

Brevet N° **87570**  
 du **11 août 1989**  
 Titre délivré **- 8 JAN. 1990**

GRAND-DUCHÉ DE LUXEMBOURG



Monsieur le Ministre  
 de l'Économie et des Classes Moyennes  
 Service de la Propriété Intellectuelle  
 LUXEMBOURG

# Demande de Brevet d'Invention

## I. Requête

La société dite: NORSK HYDRO a.s., Bygdøy Allé 2, (2)  
N-0257 OSLO 2, Norvège, représentée par Monsieur  
Jacques de Muysen, agissant en qualité de mandataire (3)

dépose(nt) ce onze août 1990 quatre-vingt neuf (4)  
 à 15 heures, au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes, à Luxembourg:

1. la présente requête pour l'obtention d'un brevet d'invention concernant:  
"Composition d'acides gras." (5)

2. la description en langue française de l'invention en trois exemplaires:

3. // planches de dessin, en trois exemplaires:

4. la quittance des taxes versées au Bureau de l'Enregistrement à Luxembourg, le 9 août 1989 :

5. la délégation de pouvoir, datée de \_\_\_\_\_ le \_\_\_\_\_ :

~~6. le dossier de la demande de brevet d'invention~~

déclare(nt) en assumant la responsabilité de cette déclaration, que l'(es) inventeur(s) est (sont): (6)

1. Harald BREIVIK, Uranusveien 22, N-3942 SKJELSVIK, Norvège
2. Bernt BØRRETZEN, Solhagevn. 3, N-3900 PORSGRUNN, Norvège
3. Knut Helkas DAHL, Helgen, N-3745 ULEFOSS, Norvège
4. Hans Einar KROKAN, Mikkeln. 7b, N-7081 SJETNEMARKA, Norvège
5. Kaare H. BØNAA, Grønnegt. 136, N-9000 TROMSØ, Norvège

revendique(nt) pour la susdite demande de brevet la priorité d'une (des) demande(s) de (7)  
brevet déposée(s) en (8) Grande-Bretagne

le (9) 11 août 1988

sous le N° (10) 8819110.1

au nom de (11) la déposante

élit(élisent) domicile pour lui (elle) et, si désigné, pour son mandataire, à Luxembourg

35, boulevard Royal (12)

solicite(nt) la délivrance d'un brevet d'invention pour l'objet décrit et représenté dans les annexes susmentionnées,  
 avec ajournement de cette délivrance à // mois. (13)

Le déposant / mandataire: \_\_\_\_\_ (14)

## II. Procès-verbal de Dépôt

La susdite demande de brevet d'invention a été déposée au Ministère de l'Économie et des Classes Moyennes,  
 Service de la Propriété Intellectuelle à Luxembourg, en date du: 11 août 1989

à 15 heures

Pr. le Ministre de l'Économie et des Classes Moyennes,  
 p. d.

Le chef du service de la propriété intellectuelle,



A 68007

EXPLICATIONS RELATIVES AU FORMULAIRE DE DÉPÔT.

(1) s'il y a lieu "Demande de certificat d'addition au brevet principal, à la demande de brevet principal No . . . . . du . . . . . " - (2) inscrire les nom, prénom, profession, adresse du demandeur, lorsque celui-ci est un particulier ou les dénomination sociale, forme juridique, adresse du siège social, lorsque le demandeur est une personne morale - (3) inscrire les nom, prénom, adresse du mandataire agréé, conseil en propriété industrielle, muni d'un pouvoir spécial, s'il y a lieu: "représenté par . . . . . agissant en qualité de mandataire" - (4) date de dépôt en toutes lettres - (5) titre de l'invention - (6) inscrire les noms, prénoms, adresses des inventeurs ou l'indication "(voir) désignation séparée (suivra)", lorsque la désignation se fait ou se fera dans un document séparé, ou encore l'indication "ne pas mentionner", lorsque l'inventeur signe ou signera un document de non-mention à joindre à une désignation séparée présente ou future - (7) brevet, certificat d'addition, modèle d'utilité, brevet européen (CBE), protection internationale (PCT) - (8) Etat dans lequel le premier dépôt a été effectué ou, le cas échéant, Etats désignés dans la demande européenne ou internationale prioritaire - (9) date du premier dépôt - (10) numéro du premier dépôt complet, le cas échéant, par l'indication de l'office receveur C'BE/PCT - (11) nom du titulaire du premier dépôt - (12) adresse du domicile effectif ou élu au Grand-Duché de Luxembourg - (13) 2, 6, 12 ou 18 mois - (14) signature du demandeur ou du mandataire agréé.

