



CH 680 789 A5



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

① CH 680 789 A5

⑤ Int. Cl.⁵: C 07 C 57/03
C 07 C 69/587
A 61 K 31/20
A 61 K 31/23

Erfindungspatent für die Schweiz und Liechtenstein
Schweizerisch-liechtensteinischer Patentschutzvertrag vom 22. Dezember 1978

⑫ **PATENTSCHRIFT** A5

⑳ Gesuchsnummer: 2922/89

⑦ Inhaber:
Norsk Hydro A/S, Oslo 2 (NO)

㉒ Anmeldungsdatum: 09.08.1989

③ Priorität(en): 11.08.1988 GB 8819110

⑦ Erfinder:
Breivik, Harald, Skjelsvik (NO)
Borretzen, Bernt, Porsgrunn (NO)
Dahl, Knut Helkas, Ulefoss (NO)
Krokan, Hans Einar, Sjetnemarka (NO)
Bonaa, Kaare H., Tromso (NO)

㉔ Patent erteilt: 13.11.1992

④ Patentschrift
veröffentlicht: 13.11.1992

⑦ Vertreter:
E. Blum & Co., Zürich

⑤ **Fettsäurezusammensetzung.**

⑦ Die Fettsäurezusammensetzung enthält wenigstens 80 Gew.-% an Omega-3-Fettsäuren und/oder deren funktionelle Derivate. Die (all-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure (EPA) und (all-Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure (DHA) sind in relativen Mengen von 1:2 bis 2:1 vorhanden und sie machen wenigstens 75 Gew.-% der gesamten Fettsäuren aus.

Ein Verfahren zur Herstellung der genannten Zusammensetzung ist beschrieben.

Pharmazeutische Präparate zur Behandlung oder Prophylaxe von mehrfachen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten enthalten die beschriebene Zusammensetzung.



CH 680 789 A5

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf eine Fettsäurezusammensetzung, die mindestens 80 Gew.-% an Omega-3-Fettsäuren und/oder deren funktionelle Derivate enthält, wobei (all-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure (EPA) und (all-Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure (DHA) in relativen Mengen von 1:2 bis 2:1 vorhanden sind und wenigstens 75 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen.

Ebenfalls bezieht sich die Erfindung auf ein Verfahren zur Herstellung der genannten Fettsäuren, auf die Verwendung von marinem Ölkonzentrat, das wenigstens 80% langkettige Omega-3-Fettsäuren oder deren funktionelle Derivate enthält für die Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung oder Prophylaxe von mehrfachen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten.

Auch die Herstellung des genannten pharmazeutischen Präparates wird von der vorliegenden Erfindung umfasst.

Kardiovaskuläre Krankheiten, welche zu Morbidität und vorzeitiger Mortalität führen, stehen in Beziehung zu verschiedenen Risikofaktoren, wie etwa Hochdruck, Hypertriglyceridemia, Hypercholesterolemia, hohe Blutplättchenaggregation, und gemäss kürzlichen Befunden, einer hohen Aktivität des Blutkoagulationfaktor-VII-phospholipid-Komplexes. Während der letzten drei Dekaden haben antihypertonische Arzneimittel zur Abnahme der kardiovaskulären Krankheiten bezogenen Morbidität und Mortalität beigetragen. Es gibt jedoch eine erhöhte Beachtung gegenüber Nebeneffekten und Toxizität, assoziiert mit der gegenwärtigen antihypertonischen Therapie, speziell bei schwach hypertensiven Patienten. Es gibt Resultate, welche darauf hindeuten, dass, wenngleich die gegenwärtig verwendeten antihypertonischen Mittel wirksam sind bei der Reduktion des Blutdruckes, die Pulsrate gleichzeitig vergrössert wird. Es besteht daher ein Bedarf an einem Arzneimittel mit weniger nachteiligen Effekten für die Behandlung von erhöhtem Druck. Es wäre speziell vorteilhaft, wenn ein solches Arzneimittel verwendet werden könnte für die gleichzeitige Behandlung für alle weiter oben erwähnten mehrfachen Risikofaktoren, assoziiert mit kardiovaskulären Krankheiten, was generell nicht der Fall ist mit den gegenwärtig erhältlichen antihypertonischen Arzneimitteln.

Während der letzten Dekade sind zahlreiche Publikationen erschienen, welche berichten, dass verschiedene diätetische Fischölpräparate, enthaltend Omega-3 polyungesättigte Fettsäuren, einen Effekt auf das Serum-Cholesterol und auf die Blutplättchenaggregation haben. Die Mechanismen, welche für diese Effekte vorgeschlagen sind, drehen sich oft um das prostanoides System. Deshalb gibt es einige Informationen, wie diätetische Fischöle die Ausscheidung von einigen Prostaglantin-Metaboliten ändern, aber die erhältlichen Daten stehen bei verschiedenen Punkten miteinander im Widerspruch.

Es ist berichtet worden von einer Reduktion des Blutdruckes nach der Einnahme von Fisch, rohem Fischöl (beginnend bei 7% EPA und 5% DHA) oder leicht konzentrierten Fischölpräparaten (typischerweise enthaltend 18% EPA und 12% DHA), obwohl die Komponenten, welche für diese Effekte verantwortlich sind, nie identifiziert worden sind. Ferner haben alle Studien, welche bislang präsentiert worden sind, einen oder mehrere ernsthafte Fehler, wie dies in Übersichtsartikeln über die erhältlichen Studien dargelegt ist (H.R. Knapp et al., «Proceedings of AOCS Short Course on polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids», Ed. W.E.M. Lands, Seiten 41–55, American Oil Chemists Society) und (K. Bonaa, Tidskr. Nor Laegeforen nr. 28, 1987, 2425–8). Eikosapentaensäure C 20:5 Omega 3 (EPA) wird als die wichtigste der marinen Omega-3 polyungesättigten Fettsäuren betrachtet, teilweise wegen ihrer potenten antiaggregatorischen Wirkung i.a., wie dies im US-Patent No. 4 097 602, Silver et al., berichtet wird, welches im August 1974 eingereicht worden ist. Later Dyerberg et al. beschreiben auch den gleichen Effekt in Lancet, Seite 152, 21. Januar 1978 und Lancet II Seiten 117–119, 15. Juli 1978. Der Hauptgrund für die angenommene Wichtigkeit von EPA liegt wahrscheinlich darin, dass sie zu den Eikosanoiden gehört, welche Schlüsselsubstanzen für den Prostaglantin-Metabolismus sind.

