витамины называются: тиамин (В1), рибофлавин (В2), ниацин (В3), пантотеновая кислота (В5), пиридоксин (В6), биотин (В8), фолиевая кислота (В9) и цианокобаламин (В12).

Витамины и провитамины группы В имеют преимущества, связанные с их функцией. В частности, никотиниловый спирт представляет собой спирт, происходящий из никотиновой кислоты (витамин В3). В организме человека он быстро превращается в никотиновую кислоту.

Никотиновая кислота, также известная как ниацин, представляет собой водорастворимый витамин группы В, который может быть синтезирован из триптофана. Однако эффективные терапевтические дозы для целей снижения холестерина и липидов выше, чем количества, синтезируемые организмом. Таким образом, доказано, что пероральная добавка является существенной для снижения уровней холестерина и/или триглицеридов.

Что касается механизма действия, то предполагают, что никотиновая кислота ингибирует высвобождение свободных жирных кислот из жировой ткани, что приводит к снижению поступления жирных кислот в печень. Поскольку меньше жирных кислот будет этерифицироваться в триглицериды, меньше будет включаться в

липопротеины низкой плотности (LDL), таким образом снижая уровни холестерина LDL. Также обратили внимание, что никотиновая кислота значительно увеличивает уровни холестерина HDL, наиболее вероятно, путем ингибирования катаболизма этой формы холестерина HDL.

5 В частности, никотиновая кислота оказывает сильный периферический сосудорасширяющий эффект. Таким образом, внутривенная инъекция никотинилового спирта после его превращения в никотиновую кислоту приводит к вазодилатации, благоприятной для снижения артериального давления.

10 Никотиновую кислоту широко используют в терапии для снижения уровней холестерина и липидов.

Также было показано, что никотиновая кислота может быть объединена с ингибиторами HMG-CoA-редуктазы (гидроксиметилглутарил-кофермент А-редуктазы), такими как статины, например, в случаях, когда снижение холестерина этими ингибиторами HMG-CoA-редуктазы не является достаточным. Такая комбинация может быть полезна, когда добиваются выгоды от эффектов каждого соединения, в частности, снижения холестерина LDL статинами и повышения холестерина HDL никотиновой кислотой. Кроме того, никотиновая кислота подходит для лечения смешанной дислипидемии и, таким образом, способна оказывать влияние на уровни как холестерина, так и триглицеридов.

Пантенол представляет собой спиртовое производное пантотеновой кислоты, более известное как витамин B5. В организме пантенол превращается в пантотеновую кислоту. Пантотеновая кислота затем становится важной частью соединения кофермента А, который представляет особый интерес в клеточном метаболизме. Действительно, он участвует в метаболизме липидов, углеводов и белков. Пантенол также участвует в образовании ацетилхолина и адренальных стероидов. Он также играет роль в детоксификации инородных тел и в устойчивости к инфекции.

30 Инозитол (витамин B7) мобилизует жиры посредством предотвращения их накопления. Он также обладает анксиолитическим эффектом, он стимулирует нервную систему и печень и он снижает уровень холестерина в крови. Он вовлечен в увеличение активности серотониновой системы, контроль концентрации внутриклеточного кальция, поддержание потенциала клеточной мембраны и сборку цитоскелета.

Изосорбид, в частности изосорбида моонитрат, представляет собой мощный периферический вазодилататор.

40 Неожиданно авторы изобретения обнаружили, что сложные эфиры докозагексаеновой кислоты (DHA) со спиртами, выбранными из витаминов или провитаминов группы В, таких как никотиниловый спирт (B3), пантенол (B5) и инозитол (B7), или с изосорбидом или изосорбида моонитратом, в частности, пиридин-3-илметилдокозагексаноат (сложный эфир докозагексаеновой кислоты (DHA) с никотиниловым спиртом), также обладают значительной активностью в отношении сердечно-сосудистого заболевания.

Таким образом, настоящее изобретение относится к сложному эфиру докозагексаеновой кислоты со спиртом, выбранным из витаминов или провитаминов группы В, предпочтительно состоящих из:

50 - никотинилового спирта следующей формулы:

предпочтительно, с никотиниловым спиртом.

Трансэтерификация может быть осуществлена способами, хорошо известными специалистам в данной области техники.

5 Предпочтительно, трансэтерификацию по настоящему изобретению осуществляют в присутствии катализатора. Предпочтительно, такой катализатор представляет собой карбонат щелочного металла или карбонат щелочноземельного металла, предпочтительно K_2CO_3 . Предпочтительно, молярное соотношение карбоната щелочного металла или карбоната щелочноземельного металла к этиловому эфиру ДНА находится в диапазоне от 1/1 до 6/1. Предпочтительно, молярное соотношение спирта к этиловому эфиру ДНА находится в диапазоне от 1/1 до 6/1, еще более предпочтительно, молярное соотношение никотинилового спирта к этиловому эфиру ДНА находится в диапазоне от 1/1 до 6/1. Предпочтительно, реакцию трансэтерификации осуществляют в растворителе, предпочтительно выбранном из диоксана или тетрагидрофурана (THF); предпочтительно, выбран THF. Предпочтительно, THF дегазируют посредством барботирования азотом. Еще более предпочтительно, реакционную смесь нагревают с обратным холодильником, предпочтительно в течение по меньшей мере 14 часов.