REVENDEICATION DE LA PRIORITE

de la demande de brevet / ~~du modèle d'unité~~

En Grande-Bretagne.

Du 11 août 1988 (No. 8819110.1)

Mémoire Descriptif

déposé à l'appui d'une demande de

BREVET D'INVENTION

au

Luxembourg

au nom de : NORSK HYDRO a.s.  
N-0257 OSLO 2 (Norvège)

pour : "Composition d'acides gras."

### Composition d'acides gras

La présente invention concerne une composition d'acides gras comprenant au moins 80% en poids d'acides gras oméga-3-polyinsaturés, dans laquelle au moins 75% en poids des acides gras totaux sont formés par de l'acide oméga-3 (tout-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque (AEP) C 20:5 et de l'acide oméga-3 (tout-Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque (ADH) C 22:6.

### Domaine de l'invention

Les affections cardiovasculaires menant à un état maladif et à une mortalité prématurée sont en relation avec divers facteurs de risque tels que l'hypertension, l'hypertriglycéridémie, l'hypercholestérolémie, une forte agrégation des plaquettes du sang et, suivant des découvertes récentes, une haute activité du complexe phospholipidique du facteur VII de coagulation du sang. Au cours des trois dernières décennies, les médicaments anti-hypertenseurs ont contribué au déclin des maladies et de la mortalité d'origine cardiovasculaire. Les effets secondaires et la toxicité qui sont associés au traitement anti-hypertenseur courant, spécialement chez le patient modérément hypertendu, suscitent toutefois des inquiétudes croissantes. Il existe des résultats qui indiquent que bien que les agents anti-hypertenseurs actuellement en usage soient efficaces pour faire baisser la tension artérielle, la vitesse de pulsation augmente en même temps. Il existe donc un besoin pour un médicament se prêtant au traitement de l'hypertension avec moins d'effets défavorables. Il serait particulièrement avantageux qu'un tel médicament puisse être utilisé pour le traitement simultané de tous les facteurs de risques multiples précités associés aux affections cardiovasculaires, ce qui n'est généralement pas le cas des médicaments anti-hypertenseurs couramment dis-

ponibles.

Etat de la question

Au cours de la dernière décennie, on a vu paraître de nombreuses publications indiquant que différentes préparations diététiques d'huile de poisson contenant des acides gras oméga-3-polyinsaturés ont un effet sur le cholestérol sérique et sur l'agrégation des plaquettes du sang. Les mécanismes suggérés pour ces effets sont souvent centrés sur le système prostanoidé. Il existe par conséquent des informations sur la façon dont les huiles de poisson alimentaires modifient l'excrétion de certains métabolites des prostaglandines, mais les données disponibles sont contradictoires sur différents points.

Une baisse de la tension artérielle a été décrite après consommation de poisson, d'huile de poisson brute (à partir de 7% d'AEP et de 5% d'ADH) ou de préparations d'huile de poisson faiblement concentrée (contenant typiquement 18% d'AEP et 12% d'ADH) bien que les composants responsables de ces effets n'aient jamais été identifiés. De surcroît, toutes les études présentées jusqu'à présent comprenaient une ou plusieurs erreurs graves, comme l'indiquent des revues des études accessibles [H.R.Knapp et al., Proceedings of AOCS Short Course on polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids, Ed. W.E.M. Lands, pages 41-55, American Oil Chemists Society] et [K. Bónaa, Tidsskr. Nor Laegeforen nr. 28, 1987, 2425-8].