Jedoch gemäss verschiedenen kürzlich erschienenen Berichten hat EPA alleine nicht einen signifikanten Effekt auf Hypertension. In «Effects of highly purified eicosapentaenoic acid to angiotensin II and norepinephrine in the rabbit», Prostaglandins, August 1986, Vol. 32, Nr. 2, Seiten 179–187, wird berichtet, dass keine Reduktion des Blutdruckes in Hasen erhalten wurde, wenn hochgereinigte EPA mit 90%iger Konzentration verwendet wurde. Terano et al., Atherosclerosis, 46, 321–331, 1983, berichten, dass ein Präparat, enthaltend 75% EPA und 6,2% DHA, keinen signifikanten Effekt auf den Blutdruck in gesunden Freiwilligen nach einer Einnahme von 3,6 g EPA-Äthylester hat. Ähnlich berichten Yoshida et al., Artery, 14, 295–303, 1987, von keinem Effekt auf den basalen Blutdruck nach der Einnahme von 900 mg EPA-Äthylester während 14 Tagen oder länger. Ferner hatte 90% EPA-Methylester keinen Effekt auf spontan hypertensive Ratten, K. Yin et al., 1988, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 15, 275–280.

Im Kontrast dazu wird in der britischen Anmeldung 2 197 199 eine Zusammensetzung für die Bekämpfung von schwangerschaftsinduziertem erhöhtem Druck beschrieben, wobei die Zusammensetzungen, welche im Beispiel verwendet werden, einen EPA-Gehalt von 28–35% haben. Die Patientinnen hatten früher keinen erhöhten Druck. Es wird vermutet, dass der unter Schwangerschaft sich entwickelnde erhöhte Druck eher verschiedene biologische Ursachen als normaler erhöhter Druck hat, was die Tatsache zu unterstreichen scheint, dass er nach der Beendigung der Schwangerschaft normalerweise wieder verschwindet.

Gemäss unserem Wissen gibt es nichts, was vorschlägt, dass DHA alleine irgendeinen Effekt auf den Blutdruck hat.

Gemäss dem US-Patent 3 082 228, basierend auf einer Anmeldung, eingereicht am 18. Dezember 1959, senkt ein Produkt, enthaltend wenigstens 60% polyungesättigte Fettsäuren mit 20 oder mehr C-Atomen, den Blutcholesteringehalt signifikant. Obwohl andere frühere Studien darauf hindeuten, dass Fischöle Totalcholesterin und LDL-Cholesterin senken und HDL Cholesterin anheben, haben spätere Resultate im allgemeinen den gegenteiligen Schluss gezogen, wie dies dargelegt wird von W.S. Harris in (n-3) News, 3 (4), 1-7. Wenn er 45 Artikel auf diesem Gebiet zusammenfasst, fand er heraus, dass LDL-Cholesterin um 2-30% erhöht wurde, abhängig vom Typ von Hyperlipidämie.

Aus PCT/WO 87/02247 ist eine lipide Emulsion für die parenterale Verwendung bekannt, umfassend einen Emulgator, Wasser und ein marines Öl, enthaltend wenigstens eine Omega-3-Fettsäure, worin die Konzentration der freien Fettsäure in der Emulsion unterhalb etwa 5 meq/l ist, und worin das marine Öl wenigstens 30 Gew.-% einer Kombination von Estern aus EPA und DHA enthalten soll. Diese lipide Emulsion wird verwendet für die intravenöse Behandlung von thrombotischen Krankheitszuständen.

Es ist jetzt gefunden worden, dass Fettsäurezusammensetzungen, enthaltend eine hohe Konzentration, wenigstens 80 Gew.-% an Omega-3-Fettsäuren und/oder funktionellen Derivaten davon, vorzugsweise die pharmazeutisch annehmbaren Salze, wobei EPA und DHA in relativen Mengen von 1:2 bis 2:1 vorhanden sind, und wenigstens 75% der gesamten Menge an Fettsäuren ausmachen, einen überraschend vorteilhaften Effekt auf alle weiter oben erwähnten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten haben, im speziellen einen guten Effekt bei schwach erhöhtem Druck, Hypertriglyceridämie und auf die Koagulation-Faktor-VII-Phospholipid-Komplex-Aktivität. Dabei wird Serum-LDL-Cholesterin gesenkt, Serum-HDL-Cholesterin erhöht, Serum-Triglyzeride gesenkt, systolischer und diastolischer Blutdruck und die Pulsrate gesenkt, und die Aktivität des Blutkoagulation-Faktor-VII-Phospholipid-Komplexes gesenkt. Obwohl die detaillierten biologischen Mechanismen für die Effekte der Zusammensetzungen gemäss der vorliegenden Anmeldung nicht explizit bekannt sind, gibt es Hinweise auf eine überraschende Synergie zwischen der Wirkung von EPA und DHA.

Ein Vorteil der Zusammensetzung gemäss der vorliegenden Erfindung besteht darin, dass sie sehr gut toleriert werden und keinen Anlass zu irgendwelchen Nebeneffekten geben.

Eine speziell bevorzugte Zusammensetzung gemäss der vorliegenden Erfindung umfasst wenigstens 90 Gew.-% an langkettigen, polyungesättigten Omega-3-Fettsäuren, wovon EPA und DHA wenigstens 85 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen und in einem Verhältnis von EPA:DHA von 1:1 bis 2:1, speziell etwa 3:2, vorhanden sind.

