
Octrooiraad



⑫ A **Terinzagelegging** ⑪ **8902020**

Nederland

⑲ NL

⑤4 **Vetzuurmengsel.**

⑤1 Int.Cl⁵: C11B 3/00, A61K31/20, A61K35/60, C11C3/04.

⑦1 Aanvrager: Norsk Hydro a.s. te Oslo, Noorwegen.

⑦4 Gem.: Ir. Th.A.H.J. Smulders c.s.
Vereenigde Octrooibureaux
Nieuwe Parklaan 107
2587 BP 's-Gravenhage.

②1 Aanvraag Nr. 8902020.

②2 Ingediend 7 augustus 1989.

③2 Voorrang vanaf 11 augustus 1988.

③3 Land van voorrang: Groot-Brittannië (GB).

③1 Nummer van de voorrangsaanvraag: 8819110 .

⑥2 - -

④3 Ter inzage gelegd 1 maart 1990.

De aan dit blad gehechte stukken zijn een afdruk van de oorspronkelijk ingediende beschrijving met conclusie(s) en eventuele tekening(en).

Titel: Vetzuurmengsel.

De onderhavige uitvinding betreft een vetzuurmengsel bevattend minstens 80 gew.% omega-3-poly-onverzadigde vetzuren, waarbij minstens 75 gew.% van de totale vetzuren bestaat uit omega-3-(all-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur (EPA) C 20:5 en -(all-Z)-4,7,10,13,16,29-docosahexa-
5 eenzuur (DHA) C 22:6.

Terrein van de uitvinding:

Cardiovasculaire ziekten resulterend in morbiditeit en voortijdige sterfte, houden verband met verschillende risicofactoren, zoals hypertensie, hypertriglyceridemie, hypercholesterolemie, sterke bloedplaatjesaggregatie en, volgens recente bevindingen, een sterke activiteit van de bloedcoagulatiefactor VII-fosfolipidecomplex. Gedurende de laatste drie decennia hebben antihypertensieve geneesmiddelen bijgedragen tot de vermindering van de met cardiovasculaire ziekten verband houdende morbiditeit en sterfte. Er bestaat echter toenemende bezorgdheid
15 vanwege neveneffecten en toxiciteit behorend bij de hedendaagse antihypertensieve therapie, in het bijzonder bij de patiënt met zwakke hypertensie. Er zijn resultaten die erop wijzen, dat hoewel de heden ten dage toegepaste antihypertensieve middelen doeltreffend zijn wat betreft het verminderen van de bloeddruk, de puls frequentie tegelijkertijd wordt
20 verhoogd. Aldus bestaat behoefte aan een geneesmiddel met een geringer aantal nadelige werkingen voor de behandeling van hypertensie. Het zou bijzonder gunstig zijn indien een dergelijk geneesmiddel zou kunnen worden gebruikt voor de gelijktijdige behandeling van alle bovengenoemde meervoudige risicofactoren die cardiovasculaire ziekten begeleiden, wat
25 over het algemeen niet het geval is met de heden ten dage beschikbare antihypertensieve geneesmiddelen.

Beschrijving van de stand der techniek:

Gedurende het afgelopen decennium zijn talrijke publikaties ver-

8902020

schenen, die melden dat verscheidene diëtische visoliepreparaten, die omega-3-polygonverzadigde vetzuren bevatten, een uitwerking op serumcholesterol en bloedplaatjesaggregatie hebben. Het voor deze uitwerkingen voorgestelde mechanisme concentreert zich vaak om het prostanoïde-
5 systeem. Zo is er enige informatie over hoe diëtische visoliën de excretie van sommige prostaglandinemetabolieten veranderen, maar de beschikbare gegevens spreken elkaar op verschillende punten tegen.

Een vermindering van de bloeddruk werd beschreven na het nuttigen van vis, ruwe visolie (beginnend bij 7% EPA en 5% DHA) of zwak geconcentreerde visoliepreparaten (typisch bevattend 18% EPA en 12% DHA), hoewel
10 de voor deze uitwerkingen verantwoordelijke componenten nooit werden geïdentificeerd. Voorts hebben alle tot nu toe aangeboden onderzoeken één of meer ernstige tekortkomingen, zoals wordt vermeld in besprekingen van de beschikbare onderzoekingen (H.R.Knapp et al., Proceedings of AOCS
15 Short Course on polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids, Ed.: W.E.M.Lands, p.41 - 55, American Oil Chemists Society) en (L.Bønnaa, Tidsskr. Nor Lægeforen nr. 28, 1987, 2425-8).

Eicosapentaenzuur C 20:5 omega-3 (EPA) werd beschouwd als de belangrijkste van de van zeedieren afkomstige omega-3-polygonverzadigde vet-
20 zuren, deels vanwege zijn krachtige antiaggregatiewerking onder andere vermeld in US-A-4.097.602, Silver et al., dat werd ingediend in augustus 1974. Later beschreven Dyerberg et al. ook hetzelfde effect in (Lancet, p.152, 21 januari 1978) en (Lancet II, p. 117 - 119, 15 juli 1978). De hoofdreden voor de veronderstelde belangrijkheid van EPA is waarschijnlijk,
25 lijk, dat het behoort tot de eicosanoiden die sleutelmaterialen zijn voor het prostaglandinemetabolisme.