L'acide eicosapentaénoïque C 20:5 oméga-3 (AEP) a été considéré comme étant le plus important des acides gras oméga-3 polyinsaturés d'origine marine, en partie en raison de son puissant effet antiagrégant rapporté, entre autres, dans le brevet EUA n° 4.097.602

de Silver et al, déposé en août 1974. Ultérieurement, Dyerberg et al. ont également décrit le même effet dans Lancet, page 152, 21 janvier 1978 et Lancet II, pages 117-119, 15 juillet 1978. La raison principale de l'importance attribuée à l'AEP est probablement qu'il appartient aux eicosanoïdes qui sont les substances clés pour le métabolisme des prostaglandines.

Toutefois, suivant plusieurs documents récents, l'AEP seul n'a pas d'effet sensible sur l'hypertension. Dans "Effects of highly purified eicosapentaenoic acid to angiotensin II and norepinephrine in the rabbit", [Prostaglandins août 1986, volume 32, n° 2, pages 179-187], aucune baisse de la tension artérielle chez le lapin n'a été obtenue avec de l'AEP hautement purifié d'une concentration de 90%. Terano et al, [Atherosclerosis, 46, 321-331, (1983)] ont indiqué qu'une préparation contenant 75% d'AEP et 6,2% d'ADH n'a pas d'effet sensible sur la tension artérielle de volontaires bien portants après une prise de 3,6 g d'ester éthylique d'AEP. De même, Yoshida et al, [Artery, 14, 295-303, 1987] n'ont observé aucun effet sur la tension artérielle de base après absorption de 900 mg d'ester éthylique d'AEP pendant 14 jours ou davantage. De plus, l'ester méthylique d'AEP à 90% n'a pas d'effet chez le rat spontanément hypertendu [K. Yin et al, 1988, Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 15, 275-280].

Au contraire de ceci, la demande de brevet anglais 2197199 décrit une composition pour combattre l'hypertension induite par la grossesse, les compositions utilisées dans l'exemple ayant une teneur en AEP de 28-35%. Les patientes étaient exemptes de symptômes antérieurs d'hypertension. L'hypertension développée en cours de grossesse est considérée comme

ayant des causes biologiques différentes de l'hypertension normale, ce qui semble souligné par le fait qu'elle disparaît habituellement après la grossesse.

A la connaissance de la Demanderesse, rien ne suggère qu'l'ADH seul ait un effet quelconque sur la tension artérielle.

Suivant le brevet EUA 3.082.228 basé sur la demande de brevet déposée le 18 décembre 1959, un produit contenant au moins 60% d'acides gras polyinsaturés comptant 20 atomes de carbone ou davantage fait baisser significativement le taux de cholestérol sanguin. Bien que d'autres études plus anciennes aient montré que les huiles de poisson font baisser le cholestérol total et le LDL-cholestérol et augmenter le HDL-cholestérol, les résultats ultérieurs ont généralement mené à la conclusion opposée, comme précisé par W.S. Harris [(n-3)news, 3 (4), 1-7]. Ce dernier, en résumant 45 articles sur le sujet, a trouvé que le LDL-cholestérol augmente de 2 à 30% suivant le type d'hyperlipidémie.

D'après le document PCT/WO 87/02247, on connaît une émulsion lipidique à usage parentéral qui comprend un émulsionnant, de l'eau et une huile de poisson qui contient au moins un acide oméga-3-gras, dans laquelle la concentration de l'acide gras libre de l'émulsion est inférieure à environ 5 milliéquivalents/litre et où l'huile de poisson doit contenir au moins 30% en poids d'une combinaison d'esters d'AEP et d'ADH. Cette émulsion lipidique est utilisée pour le traitement intraveineux d'états thrombotiques pathologiques.