Um EPA und DHA in einem Gemisch hoher Konzentration gemäss der vorliegenden Erfindung zu isolieren, wurde ein spezielles Verfahren für die Reinigung und Isolierung der langkettigen Fettsäuren aus natürlichen Fischölen entwickelt. Erfindungsgemässe Zusammensetzungen können hergestellt werden gemäss dem Verfahren des europäischen Patentes Nr. EP-B 0 255 824. Die Analyse in Gew.-% basiert auf den Äthylestern, selbst wenn andere Derivate oder Salze oder die Säuren selbst einen Teil der vorliegenden erfindungsgemässen Zusammensetzung sind.

Die Zusammensetzung gemäss der vorliegenden Erfindung wird vorzugsweise hergestellt via das folgende Verfahren: Anfänglich wird das marine Öl-Rohmaterial verestert und via Harnstofffraktionierung oder ähnlichem konzentriert, wobei die Bedingungen genügend mild sind, um eine Zersetzung der Produkte zu vermeiden. Der zweite Schritt ist eine molekulare Destillation. Die Fraktionierung entfernt im Prinzip anfänglich den Hauptteil der Ester, welche eine Kettenlänge unterhalb C 20 haben. Danach wird eine Hauptfraktion entfernt, welche im wesentlichen aus Estern der C 20 und C 22-Säuren besteht. Weil die Harnstofffraktionierung die gesättigten und wenig ungesättigte Ester entfernt, enthält diese Fraktion hohe Konzentrationen an EPA und DHA, entsprechend dem vorliegenden Verfahren wenigstens 75 Gew.-%. Die gesamte Menge an langkettigen Omega-3-Säuren beträgt wenigstens 80 Gew.-%. Weitere bevorzugte Zusammensetzungen gemäss der vorliegenden Anmeldung enthalten wenigstens 95 Gew.-% mit dem EPA plus DHA-Gehalt von wenigstens 90 Gew.-%. Eine andere bevorzugte Zusammensetzung gemäss der vorliegenden Erfindung enthält wenigstens 85 Gew.-% der Gesamtmenge an Omega-3-Fettsäuren, und eine EPA- und DHA-Menge von wenigstens 80 Gew.-%.

Weitere Omega-3-Säuren der C 20, C 21 und C 22-Serie können in ungefähr ihrer ursprünglichen Konzentration erhalten werden, z.B. von 3-5 Gew.-%, typischerweise wenigstens 4,5 Gew.-%. So ist die spezielle und ungerade numerierte Omega-3 all-Z 6,9,12,15, 18 - Heneikosapentaensäure C 21:5 normalerweise in Konzentrationen von wenigstens 1,5 Gew.-% vorhanden, und die Omega-3 all-Z 7,10,13,16,19 - Docosapentaensäure ist normalerweise in Konzentration von etwa 3,0 Gew.-% vorhanden.

Nach der Entfernung des Harnstoffniederschlages wird das verwendete Lösungsmittel, normalerweise Ethanol, gewöhnlich teilweise oder vollständig entfernt mittels Verdampfung, und die so isolierten Estern können weiter gereinigt werden mittels Waschen mit Wasser oder einer schwach alkalischen Wasserlösung, wenn die reinen Ester ohne Kontaminierung der Säuren isoliert werden sollten.

Die freien Säuren können hergestellt werden mittels gut bekannten Hydrolysisverfahren.

Die Verbesserung der EPA-Fraktion, um ein Gewichtsverhältnis von EPA:DHA von 1:1 bis 2:1, speziell 3:2, zu erhalten, oder die Verbesserung der DHA-Fraktion, um ein EPA:DHA Gewichtsverhältnis von 1:1 bis 1:2 zu erhalten, kann erreicht werden im Molekulardestillationsschritt. Das Verfahren bein-

haltet auch die Möglichkeit der Verwendung von überkritischer Flüssigextraktion und/oder Chromatographie im zweiten Schritt mit CO₂, enthaltend gegebenenfalls einen polarerer Modifikator, wie etwa Ethanol, um die EPA- und/oder DHA-Fraktion zu konzentrieren.

Die Harnstofffraktionierung und die nachfolgende molekulare Destillation werden vorzugsweise unter schonenden Bedingungen durchgeführt, um eine Oxydation und/oder Isomerisation der stark instabilen Omega-3-Säuren zu vermeiden. Wie aus den nachfolgenden Tabellen 1 und 2 ersichtlich ist, worin die Analyse von Produkten gegeben ist, erhalten in Übereinstimmung mit dem Verfahren dieser Erfindung, gibt es nicht mehr als 1% an unbekanntem Komponenten im gereinigten Produkt. Es gibt jedoch eine bestimmte Menge an kleineren Produkten, wie etwa C-16- und C-18-Säuren, wie dies ersichtlich ist aus der detaillierten Analyse, welche in Tabelle 2 gezeigt wird.

Für den Hauptteil sind diese Produkte die kombinierte Summe der Fraktion der Fettsäure-Ester, welche natürlich auftreten in Fischölen, aber die Konzentration von jedem separaten Ester im Endprodukt ist weniger als 0,2%, abgesehen von der Omega-3-Octadecatetraensäure C 18:4 n-3, welche ungefähr in der gleichen Menge vorhanden ist wie im Ausgangsmaterial.

Es versteht sich daher, dass die gesamte Konzentration an Nebenprodukten, welche aus dem Verfahren stammen, sehr gering ist.