20 В другом конкретном воплощении изобретения катализатор трансэтерификации по настоящему изобретению представляет собой липазу, предпочтительно липазу из *Candida antarctica*. В частности, липаза находится в иммобилизованной форме. Предпочтительно, липаза представляет собой Novozyme®, продаваемый фирмой Novo Nordisk (Ново Нордиск). Предпочтительно, реакция протекает в среде без растворителя или в растворителе, таком как 2-метил-2-бутанол или ацетонитрил, предпочтительно в среде без растворителя в случае никотинилового спирта и в растворителе в случае пантенола. Предпочтительно, в случае инозитола, используемый растворитель представляет собой ионный полярный растворитель, такой как 1-бутил-3-метилимидазолий тетрафторборат (BF_4) или 1-бутил-3-метилимидазолий $C(CN)_2$. Предпочтительно, реакция протекает при температуре выше комнатной температуры, предпочтительно при 60°C.

35 Предпочтительно, этанол удаляют во время реакции, предпочтительно под вакуумом или посредством барботирования азотом, еще более предпочтительно, посредством барботирования азотом. Таким путем увеличивают скорость конверсии, ускоряют реакцию и удаляют паразитную реакцию гидролиза.

Предпочтительно, молярное соотношение спирта к этиловому эфиру ДНА находится между 1 и 5, предпочтительно между 1,5 и 4,5.

40 Предпочтительно, реакцию осуществляют в течение от 1 часа до 100 часов, предпочтительно от 1 часа до 72 часов, предпочтительно от 1 часа до 48 часов, еще более предпочтительно от 1 часа до 3 часов.

45 В другом конкретном воплощении способа по настоящему изобретению реакция трансэтерификации протекает в безводном растворителе, в небезводном растворителе в присутствии водоотделителя, такого как, например, хлорид лития, $MgCl_2$ или силикагель, или без растворителя в сухой атмосфере. Таким образом удаляют паразитную реакцию гидролиза.

50 Предпочтительно, реакция трансэтерификации протекает с чистым этиловым эфиром докозагексаеновой кислоты (по меньшей мере 95%-ной чистоты, имеющимся в продаже или очищенным способами, хорошо известными специалистам в данной области техники, из смеси этиловых эфиров жирных кислот) или со смесью, содержащей по меньшей мере 70 мол.% этилового эфира ДНА. В случае, когда

используемый этиловый эфир ДНА представляет собой смесь, целесообразно очистить полученный сложный эфир после реакции трансэтерификации.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей сложный эфир докозагексаеновой кислоты по настоящему изобретению, в частности, пиридин-3-илметилдокозагексаноат, и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

Фармацевтические композиции по настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде препаратов для введения млекопитающим, включая человека. Дозы варьируются в зависимости от режимов лечения и заболеваний, которые лечат. Эти композиции готовят таким образом, чтобы вводить пероральным, сублингвальным, подкожным, внутримышечным, внутривенным, трансдермальным, местным или ректальным путем. В этом случае активный ингредиент можно вводить животным или людям в виде лекарственных форм на одну дозу или в смеси со стандартными фармацевтическими носителями. Подходящие лекарственные формы на одну дозу включают в себя формы для введения пероральным путем, такие как таблетки, желатиновые капсулы, порошки, гранулы и пероральные растворы или суспензии, формы для сублингвального и перорального введения, формы для подкожного, местного, внутримышечного, внутривенного, интраназального или внутриглазного введения и формы для ректального введения.

Когда твердую композицию приготавливают в таблетированной форме, тогда первичный активный ингредиент смешивают с фармацевтическим носителем, таким как желатин, крахмал, лактоза, стеарат магния, тальк, аравийская камедь, диоксид кремния или аналоги. Таблетки могут быть покрыты сахарозой или другими подходящими веществами, или они могут быть обработаны таким образом, чтобы иметь замедленную или отсроченную активность и чтобы непрерывно высвобождать заданное количество активного ингредиента.

Препарат в виде желатиновой капсулы получают путем смешивания активного ингредиента с разбавителем и затем высыпания полученной смеси в мягкие или твердые желатиновые капсулы.

Препарат в виде сиропа или эликсира может содержать активный ингредиент в сочетании с подсластителем, антисептическим средством, а также ароматизатором и подходящим красителем.

Порошки или гранулы, которые могут быть диспергированы в воде, могут содержать активный ингредиент в смеси с диспергирующими агентами, увлажняющими агентами или суспендирующими агентами, а также с вкусо-ароматическими агентами или подсластителями.