#### APERCU DE L'INVENTION

La Demanderesse a découvert à présent que les compositions d'acides gras ayant une concentration élevée, d'au moins 80% en poids, en acides oméga-3-

gras et en leurs sels ou dérivés, dans lesquelles AEP et ADH sont présents en quantités relatives de 1:2 à 2:1 et constituent au moins 75% des acides gras totaux, ont un effet étonnamment avantageux sur tous les facteurs de risque précités des affections cardiovasculaires, mais spécialement un bon effet sur l'hypertension modérée et l'hypertriglycéridémie et sur l'activité du complexe phospholipidique du facteur VII de coagulation. Elles font baisser le LDL-cholestérol sérique, augmenter le HDL-cholestérol sérique, baisser les triglycérides sériques, baisser la tension artérielle systolique et diastolique et la vitesse de pulsation et baisser l'activité du complexe phospholipidique du facteur VII de coagulation du sang. Bien que les mécanismes biologiques détaillés des effets des compositions conformes à l'invention ne soient pas clairement élucidés, il existe des indications d'une synergie surprenante entre l'effet d'AEP et celui d'ADH.

Un avantage des compositions conformes à l'invention est qu'elles sont très bien tolérées et ne donnent lieu à aucun effet secondaire grave.

Une composition spécialement préférée conforme à l'invention comprend au moins 90% en poids d'acides oméga-3-gras polyinsaturés à longue chaîne parmi lesquels AEP et ADH constituent au moins 85% du poids des acides gras totaux et sont présents dans un rapport AEP:ADH de 1:1 à 2:1 et spécialement d'environ 3:2.

Afin d'isoler AEP et ADH dans un mélange à concentration élevée conforme à l'invention, un procédé spécial a été développé pour la purification et l'isolement des acides gras à longue chaîne à partir des huiles de poisson naturelles. Les compositions conformes à l'invention peuvent être préparées

suivant le procédé de la demande de brevet européen n° 86 906964.1 de la Demanderesse. L'analyse en pourcentages pondéraux est basée sur les esters éthyl-iques, même si d'autres dérivés ou sels des acides eux-mêmes sont constitutifs du produit de l'invention.

Description détaillée de l'invention

La composition conforme à l'invention est produite de préférence par le procédé suivant. Initialement, l'huile de poisson dont on part est estérifiée et concentrée par fractionnement à l'urée ou un procédé analogue, les conditions étant suffisamment modérées pour éviter la dénaturation des produits. Le second stade est une distillation moléculaire.

Le fractionnement sépare en principe initialement la majeure partie des esters dont la longueur de chaîne est inférieure à C 20. Ensuite, une fraction principale consistant essentiellement en les esters des acides en C 20 et C 22 est recueillie. Du fait que le fractionnement à l'urée élimine les esters saturés et peu insaturés, cette fraction a une concentration élevée en AEP et ADH, qui est d'au moins 75% en poids conformément au procédé de l'invention. La quantité totale des acides oméga-3-gras à longue chaîne doit être d'au moins 80% en poids. D'autres compositions préférées conformes à l'invention en contiennent au moins 95% en poids, la teneur cumulée en AEP et ADH étant d'au moins 90% en poids. Une autre composition préférée conforme à l'invention contient au moins 85% en poids des acides oméga-3-gras totaux et la quantité d'AEP et D'ADH est d'au moins 80% en poids.

Les autres acides oméga-3-gras des séries en C 20, C 21 et C 22 sont obtenus à peu près dans leurs concentrations d'origine, par exemple de 3 à 5% en poids et typiquement d'au moins 4,5% en poids. Ainsi,



l'acide oméga-3 (tout-Z)6,9,12,15,19-heneicosapenta-énoïque C 21:5 impair spécial est normalement présent en concentrations d'au moins 1,5% en poids et l'acide oméga-3 (tout-Z)7,10,13,16,19-docosapentaénoïque est normalement présent en concentrations d'environ 3,0% en poids.