Das Verfahren ist flexibel genug, um auf die relativen Anteile zwischen den langkettigen C 20, C 21 und C 22 Fettsäuren zu wirken, welche natürlich auftreten in erhältlichen Fischölmaterialien. Es ermöglicht nicht nur die Verbesserung der einzelnen Säuren, sondern das Verhältnis zwischen ihnen bleibt auch in einem Muster von Variationen, welches optimal in der Natur ist. Gleichzeitig ist aber genügend Spielraum für die Kompensierung von manchmal extremen Variationen, welche natürlich auftreten können; siehe weiter unten. Demnach ist es möglich, ein Produkt mit einer konstanten und vorausbestimmten Zusammensetzung zu machen.

Fischöle können auch Nebenprodukte und Verunreinigungen enthalten, wie etwa Pestizide, chlorierte Kohlenwasserstoffe, Schwermetalle, Cholesterin und Vitamine. Während der Herstellung des Konzentrates werden die Konzentrationen dieser Komponenten signifikant reduziert, verglichen mit unbehandelten Fischölen.

In der Natur sind die relativen Gehalte an EPA und DHA, und auch die anderen langkettigen Omega-3-Säuren, abhängig von den marinen Spezies, und es gibt auch saisonale Variationen innerhalb der gleichen Spezies. In den USA wird heutzutage Fischöl hauptsächlich aus Heringsfischen produziert. Dieses Öl enthält typischerweise 14-19% EPA und 5-8% DHA. Unsere Analyse einer Lebertrancharge zeigte einen Gehalt von 6,9 EPA und 8,4 DHA. Für *Mallotus villosus* variierten die EPA-Werte von 8,6 bis 11,4 von Januar 1973 bis August 1973, währenddem die DHA-Werte von 6,7% bis 11% während der gleichen Zeitspanne variierten. Für norwegische Küstenheringe war der Gehalt im Oktober 1974 6,4% EPA und 9,8% DHA, währenddem Fänge im November 1975 eine Reduktion auf 1,7% und 1,1% zeigten.

Diese Variationen bedeuten, dass diätetische Einnahmen von Fischölen oder Fisch alleine eine konstante Zufuhr von Omega-3-Säuren nicht sicherstellt. Selbst wenn alle langkettigen C 20, C 21 und C 22 Omega-3-Säuren nicht oder nur leicht verbessert werden während des Verfahrens, werden sie wenigstens in ihren ursprünglichen Proportionen erhalten.

In Tabelle 1 illustriert die linke Kolonne die typischen Variationen zwischen den Gehalten an einzelnen langkettigen Säuren in den Zusammensetzungen dieser Erfindung, währenddem die Kolonne rechts die exakte Analyse der Testprobe zeigt, welche verwendet wurde beim Studium der biologischen Effekte, welche Resultate davon in den untenstehenden Tabellen 4-8 gezeigt werden.

Tabelle 1

	Typische Produktvariationen	Testprobe
C 20:4 Omega-6	1-2 Gew.-%	1,4 Gew.-%
C 20:5 Omega-3	40-60 Gew.-%	54 Gew.-%
C 21:5 Omega-3	1-4 Gew.-%	1,5 Gew.-%
C 22:5 Omega-3	1-3 Gew.-%	2 Gew.-%
C 22:6 Omega-3	25-45 Gew.-%	32,6 Gew.-%
niedere Säuren	3-8,5 Gew.-%	7,5 Gew.-%
unbekannt	1 Gew.-%	1 Gew.-%
Summe Omega-3-Fettsäuren	-	90,1 Gew.-%
Summe EPA + DHA	-	86,6 Gew.-%
EPA:DHA	-	3,3:2

CH 680 789 A5

Tabelle 2 zeigt eine detaillierte Analyse einer Charge von Ausgangsmaterial und einer Zusammensetzung dieser Erfindung, welche daraus erhalten wurde.

5 Tabelle 2
Fettsäurezusammensetzung (%)

	Fettsäure	Ausgangsmaterial Fischöl	Produkt Ethylester Testprobe
10	C14:0	7.6	0.0
	Pristanate	0.4	0.0
	C16:0	19.1	0.0
	C16:1 n7	7.2	0.0
15	7-Me16:0	0.3	0.0
	C16:2 n6	0.5	0.0
	C16:2 n4	1.2	0.0
	Phytanate	0.3	0.0
20	C16:3 n4	0.5	0.0
	C16:4 n1	1.0	0.2
	C18:0	2.3	0.0
25	C18:1 n9	9.1	0.0
	C18:1 n7	3.0	0.0
	C18:1 n5	0.4	0.1
	C18:2 n6	1.1	0.0
30	C18:2 n4	0.2	0.0
	C18:3 n6	0.2	0.2
	C18:3 n3	0.7	0.2
	C18:4 n3	2.5	2.8
35	C18:4 n1	0.1	0.2
	C20:1 n9+7	5.9	0.0
	C20:1	0.1	0.0
	C20:2 n6	0.2	0.1
40	C20:3 n6	0.1	0.0
	C20:4 n6	0.7	1.4
	C20:4 n3	1.2	0.9
	C20:5 n3	16.5	53.4
45	C22:1 n11+9	4.6	0.0
	C22:2 n6	0.7	0.0
	C21:5 n3	0.9	1.6
50	C22:4 n6	0.1	0.0
	C22:5 n6	0.1	0.4
	C22:5 n3	2.0	3.1
	C22:6 n3	7.9	34.3
55	Summe unbekannt	1.0	1.0
	Summe Omega-3-Fettsäuren	31.7	95.4
	inkl. C 18	3.2	3.0
	Summe EPA + DHA	24.4	87.7
60	EPA:DHA	2.1:1	3.1:2

65

Tabelle 3 zeigt die Hauptfettsäuregehalte der verschiedenen Zusammensetzungen gemäss der vorliegenden Erfindung.

