

Данное изобретение относится к конъюгатам (продуктам соединения) желчных кислот или желчных солей с жирными кислотами (в дальнейшем называемым «BAFAC»), к их использованию для растворения холестериновых желчных конкрементов в желчи, предотвращения их появления или рецидива, к их использованию для ослабления или профилактики атеросклероза и способам лечения указанных заболеваний.

Следует отметить, что термины желчные кислоты и желчные соли используют взаимозаменяемо.

Желчные конкременты находят приблизительно у 15% людей в большинстве индустриальных стран. Большинство желчных конкрементов являются холестериновыми желчными конкрементами, т.е. холестерин является их основным компонентом. Таким образом, холестериновые желчные конкременты представляют собой основную проблему здоровья населения. Желчь часто перенасыщена холестерином, который имеет тенденцию кристаллизоваться. Предотвращение кристаллизации холестерина в желчи будет предотвращать образование холестериновых желчных конкрементов или их рецидивов после таких процедур, как камнедробление, растворение или экстракция камней. Время пребывания вновь секретированной желчи в желчном пузыре короткое - меньше, чем 12-24 ч. Предотвращение кристаллизации холестерина в желчи в течение такого периода может предотвратить образование желчных конкрементов.

Было доказано, что холестериновые желчные конкременты можно растворить лекарственным способом и их рецидив можно предотвратить с использованием некоторых желчных солей, таких как хенодезоксихолевая или урсодезоксихолевая кислота. Терапия желчными солями, однако, малоэффективна, требует большого расхода времени, от нее в основном отказались. Таким образом, требуются более эффективные терапии.

В последней работе была показана основная роль, выполняемая фосфолипидами в растворении холестерина в желчи. (T. Gilat et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1286 (1996), 95-115; Y. Ringel et al., *Biochimica et Biophysica Acta* 1390 (1998), 293-300; и J. *Hepatology*, 28 (1998), 1008-1014). Фосфолипиды являются основным или единственным компонентом растворяющих холестерин липидных агрегатов в желчи. Было показано, что ступенчатое добавление фосфолипидов к желчи будет прогрессивно пролонгировать время образования центров кристаллизации в желчи. (Z. Halpern et al., *Gut* 34 (1993), 110-115).

Были показаны основные различия между некоторыми фосфолипидными молекулярными разновидностями в их ингибирующей кристаллизацию холестерина эффективности в желчи

человека или модельной желчи. Фосфолипиды отличаются друг от друга в основном жирными кислотами, имеющими стереоспецифические положения у sn-1 и/или sn-2, и их головными группами. Было показано, что основные пролонгации во времени образования центров кристаллизации и основные снижения в скорости роста кристаллов холестерина и в общей массе кристаллов холестерина достигаются изменениями в фосфолипидных молекулярных разновидностях без изменения абсолютных или относительных количеств фосфолипидов. Кристаллизация холестерина заметно замедлялась, когда жирная кислота в положении sn-2 была насыщена, когда головной группой был серин вместо холина и т.д. (Y. Ringel et al., см. выше).

Было также показано, что различные компоненты фосфолипидов сами (без всей фосфолипидной молекулы), например насыщенные жирные кислоты, такие как пальмитиновая кислота или стеариновая кислота, или фосфатидилглицерин, обладают сильной ингибирующей кристаллизацию холестерина активностью.

Таким образом, обогащение желчи человека фосфолипидами в общем или определенными фосфолипидами или их компонентами, такими как жирные кислоты, могут заметно тормозить кристаллизацию холестерина в желчи и достичь желаемого результата.

Проблема состояла в том, как обогатить желчь человека *in vivo* фосфолипидами или их компонентами. Когда желчные соли вводят людям, они очень эффективно абсорбируются, поглощаются печенью и экскретируются в желчь. Это относится также к синтетическим аналогам желчных солей. Для этих целей в организме имеются специфические и очень эффективные механизмы переноса. Так, когда урсодезоксихолевую кислоту (которая обычно присутствует в желчи человека в незначительных количествах) вводят регулярно, она абсорбируется и секретруется в желчь и в итоге составляет 30-50% билиарных желчных кислот. Однако, как указано выше, терапия желчными солями для растворения холестериновых желчных конкрементов не удовлетворительна.

Фосфолипиды и их компоненты хорошо абсорбируются и поглощаются печенью. Секреция фосфолипидов в желчь, однако, недостаточно регулируется печенью и только ограниченные количества и разновидности фосфолипидов секретуются в желчь в ассоциации с секрецией желчных солей и холестерина. В настоящее время не существует эффективного способа модуляции, количественно или качественно, состава билиарных фосфолипидов человека до любой значительной степени. Когда пищевые фосфолипиды достигают печени, они могут метаболизироваться, секретироваться в кровь или накапливаться в печени. Только небольшие количества и predeterminedенные раз-

новидности секретируются в желчь с минимальными возможностями для модуляции.

Следовательно, было желательно найти удовлетворительный способ для переноса фосфолипидов или одного из их компонентов в желчь, которые могут повысить солюбилизацию билиарного холестерина и предотвратить образование холестериновых желчных конкрементов или растворить присутствующие желчные конкременты.

Из описания патента Израиля № 95668 и соответствующих описаний патентов США известны производные желчных кислот общей формулы I



в которой G представляет собой радикал желчной кислоты, W представляет собой остаток активного соединения лекарственного средства и X представляет либо прямую связь либо связывающий член между указанным радикалом желчной кислоты и активным соединением. В указанных описаниях приводится длинный список заместителей, но в нем W не упоминается в частности как радикал жирной кислоты, ни насыщенной кислоты, ни ненасыщенной кислоты, т.е. указанные описания ничего не говорят о BAFAC.

Кроме того, среди всех объектов указанных соединений нельзя обнаружить даже намека на то, что любое из указанных соединений можно использовать для повышения солюбилизации билиарного холестерина, чтобы предотвратить образование холестериновых желчных конкрементов, растворить существующие холестериновые желчные конкременты или ослабить или предотвратить атеросклероз.