Après que le précipité par l'urée a été éliminé, le solvant utilisé, qui est normalement l'éthanol, est éliminé pour tout ou partie par évaporation et les esters ainsi isolés peuvent être davantage purifiés par lavage avec de l'eau ou une solution aqueuse faiblement alcaline si les esters purs exempts de contamination par les acides doivent être isolés.

Les acides libres peuvent être obtenus suivant les procédés d'hydrolyse classiques.

L'enrichissement de la fraction d'AEP jusqu'à atteindre un rapport pondéral AEP:ADH de 1:1 à 2:1 et spécialement de 3:2 et l'enrichissement de la fraction d'ADH jusqu'à atteindre un rapport pondéral AEP:ADH de 1:1 à 1:2 peuvent être exécutés au stade de la distillation moléculaire. Le procédé offre aussi la possibilité d'appliquer l'extraction et/ou la chromatographie par un fluide supercritique au second stade avec du CO<sub>2</sub> contenant éventuellement un modificateur plus polaire, comme l'éthanol, aux fins de concentrer la fraction d'AEP et/ou ADH.

Le fractionnement par l'urée et la distillation moléculaire ultérieure sont exécutés dans des conditions modérées pour éviter l'oxydation et/ou l'isomérisation des acides oméga-3-gras très instables. Comme il ressort des tableaux 1 et 2 ci-après, qui indiquent l'analyse des produits obtenus suivant le procédé de l'invention, il n'y a pas plus de 1% de composants inconnus dans le produit purifié. Il

existe cependant une certaine quantité de produits mineurs tels que les acides en C-16 et C-18, comme il ressort de l'analyse détaillée reprise au tableau 2.

Pour la partie principale, ces produits sont la somme combinée de la fraction des esters d'acides gras qui existent naturellement dans les huiles de poisson, mais la concentration de chaque ester distinct dans le produit fini est inférieure à 0,2%, sauf l'acide oméga-3 octadécatétraénoïque C 18:4 n -3 qui est présent à peu près en la même quantité que dans le mélange de départ.

Il est ainsi apparent que la concentration totale en sous-produits résultant du procédé est très faible.

Le procédé est suffisamment souple pour influencer les proportions relatives entre les acides gras à longue chaîne en C 20, C 21 et C 22 qui existent dans les huiles de poisson brutes disponibles. Il permet non seulement d'enrichir les divers acides, mais de plus de maintenir le rapport entre ceux-ci dans un intervalle de variation de nature optimale. Toutefois, il reste simultanément possible de compenser les variations parfois extrêmes qui peuvent apparaître naturellement, voir ci-après. Il est ainsi possible d'obtenir un produit d'une composition constante et déterminée au préalable.

Les huiles de poisson peuvent aussi contenir des sous-produits et impuretés, comme des pesticides, des hydrocarbures chlorés, des métaux lourds, du cholestérol et des vitamines. Pendant la production du concentré, les concentrations en ces divers constituants sont sensiblement réduites, par comparaison avec celles existant dans les huiles de poisson non traitées.

Les teneurs relatives en AEP et ADH et en

les autres acides oméga-3 à longue chaîne dépendent évidemment de l'espèce animale d'origine et il existe de surcroît des variations saisonnières dans la même espèce. Aux Etats-Unis d'Amérique, l'huile de poisson est actuellement produite principalement à partir du menhaden. Cette huile contient typiquement 14-19% d'AEP et 5-8% d'ADH. L'analyse d'une huile de foie de morue par la Demanderesse a révélé une teneur en AEP de 6,9% et en ADH de 8,4%. Pour le capelan, les valeurs relatives à l'AEP ont varié de 8,6 à 11,4% de janvier 1973 à août 1973, tandis que celles relatives à ADH ont varié de 6,7 à 11% pendant la même période. Pour le hareng des côtes de Norvège, la teneur en octobre 1973 était de 6,4% d'AEP et 9,8% d'ADH, tandis que les prises de novembre 1983 ont révélé une baisse à 1,7% et 1,1%, respectivement.