Volgens verscheidene recente rapporten heeft EPA alleen echter geen uitwerking van betekenis op hypertensie. In "Effects of highly purified eicosapentaenoic acid to angiotensin II and norepinephrine in
30 the rabbit" (Prostaglandins augustus 1986, Vol. 32, No.2, p. 179 - 187) werd geen verlaging van de bloeddruk bij konijnen verkregen bij gebruikmaking van sterk gezuiverd EPA met een concentratie van 90%. Terano et al. (Atherosclerosis, 46, 321 - 331 (1983)) rapporteerden dat een 75% EPA en 6,2% DHA bevattend preparaat geen uitwerking van betekenis had
35 op de bloeddruk bij gezonde vrijwilligers na het innemen van 3,6 g EPA-

8902020.

ethylester. Evenzo rapporteerden Yoshida et al. (Artery, 14, 295 - 303, 1987) dat er geen uitwerking was op de basale bloeddruk na inname van 900 mg EPA-ethylester gedurende 14 dagen of langer. Voorts had 90%'s EPA-methylester geen uitwerking op spontaan hypertensieve ratten
5 (K.Yin et al., 1988, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 15, 275 - 280).

In tegenstelling hiermee beschrijft de Britse octrooiaanvraag 2.197.199 een materiaal voor de bestrijding van door zwangerschap teweeg-
gebrachte hypertensie, waarbij de in het voorbeeld gebruikte materialen
10 een EPA-gehalte van 28 - 35% hadden. De patiënten hadden geen vroegere geschiedenis van hypertensie. Tijdens zwangerschap ontwikkelde hypertensie wordt geacht andere biologische oorzaken dan normale hypertensie te hebben, wat schijnt te worden benadrukt door het feit, dat deze gewoonlijk verdwijnt na afloop van de zwangerschap.

15 Naar ons beste weten is er niets wat erop wijst, dat DHA alleen enige uitwerking heeft op de bloeddruk.

Volgens US-A-3.082.228, op basis van een op 18 december 1959 ingediende aanvraag, verlaagt een minstens 60% polyonverzadigde vetzuren met 20 of meer C-atomen bevattend produkt het bloedcholesterolgehalte in aan-
20 merkelijke mate. Hoewel andere oudere studies aangeven, dat visoliën totaal cholesterol en LDL-cholesterol verlagen en HDL-cholesterol verhogen, kwamen latere resultaten over het algemeen tot de tegengestelde conclusie, zoals uiteengezet door W.S.Harris in ((n-3)-news, 3(4), 1-7). Toen hij 45 artikelen over het onderwerp had samengevat, vond hij, dat
25 LDL-cholesterol werd verhoogd met 2 - 30%, al naar gelang het type hyperlipidemie.

Uit PCT/WO 87/02247 is een lipide-emulsie voor parenteraal gebruik bekend, bevattend een emulgator, water en een van zeedieren afkomstige olie bevattend minstens één omega-3-vetzuur, waarbij de concentra-
30 tie van het vrije vetzuur in de emulsie kleiner is dan ca. 5 meq/l, en waarbij de van zeedieren afkomstige olie minstens 30 gew.% van een combinatie van esters van EPA en DHA bevat. Deze lipide-emulsie wordt gebruikt voor de intraveneuze behandeling van trombotische ziekte-toestanden.

Samenvatting van de uitvinding:

35 Gevonden werd nu, dat vetzuurmengsels die in een grote concentra-

8902020.1

tie van minstens 80 gew.% omega-3-vetzuren, zouten of derivaten daarvan, bevatten, waarbij EPA en DHA aanwezig zijn in relatieve hoeveelheden van 1 : 2 tot 2 : 1, en minstens 75% van de totale vetzuren vormen, een verrassend gunstige uitwerking hebben op alle bovengenoemde risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten, maar in het bijzonder een goede uitwerking op zwakke hypertensie, hypertriglyceridemie en op de werking van het coagulatiefactor VII-fosfolipidecomplex. Zij verlagen de spiegels van serum-LDL-cholesterol, verhogen die van serum-HDL-cholesterol, verlagen die van serum-triglyceriden, zij verminderen de systolische en diastolische bloeddruk en de polsfrequentie en verzwakken de activiteit van het bloedcoagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplex. Hoewel de gedetailleerde biologische mechanismen voor de uitwerkingen van de mengsels volgens de onderhavige uitvinding niet uitdrukkelijk bekend zijn, bestaan er aanwijzingen van een verrassend synergisme tussen de werking van EPA en van DHA.

Eén voordeel van de mengsels volgens de onderhavige uitvinding is, dat zij zeer goed worden verdragen zonder aanleiding te geven tot enige ernstige neveneffecten.

Een bijzondere voorkeur genietend mengsel volgens de onderhavige aanvraag bevat minstens 90 gew.% polyonverzadigde omega-3-vetzuren met een lange keten, waarvan EPA en DHA minstens 85 gew.% van de totale vetzuren vormen en aanwezig zijn in een verhouding van EPA : DHA van 1 : 1 tot 2 : 1, in het bijzonder ca. 3 : 2.

Om EPA en DHA te isoleren uit een mengsel met grote concentratie volgens de onderhavige uitvinding, werd een speciale methode ontwikkeld voor de zuivering en isolering van de vetzuren met lange keten uit natuurlijke visoliën. Mengsels volgens de onderhavige uitvinding kunnen worden bereid volgens de werkwijze van onze Europese octrooiaanvraag No. 86906964.1. De analyse in gew.% berustte op de ethylesters, hoewel andere derivaten of zouten van de zuren zelf onderdeel van de onderhavige uitvinding vormen.