Теперь обнаружено, что желчные кислоты или соли, соединенные с жирными кислотами (насыщенными или ненасыщенными) через соединяющую связь -NH- (BAFAC), могут служить в качестве носителей для переноса жирных кислот в желчь с использованием очень эффективной энтеропеченочной циркуляции желчных кислот и солей.

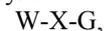
Сложноэфирная связь между жирной кислотой(ами) и желчной кислотой нестабильна, поскольку она может быть разрушена пищеварительным соком и кишечными бактериями во время абсорбции и энтеропеченочной циркуляции. Только часть интактных BAFAC останется в желчи.

Было показано также, что BAFAC абсорбируются из кишечника, поглощаются печенью и секретируются в желчь. Указанные BAFAC повышали солюбилизацию холестерина в желчи и заметно замедляли его кристаллизацию. Указанные BAFAC, следовательно, можно использовать в качестве агентов для профилактики образования или рецидива холестериновых желчных конкрементов и для растворения холестериновых желчных конкрементов.

Введение BAFAC оказывает также ингибирующее действие на кристаллизацию холестерина в большом круге кровообращения (сосудистое дерево). В физиологической ситуации проглоченные желчные кислоты или соли абсорбируются в кишечнике, переносятся через воротную вену к печени и экскретируются через желчь в кишечник. Таким образом, они рециркулируют в энтеропеченочной циркуляции, причем только небольшие количества достигают большого круга кровообращения (сосудистое дерево). Поведение BAFAC более похоже на липиды, которые после кишечной абсорбции переносятся через лимфу к большому кругу кровообращения. Было показано, что BAFAC переносятся как через лимфу, так и через воротную вену. При переносе обоими путями они поглощаются печенью и секретируются в желчь. При каждой энтеропеченочной циркуляции они секретируются в кишечник, снова частично реабсорбируются через лимфу и рециркулируют в большой круг кровообращения до поглощения печенью. Поскольку имеется 10-12 циклов энтеропеченочной циркуляции в сутки, результирующим действием будет рециркуляция BAFAC в большом круге кровообращения.

Введение BAFAC перорально в разделенных дозах в течение дня усилит это действие. Было доказано ингибирующее действие BAFAC на кристаллизацию холестерина и их эффективность в растворении существующих кристаллов холестерина. Тем самым была также показана их ценность в снижении и/или предотвращении кристаллизации холестерина в большом круге кровообращения, т.е. атеросклероза.

Данное изобретение, таким образом, состоит из конъюгатов (продуктов соединения) желчных кислот или желчных солей и жирных кислот общей формулы II



в которой G имеет такое же значение, как в формуле I, и который, при желании, соединяют в положении 24 с подходящей аминокислотой, W представляет собой один или два радикала жирных кислот, имеющих 6-26 атомов углерода, и X представляет собой связь NH между радикалом указанной желчной кислоты или желчной соли и радикалом(ами) жирной кислоты.

В качестве подходящих желчных кислот здесь можно указать, например, холевую кислоту, хенодезоксихолевую кислоту, урсодезоксихолевую кислоту и дезоксихолевую кислоту. Используемые желчные кислоты могут быть несоединенными или, как в желчи, соединенными с глицином, таурином или другой подходящей аминокислотой. Эти возможности находятся в пределах определения желчной кислоты и, таким образом, в пределах объема данного изобретения. Соединение с радикалом жирной кислоты выполняют, главным образом, в положении 3 кольца в зависимости от используемой желчной кислоты. Возможно также выполнение

соединения с радикалом жирной кислоты в других положениях, например 6, 7, 12 и 24. Когда желчная кислота соединена с глицином или таурином, соединение с радикалом жирной кислоты не может выполняться в положении 24. Соединение между радикалом жирной кислоты и желчной кислотой может быть в α - или β -конфигурации.

Предпочтительными жирными кислотами являются насыщенные кислоты, которые имеют в подходящих случаях 18-22 атомов углерода. Предпочтительными насыщенными жирными кислотами являются бегеновая кислота, арахидиновая кислота и стеариновая кислота.

Когда W представляет собой две жирные кислоты, они соединяются в подходящих случаях в положениях 3 и 7.

Данное изобретение заключается также в фармацевтической композиции, позволяющей растворить холестериновые желчные конкременты в желчи и предотвратить их образование и позволяющей предотвратить и/или ослабить атеросклероз и включающей в себя в качестве активного ингредиента производное желчной кислоты и жирных кислот общей формулы II.

Указанная композиция может иметь форму таблетки, капсулы, раствора, эмульсии и т.д.

Указанная композиция может включать в себя дополнительные соединения, такие как носители, растворители, эмульгаторы, усилители абсорбции, ингибиторы синтеза или секреции холестерина в желчь и т.д. Указанная композиция должна выгодным образом включать в себя 0,1-1,5 г активного ингредиента.

Композиция подходящим образом проглатывается один раз в сутки, предпочтительно перед сном. Ее можно также проглатывать в разделенных дозах в течение дня.

Данное изобретение заключается также в использовании производного желчной кислоты и жирных кислот общей формулы II или фармацевтической композиции, включающей в себя то же самое, для растворения холестериновых желчных конкрементов в желчи и для предотвращения их образования.

Данное изобретение заключается также в использовании производного желчной кислоты и жирных кислот общей формулы II или фармацевтической композиции, включающей в себя то же самое, для профилактики и/или ослабления атеросклероза.

Данное изобретение заключается также в способе растворения холестериновых желчных конкрементов в желчи и предотвращения их образования путем введения производного желчной кислоты и жирных кислот общей формулы II или фармацевтической композиции, включающей в себя то же самое.

Данное изобретение заключается также в способе профилактики и/или ослабления атеросклероза путем введения производного желчной кислоты и жирных кислот общей формулы II

или фармацевтической композиции, включающей в себя то же самое.

Данное изобретение теперь будет иллюстрироваться ссылкой на сопровождающие примеры и рисунки без ограничения ими изобретения.