Ces variations signifient que la consommation alimentaire des huiles de poisson ou du poisson tel quel ne procurent pas un apport constant d'acides oméga-3. Même si tous les acides oméga-3 à longue chaîne en C 20, C 21 et C 22 ne sont pas enrichis ou ne sont enrichis que modérément pendant le processus, ils se retrouvent au moins dans leurs proportions originales.

Au tableau 1, la colonne de gauche indique les variations typiques des teneurs en acides à longue chaîne particuliers dans les compositions de l'invention et la colonne de droite donne l'analyse exacte de l'échantillon utilisé pour l'étude des effets biologiques dont les résultats sont détaillés aux tableaux 4 à 8 ci-après.

TABLEAU 1

	Variation typique du produit	Echantillon examiné
C 20:4 oméga-6	1- 2	1,4
C 20:5 oméga-3	40-60 % p	54 % p
C 21:5 oméga-3	1- 4 "	1,5 "
C 22:5 oméga-3	1- 3 "	2 "
C 22:6 oméga-3	25-45 "	32,6 "
Acides inférieurs	3- 8,5 "	7,5 "
Inconnus	1 "	1 "
Somme AG oméga-3		90,1 "
Somme AEP + ADH		86,6 "
AEP : ADH		3,3 : 2

Le tableau 2 donne une analyse détaillée d'un lot de matière première et d'une autre composition conforme à l'invention qui en a été préparée.

TABLEAU 2

Acide gras	Composition en acides gras (%)	
	Huile de poisson de départ	Esters éthyliques dans l'échantillon de produit
C14:0	7,6	0,0
Pristanate	0,4	0,0
C16:0	19,1	0,0
C16:1 n7	7,2	0,0
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
C16:3 n4	0,5	0,0
C16:4 n1	1,0	0,2
C18:0	2,3	0,0
C18:1 n9	9,1	0,0
C18:1 n7	3,0	0,0
C18:1 n5	0,4	0,1

TABLEAU 2 (suite)

Composition en acides gras (%)		
Acide gras	Huile de poisson de départ	Esters éthyliques dans l'échantillon de produit
C18:2 n6	1,1	0,0
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
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
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
C22:1 n11+9	4,6	0,0
C22:2 n6	0,7	0,0
C21:5 n3	0,9	1,6
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
Somme Inconnus	1,0	1,0
Somme AG oméga-3	31,7	95,4
C 18 incl.	3,2	3,0
Somme AEP + ADH	24,4	87,7
AEP : ADH	2,1:1	3,1:2

Le tableau 3 indique les teneurs en acides gras principaux de diverses compositions conformes à l'invention.

TABLEAU 3

Acide gras	Composition (%)					
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
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
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
C22:6 n3	28,7	31,0	38,0	34,9	42,4	58,5
Somme AG n-3	95,9	95,1	89,6	93,2	94,9	95,7
C 18 incl.						
Somme AEP+ADH	83,4	83,7	80,2	83,4	83,4	90,2
AEP : ADH	1,9:1	1,7:1	1,1:1	1,4:1	1:1	1:1,8

AG n-3 = acides oméga-3-gras

#### EFFETS BIOLOGIQUES

Pour évaluer l'effet d'une composition conforme à l'invention sur la tension artérielle, la vitesse de pulsation, les taux de triglycéride, le cholestérol et le HDL-cholestérol sériques, l'agrégation des plaquettes sanguines et l'activité du complexe phospholipidique du facteur VII de coagulation, l'ensemble de la population d'un âge de 34 à 60 ans d'une petite ville de Norvège a été invité à une visite médicale et les critères suivants ont été appliqués à la sélection parmi 22.000 habitants:

- hypertension modérée non traitée avec une tension artérielle diastolique (TAD) de 89 à 111 mm Hg et une tension artérielle systolique (TAS) de 110 à 180 mm Hg.
- pas d'affection cardiaque antérieure et pas de consommation de médicaments cardiaques

- pas de maladies graves
- pas d'excès extrême de poids
- pas d'alcoolisme
- cholestérol sérique d'au moins 6,0 millimoles/litre

Le groupe des volontaires sélectionnés suivant ces critères s'est élevé à 172 personnes. Les volontaires ont été observés pendant une période préalable de 6 mois pour assurer la stabilisation de la tension artérielle avant l'administration des substances expérimentales.

Toutes les mesures de la tension artérielle ont été exécutées au moyen d'un instrument automatique (Dinamap) et à chaque reprise, trois mesures (avec des intervalles de 2 minutes) ont été faites sur le sujet assis et debout dans des conditions définies. La moyenne des deux dernières mesures sur le sujet assis et debout a été utilisée.

L'étude a été une étude au double insu contrôlé. Les 172 volontaires ont été répartis au hasard en deux groupes de taille comparable. L'un des groupes a reçu des capsules placebo d'huile de maïs contenant chacune 1 g d'huile de maïs et 0,3% de vitamine E. L'autre groupe a reçu des capsules contenant 1 g de la substance expérimentale ayant la composition précisée au tableau 1. Les capsules des deux espèces étaient faites de gélatine molle colorée pour empêcher l'identification. Il a été demandé aux volontaires de prendre deux fois par jour 3 capsules de la substance expérimentale ou de la substance témoin pendant 11 à 12 semaines. L'étude a été menée à son terme par 171 volontaires et en moyenne environ 90% des capsules ont été consommées.

Comme il ressort des tableaux 4 et 5 ci-après, l'huile de maïs est restée sans effet statistiquement significatif sur la tension artérielle. L'effet de

la substance expérimentale sur la tension artérielle a été évalué d'abord sur l'ensemble du groupe prenant la substance expérimentale et ensuite sur les individus ayant la tension artérielle la plus élevée. Les tensions artérielles moyennes pour les patients ayant une tension artérielle élevée au début et à la fin du traitement à l'aide de la substance expérimentale active de l'invention sont données au tableau 4 (tension artérielle diastolique) et au tableau 5 (tension artérielle systolique).



TABLEAU 4  
 EFFET DE LA SUBSTANCE EXPERIMENTALE ET DE L'HUILE DE MAÏS SUR LA TENSION ARTERIELLE  
 DIASTOLIQUE

Intervalle TAD	Nombre de patients	TAD moyenne avant trai- tement (mm Hg)	TAD moyenne après trai- tement (mm Hg)	Baisse moyenne de TAD (mm Hg)	Signifi- cation
Substance expérimentale					
85-109	62	95,8	93,4	2,4	p<0,05
98-109	22	102	96,2	5,8	p<0,01
Huile de maïs					
85-109	57	95,7	96,0	0	n.s.
98-109	26	101,8	100,7	1,1	n.s.

n.s. = non significatif

TABLEAU 5  
 EFFET DE LA SUBSTANCE EXPERIMENTALE ET DE L'HUILE DE MAÏS SUR LA TENSION ARTERIELLE  
 SYSTOLIQUE

TAS des patients (mm Hg)	Nombre de patients	TAS moyenne avant trai- tement (mm Hg)	TAS moyenne après trai- tement (mm Hg)	Baisse moyenne de TAS (mm Hg)	Signifi- cation
Substance expérimentale					
> 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
Huile de maïs					
> 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.