Суппозитории, которые приготавливают со связующими агентами, которые плавятся при ректальной температуре, такими как масло какао или полиэтиленгликоль, например, используют для ректального введения.

Для парентерального (внутривенного, внутримышечного и т.д.), интраназального или внутриглазного введения предназначены водные суспензии, изотонические солевые растворы или стерильные инъекционные растворы, содержащие фармакологически совместимые диспергирующие агенты и/или увлажняющие агенты.

Активный ингредиент может быть также приготовлен в виде микрокапсул, возможно с одной или более добавками.

Предпочтительно, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предназначена для введения пероральным или внутривенным путем, предпочтительно, внутривенным путем в случае лечения постинфарктного состояния.

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать другие активные ингредиенты, которые дают комплементарный или возможно синергетический эффект. Предпочтительно, фармацевтическая композиция не содержит сложного эфира ЕРА.

5 Настоящее изобретение также относится к сложному эфиру докозагексаеновой кислоты по настоящему изобретению, в частности, пиридин-3-илметилдокозагексаноату, или к фармацевтической композиции по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства.

10 Настоящее изобретение также относится к сложному эфиру докозагексаеновой кислоты по настоящему изобретению, в частности, пиридин-3-илметилдокозагексаноату, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства для предупреждения и/или лечения сердечно-сосудистого заболевания, предпочтительно относящегося к ритму сердца (предпочтительно нарушению ритма или нарушению проводимости),
15 предпочтительно выбранного из предсердной и/или желудочковой аритмии, тахикардии и/или фибрилляции; для предупреждения и/или лечения заболеваний, обусловленных дефектами в электрической проводимости в клетках миокарда; для предупреждения и/или лечения множества факторов риска сердечно-сосудистого
20 заболевания, предпочтительно выбранных из гипертриглицеридемии, гиперхолестеринемии, гипертензии, гиперлипидемии, дислипидемии, предпочтительно смешанной дислипидемии, и/или фактора VII гиперактивности в свертывании крови; для лечения и/или первичного или вторичного предупреждения сердечно-сосудистого
25 заболевания, являющегося результатом нарушений ритма, таких как предсердная и/или желудочковая аритмии, тахикардия, фибрилляция и/или дефекты электропроводности, вызванные инфарктом миокарда, предпочтительно внезапная смерть; и/или для лечения постинфарктного состояния.

30 Нарушения ритма включают, в частности, дефекты синусно-предсердного узла, такие как синусная тахикардия; предсердную аритмию, такую как предсердные экстрасистолы, регулярная предсердная тахикардия или фибрилляция предсердий; узловую тахикардию, такую как пароксизмальная узловая тахикардия или синдром Вольфа-Паркинсона-Уайта; или желудочковую аритмию, такую как
35 преждевременное сокращение желудочков, тахикардия желудочков или фибрилляция желудочков.

Нарушения проводимости включают, в частности, брадикардию.

Итак, настоящее изобретение относится к сложному эфиру докозагексаеновой
40 кислоты по настоящему изобретению, в частности, пиридин-3-илметилдокозагексаноату, или фармацевтической композиции по настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства для предупреждения и/или лечения фибрилляции предсердий.

45 Не будучи связанными теорией, полагают, что сложный эфир докозагексаеновой кислоты по настоящему изобретению, в частности пиридин-3-илметилдокозагексаноат, высвобождает в организме спирт и ДНА, в частности никотиновый спирт и ДНА в случае пиридин-3-илметилдокозагексаноата, благодаря эстеразной активности. Таким образом, сложный эфир докозагексаеновой кислоты по настоящему изобретению, по-видимому, имеет такую же активность в виде смеси ДНА
50 и спирта. Таким образом, если этот спирт представляет собой витамин или провитамин группы В, то сложный эфир докозагексаеновой кислоты по настоящему изобретению будет оказывать такой же эффект, что и смесь ДНА и витамина или

провитамина группы В. Из этого также следует, что в случае пиридин-3-илметилдокозагексаноата никотиновый спирт превращается в организме в никотиновую кислоту. Таким образом, пиридин-3-илметилдокозагексаноат по настоящему изобретению, по-видимому, имеет такую же активность, что и смесь ДНА и никотиновой кислоты. Преимущество сосудорасширяющего эффекта никотиновой кислоты состоит в наиболее удовлетворительном распределении ДНА по периферии, в частности, в случае внутривенной инъекции пиридин-3-илметилдокозагексаноата, после превращения никотинового спирта в никотиновую кислоту.

Изобретение будет более понятно со ссылкой на графические материалы и на примеры, которые следуют ниже.

На Фиг.1 представлена зависимость расхода ДНА-ЕЕ (этилового эфира докозагексаеновой кислоты) в процентах от времени для примеров 3.1 (открытая пробирка), 3.2 (под вакуумом) и 3.3 (при барботировании азотом) во время реакции трансэтерификации в присутствии 200 мг Novozyme® при 60°C с соотношением спирта к сложному эфиру, равным 3.

Следующие примеры даны в качестве примеров, не ограничивающих изобретение.