5 **Tabelle 3**

Fettsäure	Zusammensetzung (%)					
C18:2 n6	0.3	0.3	0.1	0.0	0.2	0.1
C18:3 n3	0.3	0.3	0.0	0.1	0.3	0.0
10 C18:4 n3	2.3	2.3	3.6	2.2	1.8	0.7
C18:4 n1	0.2	0.2	0.4	0.3	0.0	0.0
C20:4 n6	1.7	1.7	1.5	3.9	1.6	1.6
C20:4 n3	2.4	0.9	1.3	1.2	1.9	0.3
15 C20:5 n3	54.7	52.7	42.2	48.5	41.0	31.7
C21:5 n3	2.1	2.1	1.7	2.0	1.7	1.2
C22:5 n6	0.4	0.4	0.6	0.8	0.7	1.1
C22:5 n3	5.4	5.8	2.8	4.3	5.8	3.3
20 C22:6 n3	28.7	31.0	38.0	34.9	42.4	58.5
Summen n3-Fettsäuren inkl. C 18	95.9	95.1	89.6	93.2	94.9	95.7
Summe EPA + DHA	83.4	83.7	80.2	83.4	83.4	90.2
25 EPA:DHA	1.9:1	1.7:1	1.1:1	1.4:1	1:1	1.1:8

n3FA bedeutet Omega-3-Fettsäuren

30 Biologische Effekte

Um den Effekt einer Zusammensetzung gemäss der vorliegenden Erfindung auf den Blutdruck, die Pulsrate, Triglyzeridspiegel, Serumcholesterin und HDL-Cholesterin, Blutplättchenaggregation und die Koagulation-Faktor-VII-Phospholipid-Komplex-Aktivität zu evaluieren, wurde die gesamte Bevölkerung im Alter von 34–60 Jahren einer kleinen norwegischen Stadt eingeladen zu einem Gesundheitscheck, und von diesen wurden 22 000 Personen ausgewählt für die folgenden Kriterien:

- unbehandelter mässiger Blut-Hochdruck eines diastolischen Blutdruckes (DBP) im Bereich von 89 bis 111 mm Hg und eines systolischen Blutdruckes (SBP) von 110 bis 180 mm Hg
- keine vorgängige Herzkrankheit und keine Verwendung von Herzarzneimitteln
- 40 – keine ernsthafte Krankheiten
- kein extremes Übergewicht
- kein Alkoholismus
- Serumcholesterin von wenigstens 6,0 mmol/Liter.

Die Gruppe von Freiwilligen, ausgewählt durch diese Kriterien, ergab 172 Personen. Die Freiwilligen wurden ausgewählt während einer Einlaufperiode von 6 Monaten, um die Stabilisation des Blutdruckes sicherzustellen, bevor die Testsubstanz verabreicht wurde.

Alle Blutdruckmessungen wurden mit einem automatischen Instrument (Dinamap) gemacht, und bei jeder Gelegenheit wurden 3 Messungen (mit 2minütigen Intervallen) durchgeführt, sitzend und stehend unter kontrollierten Bedingungen. Der Durchschnitt der beiden letzten sitzenden und stehenden Messungen wurde verwendet.

Die Studie wurde mit einem doppelten Blindversuch kontrolliert. Die 172 Freiwilligen wurden zufällig in 2 Gruppen von ähnlicher Grösse aufgeteilt. Eine Gruppe erhielt Placebo-Kapseln aus Maisöl, jede mit 1 g Maisöl mit 0,3% hinzugefügtem Vitamin E. Die andere Gruppe erhielt Kapseln, enthaltend 1 g der Testsubstanz, dessen Zusammensetzung in Tabelle 1 gegeben ist. Beide Sets von Kapseln wurden aus gefärbter weicher Gelatine gemacht, um den Blindeffekt sicherzustellen. Die Freiwilligen wurden angehalten, 3 Kapseln 2mal täglich von entweder der Testsubstanz oder der Kontrollsubstanz während 11–12 Wochen einzunehmen. 171 Freiwillige beendeten die Studie, und im Durchschnitt wurden etwa 90% der Kapseln eingenommen.

Wie auf den untenstehenden Tabellen 4 und 5 ersichtlich ist, hat Maisöl keinen statistisch signifikanten Effekt auf den Blutdruck. Der Effekt der Testsubstanz auf den Blutdruck wurde zuerst mit der ganzen Gruppe festgesetzt, welche die Testsubstanz einnahm, und als nächstes wurden jene Individuen mit höherem Blutdruck berücksichtigt. Der durchschnittliche Blutdruck der Patienten mit höherem Blutdruck zu Beginn und am Ende der Behandlung mit der aktiven Testsubstanz dieser Erfindung ist in Tabelle 4 (diastolischer Blutdruck) und Tabelle 5 (systolischer Blutdruck) wiedergegeben.

Tabelle 4
Effekt der Testsubstanz und Maisöl auf den diastolischen Blutdruck

DBP-Bereich	Anzahl von Patienten	Durchschnitt DBP vor der Behandlung (mm Hg)	Durchschnitt DBP nach der Behandlung (mm Hg)	Durchschnittliche Reduktion in DBP (mm Hg)	Signifikanz
Testsubstanz					
85-109	62	95.8	93.4	2.4	p < 0.05
98-109	22	102	96.2	5.8	p < 0.01
Maisöl					
86-109	57	95.7	96.0	0	n.s.
98-109	26	101.8	100.7	1.1	n.s.

15 n.s. bedeutet nicht signifikant

Tabelle 5
Effekt der Testsubstanz und Maisöl auf den systolischen Blutdruck

SBP-Bereich	Anzahl von Patienten	Durchschnitt SBP vor der Behandlung (mm Hg)	Durchschnitt SBP nach der Behandlung (mm Hg)	Durchschnittliche Reduktion in SBP (mm Hg)	Signifikanz
Testsubstanzen					
> 135	71	148.1	144.5	3.6	p 0.05
> 150	24	158.4	150.3	8.1	p 0.001
> 155	15	162.2	152.4	9.8	p 0.001
Maisöl					
> 135	62	148.5	149.6	0	n.s.
> 150	23	159.1	158.0	1.1	n.s.
> 155	17	161.8	159.6	2.2	n.s.