Gedetailleerde beschrijving van de uitvinding:

Het mengsel volgens deze uitvinding wordt bij voorkeur bereid volgens de volgende methode. Om te beginnen wordt de van zeedieren afkomstige olie als grondstof veresterd en geconcentreerd via ureumfractione-

8902020.

ring of dergelijke, waarbij de omstandigheden voldoende mild zijn om ontleding van de produkten te vermijden. De tweede trap is een moleculaire destillatie.

Bij de fractionering wordt in principe aanvankelijk het merendeel van de esters met een kleinere ketenlengte dan C 20 verwijderd. Daarna wordt een hoofdfractie verwijderd, die in hoofdzaak bestaat uit esters van de C 20- en C 22-zuren. Daar de ureumfractionering de verzadigde en minder onverzadigde esters verwijdert, bevat deze fractie een grote concentratie aan EPA en DHA en wel volgens de onderhavige methode minstens 75 gew.%. De totale hoeveelheid van de omega-3-zuren met een lange keten wordt minstens 80 gew.%. Andere voorkeur genietende mengsels volgens de onderhavige uitvinding bevatten minstens 95 gew.%, waarbij het gehalte aan EPA + DHA minstens 90 gew.% bedraagt. Een ander voorkeursmengsel volgens de onderhavige uitvinding bevat minstens 85 gew.% van de totale omega-3-vetzuren en een hoeveelheid EPA en DHA van minstens 80 gew.%.

Andere omega-3-zuren uit de C 20-, C 21- en C 22-reeks worden verkregen ongeveer in hun oorspronkelijke concentraties, b.v. van 3 - 5 gew.%, typisch minstens 4,5 gew.%. Aldus is het speciale omega-3-all-Z-6,9,12,15,19-heneicosapentaeenzuur C 21:5 met een oneven aantal normaliter aanwezig in concentraties van minstens 1,5 gew.% en omega-3-all-Z-7,10,13,16,19-docosapentaeenzuur normaliter in concentraties van ca. 3,0 gew.%.

Na het verwijderen van het ureumneerslag wordt het gebruikte oplosmiddel, normaliter ethanol, gedeeltelijk of volledig verwijderd door verdamping en de aldus geïsoleerde esters kunnen verder worden gezuiverd door uitwassen met water of een zwak alkalische waterige oplossing, wil men de zuivere esters zonder verontreiniging met de zuren isoleren.

De vrije zuren kunnen worden bereid volgens bekende hydrolyseprocessen.

Het verbeteren van de EPA-fractie voor het verkrijgen van een gewichtsverhouding van EPA : DHA van 1 : 1 tot 2 : 1, in het bijzonder 3 : 1, of het verbeteren van de kwaliteit van de DHA-fractie voor het verkrijgen van een gewichtsverhouding van EPA : DHA van 1 : 1 tot 1 : 2, kan worden bereikt in de uit moleculaire destillatie bestaande trap. De werkwijze verschaft tevens de mogelijkheid gebruik te maken van superkri-

8902020.

tische vloeistofextractie en/of chromatografie in de tweede trap met CO₂, dat eventueel een sterker polaire modifier, zoals ethanol, bevat om de EPA- en/of DHA-fractie te concentreren.

De ureumfractionering en de daaropvolgende moleculaire destilla-
5 tie worden uitgevoerd onder milde omstandigheden teneinde oxydatie en/of isomerisatie van de zeer onstabiele omega-3-zuren te vermijden. Zoals blijkt uit de onderstaande tabellen 1 en 2, die de analyse van de vol-
gens de werkwijze overeenkomstig deze uitvinding verkregen produkten ver-
melden, was niet meer dan 1% aan onbekende componenten aanwezig in het
10 gezuiverde produkt. Er is echter een zekere hoeveelheid aan mindere pro-
dukten, zoals C-16- en C-18-zuren, zoals zal blijken uit de in tabel 2
vermelde gedetailleerde analyse.

Voor het merendeel bestaan deze produkten uit de gecombineerde
som van de fractie van vetzuuresters die natuurlijk voorkomen in visoliën
15 maar de concentratie van iedere afzonderlijke ester in het gerede pro-
dukt is kleiner dan 0,2%, afgezien van het omega-3-octadecatetraeenzuur
C 18:4 n-3, dat aanwezig is in ongeveer dezelfde hoeveelheid als in het
uitgangsmateriaal.

Aldus zal het duidelijk zijn, dat de totale concentratie aan van
20 het proces afkomstige bijprodukten zeer klein is.

Het proces is voldoende flexibel voor beïnvloeding van de onder-
linge verhoudingen tussen de C 20-, C 21- en C 22-vetzuren met een lange
keten, die van nature voorkomen in beschikbare visoliën als grondstof.
Het biedt niet alleen de mogelijkheid voor het verbeteren van de kwali-
25 teit van de individuele zuren, maar daarbij blijft de verhouding tussen
hen binnen een variatiepatroon dat in de natuur optimaal is. Maar tege-
lijkertijd is er ruimte voor de compensatie van de soms extreme varia-
ties die in de natuur voorkomen, zie hiervoor verderop. Aldus is het mo-
gelijk een produkt met een constante en vooraf bepaalde samenstelling
30 te bereiden.

Visoliën kunnen ook bijprodukten en verontreinigingen zoals pes-
ticipiden, gechloreerde koolwaterstoffen, zware metalen, cholesterol en
vitaminen bevatten. Gedurende de bereiding van het concentraat worden
de concentraties van deze componenten aanzienlijk verminderd in verge-
35 lijking met die van onbehandelde visoliën.

8902020.