Пример 1: Синтез пиридин-3-илметилдокозагексаноата с использованием K_2CO_3

1 г (2,8 ммоль) этилдокозагексаноата (чистота более 95%; поставляется фирмой Interchim) помещают в 5 мл THF, дегазированного посредством барботирования азотом в присутствии 1,53 г (11 ммоль) измельченного K_2CO_3 и 1,06 мл (10,9 ммоль) никотинового спирта (чистота более 98%; поставляется фирмой Acros). Реакционную смесь нагревают с обратным холодильником в течение 7 ч и затем добавляют 0,76 г (5,5 ммоль) K_2CO_3 , и нагревание продолжают в течение 7 ч.

После охлаждения реакцию смесь вливают в воду и затем экстрагируют этилацетатом. Органические фазы сушат над $MgSO_4$, фильтруют и затем концентрируют досуха. Полученный остаток очищают с помощью флэш-хроматографии на силикагеле ($CH_2Cl_2 \rightarrow$ градиент CH_2Cl_2 /этилацетат, 90/10, в течение 15 мин). Выделяют прозрачное масло (0,84 г, выход 71%).

TLC (тонкослойная хроматография) на силикагеле 60 F 254 Merck, CH_2Cl_2 /AcOEt, 90/10, $R_f=0,35$.

Пример 2: Синтез пиридин-3-илметилдокозагексаноата с использованием липазы

Все реакции осуществляют в реакторе с периодическим перемешиванием (магнитное перемешивание) при оптимальной температуре для каждого фермента.

Используемые материалы представляют собой:

- смесь этиловых эфиров, обогащенных до 70% этиловым эфиром ДНА (ДНА-ЕЕ) (продается фирмой Croda Chemical Ltd.), называемая ниже как "70%-ная эфирная смесь ДНА-ЕЕ";

- Novozyme®, иммобилизованная форма липазы из *Candida antarctica*, продается фирмой Novo Nordisk;

- никотиновый спирт.

Реакционная смесь представляет собой либо:

- среду без растворителя, которую используют только для субстратов;

либо

- органическую среду с использованием различных растворителей.

Растворители, используемые в этой органической среде, представляют собой:

- 2-метил-2-бутанол (2М2В), умеренно полярный растворитель, который делает возможной совместную солюбилизацию гидрофобных соединений, таких как сложные эфиры полиненасыщенных жирных кислот, и гидрофильных соединений, таких как

никотиниловый спирт; или

- ацетонитрил, по тем же причинам, что и 2М2В.

Реакционные условия приведены в следующей таблице 1:

5

Таблица 1

Реакционные условия, протестированные для трансэтерификации 70%-ных сложных эфиров ДНА-ЕЕ с никотиниловым спиртом					
Спирт	Среда	[70%-ные сложные эфиры ДНА-ЕЕ] (М)	[Спирт]	Общий объем (мл)	Молярное соотношение спирт/сложный эфир
10 Никотиниловый спирт	Органическая (2М2В и ацетонитрил)	0,43	0,64	12	1,5
	Без растворителя	1,5	4,5	3,5	3

Для каждого условия инкубируют с 200 мг Novozyme® при 60°C. Реакции в 2М2В, проведенные на открытом воздухе (в вытяжном шкафу), тестировали при 60°C с 200 мг Novozyme®.

15 Регулярные образцы объемом 500 мкл берут перед завершением реакций. Реакционный процесс гасят центрифугированием в течение 5 минут при 13000 об/мин, делая возможным удаление иммобилизованного фермента из среды. Все образцы хранят при 4°C до анализа.

20 Контрольные реакции без фермента и контрольные реакции без косубстрата (никотиниловый спирт) проводили параллельно.

Анализы проводят с использованием двух методик ВЭЖХ (с использованием аппарата Agilent серии 1100) в соответствии со следующими параметрами:

Методика 1

- 25
- Колонка Zorbax SB-C18 (4,6 мм×25 см)
 - Температура: 40°C
 - Скорость потока: 1 мл/мин
 - Элюент: 0,02% метанол/уксусная кислота
 - 30 - Детекция: рефрактометрия
 - Время прогона: 15 минут

Методика 2

- 35
- Колонка Zorbax SB-C18 (4,6 мм×25 см)
 - Температура: 40°C
 - Скорость потока: 3 мл/мин
 - Элюент: 50/50 ацетонитрил/ацетон
 - Детекция: рефрактометрия
 - Время прогона: 15 минут

40 Образцы, взятые во время различных реакций, разбавляют заранее до концентрации менее 100 мМ в смеси 0,02% метанол/уксусная кислота в случае методики 1 и в ацетоне в случае методики 2.

Результаты и обсуждение

45 Два продукта появляются во время реакции трансэтерификации. Первый элюируется при 4,15 минутах и соответствует продукту гидролиза сложного эфира, а второй элюируется при 4,85 минутах при аналитических условиях. Последнее соединение соответствует продукту трансэтерификации между 70%-ными сложными эфирами ДНА-ЕЕ и никотиниловым спиртом. Здесь ожидается только один продукт, поскольку никотиниловый спирт имеет только один первичный гидроксил.