35 n.s. bedeutet nicht signifikant

Wie aus den obigen Tabellen ersichtlich ist, hatte die Testsubstanz einen stark signifikanten hypertensiven Effekt, sowohl auf den systolischen als auch auf den diastolischen Blutdruck. Es ist also klar, dass der Effekt am stärksten auf jene Patienten mit dem höchsten Blutdruck wirkt. Kein signifikanter Effekt wurde erhalten mit der Maisölgruppe.

Tabelle 6
Effekt der Testsubstanz und Maisöl auf den systolischen und diastolischen Blutdruck gemäss diätetischer Einnahme von Fisch (Gerichte pro Woche)

Gerichte pro Woche	Anzahl Patienten	Durchschnitt BP vor der Behandlung (mm Hg)	Durchschnitt BP nach der Behandlung (mm Hg)	Durchschnittliche Reduktion in BP (mm Hg)	Signifikanz
Testsubstanz					
0-2	44	SBP 145.3	139.3	-6.9	p = 0.005
		DBP 99.8	94.0	-5.7	p = 0.0001
3-5	34	SBP 143.6	141.2	-2.4	p = 0.2
		DBP 97.7	96.3	-1.4	p = 0.2
Maisöl					
0-2	34	SBP 145.2	146.8	+1.6	p = 0.4
		DBP 98.3	100.2	+1.9	p = 0.1
3-5	44	SBP 142.3	143.4	+1.1	p = 0.5
		DBP 97.4	97.9	+0.5	p = 0.7

65

Wie aus Tabelle 6 ersichtlich ist, wird ein guter hypertotonischer Effekt erreicht mit der Zusammensetzung gemäss der vorliegenden Erfindung, überraschenderweise sogar in der Gruppe mit einer hohen diätetischen Einnahme von Fisch von 3–5 Gerichten pro Woche. Im Vergleich dazu wird kein günstiger Effekt mit Maisöl erreicht.

5 Die oben gezeigten Resultate weisen darauf hin, dass eine erfindungsgemässe Zusammensetzung einen überraschend viel besseren Effekt ergibt, als man bei einer diätetischen Einnahme von Fisch oder leicht konzentriertem marinen Öl erwarten würde. Dies ist wahrscheinlich bedingt durch einen synergistischen Effekt von EPA und DHA.

10 Verglichen mit den Testresultaten, erreicht mit den vorgängig durchgeführten Studien mit einer diätetischen Einnahme von marinen Fischölen, zeigen die Resultate, erhalten mit einer erfindungsgemässen Zusammensetzung, eine überraschende Verbesserung im Effekt auf den diastolischen und systolischen Blutdruck von leicht hypertotonischen Patienten gegenüber mehr hypertotonischen Patienten von ungefähr 30% und 45%.

15

Tabelle 7
Effekt der Testsubstanz und Maisöl auf die Pulsrate (pro Minute)

Gruppe	Vorher	Nachher	Veränderung	Signifikanz
Testsubstanz				
sitzend	75.4	73.2	-2.2	p < 0.02
stehend	82.9	80.2	-2.7	p < 0.005
Maisöl				
stehend	74.3	75.1	+0.8	p = 0.3
sitzend	80.9	82.2	+1.3	p = 0.2

20

25

Die Pulsrate-Studie umfasste 78 Personen in der Gruppe, welche die Testsubstanz erhielt, und 77 Personen in der anderen Gruppe.

30

Wie aus der obenstehenden Tabelle ersichtlich ist, wurde eine signifikante Herabsetzung der Pulsrate mit der Testsubstanz gemäss der vorliegenden Erfindung, erhalten, und eine leichte, nicht signifikante Anhebung der Pulsrate mit Maisöl.

35

Tabelle 8
Effekt der Testsubstanz von Maisöl auf Serum-Cholesterin (mmol/Liter)

Gruppe	Vorher		Nachher	
	Tot. Chol.	HDL Chol.	Tot. Chol.	HDL Chol.
Alle Patienten				
Testsubstanz				
(n = 78)	6.58	1.35	6.57	1.41**
Maisöl (n = 78)	6.68	1.33	6.64	1.41**
Tot. Chol. > 7				
Testsubstanz				
(n = 26)	7.74	1.53	7.31**	1.58*
Maisöl (n = 20)	7.66	1.26	7.45*	1.32*

* p < 0.1
** p < 0.01

40

45

50

55 Wie aus Tabelle 8 ersichtlich ist, senkt die Testzusammensetzung gemäss der vorliegenden Anmeldung das totale Serum-Cholesterin signifikant bei Patienten mit einem totalen Cholesterin von oberhalb 7,0 mmol/liter und hebt HDL-Cholesterin signifikant an bei der ganzen Population. Ähnliche, aber schwächere Effekte werden erhalten in der Maisölgruppe.

60

Die Zusammensetzungen gemäss der vorliegenden Erfindung senken weiterhin LDL-Cholesterin um 5–10% bei Patienten mit einem totalen Cholesterin > 7 mmol/l, haben aber keinen signifikanten Effekt bei Patienten mit einem totalen Cholesterin < 6.5 mmol/l.

65

Tabelle 9
Effekt der Testsubstanz und Maisöl auf Serumtriglyzerid

Triglyzerid (mmol/l)					
Gruppe	n	Vorher	Nachher	Reduktion	p-Wert
Testsubstanz	87	1.51	1.20	0.31	0.001
Maisöl	85	1.57	1.47	0.03	NS

Patienten mit Triglyzeriden > 2.00 mmol/l					
Gruppe	n	Vorher	Nachher	Reduktion	p-Wert
Testsubstanz	14	3.28	2.03	1.25	0.0001
Maisöl	17	3.22	2.66	0.56	0.01

Wie aus Tabelle 9 ersichtlich ist, hat die Testsubstanz den Effekt der Erniedrigung des Serum-Triglyzeridspiegels, speziell bei Patienten mit hohen Spiegeln (> 2.0 mmol/l) vor der Behandlung. Kein signifikanter Effekt wird erhalten mit Maisöl in der ganzen Gruppe der Freiwilligen, währenddem ein sehr kleiner Effekt erhalten wird bei Personen mit hohen Triglyzerid-Spiegeln.