In de natuur zijn de relatieve gehalten aan EPA en DHA en ook van de andere omega-3-zuren met een lange keten afhankelijk van het soort zeedier en er zijn ook seizoensvariaties binnen hetzelfde soort. In de V.S.v.A. wordt visolie heden ten dage in hoofdzaak bereid uit "menhaden" (de haringsoort *Brevoortia tyrannus*). Deze olie bevat typisch 14 - 19% EPA en 5 - 8% DHA. Onze analyse van een partij levertraan gaf als resultaat een gehalte van 6,9% EPA en 8,4% DHA. Voor lodde varieerden de EPA-waarden van 8,6% tot 11,4% van januari 1973 tot augustus 1973, terwijl de DHA-waarden varieerden van 6,7% tot 11% gedurende dezelfde periode. Voor voor de Noorse kust gevangen haring was het gehalte in oktober 1973 6,4% EPA en 9,8% DHA, terwijl vangsten in november 1983 een vermindering tot 1,7% resp. 1,1% te zien gaven.

Deze variaties betekenen, dat diëtische inname van visoliën of vis alleen niet zorgt voor een constante toevoer van omega-3-zuren. Zelfs al wordt de kwaliteit van de C 20-, C 21- en C 22-omega-3-zuren niet of misschien slechts matig verbeterd gedurende het proces, dan blijven zij tenminste in hun oorspronkelijke verhoudingen behouden.

In tabel 1 illustreert de linkerkolom de typische variaties in de gehalten van individuele zuren met een lange keten in de mengsels volgens deze uitvinding, terwijl de rechterkolom de exacte analyse van het bij de bestudering van de biologische uitwerkingen, waarvan de resultaten worden vermeld in de onderstaande tabellen 4 - 8, gebruikte proefmonsters weergeeft.

TABEL 1

	Typische produkt- variatie	Proefmonster
	1-2 gew. %	1,4 gew. %
C 20:4	40-60 "	54 "
C 20:5	1-4 "	1,5 "
C 21:5	1-3 "	2 "
C 22:5	25-45 "	32,6 "
C 22:6	3-8,5 "	7,5 "
lagere zuren	1 "	1 "
onbekend		90,1 "
som omega-3-FA		86,6 "
som EPA + DHA		3,3 : 2
EPA : DHA		

8902020.

Tabel 2 vermeldt een gedetailleerde analyse van een partij uitgangsmateriaal en van een ander daaruit verkregen mengsel volgens deze uitvinding.

TABEL 2

5	Vetzuur	Vetzuursamenstelling (%)	
		uitgangsmateriaal visolie	ethylesterprodukt proefmonster
	C 14:0	7,6	0,0
	pristanaat	0,4	0,0
10	C 16:0	19,1	0,0
	C 16:1 n7	7,2	0,0
	7-Me16:0	0,3	0,0
	C 16:2 n6	0,5	0,0
	C 16:2 n4	1,2	0,0
15	fytanaat	0,3	0,0
	C 16:3 n4	0,5	0,0
	C 16:4 n1	1,0	0,2
	C 18:0	2,3	0,0
	C 18:1 n9	9,1	0,0
20	C 18:1 n7	3,0	0,0
	C 18:1 n5	0,4	0,1
	C 18:2 n6	1,1	0,0
	C 18:2 n4	0,2	0,0
	C 18:3 n6	0,2	0,2
25	C 18:3 n3	0,7	0,2
	C 18:4 n3	2,5	2,8
	C 18:4 n1	0,1	0,2
	C 20:1 n9+7	5,9	0,0
	C 20:1	0,1	0,0
30	C 20:2 n6	0,2	0,1
	C 20:3 n6	0,1	0,0
	C 20:4 n6	0,7	1,4
	C 20:4 n3	1,2	0,9
	C 20:5 n3	16,5	53,4
35	C 22:1 n11+9	4,6	0,0

8902020.

TABEL 2 (vervolg)

	C 22:2 n6	0,7	0,0
	C 21:5 n3	0,9	1,6
	C 22:4 n6	0,1	0,0
5	C 22:2 n6	0,1	0,4
	C 22:5 n3	2,0	3,1
	C 22:6 n3	7,9	34,3
	som van onbekend	1,0	1,0
	som omega-3-FA	31,7	95,4
10	incl. C 18	3,2	3,0
	som EPA + DHA	24,4	87,7
	EPA : DHA	2,1 : 1	3,1 : 2

Tabel 3 vermeldt de gehalten aan de belangrijkste vetzuren van verschillende mengsels volgens de onderhavige uitvinding.

15 TABEL 3

	Vetzuur	Samenstelling (%)					
	C 18:2 n6	0,3	0,3	0,1	0,0	0,2	0,1
	C 18:3 n3	0,3	0,3	0,0	0,1	0,3	0,0
	C 18:4 n3	2,3	2,3	3,6	2,2	1,8	0,7
20	C 18:4 n1	0,2	0,2	0,4	0,3	0,0	0,0
	C 20:4 n6	1,7	1,7	1,5	3,9	1,6	1,6
	C 20:4 n3	2,4	0,9	1,3	1,2	1,9	0,3
	C 20:5 n3	54,7	52,7	42,2	48,5	41,0	31,7
	C 21:5 n3	2,1	2,1	1,7	2,0	1,7	1,2
25	C 22:5 n6	0,4	0,4	0,6	0,8	0,7	1,1
	C 22:5 n3	5,4	5,8	2,8	4,3	5,8	3,3
	C 22:6 n3	28,7	31,0	38,0	34,9	42,4	58,5
	som n3FA	95,5	95,1	89,6	93,2	94,9	95,7
	incl. C 18						
30	som EPA + DHA	83,4	83,7	80,2	83,4	83,4	90,2
	EPA : DHA	1,9:1	1,7:1	1,1:1	1,4:1	1:1	1:1,8

n3FA geeft omega-3-vetzuren aan.