50 Относительные конверсии, полученные в различных реакционных условиях, приведены в следующей таблице 2:

Таблица 2

Относительная конверсия, полученная во время трансэтерификации 70%-ных этиловых эфиров ДНА-ЕЕ с никотиниловым спиртом (*: в этом случае пробирку оставляют открытой для обеспечения возможности выпаривания этанола, полученного во время реакции)	
Реакционные условия	Относительные конверсии ДНА-ЕЕ в ДНА-никотиниловый спирт
Ацетонитрил	31% через 72 ч
2М2В	47% через 48 ч
2М2В на открытом воздухе*	60% через 118 ч
Без растворителя	11% через 72 ч
Без растворителя на открытом воздухе*	100% через 72 ч

Скорости конверсии выше, когда реакции осуществляют на открытом воздухе; полученный этанол, который сдвигает равновесие реакции в сторону синтеза ДНА-никотинилового спирта, выпаривают. Эти реакции трансэтерификации сопровождаются сильным почернением реакционной смеси.

Продукты гидролиза появляются предпочтительно, когда в качестве растворителя реакции используют 2М2В. Однако слабая реакция гидролиза также присутствует в среде без растворителя. Таким образом, из этого следует, что вода присутствует также в используемом никотиниловом спирте или что влажность окружающей среды вызывает эту паразитную реакцию.

Продемонстрировали осуществимость реакций трансэтерификации 70%-ных сложных эфиров ДНА-ЕЕ с никотиниловым спиртом, при этом такие реакции показали преимущественные скорости конверсии, близкие к 90% или выше, в частности, когда этанол, полученный во время реакции, удаляют из реакционной смеси. Однако паразитная реакция гидролиза из-за присутствия воды в используемых растворителях и/или влажности окружающей среды препятствует этим синтезам.

Таким образом, кажется интересным попытаться избежать наблюдающейся паразитной реакции гидролиза. Например, можно было бы использовать полностью безводные растворители. Также можно проводить эти одинаковые реакции в присутствии водоотделителя (хлорид лития, $MgCl_2$ или силикагель, например) для устранения любой возможности гидролиза.

Для реакции синтеза сложного эфира никотиниловый спирт-ДНА, этанол, полученный во время реакции, по-видимому, является элементом, который ограничивает реакции. Его удаление сдвигает равновесие реакции в сторону синтеза рассматриваемых сложных эфиров. Таким образом, целесообразно оптимизировать это удаление, особенно при осуществлении синтеза при пониженном давлении. Это делает возможным быстрое выпаривание этанола и, таким образом, увеличение скоростей реакции.

Пример 3; Синтез пиридин-3-илметилдокозагексаноата с использованием липазы; оптимизация трансэтерификации; выпаривание этанола, полученного во время реакции, и устранение окислительного потемнения

Реакцию синтеза, аналогичную реакции из примера 2, осуществляли с использованием тех же исходных продуктов (никотиниловый спирт, 70%-ная эфирная смесь ДНА-ЕЕ, Novozyme®) в среде без растворителя при 60°C в присутствии 200 мг Novozyme® с соотношением спирта к сложному эфиру, равным 3. Используемый реактор является таким же, как реактор из примера 2, и методы анализа являются такими же.

Пример 3.1

Единственное отличие по сравнению с примером 2 состоит в том, что реакцию осуществляли в открытой емкости (открытая пробирка).

Результаты (Фиг.1):

Реакция трансэтерификации является "медленной", занимающей в общей сложности

примерно 80 часов. Окислительное потемнение присутствует. "Сильный" паразитный гидролиз присутствует.

Пример 3.2

Единственное отличие по сравнению с примером 2 состоит в том, что реакцию осуществляли под вакуумом.

Результаты (Фиг.1):

Наблюдается ускорение реакции по сравнению с примером 3.1, но она остается "медленной", занимающей в общей сложности примерно 48 часов.

Кроме того, окислительное потемнение и паразитный гидролиз сохраняются.

Пример 3.3

Единственное отличие по сравнению с примером 2 состоит в том, что реакцию осуществляли при барботировании азотом.

Результаты (Фиг.1):

Наблюдается очень существенное ускорение реакции, которая составляет в общей сложности менее 3 часов вследствие немедленного удаления этанола, полученного во время реакции, и улучшенной смеси.

Отмечено отсутствие окислительного потемнения.

Паразитный гидролиз сильно снижен.