Tabelle 10
Effekt der Testsubstanz und Maisöl auf die Blutplättchenaggregation

Gruppe	n	Collagen 0.2 µg/ml				Collagen 9.1 µg/ml			
		Vorher		Nachher		Vorher		Nachher	
		\bar{X}	SEM	\bar{X}	SEM	\bar{X}	SEM	\bar{X}	SEM
Testsubstanz	21	63.4 ±	4.40	38.8 ±	5.19	38.0 ±	5.91	13.7 ±	3.77
Maisöl	21	73.5 ±	4.40	57.4 ±	6.37	43.4 ±	45.5	15.2 ±	3.32

Wie aus Tabelle 10 ersichtlich ist, haben die erfindungsgemässen Zusammensetzungen einen Blutplättchenantiaggregationseffekt.

Der Koagulationsfaktor-VII-Phospholipid-Komplex ist gefunden worden im Plasma von Männern, welche zu einer hohen Risiko-Gruppe für kardiovaskuläre Krankheiten gehören, wie dies beschrieben ist in P. Leren et al. (The Oslo Study, Cardiovascular diseases in middle aged and young Oslo men. *Acta Med. Scand.* suppl. 588, 1-38, (1987)) und Dalaker et al. (A novel form of factor VII in plasma from men at risk for cardiovascular disease, *Br. J. Haematol.*, 61, 315-322, (1985)), und wird betrachtet als ein weiterer Risikofaktor für kardiovaskuläre Krankheiten.

Tabelle 11
Effekt der Testsubstanz und Maisöl auf die Koagulationsfaktor-VII-Phospholipidkomplexaktivität (Prozent)

Gruppe	n	Vorher	Nachher	Differenz
Testsubstanz	69	9.7	6.6	3.1**
Maisöl	72	8.5	8.8	0.3 N.S.

** p < 0.02

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, wird die Aktivität signifikant reduziert mit der Zusammensetzung gemäss der vorliegenden Erfindung, währenddem kein signifikanter Effekt mit Maisöl erreicht wird.

Gemäss den Resultaten, welche in den obenstehenden Tabellen 3-11 gezeigt werden, hat eine erfindungsgemässe Zusammensetzung einen signifikanten Effekt auf all die oben erwähnten Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten. Im Vergleich dazu werden einige positive Resultate erhalten mit Maisöl, aber keine signifikanten Effekte werden erhalten für den Blutdruck, den Serum-Triglyzeridspiegel oder für die Aktivität des Koagulationsfaktors VII. Ferner scheinen die Effekte, gemessen in der Maisölgruppe, für diese Risikofaktoren in die entgegengesetzte Richtung zu gehen und sind nachteilig.

Demgemäss sind die Fettsäurezusammensetzungen gemäss der vorliegenden Erfindung potentiell wertvoll für die Behandlung und Prophylaxe von mehrfachen Risikofaktoren, welche bekannt sind für kardiovaskuläre Krankheiten, wie etwa Blut-Hochdruck, Hypertriglyzeridämie und hohe Koagulationsfaktor-VII-Phospholipid-Komplex-Aktivität.

Die Dosen der Zusammensetzung dieser Erfindung, welche benötigt werden für therapeutische oder prophylaktische Effekte, variieren gewöhnlich mit der Art der Verabreichung. In unseren Test im grossen Massstab verabfolgten wir 6 g pro Person pro Tag von der Testzusammensetzung. Im allgemeinen können für eine durchschnittliche erwachsene Person die Dosen von 1,0 bis 10 g variieren, in Abhängigkeit von der Körpergrösse und der Ernsthaftigkeit der zu behandelnden Kondition.

Die erfindungsgemässen Zusammensetzungen können ferner verwendet werden als ein zusätzliches Arzneimittel zu herkömmlichen hypertonischen Arzneimitteln bei der Behandlung von Blut-Hochdruck. Die Dosen werden wahrscheinlich im unteren Teil der oben erwähnten Dosierungsbereiche liegen.

Weitere mögliche medizinische Indikationen, für welche die Zusammensetzungen gemäss der vorliegenden Erfindung verabreicht werden können, sind chronische Polyarthritis, psoriatische Arthritis, Periarthritis Nodosa, Lupus Erythematosus Disseminatus (LED), Sclerodermie, Crohn's-Krankheit, ulcerative Colitis, Psoriasis, atopische Dermatitis und Migräne, wie dies indiziert worden ist in Standard-in-vivo-Tests.

Vorzugsweise sollten die aktiven Verbindungen oral verabreicht werden in Form von Pillen, weichen Kapseln oder ähnlichem. Jedoch kann die Verabreichung auch über irgendeinen anderen Weg erfolgen, bei dem die aktiven Bestandteile wirksam absorbiert und verwendet werden, z.B. intravenös, subkutan, rektal, vaginal oder möglicherweise topisch.

Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können schliesslich enthalten, zusätzlich zu den EPA- und DHA-aktiven Bestandteilen, wie sie definiert sind, einen oder mehrere pharmazeutisch annehmbare Träger, welche dem Fachmann gut bekannt sind. Die Zusammensetzungen können auch Füllstoffe, Stabilisatoren, Streckmittel, Bindemittel, Befeuchtungsmittel, Oberflächenmittel, Gleitmittel und ähnliches enthalten, wie dies dem Fachmann für Formulierungen von pharmazeutischen Zusammensetzungen bekannt ist.

Zusätzlich können Antioxidantien, z.B. Hydroxytoluol, Butyrat, Chinon, Tocopherol, Ascorbinsäure etc., Konservierungsmittel, färbende Mittel, Parfüm, Geschmacksmittel und andere pharmazeutische Mittel verwendet werden.