Biologische uitwerkingen:

35 Ter beoordeling van de uitwerking van een mengsel volgens de onderhavige uitvinding op bloeddruk, polsfrequentie, triglyceridespiegels,

8902020.

- serumcholesterol en serum-HDL-cholesterol, bloedplaatjesaggregatie en activiteit van het coagulatiefactor-VIII-fosfolipidecomplex werd de gehele bevolking in de leeftijd van 34 - 60 jaar van een kleine Noorse stad uitgenodigd voor een gezondheidscontrole en van deze werden 22.000
- 5 personen onderzocht, waarbij de volgende criteria werden gehanteerd:
- onbehandelde matige hypertensie met een diastolische bloeddruk (DBP) van 89 - 111 mm Hg en een systolische bloeddruk (SBP) van 110 - 180 mm Hg,
 - geen eerdere hartaandoening en geen gebruik van hartgeneesmiddelen,
 - 10 - geen ernstige ziekten,
 - geen extreme zwaarlijvigheid,
 - geen alcoholisme,
 - een serumcholesterolspiegel van minstens 6,0 mmol/l.

De volgens deze criteria gekozen groep vrijwilligers telde 172

15 personen. De vrijwilligers werden onderzocht gedurende een aanlooperperiode van 6 maanden om te zorgen voor stabilisering van de bloeddruk voordat het proefmateriaal werd toegediend.

Alle bloeddrukmetingen werden uitgevoerd met een automatisch instrument (Dinamap) en bij iedere gelegenheid werden drie metingen (met

20 tussenpozen van 2 minuten) uitgevoerd, waarbij de proefpersoon zat en stond onder beheerste omstandigheden. Het gemiddelde van de laatste twee metingen bij zitten en staan werd gebruikt.

Het onderzoek was een beheerst dubbel-blind onderzoek. De 172

vrijwilligers werden willekeurig verdeeld in twee groepen van gelijke

25 grootte. De ene groep werd behandeld met placebo-capsules van maisolie, ieder met 1 g maisolie waaraan 0,3% vitamine E was toegevoegd. De andere groep ontving capsules die 1 g van het proefmateriaal bevatten, waarvan de samenstelling wordt vermeld in tabel 1. In beide gevallen waren de capsules vervaardigd van gekleurde zachte gelatine om te zorgen voor het

30 blind-effect. De vrijwilligers werd gevraagd tweemaal daags 3 capsules te nemen ofwel van het proefmateriaal ofwel van het vergelijkingsmateriaal gedurende 11 - 12 weken. 171 vrijwilligers voltooiden het onderzoek en gemiddeld werd ca. 90% van de capsules ingenomen.

Zoals moge blijken uit de navolgende tabellen 4 en 5 had maisolie

35 geen uitwerking van statistische betekenis op de bloeddruk. De uitwer-

8902020.

king van het proefmateriaal op de bloeddruk werd eerst bepaald bij de gehele groep die het proefmateriaal gebruikte en vervolgens bij die individuen met hogere bloeddrukken. De gemiddelde bloeddrukken van de patiënten met hogere bloeddruk bij het begin en het eind van de behandeling met het actieve proefmateriaal volgens deze uitvinding, worden vermeld in tabel 4 (diastolische bloeddruk) en tabel 5 (systolische bloeddruk).

TABEL 4

Uitwerking van het proefmateriaal en maisolie op de diastolische bloeddruk (DBP):

DBP-gebied	Aantal patiënten	Gemiddelde DBP vóór behandeling (mm Hg)	Gemiddelde DBP na behandeling (mm Hg)	Gemiddelde vermindering van de DBP (mm Hg)	Significantie
15 Proefmateriaal:					
85 - 109	62	95,8	93,4	2,4	p < 0,05
98 - 109	22	102	96,2	5,8	p < 0,01
Maisolie:					
85 - 109	57	95,7	96,0	0	n.s.
20 98 - 109	26	101,8	100,7	1,1	n.s.

n.s. betekent "niet significant".

TABEL 5

Uitwerking van het proefmateriaal en maisolie op de systolische bloeddruk (SBP)

SBP van patiënten (mm Hg)	Aantal patiënten	Gemiddelde SBP vóór behandeling (mm Hg)	Gemiddelde SBP na behandeling (mm Hg)	Gemiddelde vermindering van de SBP (mm Hg)	Significantie
25 Proefmateriaal:					
30 > 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
Maisolie:					
> 135	62	148,5	149,6	0	n.s.
> 150	23	159,1	158,0	1,1	n.s.
35 > 155	17	161,8	159,6	2,2	n.s.

8902020.

Zoals blijkt uit de bovenstaande tabellen had het proefmateriaal een zeer aanmerkelijke hypotensieve uitwerking zowel op de systolische als de diastolische bloeddruk. Het is ook duidelijk, dat de uitwerking het sterkst is bij die patiënten die de hoogste bloeddruk hadden. Een significant effect werd niet verkregen bij de maisoliegroep.