В указанных рисунках

фиг. 1A показывает стадии в соединении холевой кислоты (у C-3) с бегеновой кислотой (C-22), арахидиновой кислотой (C-20) и стеариновой кислотой (C-18);

фиг. 1B показывает стадии в синтезе соединенного с глицином стеарилолхолата;

фиг. 1C показывает синтез олеоилхолата;

фиг. 1D показывает соединение урсодезоксихолевой кислоты с двумя молекулами стеариновой кислоты в положениях C-3 и C-7 кольца желчной кислоты;

фиг. 2 показывает массу кристаллов холестерина. Раствор модельной желчи. Влияние соединений BAFAC, включающих в себя стеариновую (C-18) и арахидиновую (C-20) кислоты, соединенные с холевой кислотой (у C-3). Испытуемые соединения заменяли 20 мол.% NATC в контрольном растворе;

фиг. 3 показывает время образования центров кристаллизации. Раствор модельной желчи. Влияние соединений, использованных в фиг. 2;

фиг. 4 показывает массу кристаллов холестерина обогащенной желчи человека через 22 дня после инкубации. Влияние 5 мМ стеарилоил(C-18)холата и арахидоил(C-20)холата, добавленного к желчи, в сравнении с контрольной желчью и желчью с добавленной 5 мМ холевой кислотой;

фиг. 5 показывает время образования центров кристаллизации, модельные желчи. Влияние замены 20 мол.% NaTC эквимольными количествами нескольких BAFAC, включающих в себя стеарилоил(C-18)холат, арахидоил(C-20)холат и дистеарилоилурсодезоксихолат, по сравнению с модельной желчью с заменой и без замены 20% NaTC холевой кислотой, и

фиг. 6A и 6B показывают уровни стеарилоил(C-18)холата у хомяков через 1, 2 и 3 ч после проглатывания 30 мг его. Концентрации в крови сердца, крови воротной вены и желчи желчного пузыря.

Пример I. 3 β -Бегениламидо-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овая кислота (фиг. 1A-3).

(a) 1,15 г Метилового эфира 3 β -амино-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1A-1) [патент Франции 1017756, 18 декабря, 1952, Chem. Abstr. 52:1293c] растворяли в 30 мл сухого диметилформамида и обрабатывали 15 мл триэтиламина при перемешивании. К получаемому раствору по каплям добавляли 1,13 г бегеноилхлорида в 10 мл диметилформамида и перемешивание продолжали в течение ночи. Реакционную смесь выливали в воду, экстрагировали метиленхлоридом, органическую часть

затем сушили над сульфатом натрия, выпаривали досуха и хроматографировали на силикагеле с использованием смеси этилацетата и гексана (6:4 и 8:2), получая 0,8 г метилового эфира 3 β -бегениламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-2).

¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,69 (с, CH₃-18), 0,88 (т, J = 1 Гц, CH₃-23), 0,95 (с, CH₃-19), 0,99 (д, J = 3 Гц, CH₃-21), 1,25, 1,14 [с, (CH₂)₂₀], 2,14 (т, J = 5 Гц, CH₃-бегенил), 3,67 (с, COOCH₃), 3,91 (д, J = 1,5 Гц, CH-7), 3,96 (с, J = 4 Гц, CH-12), 3,99 (м, CH-3), 5,60 (д, J = 4,5 Гц, -CH₂CO-).

(b) Вышеуказанный метиловый эфир, 0,45 г, растворяли в 20 мл метанола, обрабатывали 2 мл 1н. гидроксида натрия и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Метанол затем отгоняли, добавляли 10 мл воды и реакцию смесь экстрагировали этилацетатом. Водную часть затем подкисляли разбавленной хлористоводородной кислотой, что приводило к образованию белого осадка, который промывали водой, получая 0,41 г чистой 3 β -бегениламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-3).

Пример II. 3 β -Арахиниламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овая кислота (фиг. 1А-5).

(a) Метиловый эфир 3 β -амино-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-1) [см. пример 1] в количестве 1,0 г растворяли в 30 мл сухого диметилформамида и обрабатывали 15 мл триэтиламина при перемешивании. К получаемому раствору по каплям добавляли 1,0 г арахиноилхлорида в 10 мл диметилформамида и перемешивание продолжали в течение ночи. Реакционную смесь выливали в воду, экстрагировали метиленхлоридом, органическую фракцию затем сушили над сульфатом натрия, выпаривали досуха и хроматографировали на силикагеле с использованием смеси этилацетата и гексана (6:4 и 8:2), получая 0,6 г метилового эфира 3 β -арахиниламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-4).

¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,70 (с, CH₃-18), 0,88 (т, J = 6 Гц, CH₃-23), 0,95 (с, CH₃-19), 0,99 (д, J = 3 Гц, CH₃-21), 1,25, 1,14 [с, (CH₂)₁₈], 2,14 (т, J = 5 Гц, CH₃-арахинил), 3,67 (с, COOCH₃), 3,91 (д, J = 1,5 Гц, CH-7), 3,96 (т, J = 4 Гц, CH-12), 4,4 (м, CH-3), 5,60 (д, J = 4,5 Гц, -CH₂CONH).

(b) Метиловый эфир 3 β -арахиниламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-4) в количестве 0,5 г растворяли в 20 мл метанола, обрабатывали 2 мл 1н. гидроксида натрия и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Метанол затем отгоняли, добавляли 10 мл воды и реакцию смесь экстрагировали этилацетатом. Водную часть затем подкисляли разбавленной хлористоводородной кислотой, что приводило к образованию белого осадка, который промывали водой, получая 0,7 г чистой 3 β -арахиниламида-7 α ,12 α -дигидрокси-

5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-5).

Пример III. 3 β -Стеариламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овая кислота (фиг. 1А-7).

Способ 1.

(a) Метиловый эфир 3 β -амино-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-1) [см. пример 1] в количестве 1,15 г растворяли в 30 мл сухого диметилформамида и обрабатывали 15 мл триэтиламина при перемешивании. К получаемому раствору по каплям добавляли 1,13 г стеариолхлорида в 10 мл диметилформамида и перемешивание продолжали в течение ночи. Реакционную смесь выливали в воду, экстрагировали метиленхлоридом, органическую часть затем сушили над сульфатом натрия, выпаривали досуха и хроматографировали на силикагеле с использованием смеси этилацетата и гексана (6:4 и 8:2), получая 0,68 г метилового эфира 3 β -стеариламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-6).

¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,69 (с, CH₃-18), 0,88 (т, J = 1 Гц, CH₃-23), 0,95 (с, CH₃-19), 0,99 (т, J = 3 Гц, CH₃-21), 1,25, 1,44 [с, (CH₂)₁₆], 2,14 (т, J = 5 Гц, CH₃-стеарил), 3,67 (с, COOCH₃), 3,91 (д, J = 1,5 Гц, CH-7), 3,99 (м, CH-3), 4,4 (м, CH-3), 5,60 (д, J = 4,5 Гц, -CH₂CONH).

(b) Метиловый эфир 3 β -стеариламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-6) в количестве 0,45 г растворяли в 20 мл метанола, обрабатывали 2 мл 1н. гидроксида натрия и оставляли на 24 ч при комнатной температуре. Метанол затем отгоняли, добавляли 10 мл воды и реакцию смесь экстрагировали этилацетатом. Водную часть затем подкисляли разбавленной хлористоводородной кислотой, что приводило к образованию белого осадка, который промывали водой, получая 0,41 г чистой 3 β -стеариламида-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-7), т. пл. 63-65°C.

Способ 2.

3 β -Амино-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овую кислоту (получена в соответствии с Kramer et al., J. of Lipid Research 24, 910, 1983) в количестве 2,5 г растворяли в ацетонитриле и к перемешиваемому раствору добавляли 1,2 г стеариновой кислоты и 3,6 г N-гидроксисукцинамида в том же самом растворителе. Через 8 ч осадок отделяли фильтрованием, промывали растворителем и выпаривали досуха. Остаток добавляли к раствору 1,2 г стеариновой кислоты в 10 мл N-метилморфолина и N,N-диметилформамида (1:3). После выдерживания при комнатной температуре в течение ночи, раствор разбавляли водой, экстрагировали этилацетатом, получая 0,6 г кислоты (фиг. 1А-7), идентичной с кислотой способа 1.

Способ 3.

Раствор 6 г стеариолхлорида добавляли по каплям к перемешиваемому раствору 1,6 г ами-

на (фиг. 1В-18) в толуоле при 0°C и выдерживали при такой же температуре в течение 1 ч. Получаемый раствор нагревали при 50°C в течение следующего часа, подкисляли 3н. хлористо-водородной кислотой и затем фильтровали. Твердый материал промывали водой и сушили при 45°C, получая кислоту (фиг. 1А-7), идентичную с кислотой, описанной выше.

Пример IV. N-(Карбоксиметил)-3β-стеариламидо-7α,12α-дигидрокси-5β-холан-24-амид (фиг. 1В-17).

(а) 3β-Стеариламидо-7α,12α-дигидрокси-5β-холан-24-овую кислоту (фиг. 1А-7) в количестве 0,5 г растворяли в 25 мл сухого 1,4-диоксана и охлаждали до -10°C. Перемешиваемый раствор обрабатывали 0,5 мл триэтиламина, затем 0,085 мл хлорэтилформиата и перемешивали при такой же температуре в течение 15 мин. Раствор оставляли для достижения комнатной температуры, обрабатывали 0,1 мл триэтиламина и 14 г гидрохлорида этилглицина и оставляли на ночь. Реакционную смесь выливали в воду, экстрагировали этилацетатом и промывали водой. Экстракт выпаривали досуха и хроматографировали на силикагеле, используя смесь 60:40 этилацетат:гексан, чистый этилацетат и затем смесь 9:1 этилацетат:метанол, получая 0,27 г продукта (фиг. 1В-16).

(b) Вышеуказанное соединение в количестве 0,27 г растворяли в 20 мл метанола и обрабатывали 2 мл 1н. гидроксида натрия. Через 24 ч метанол выпаривали досуха, остаток растворяли в воде и экстрагировали этилацетатом. Водную фракцию подкисляли 1н. HCl. Полученный осадок промывали водой и сушили, получая 0,24 г сухого материала (фиг. 1В-17).

Пример V. 3β-Олеиламидо-7α,12α-дигидрокси-5β-холан-24-овая кислота (фиг. 1С-20).

(а) Метилловый эфир 3β-амино-7α,12α-дигидрокси-5β-холан-24-овой кислоты (фиг. 1А-1) в количестве 1,6 г растворяли в 30 мл сухого диметилформамида и обрабатывали 3 мл триэтиламина при перемешивании. Добавляли по каплям раствор 1,38 г олеилхлорида в 10 мл сухого ДМФ и получаемый раствор оставляли при комнатной температуре на ночь. Реакционную смесь выливали в воду, экстрагировали этилацетатом, органическую часть очищали промыванием разбавленной хлористо-водородной кислотой, бикарбонатом натрия и затем водой. Выпаривание досуха в вакууме давало 3,1 г продукта, который хроматографировали на силикагеле с использованием смеси этилацетат/гексан (4:6 и 10:8), получая 1,8 г метилового эфира (фиг. 1С-19).

(b) Раствор 1,2 г метилового эфира в 20 мл метанола обрабатывали при комнатной температуре 5 мл 1н. раствора гидроксида натрия и выдерживали при комнатной температуре в течение 48 ч и затем выпаривали досуха. Остаток растворяли в 20 мл воды и экстрагировали 25 мл

этилацетата 3 раза. Экстракт водного раствора подкисляли раствором хлористо-водородной кислоты, получая осадок, который отделяли фильтрованием. Этот остаток хроматографировали на силикагеле с использованием смеси этилацетат:гексан:уксусная кислота (10:4:0,3), получая 0,3 г 3β-олеиламидо-7α,12α-дигидрокси-5β-холан-24-овой кислоты (фиг. 1С-20).

Пример VI. 3β,7α-Дистеариламидо-5β-урсодезоксихолан-24-овая кислота (фиг. 1D-26).