Beispiel eines pharmazeutischen Präparates

Weiche Gelatine-Kapseln, enthaltend 1 g/pro Kapsel

Zusammensetzung:

EPA Ethylester	525 mg/Kapsel
DHA Ethylester	315 mg/Kapsel
d-Alpha Tocopherol	4 IU/Kapsel
Gelatine	246 mg/Kapsel
Glycerol	118 mg/Kapsel
Rotes Eisenoxyd	2.27 mg/Kapsel
Gelbes Eisenoxyd	2.27 mg/Kapsel

Die aktiven Bestandteile und die Arzneimittelträger wurden gewogen und homogenisiert in einem Hochgeschwindigkeitsrührer. Das Gemisch wurde anschliessend Kolloid gemahlen und entgast in einem rostfreien Stahlkessel, welcher bereit ist für die Einkapselung. Das Gemisch wird in weiche Gelatine-Kapseln der Grösse 20 länglich eingefüllt (Durchschnittsgewicht 1,4 g) unter Verwendung einer Standard-Einkapselungsmaschine.

Patentansprüche

1. Fettsäurezusammensetzung, enthaltend wenigstens 80 Gew.-% an Omega-3-Fettsäuren und/oder deren funktionellen Derivate, wobei (all-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure, EPA, und (all-Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure, DHA, in relativen Mengen von 1:2 bis 2:1 vorhanden sind und wenigstens 75 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen.

2. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass andere Omega-3-C20-, -C21- und -C22-Fettsäuren mindestens 3 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen.

3. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es sich bei weiteren vorhandenen langkettigen Fettsäuren um (all-Z)-6,9,12,15,18-Heneikosapentaensäure und/oder (all-Z)-7,10,13,16,19-Docosapentaensäure und/oder (all-Z)-6,9,12,15-Octadecatetraensäure handelt.

4. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte Konzentration an langkettigen Omega-3-Fettsäuren wenigstens 90 Gew.-% ist, wovon EPA und DHA wenigstens 85 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen, und EPA:DHA in relativen Mengen von 1:1 bis 2:1, speziell etwa 3:2 vorhanden sind und die anderen langkettigen Omega-3 C 20, C 21 und C 22 Säuren wenigstens 4,5 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen.

5. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte Konzentration an langkettigen Omega-3-Fettsäuren wenigstens 95 Gew.-% ist, wobei EPA und DHA wenigstens 90 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen, und die anderen langkettigen Omega-3 C 20, C 21, und C 22 Säuren wenigstens 4,5 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen.
- 5 6. Zusammensetzung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die gesamte Konzentration an langkettigen Omega-3-Fettsäuren wenigstens 85 Gew.-% ist, wobei EPA und DHA wenigstens 80% Gew.-% ausmachen, und die anderen langkettigen C 20, C 21 und C 22 Säuren wenigstens 4,5 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen.
- 10 7. Zusammensetzung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass EPA und DHA vorhanden sind in relativen Mengen von 1:1 bis 2:1.
8. Zusammensetzung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Fettsäuren in Form von funktionellen Derivaten vorhanden sind.
9. Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass die funktionellen Derivate der Fettsäuren pharmazeutisch annehmbare Salze sind.
- 15 10. Zusammensetzung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das funktionelle Derivat ein Ester, insbesondere ein Alkylester, ist.
11. Zusammensetzung nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Fettsäuren vorhanden sind in der Form von Äthylestern.
12. Zusammensetzung nach einem der vorherigen Ansprüche für die Behandlung oder Prophylaxe von mehrfachen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten.
- 20 13. Verfahren für die Herstellung einer Fettsäurezusammensetzung gemäss einem der Ansprüche 1–10, dadurch gekennzeichnet, dass marines Rohmaterial den folgenden Schritten in beliebiger Reihenfolge unterworfen wird: Transveresterung, Konzentration via Harnstofffraktionierung, molekulare Destillation und/oder überkritischer flüssiger Extraktion oder Chromatographie, wobei eine Hauptfraktion, bestehend im wesentlichen aus Estern der Omega-3 C 20:5 und C 22:6 Säuren, isoliert wird, ergebend eine gesamte Menge an langkettigen Omega-3-Fettsäure-Estern von wenigstens 80 Gew.-%, wobei die Harnstofffraktionierung und die molekulare Destillation ausgeführt werden unter schonenden Bedingungen, um eine Oxydation und Isomerisation der Omega-3-Säuren zu vermeiden.
- 25 14. Verwendung von marinem Ölkonzentrat, enthaltend wenigstens 80% langkettige Omega-3-Fettsäuren oder funktionelle Derivate davon, wobei (all-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure, EPA, und (all-Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure, DHA, vorhanden sind in relativen Mengen von 1:2 bis 2:1 und wenigstens 75 Gew.-% der gesamten langkettigen Fettsäuren ausmachen, für die Herstellung eines pharmazeutischen Präparates für die Behandlung oder Prophylaxe von mehrfachen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten.
- 30 15. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Fettsäurezusammensetzung gemäss einem der Ansprüche 1 bis 12 und einen pharmazeutisch annehmbaren Träger und/oder Füllstoff enthält.
16. Verfahren für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung für die Behandlung oder Prophylaxe von mehrfachen Risikofaktoren für kardiovaskuläre Krankheiten, dadurch gekennzeichnet, dass man ein pharmazeutisch annehmbares Trägermaterial oder Verdünnungsmittel in ein marines Ölkonzentrat inkorporiert, enthaltend wenigstens 80 Gew.-% an langkettigen Omega-3-Fettsäuren oder funktionellen Derivaten davon, wobei (all-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure, EPA, und (all-Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure, DHA, vorhanden sind in relativen Mengen von 1:2 bis 2:1, und wenigstens 75 Gew.-% der gesamten Fettsäuren ausmachen.

45

50

55

60

65