TABEL 6

Uitwerking van het proefmateriaal en maisolie op de systolische en diastolische bloeddruk bij een diëtische consumptie van vis (maaltijden per week):

10	Maaltijden per week	Aantal patiënten	Gemiddelde BP vóór de behandeling (mm Hg)	Gemiddelde BP na de behandeling (mm Hg)	Gemiddelde vermindering in BP (mm Hg)	Significantie
Proefmateriaal:						
	0 - 2	44	SBP 145,3	139,3	-6,9	p=0,005
15			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
Maisolie:						
	0 - 2	34	SBP 145,2	146,8	+1,6	p=0,4
20			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

Zoals blijkt uit tabel 6 wordt een goede hypotensieve uitwerking bereikt met het mengsel volgens de onderhavige uitvinding, verrassenderwijs zelfs bij de groep met een grote diëtische visconsumptie van 3 - 5 maaltijden per week. In vergelijking hiermee werd geen gunstige uitwerking bereikt met maisolie.

De bovenstaand vermelde resultaten geven aan, dat een mengsel volgens de onderhavige uitvinding een verrassend veel betere uitwerking heeft dan de diëtische consumptie van vis of zwak geconcentreerde, van zeedieren afkomstige olie zou doen verwachten. Dit moet waarschijnlijk worden toegeschreven aan een synergetisch effect van EPA en DHA.

In vergelijking met de in de eerder uitgevoerde onderzoeken met een diëtische consumptie van visolie bij de testresultaten, laten de met een mengsel volgens de onderhavige uitvinding bereikte resultaten een ver-

8902020.

rassende verbetering zien wat betreft de uitwerking op de diastolische en systolische bloeddruk van iets hypertensieve patiënten resp. de sterker hypertensieve patiënt, en wel van ca. 30% en 45%.

TABEL 7

5 Uitwerking van proefmateriaal en maisolie op de polsfrequentie (per minuut)

Groep	Vóór	Na	Verandering	Significantie
proefmateriaal:				
zittend	75,4	73,2	-2,2	p < 0,02
staand	82,9	80,2	-2,7	p < 0,005
10 maisolie:				
zittend	74,3	75,1	+0,8	p = 0,3
staand	80,9	82,2	+1,3	p = 0,2

Het onderzoek van de polsfrequentie omvatte 78 personen in de het proefmateriaal ontvangende groep en 77 personen in de andere groep.

15 Zoals blijkt uit de bovenstaande tabel werd een significante verlaging van de polsfrequentie verkregen met het proefmateriaal volgens de onderhavige uitvinding en een zwakke, niet significante verhoging van de polsfrequentie met maisolie.

TABEL 8

20 Uitwerking van proefmateriaal en maisolie op serumcholesterol (mmol/l).

Groep	Vóór		Na	
	totaal cholesterol	HDL-cholesterol	totaal cholesterol	HDL-cholesterol
Alle patiënten:				
25 proefmateriaal (n=78)	6,58	1,35	6,57	1,41**
maisolie (n=78)	6,68	1,33	6,64	1,41**
Totaal cholesterol 7:				
proefmateriaal (n=26)	7,74	1,53	7,31**	1,58*
maisolie (n=20)	7,66	1,26	7,45*	1,32*

30 * p < 0,1

** p < 0,01

35 Zoals blijkt uit tabel 8 verlaagt het proefmateriaal volgens de onderhavige uitvinding de totale serumcholesterol in aanmerkelijke mate bij patiënten met een totale cholesterolspiegel groter dan 7,0 mmol/l en verhoogt de HDL-cholesterolspiegel in aanmerkelijke mate bij de gehele po-

8902020.

pulatie. Soortgelijke, maar zwakkere uitwerkingen worden verkregen bij de maisoliegroep.

Verder verlagen de mengsels volgens de onderhavige uitvinding LDL-cholesterol met 5 - 10% bij patiënten met een totaal aan cholesterol groter dan 7 mmol/l, maar zij hebben geen significant effect bij patiënten met een totaal aan cholesterol van < 6,5 mmol/l.

TABEL 9

Uitwerking van het proefmateriaal en maisolie op serumtriglyceride.

		<u>Triglyceride (mmol/l)</u>				
10	<u>Groep</u>	<u>n</u>	<u>Vóór</u>	<u>Na</u>	<u>Vermindering</u>	<u>p-waarde</u>
	Proefmateriaal:	87	1,51	1,20	0,31	0,001
	Maisolie:	85	1,57	1,47	0,03	n.s.
		<u>Patiënten met triglyceriden groter dan 2,00 mmol/l</u>				
	<u>Groep</u>	<u>n</u>	<u>Vóór</u>	<u>Na</u>	<u>Vermindering</u>	<u>p-waarde</u>
15	Proefmateriaal:	14	3,28	2,03	1,25	0,0001
	Maisolie:	17	3,22	2,66	0,56	0,01

Zoals blijkt uit tabel 9 heeft het proefmateriaal een verlaging van de serumtriglyceridenspiegel als uitwerking, in het bijzonder bij patiënten met hoge spiegels (> 2,0 mmol/l) vóór behandeling. Een significante werking wordt niet verkregen met maisolie bij de gehele groep van vrijwilligers, terwijl een zeer zwakke uitwerking wordt verkregen bij personen met hoge triglyceridenspiegels.

TABEL 10

Uitwerking van het proefmateriaal en maisolie op de bloedplaatjesaggregatie.

		<u>Collageen 0,2 µg/ml</u>				<u>Collageen 0,1 µg/ml</u>			
	<u>n</u>	<u>Vóór</u>		<u>Na</u>		<u>Vóór</u>		<u>Na</u>	
		<u>\bar{X}</u>	<u>SEM</u>	<u>\bar{X}</u>	<u>SEM</u>	<u>\bar{X}</u>	<u>SEM</u>	<u>\bar{X}</u>	<u>SEM</u>
	Proefmateriaal	21	63,4±4,40	38,8±5,19		38,0±5,91	13,7±3,77		
30	Maisolie	21	73,5±4,40	57,4±6,37		43,4±45,5	15,2±3,32		

Zoals blijkt uit tabel 10 heeft de toediening van mengsels volgens de onderhavige uitvinding een anti-aggregatie-uitwerking op bloedplaatjes.