(а) Урсодезоксихолан-24-овую кислоту в количестве 20 г растворяли в 200 мл абсолютно-го метанола, обрабатывали 1 мл концентрированной серной кислоты и перемешивали в течение 24 ч. Большую часть растворителя отгоняли и остаток выливали в воду и экстрагировали метиленхлоридом. Органический экстракт промывали раствором бикарбоната натрия и хлорида натрия и выпаривали досуха, получая 19,5 г метилового эфира 3α,7β-дигидрокси-5β-урсодезоксихолан-24-овой кислоты, (фиг. 1D-21).

¹H ЯМР (CDCl₃), δ, м.д.: 0,66 (с, CH₃-18), 0,90 (т, J = 1 Гц, CH₃-23), 0,93 (с, CH₃-19), 0,94 (д, J = 3 Гц, CH₃-21), 3,58 (м, CH-3, CH-7), 3,65 (с, COOCH₃).

(b) Метилловый эфир (фиг. 1D-21) в количестве 4,06 г растворяли в 30 мл сухого пиридина и охлаждали до 0°C. Реакционную смесь перемешивали и обрабатывали по каплям в течение 15 мин раствором 1,49 г метансульфонилхлорида в 5 мл пиридина. После выдерживания в течение 3 ч при такой же температуре реакционную смесь выливали на смесь льда и воды и затем экстрагировали этилацетатом. Органическую фазу промывали хлористо-водородной кислотой, бикарбонатом натрия и раствором хлорида натрия, фильтровали и выпаривали в вакууме. Остаток, состоящий из 4 соединений, хроматографировали на колонке с силикагелем, используя в качестве элюента смесь этилацетата и гексана. Менее полярным соединением, 5,3 г, был целевой метилловый эфир 3β,7α-димезил-5β-урсодезоксихолан-24-овой кислоты (фиг. 1D-22).

¹H ЯМР (CDCl₃), δ, м.д.: 0,65 (с, CH₃-18), 0,90 (д, J = 4 Гц, CH₃-23), 0,97 (с, CH₃-19), 1,2 (т, J = 3 Гц, CH₃-21), 2,97 (с, CH₃SO₂), 2,98 (с, CH₃SO₂), 3,64 (с, CH₃SO₂), 4,09 (к, J = 12 Гц, H-7), 4,62 (м, H-7).

(с) Димезилпроизводное в количестве 5,65 г растворяли в 50 мл сухого ДМФ, обрабатывали сухим азидом натрия и нагревали до 130°C в течение 2 ч. Реакционную смесь охлаждали, выливали в ледяную воду и экстрагировали этилацетатом. Экстракт затем промывали раствором ацетата натрия и хлорида натрия, фильтровали и выпаривали досуха, получая 4,6 г метилового эфира 3β,7α-диазида-5β-урсодезоксихолан-24-овой кислоты (фиг. 1D-23).

(d) Диазидосоединение (фиг. 1D-23) в количестве 4,5 г растворяли в 120 мл метанола, к

которому было добавлено 150 мг 5% палладия на угле, и гидрировали при атмосферном давлении в течение 4 дней. Гидрирование повторяли с дополнительными 150 мг 5% палладия на угле. Гидрированную смесь фильтровали и выпаривали в вакууме, получая 3 г метилового эфира 3 β ,7 α -диамино-5 β -урсодезоксихолан-24-овой кислоты (фиг. 1D-24).

¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,65 (с, CH₃-18), 0,92 (д, J = 4 Гц, CH₃-23), 0,96 (с, CH₃-19), 1,2 (т, J = 3 Гц, CH₃-21), 3,68 (с, COOCH₃), 3,72, 3,95 (м, 2H-7,3).

(е) Метилловый эфир 3 β ,7 α -диамино-5 β -урсодезоксихолан-24-овой кислоты (фиг. 1D-24) в количестве 1,47 г растворяли в 50 мл сухой смеси 1:1 ДМСО и ДМФ, обрабатывали 2 мл триэтиламина и 30 мг диметиламинопиридина и 5,1 г стеаринового ангидрида. Реакционную смесь нагревали до 50°C, перемешивали в течение 18 ч, выливали в смесь льда и воды и экстрагировали 3 раза этилацетатом. Органическую фазу промывали хлористо-водородной кислотой, раствором бикарбоната натрия и хлорида натрия. После выпаривания органического растворителя получали 2,05 г масляного остатка. Разделение на силикагеле с использованием смеси ацетат:гексан (1:4) в качестве элюента давало ряд фракций, одна из которых, 80 мг, была целевым метиловым эфиром 3 β ,7 α -дистеариламида-5 β -урсодезоксихолан-24-овой кислоты (фиг. 1D-25), в соответствии с его масс-спектром (МС) и ¹H ЯМР-спектром. МС с бомбардировкой ускоренными атомами (FAB): МН+ 937 (ММ 936).

¹H ЯМР (CDCl₃), δ , м.д.: 0,66 (с, CH₃-18), 0,86 (д, J = 4 Гц, CH₃-23), 0,96 (с, CH₃-19), 1,2 (т, J = 3 Гц, CH₃-21), 1,26 [с, (CH₂)₁₆], 3,64 (с, COOCH₃), 3,05 (д, J = 7 Гц, H-7), 5,75 (м, H-3).

(f) Метилловый эфир в количестве 78 мг (фиг. 1D-25) растворяли в 20 мл метанола, обрабатывали 2 мл 1н. гидроксида натрия и выдерживали в течение 48 ч при комнатной температуре. Метанол выпаривали в вакууме, остаток растворяли в 25 мл воды, фильтровали и затем подкисляли разбавленной хлористо-водородной кислотой, получая осадок, который состоял из 3 β ,7 α -дистеариламида-5 β -урсодезоксихолан-24-овой кислоты (фиг. 1D-26).

Пример VII. Материалы и способы.

Холестерин (Sigma, St. Louis, Mo.) был дважды перекристаллизован из горячего этанола; Na-таурохолат (Na-TC; Sigma, St. Louis, Mo.) был дважды перекристаллизован из этанола и диэтилового эфира (J.L. Pope, J. Lipid Res. 8, (1967), 146-147); лецитин желтка яиц (EYL) (Avanti Polar Lipids, Alabaster, Al.) использовали без дополнительной очистки. Все липиды, использованные в этом исследовании, были чистыми по стандарту ТСХ.