Пример 4: Синтез сложного эфира ДНА с пантенолом с использованием липазы

Экспериментальные и аналитические условия являются такими же, как в примере 2, за исключением следующих различий:

Реакционные условия приведены в следующей таблице 3:

Таблица 3					
Реакционные условия, протестированные в отношении трансэтерификации 70%-ных сложных эфиров ДНА-ЕЕ с пантенолом					
Спирт	Среда	[70%-ные сложные эфиры ДНА-ЕЕ] (М)	[Спирт]	Общий объем (мл)	Молярное соотношение спирт/сложный эфир
Пантенол	Органическая (2М2В и ацетонитрил)	0,43	1,28	12	3

Результаты и обсуждение

Два вида элюируют при 3,9 минутах и 4,14 минутах в аналитических условиях.

Пантенол имеет два первичных спирта. Таким образом, можно было бы предположить продукцию нескольких продуктов (максимум три). Однако для контроля без косубстрата (пантенол) появляется пик при 4,14 минутах. Указанный пик, таким образом, будет соответствовать гидролизу этилового эфира, связанному с присутствием воды в используемом растворителе. Эта реакция наблюдается только в присутствии фермента.

Следовательно, только первый пик соответствует синтезу сложного эфира пантенол-ДНА.

Относительные конверсии, полученные в различных реакционных условиях, приведены в следующей таблице 4:

Таблица 4	
Относительная конверсия, полученная во время трансэтерификации 70%-ных этиловых эфиров ДНА-ЕЕ с пантенолом (*: в этом случае пробирку оставляют открытой для обеспечения возможности выпаривания этанола, полученного во время реакции)	
Реакционные условия	Относительные конверсии ДНА-ЕЕ в ДНА-пантенол
Ацетонитрил	68% через 136 ч
2М2В	76% через 115 ч
2М2В на открытом воздухе*	88% через 96 ч

Из этого следует, что относительная конверсия 70%-ных сложных эфиров ДНА-ЕЕ

увеличивается, когда реакцию осуществляют на открытом воздухе. Действительно, при этом условии этанол, полученный во время реакции, выпаривают. Равновесие реакции, таким образом, сдвигается в сторону синтеза сложных эфиров пантенол-ДНА.

Более того, эти значения конверсии, конечно, недооценены вследствие совместного выпаривания 2М2В растворителя (эффект концентрации среды). Эти реакции трансэтерификации также сопровождаются сильным почернением реакционной смеси.

Продемонстрировали осуществимость реакций трансэтерификации 70%-ных сложных эфиров ДНА-ЕЕ с пантенолом, и такие реакции показали преимущественные скорости конверсии, близкие к 90% или выше, в частности, когда этанол, полученный во время реакции, удаляют из реакционной смеси. Однако паразитная реакция гидролиза вследствие присутствия воды в используемых растворителях и/или влажности окружающей среды препятствует этим синтезам.

Таким образом, кажется интересным попытаться избежать наблюдающейся паразитной реакции гидролиза. Например, можно было бы использовать полностью безводные растворители. Также можно проводить эти одинаковые реакции в присутствии водоотделителя (хлорид лития, $MgCl_2$ или силикагель, например) для устранения любой возможности гидролиза.

Для реакции синтеза сложного эфира пантенол-ДНА, этанол, полученный во время реакции, по-видимому, является элементом, который ограничивает реакции. Его удаление сдвигает равновесие реакции в сторону синтеза рассматриваемых сложных эфиров. Таким образом, целесообразно оптимизировать это удаление, особенно при осуществлении синтеза при пониженном давлении. Это делает возможным быстрое выпаривание этанола и, таким образом, увеличение скоростей реакции.

Пример 5: Сравнительные результаты действия ЕРА и ДНА на сверхбыстрый поток калия и, таким образом, на фибрилляцию предсердий

Сердечный потенциал действия представляет собой основную электрическую единицу возбудимых клеток сердца и означает активность нескольких типов ионных каналов, отвечающих за различные фазы потенциала действия. Различные типы потенциалов действия соответствуют различным областям в сердце, таким образом обеспечивающим последовательную и координированную активность в этих областях. По этой причине, калиевые каналы $K_v 1.5$, кодируемые геном $KCNA5$, экспрессируются только в предсердной ткани и отвечают за сверхбыстрый поток калия (I_{Kur}), который участвует в реполяризации предсердного потенциала действия. Это высоколокализованная экспрессия $K_v 1.5$ является фактически мишенью выбора для лечения фибрилляции предсердий, патологии, при которой наблюдаются изменения в предсердных потенциалах действия.

Таким образом, исследовали эффекты ДНА и ЕРА на I_{Kur} . Для этой цели человеческую изоформу канала $K_v 1.5$ ($hK_v 1.5$) переносили стабильным образом в клетки НЕК 293 (эмбриональная почка человека), и поток, являющийся результатом активности этих каналов, исследовали с использованием метода пэтч-кламп (patch-clamp) на целой клетке.

Материалы и методы

Поддержание клеточной линии

Клетки НЕК 293- $hK_v 1.5$ выращивают в стандартных условиях (37°C, инкубатор при 95% O_2 и 5% CO_2) в чашках Falcon вплоть до 80%-ной конfluence. Затем их переносят и культивируют в 35-мм чашках Петри, содержащих следующую культуральную среду: DMEM (Invitrogen); 10% фетальной бычьей сыворотки (Invitrogen); смесь 100 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25

мг/мл глутамин (Invitrogen); и 1,25 мг/мл Geneticin® в качестве селективного антибиотика.