Het coagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplex wordt aangetroffen in het plasma van personen behorende tot een groep met een hoog risico van cardiovasculaire ziekten, zoals beschreven door P.Leren et al., (The Oslo

8902020.

Study, Cardiovascular diseases in middle aged and young Oslo men. Acta Med. Scand. suppl. 588, 1-38 (1987)) en 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)), en dit wordt beschouwd als een
5 andere risicofactor voor cardiovasculaire ziekten.

TABEL 11

Uitwerking van het proefmateriaal en maisolie op de activiteit wat betreft het coagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplex (%).

Groep	n	Vóór	Na	Vershil
10 proefmateriaal	69	9,7	6,6	3,1**
maisolie	72	8,5	8,8	0,3 n.s.

** p < 0,02

Zoals blijkt uit de tabel wordt de activiteit significant verminderd door het mengsel volgens de onderhavige aanvraag, terwijl geen significant effect wordt bereikt met maisolie.
15

Volgens de in de voorgaande tabellen 3 - 11 vermelde resultaten heeft een mengsel volgens de onderhavige uitvinding een significante uitwerking op alle bovengenoemde risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten. In vergelijking worden enkele positieve resultaten verkregen met
20 maisolie, maar een significant effect wordt niet verkregen ten aanzien van de bloeddruk, de serumtriglyceridenspiegel of wat betreft de activiteit van de coagulatiefactor VII. Verder schijnen de bij de maisoliegroep gemeten uitwerkingen van deze risicofactoren in de tegengestelde richting, daar zij schadelijk zijn, te wijzen.

25 Aldus zijn de vetzuurmengsels volgens de onderhavige uitvinding potentieel waardevol voor de behandeling en profylaxe van meervoudige, voor cardiovasculaire ziekten bekende risicofactoren, zoals hypertensie, hypertriglyceridemie en sterke coagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplexwerking.

30 De doses van de mengsels volgens deze uitvinding, die nodig zijn voor therapeutische of profylactische uitwerking, variëren al naar gelang het type van toediening. Bij onze grootschalige tests werd 6 g van het proefmengsel per persoon per dag toegediend. Over het algemeen kunnen doses voor de gemiddelde volwassene variëren van 1,0 - 10 g als functie
35 van de lichaamsomvang en de ernst van de te behandelen toestand.

8902020.

De mengsels volgens de onderhavige uitvinding kunnen verder worden gebruikt als een extra geneesmiddel bij gebruikelijke hypertensieve geneesmiddelen bij de behandeling van hypertensie. De doses zullen waarschijnlijk liggen in het lagere gedeelte van het bovengenoemde doserings-
5 bereik.

Andere mogelijke medische indicaties op grond waarvan de mengsels volgens de onderhavige uitvinding kunnen worden toegediend, zijn chronische polyartritis, psoriatische artritis, periartritis nodosa, lupus erythematosus disseminatus (LED), sclerodermie, de ziekte van Crohn, met
10 ulcera gepaard gaande colitis, psoriasis, atopische dermatitis en migraine, zoals bleek uit standaardproeven in vivo.

Bij voorkeur dienen de actieve verbindingen oraal te worden toegediend in de vorm van pillen, zachte capsules of dergelijke. De toediening zou echter ook kunnen plaatsvinden langs iedere andere weg, waar-
15 langs de actieve bestanddelen efficiënt kunnen worden geabsorbeerd en benut, b.v. intraveneus, subcutaan, rectaal, vaginaal of eventueel plaatselijk.

De farmaceutische preparaten kunnen, naast EPA en DHA als actieve bestanddelen zoals gedefinieerd, eventueel een of meer tot de stand der
20 techniek behorende farmaceutisch aanvaardbare dragers bevatten. Van de preparaten kunnen tevens vulmiddelen, stabilisatoren, verdunningsmiddelen, bindmiddelen, bevochtigingsmiddelen, oppervlakactieve middelen, glijmiddelen en dergelijke deel uitmaken, zoals bekend in de techniek van de formulering van farmaceutische preparaten.

Bovendien kunnen antioxydantia, b.v. hydroxytolueenbutyraat, chinon, tocoferol, ascorbinezuur enz., conserveringsmiddelen, kleurgevende middelen, parfums, smaakstoffen en andere farmaceutische middelen worden
gebruikt.

Voorbeeld van een farmaceutisch preparaat:

30 Zachte gelatinecapsules bevattend 1 g/per capsule:

Samenstelling

EPA-ethylester	525 mg/capsule
DHA-ethylester	315 mg/capsule
d-alfa-tocoferol	4 IU/capsule
35 gelatine	246 mg/capsule

8902020.

glycerol	118 mg/capsule
rood ijzeroxyde	2,27 mg/capsule
geel ijzeroxyde	2,27 mg/capsule

De actieve bestanddelen en de excipiëntia worden gewogen en ge-
5 homogeniseerd met een met grote snelheid werkende roerder. Het mengsel
wordt vervolgens in een colloïdmolen gemalen en ontlucht in een roestvast
stalen vat en is zo gereed om in capsules te worden gebracht. Met het
mengsel worden zachte gelatinecapsules, maat 20, langwerpig, (gemiddeld
gewicht 1,4 g) gevuld, onder gebruikmaking van een standaard capsulevul-
10 machine.