1. Получение желчей.

А. Модельная желчь.

Смеси EYL, холестерина и Na-TC растворяли в смеси CHCl₃/CH₃OH (2:1, об./об.), сушили в атмосфере N₂ при комнатной температуре, лиофилизировали в течение ночи и до использования выдерживали при -20°C в атмосфере аргона. Растворы модельных желчей получали путем суспендирования высушенных липидов в 150 мМ NaCl, 1,5 мМ двуназиевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA), 50 мМ Трис-НСl с рН 8,0 и инкубирования этой суспензии при 55°C в течение 1 ч. Солюбилизованные модельные желчи инкубировали в запаянных ампулах в атмосфере аргона при 37°C в течение времени эксперимента. Аликвоты моделей проверяли ежедневно.

Все модели получали в тройном повторе и выдерживали при таких же условиях на всем протяжении экспериментального периода. Состав модельной желчи был следующим: 15 мМ холестерин, 30 мМ EYL, 150 мМ Na-TC. Другие исследованные растворы модельных желчей получали добавлением синтетического соединения (конъюгата) желчной кислоты или замещением (10-20%) EYL или Na-TC этим синтетическим соединением.

В. Природная желчь желчного пузыря человека.

Природную желчь желчного пузыря человека получали из организма пациентов с холестериновыми желчными конкрементами при холецистэктомии. Обедненную желчь нескольких пациентов обогащали холестерином путем инкубации с высушенным холестерином или смешивания с концентрированной модельной желчью до использования в экспериментах, чтобы облегчить кристаллизацию.

2. Оценка образования и роста количества кристаллов холестерина.

2.1. Анализ по времени обнаружения кристаллов (COT).

COT (называемый также «временем образования центров кристаллизации») определяли, как описано Holan et al. в *Gastroenterology* 77 (1979), 611-617. Аликвоты каждой модельной желчи проверяли ежедневно поляризационной микроскопией. COT определяли как начальное время обнаружения, по меньшей мере, трех кристаллов моногидрата холестерина на поле зрения микроскопа при 100-кратном увеличении.

2.2. Анализ скорости роста кристаллов (CGR).

Рост кристаллов наблюдали спектрофотометрическим способом с использованием устройства для прочтения микропланшетов (Spectra-STL, Austria) (G.J. Somjen, et al., J. Lipid Res., 38 (1977), 1048-1052). Аликвоты (50 мкл) растворов липидов смешивали и энергично встряхивали с эквивалентными объемами Na-тауродезоксихолата (200 мМ) в лунках микропланшета. После выдерживания 60 мин при комнатной температуре микропланшеты снова встряхивали и измеряли поглощение при 405 нм в каждой

лунке. Каждую модель готовили в тройном повторе и образцы для измерения брали в двойной повторе.

Эти данные собирали и анализировали IBM-совместимым персональным компьютером и вычисляли оптическую плотность (OD), усредненную для препаратов в тройном повторе. Строили график, описывающий изменения усредненной OD для каждого раствора. Наклон в наиболее крутой области кривой вычисляли линейной регрессией, приспособленной, по меньшей мере, для трех измерений, и определяли как CGR. Разности CGR и OD между днем 0 и днем 14 вычисляли для каждой модели.

2.3. Измерение массы кристаллов.

Химические анализы холестерина проводили для каждого образца в последний день эксперимента (14 день), как ранее описано (см. выше G.J. Somjen). Образцы собирали из микролунок, центрифугировали в ультрацентрифуге с воздушным приводом (Бекман) при скорости 70000 об./мин в течение 5 мин. Отдельные определения проводили на общем образце (до центрифугирования), а также на растворе супернатанта. Количество холестерина в осажденных гранулах вычисляли вычитанием количеств в растворах супернатанта из общего количества. Кристаллический характер гранулы подтверждали поляризационной микроскопией. Массу кристалла также измеряли спектрофотометрическим способом как разность OD между днем 0 и днем 14 инкубации.

3. Анализ данных.

Каждую дисперсию липида получали в тройной повторе и дублированные аликвоты измеряли из всех образцов. Вычисляли средние величины OD и стандартные ошибки. Скорости роста кристаллов вычисляли из линейного регрессионного анализа кривых роста кристаллов, как объяснялось выше. Сравнение между разными модельными растворами проводили одним способом, дисперсионным анализом.

Пример VIII.

Раствор модельной желчи имел следующий состав: 15 мМ холестерин, 30 мл EYL, 150 мл NaTC. Его получали, как описано в примере VII. В испытуемых растворах 20 молярных процентов NaTC заменяли эквимольным количеством каждого конкретного испытуемого соединения (конъюгата) жирная кислота/желчная кислота. Результаты, полученные с соединениями (конъюгатами) насыщенных жирных кислоты с длиной цепи C₁₈ и C₂₀, соответственно, соединенных с хеновой кислотой в положении C₃, приводятся на фиг. 2 и 3.

На фиг. 2 показано влияние этих соединений на массу кристаллов холестерина после 14 дней инкубации контрольного и испытуемых растворов. Все из вышеуказанных соединений снижали конечную массу кристаллов по сравнению с контрольным раствором. C₁₈-Конъюгат

снижал ее до 14% от контроля; C₂₀-конъюгат снижал ее до 38%.

Конъюгат C₂₂, испытанный в другом эксперименте, показал активность, подобную активности C₂₀.

На фиг. 3 показано время образования центров кристаллизации (время появления кристаллов) различных испытуемых растворов по сравнению с контрольным раствором. Замена 20% желчной соли (NaTC) определенными конъюгатами приводила к пролонгированию время образования центров кристаллизации с конъюгатами C₁₈ и C₂₀-C₂₀-конъюгат пролонгировал время образования центров кристаллизации более чем на 360%.

Пример IX.