Электрофизиология

$I_{K_{ur}}$ исследуют с использованием метода пэтч-кламп на целой клетке при температуре окружающей среды (19-22°C). Среда для пипетирования содержит: 125 mM K-аспартата, 20 mM KCl, 10 mM EGTA, 5 mM HEPES, 5 mM Mg-ATP, 1 mM MgCl₂, pH 7,3 (KOH). Внеклеточная среда содержит: 140 mM NaCl, 20 mM HEPES, 5 mM D(+)-глюкозы, 5 mM KCl, 2 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, pH 7,4 (NaOH).

$I_{K_{ur}}$ индуцируют каждые 15 секунд с помощью 300 мс, +60 мВ деполяризующих импульсов из -80 мВ удерживающего потенциала с последующей -50 мВ реполяризацией. Амплитуду пика потока устанавливают на основе максимального потока, полученного во время первых 100 мс деполяризующего импульса.

Амплитуду потока в конце импульса определяют во время последних 20 мс деполяризующего импульса.

Реагенты

DNA и ERA поставляются фирмой Sigma. Исходные растворы (10 mM) готовят в этаноле, и конечная концентрация растворителя составляет 0,25%.

Результаты

Результаты приведены в следующей таблице 5.

Таблица 5

Процентное ингибирование $I_{K_{ur}}$ с помощью DNA и ERA при различных концентрациях					
Концентрация	DNA				n
	Пик $I_{K_{ur}}$		Конец импульса $I_{K_{ur}}$		
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	
1 мкМ	8,2	6,3	10,1	5,8	5
3,2 мкМ	10,9	6,9	14,5	6,5	5
5,6 мкМ	15,4	4,8	33,7	7,8	6
10 мкМ	22,6	4,0	78,0	4,2	6
25 мкМ	58,1	13,6	86,5	3,4	5
SEM - стандартная ошибка среднего					
Концентрация	ERA				n
	Пик $I_{K_{ur}}$		Конец импульса $I_{K_{ur}}$		
	Среднее	SEM	Среднее	SEM	
1 мкМ	14,6	1,7	14,9	1,9	5
3,2 мкМ	16,1	3,1	19,9	4,4	5
10 мкМ	17,5	6,4	36,6	7,2	10
25 мкМ	5,4	6,8	61,6	7,3	5

ERA слегка уменьшает амплитуду пика $I_{K_{ur}}$ (максимальное ингибирование 17,5±6,4%, n=10, p<0,05 при 10 мкМ) и амплитуду потока в конце импульса (61,6±7,3%, n=5, p<0,05 при 25 мкМ).

DNA ингибирует амплитуду пика $I_{K_{ur}}$ максимум на 58,1±13,6% (n=5, p<0,005) и амплитуду потока в конце импульса на 86,5±3,4% (n=5, p<0,005) при 25 мкМ.

Вывод

Эти результаты демонстрируют, что применение DNA ингибирует сильнее, чем ERA, и зависимым от концентрации способом сверхбыстрый поток калия ($I_{K_{ur}}$) в человеческих каналах Kv 1.5, трансфицированных в клетки НЕК 293. DNA действует предпочтительно на поток в конце импульса, что предполагает эффект на активацию каналов Kv 1.5. Более того, этот эффект сопровождается снижением пика $I_{K_{ur}}$ (в отличие от того, что наблюдается для ERA), потенцированием ингибирования $I_{K_{ur}}$ с

помощью ДНА.

Эти эффекты на I_{Kur} указывают на благоприятное воздействие ДНА на фибрилляцию предсердий.

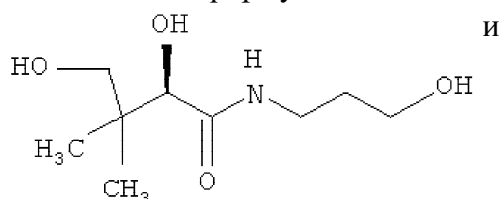
5

Формула изобретения

1. Сложный эфир докозагексаеновой кислоты со спиртом, выбранным из группы, состоящей из:

пантенола формулы:

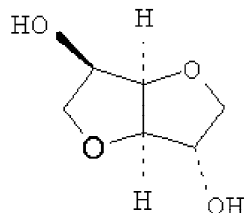
10



15

изосорбида формулы:

20



2. Сложный эфир докозагексаеновой кислоты по п.1 с пантенолом.

25 3. Способ получения сложного эфира докозагексаеновой кислоты по п.1, включающий трансэтерификацию этилового эфира докозагексаеновой кислоты со спиртом, выбранным из группы, состоящей из пантенола и изосорбида.

4. Способ по п.3, где указанный способ осуществляют в присутствии катализатора.