8902020.

C o n c l u s i e s :

=====

1. Vetzuurmengsel bevattend minstens 80 gew.% omega-3-vetzuren, waarvan (all-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaëenzuur (EPA) C 20:5 en (all-Z)-4,7,10,13,16,19-docosaeëenzuur (DHA) C 22:6 aanwezig zijn in relatieve hoeveelheden van 1 : 2 tot 2 : 1 en die minstens 75 gew.% van de totale
5 vetzuren vormen.
2. Mengsel volgens conclusie 1, waarbij andere aanwezige vetzuren met een lange keten (all-Z C 21:5)-6,9,12,15,18-heneicosapentaëenzuur, en/of (all-Z C 22:5)-7,10,13,16,19-eicosahexaëenzuur en/of (all-Z C 18:4)-6,9,12,15-octadecatetraëenzuur zijn.
- 10 3. Mengsel volgens conclusie 1 of conclusie 2, waarbij de totale concentratie van omega-3-vetzuren met een lange keten minstens 90 gew.% bedraagt, waarvan EPA en DHA minstens 85 gew.% van de totale vetzuren uitmaken en aanwezig zijn in relatieve hoeveelheden van EPA : DHA van
15 1 : 1 tot 2 : 1, in het bijzonder ca. 3 : 2, en de andere omega-3-C 20-, - C 21- en -C 22-zuren met een lange keten minstens 4,5 gew.% uitmaken.
4. Mengsel volgens conclusie 1, waarbij de totale concentratie van omega-3-vetzuren met een lange keten minstens 95 gew.% bedraagt, waarbij EPA en DHA minstens 90 gew.% van de totale vetzuren uitmaken en de
20 andere C 20-, C 21- en C 22-zuren met een lange keten minstens 4,5 gew.% uitmaken.
5. Mengsel volgens conclusie 1 of conclusie 2, waarbij de totale concentratie van omega-3-vetzuren met een lange keten minstens 85 gew.% bedraagt, waarbij EPA en DHA minstens 80 gew.% en de andere C 20-, C 21- en C 22-zuren met een lange keten minstens 4,5 gew.% uitmaken.
- 25 6. Mengsel volgens conclusie 4 of 5, waarbij EPA en DHA aanwezig zijn in relatieve hoeveelheden van 1 : 1 tot 2 : 1.
7. Mengsel volgens conclusie 1, waarbij de vetzuren aanwezig zijn in de vorm van farmaceutisch aanvaardbare zouten.
8. Mengsel volgens conclusie 1, waarbij de vetzuren aanwezig zijn in
30 de vorm van derivaten.
9. Mengsel volgens conclusie 8, waarbij het derivaat een ester, in het bijzonder een alkylester is.

8902020.

10. Mengsel volgens conclusie 9, waarbij de vetzuren aanwezig zijn in de vorm van ethylesters.
11. Mengsel volgens een der voorgaande conclusies voor de behandeling of profylaxe van meervoudige risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten.
- 5 12. Werkwijze voor de bereiding van een vetzuurmengsel volgens een der conclusies 1 - 10, waarbij uit zeedieren afkomstige grondstof wordt onderworpen aan de volgende trappen in een volgorde naar keuze: omestering, concentratie via ureumfractionering of dergelijke, moleculaire
- 10 destillatie en/of extractie met superkritische vloeistof of chromatografie, waarbij een hoofdfractie in hoofdzaak bestaande uit esters van de omega-3-C 20:5- en -C 22:6-zuren wordt geïsoleerd, waarbij een totale hoeveelheid van omega-3-vetzuuresters met een lange keten van minstens
- 15 80 gew.% wordt verkregen, waarbij de ureumfractionering en de moleculaire destillatie worden uitgevoerd onder milde omstandigheden om oxydatie en isomerisatie van de omega-3-zuren te vermijden.
13. Toepassing van een concentraat van van zeedieren afkomstige olie, dat minstens 80% omega-3-vetzuren met een lange keten of zouten of derivaten daarvan bevat, waarbij (all-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur
- 20 (EPA) C 20:5 en (all-Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaeenzuur (DHA) C 22:6 aanwezig zijn in relatieve hoeveelheden van 1 : 2 tot 2 : 1 en minstens 75 gew.% van het totaal aan vetzuren met een lange keten vormen, voor de bereiding van een farmaceutisch preparaat voor de behandeling of profylaxe van meervoudige risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten.
- 25 14. Werkwijze voor de behandeling of profylaxe van meervoudige risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten, omvattend de toediening van een mengsel volgens conclusies 1 - 10, eventueel gemengd met een farmaceutisch aanvaardbare drager.
15. Werkwijze voor de bereiding van een farmaceutisch preparaat voor
- 30 de behandeling of profylaxe van meervoudige risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten, omvattend het opnemen met een farmaceutisch aanvaardbare drager of farmaceutisch aanvaardbaar verdunningsmiddel van een concentraat van van zeedieren afkomstige olie bevattend minstens 80 gew.% omega-3-vetzuren met een lange keten of zouten of derivaten daarvan,
- 35 waarbij (all-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur (EPA) C 20:5 en (all-Z)-

8902020.

4,7,10,13,16,19-docosahexaeenzuur (DHA) C 22:6 aanwezig zijn in relatieve hoeveelheden van 1 : 2 tot 2 : 1 en die minstens 75 gew.% van de totale vetzuren uitmaken.

8902020.