Обедненную желчь желчного пузыря человека, полученную при операциях, обогащали концентрированным раствором липидов для повышения кристаллизации холестерина. Конечная концентрация в желчи добавленных липидов была следующей: NaTC 60 мМ, EYL 18,4 мМ и холестерин 9,2 мМ. Обогащенную желчь ультрацентрифугировали при скорости 50000 об./мин в течение 1 ч для удаления кристаллов холестерина и затем распределяли по 4 пробиркам. Первая пробирка содержала только обогащенную желчь (контроль). К другим 3 пробиркам были добавлены следующие растворы (при 5 мМ): хеновой кислоты, C-18(стеароил)холата и C-20(арахиноил)холата. После 22 дней инкубации при 37°C все желчи центрифугировали в ультрацентрифуге с воздушным приводом при скорости 70000 об./мин в течение 5 мин. Осадок удаляли и содержание в нем холестерина измеряли химическим способом. Результаты приводятся на фиг. 4 как мкмоль холестерина в осажденной массе кристаллов. Очевидно, что оба соединения желчная соль/жирная кислота очень заметно снижали кристаллизацию холестерина по сравнению с контрольной желчью с хеновой кислотой или без хеновой кислоты.

Пример X.

Раствор модельной желчи был получен, как описано в примере VII, с тем же самым липидным составом, и служил в качестве контроля. Во всех других образцах 20 мол.% NaTC заменяли эквимольными количествами: хеновой кислоты, C₁₈-холата и C₂₀-холата (все эти насыщенные жирные кислоты были соединены в положении C₃ холата) и дистеароилурсодезоксихолата (с радикалами стеариновой кислоты, соединенными в равных пропорциях в положениях C₃ и C₇ желчной кислоты).

Все образцы инкубировали при 37°C таким же самым образом, как описано в примере VII, и время образования центров кристаллизации определяли периодическими микроскопическими наблюдениями. Результаты приводятся на фиг. 5. Эти результаты доказывают, что: 1) все испытанные соединения (BAFAC) замедляют кристаллизацию холестерина по сравнению с кон-

трольной модельной желчью и эквимольными количествами холевой кислоты, 2) ВАФАС с более длинными цепями жирных кислот более эффективны, чем ВАФАС с более короткими цепями жирных кислот, 3) особенно эффективно соединение с 2 жирными кислотами (дистеароилурсодезоксихолат).

Пример XI. Абсорбция и перенос стеарилохолата (С-18-холат).

Самкам хомяков весом 80-100 г давали в виде одной дозы 30 мг С18-холата внутрижелудочным введением. Отдельных животных умерщвляли через 1, 2 и 3 ч после введения. Были взяты образцы крови сердца, крови воротной вены и желчи желчного пузыря. Параллельно исследовали две группы животных (А и В). Уровни стеарилохолата измеряли инструментом ВЭЖХ (Kontron Switzerland) с использованием УФ-детектора у 206 нм.

Результаты приводятся на фиг. 6А и 6В.

В группе А уровни стеарилохолата после 1, 2 и 3 ч в крови сердца были 99, 7 и 2 мкМ, тогда как уровни в крови воротной вены были 68,99 и 133 мкМ, соответственно. Уровни С18-холата в желчи желчного пузыря были 540 и 270 мМ после 2 и 3 ч, соответственно. Результаты в группе В были аналогичными.

Эти данные показывают, 1) что С-18 (стеарилоил) холат абсорбируется из кишечника, 2) что он переносится как в большой круг кровообращения (через лимфу), так и в воротную вену, 3) что он активно секретируется в желчь и концентрируется в ней.

Пример XII.

Раствор модельной желчи получали таким же образом, как описано в примере VII. Он имел такой же липидный состав и служил в качестве контроля.

В испытуемые растворы холевую кислоту, стеарилоил(С-18:0)холат и олеоил(С-18:1)холат добавляли при концентрации 20 мМ. Все образцы инкубировали при 37°C в течение 100 ч. Разность в оптической плотности между 100 ч и 0 ч (как описано в примере VII) использовали для измерения общей массы кристаллов при 100 ч. По сравнению с контрольным раствором (100%) масса кристаллов с холевой кислотой была 114%, со стеарилоилхолатом -62% и с олеоилхолатом - 55%.

Эти результаты доказывают, что ВАФАС с насыщенными, а также ненасыщенной (олеиновой) кислотами снижают кристаллизацию холестерина по сравнению с контрольной желчью и с эквимольными количествами холевой кислоты.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгаты (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой общей формулы II



в которой G представляет собой радикал желчной кислоты или желчной соли, которая, при желании, соединена в положении 24 с подходящей аминокислотой, W представляет собой один или два радикала жирных кислот, имеющих 6-26 атомов углерода, и X представляет собой NH-связь между радикалом указанной желчной кислоты или желчной соли и жирной кислотой(ами).

2. Конъюгаты (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по п.1, отличающиеся тем, что желчные кислоты выбраны из холевой кислоты, хенодезоксихолевой кислоты, урсодезоксихолевой кислоты и дезоксихолевой кислоты.

3. Конъюгаты (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по п.1 или 2, отличающиеся тем, что аминокислота в положении 24 выбрана из глицина и таурина.

4. Конъюгаты (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по любому из пп.1-3, отличающиеся тем, что соединение с радикалом жирной кислоты осуществлено в положении 3 кольца желчной кислоты.

5. Конъюгаты (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по любому из пп.1-3, отличающиеся тем, что соединение с радикалом(ами) жирной кислоты осуществлено в положении, выбранном среди положений 6, 7, 12 и 24 кольца желчной кислоты.

6. Конъюгаты (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по любому из пп.1-5, отличающиеся тем, что соединение между радикалом жирной кислоты(кислот) и желчной кислотой выбрано из α - или β -конфигурации.

7. Конъюгаты (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по любому из пп.1-6, отличающиеся тем, что насыщенная жирная кислота выбрана из бегеновой кислоты, арахидиновой кислоты и стеариновой кислоты.

8. 3 β -Бегениламидо-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овая кислота.

9. 3 β -Арахидиламидо-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овая кислота.

10. 3 β -Стеариламидо-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-овая кислота.