30 5. Способ по п.4, где катализатор представляет собой липазу, предпочтительно липазу из *Candida antarctica*.

6. Способ по п.5, где этанол удаляют во время реакции, предпочтительно посредством барботирования азотом.

35 7. Способ по п.5 или 6, где реакция протекает в безводном растворителе или без растворителя в сухой атмосфере.

8. Фармацевтическая композиция для применения в качестве лекарственного средства для предупреждения и/или лечения сердечнососудистых заболеваний, связанных с ритмом сердца, для предупреждения и/или лечения заболеваний, обусловленных дефектами в электрической проводимости в клетках миокарда, для предупреждения и/или лечения множества факторов риска сердечно-сосудистого заболевания, выбранных из гипертриглицеридемии, гипертензии, гиперлипидемии и дислипидемии, для лечения и/или первичного или вторичного предупреждения сердечнососудистого заболевания, являющегося результатом нарушений ритма сердца и/или для лечения постинфарктного состояния, содержащая сложный эфир докозагексаеновой кислоты по п.1 и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый эксципиент.

45 9. Сложный эфир докозагексаеновой кислоты по п.1 для применения в качестве лекарственного средства для предупреждения и/или лечения сердечно-сосудистых заболеваний, связанных с ритмом сердца, для предупреждения и/или лечения заболеваний, обусловленных дефектами в электрической проводимости в клетках миокарда, для предупреждения и/или лечения множества факторов риска сердечно-

50

сосудистого заболевания, выбранных из гипертриглицеридемии, гипертензии, гиперлипидемии и дислипидемии, для лечения и/или первичного или вторичного предупреждения сердечнососудистого заболевания, являющегося результатом нарушений ритма сердца и/или для лечения постинфарктного состояния.

5 10. Сложный эфир докозагексаеновой кислоты по п.1 или фармацевтическая композиция по п.8 для применения в качестве лекарственного средства для предупреждения и/или лечения фибрилляции предсердий.

10

15

20

25

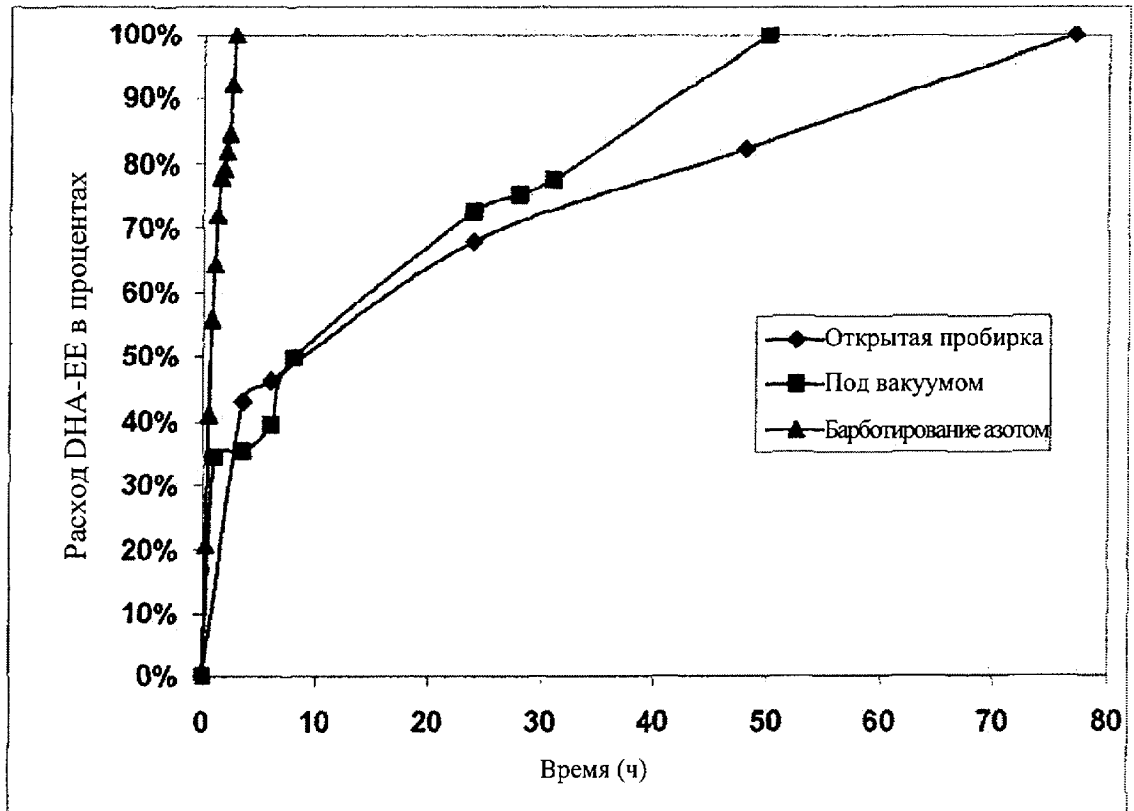
30

35

40

45

50



ФИГ. 1