11. N-(Карбоксиметил)-3 β -стеариламидо-7 α ,12 α -дигидрокси-5 β -холан-24-амид.

12. Конъюгаты (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по любому из пп.1-10, отличающиеся тем, что W представляет собой две жирные кислоты, которые присоединены в положениях 3 и 7 кольца желчной кислоты.

13. Фармацевтическая композиция, позволяющая растворить холестериновые желчные конкременты в желчи и предотвратить их обра-

зование и позволяющая предотвратить и/или ослабить атеросклероз и включающая в себя в качестве активного ингредиента производное желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой общей формулы II по любому из пп.1-12.

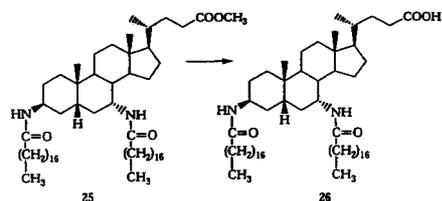
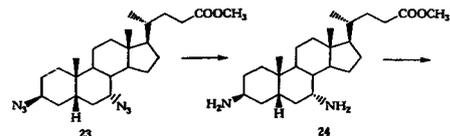
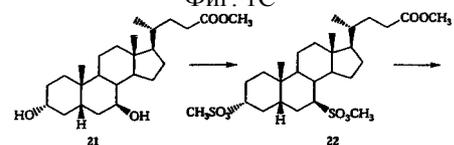
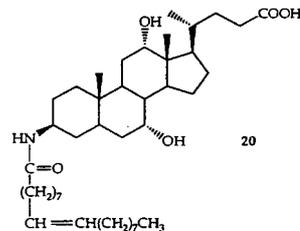
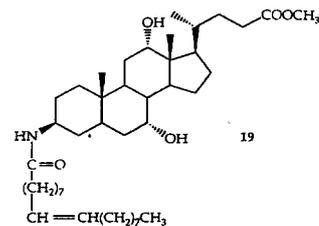
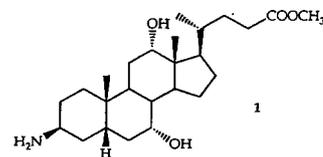
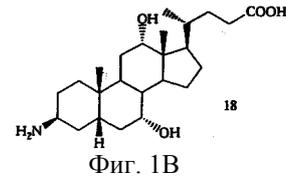
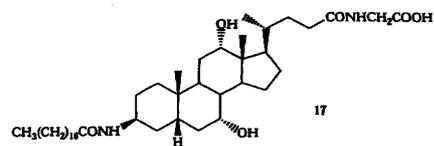
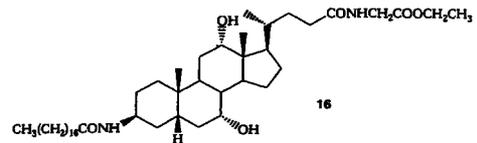
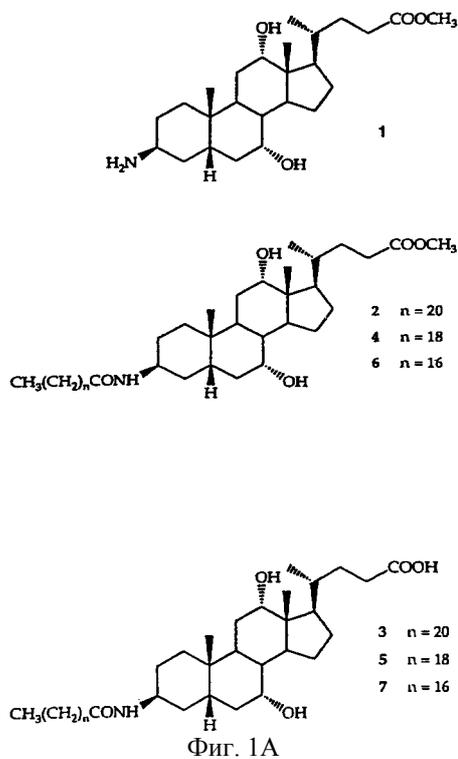
14. Фармацевтическая композиция по п.13, отличающаяся тем, что она имеет форму таблетки, капсулы, раствора и эмульсии.

15. Фармацевтическая композиция по п.13 или 14, отличающаяся тем, что она включает в себя дополнительное соединение, выбранное из носителя, растворителя, эмульгатора, усилителя абсорбции и ингибитора синтеза или секреции холестерина в желчь.

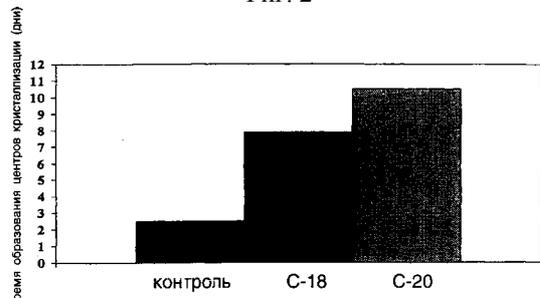
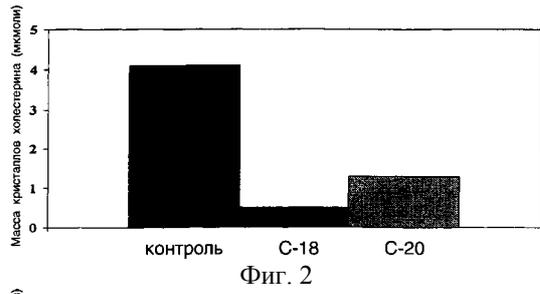
16. Фармацевтическая композиция по любому пп.13-15, отличающаяся тем, что она включает в себя 0,1-1,5 г активного ингредиента.

17. Использование конъюгата (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по любому из пп.1-12 или фармацевтической композиции по любому из пп.13-16 для растворения холестериновых желчных конкрементов в желчи и для предотвращения их образования.

18. Использование конъюгата (соединения) желчной кислоты или желчной соли с жирной кислотой по любому из пп.1-12 или фармацевтической композиции по любому из пп.13-16 для профилактики и/или ослабления атеросклероза.



Фиг. 1D



Длина цепи соединённых жирных кислот
Фиг. 3