Comme il ressort à l'évidence des tableaux ci-dessus, la substance expérimentale a eu un effet hypotenseur hautement significatif sur la tension artérielle tant systolique que diastolique. Il est évident aussi que l'effet est le plus marqué chez les patients ayant la tension artérielle la plus élevée. Aucun effet significatif n'a été observé dans le groupe contenant l'huile de maïs.

TABLEAU 6

EFFET DE LA SUBSTANCE EXPERIMENTALE ET DE L'HUILE DE MAÏS SUR LA TENSION ARTERIELLE  
 SYSTOLIQUE ET DIASTOLIQUE EN FONCTION DE LA CONSOMMATION ALIMENTAIRE DE POISSON  
 (RATIONS PAR SEMAINE)

Rations par semaine	Nombre de patients	TA moyenne avant traitement (mm Hg)	TA moyenne après traitement (mm Hg)	Baisse moyenne de TA (mm Hg)	Signification
Substance expérimentale					
0-2	44	TAS 145,3	139,3	-6,9	p=0,005
		TAD 99,8	94,0	-5,7	p=0,0001
3-5	34	TAS 143,6	141,2	-2,4	p=0,2
		TAD 97,7	96,3	-1,4	p=0,2
Huile de maïs					
0-2	34	TAS 145,2	146,8	+1,6	p=0,4
		TAD 98,3	100,2	+1,9	p=0,1
3-5	44	TAS 142,3	143,4	+1,1	p=0,5
		TAD 97,4	97,9	+0,5	p=0,7

Comme il ressort du tableau 6, un bon effet hypotenseur est obtenu avec la composition conforme à l'invention, de façon surprenante même dans le groupe ayant une consommation alimentaire élevée de poisson de 3 à 5 rations par semaine. Au contraire, aucun effet favorable n'est obtenu avec l'huile de maïs.

Les résultats présentés ci-dessus montrent qu'une composition conforme à l'invention a un effet étonnamment supérieur à celui qu'une consommation alimentaire de poisson ou d'une huile de poisson faiblement concentrée permettrait de prévoir. Ceci est probablement dû à un effet synergique entre AEP et ADH.

Comparés aux résultats d'expérience obtenus dans les études effectuées antérieurement avec une consommation alimentaire d'huiles de poisson de mer, les résultats obtenus avec une composition conforme à l'invention révèlent une amélioration surprenante de l'effet sur la tension artérielle diastolique et systolique des patients faiblement hypertendus et des patients davantage hypertendus respectivement de 30% et 45%.

TABLEAU 7

EFFET DE LA SUBSTANCE EXPERIMENTALE ET DE L'HUILE DE MAÏS SUR LA VITESSE DE PULSATION (par minute)

Groupe	Avant	Après	Modifi- cation	Signifi- cation
Substance expérimentale				
assis	75,4	73,2	-2,2	p<0,02
debout	82,9	80,2	-2,7	p<0,005
Huile de maïs				
assis	74,3	75,1	+0,8	p=0,3
debout	80,9	82,2	+1,3	p=0,2

L'étude sur la vitesse de pulsation a porté sur 78 personnes dans le groupe recevant la substance expérimentale et 77 personnes dans l'autre groupe.

Comme il ressort du tableau ci-dessus, on obtient une baisse significative de la vitesse de pulsation avec la substance expérimentale conforme à l'invention et une faible augmentation non significative de la vitesse de pulsation avec l'huile de maïs.

TABLEAU 8

EFFET DE LA SUBSTANCE EXPERIMENTALE ET DE L'HUILE DE MAÏS SUR LE CHOLESTEROL SERIQUE [millimoles/litre]

GROUPE	A V A N T		A P R E S	
	Chol.tot.	HDL-Chol.	Chol.tot.	HDL-Chol.
<u>Tous patients:</u>				
Substance expérimentale (n=78)	6,58	1,35	6,57	1,41**
Huile de maïs (n=78)	6,68	1,33	6,64	1,41**
<u>Chol. tot. &gt; 7</u>				
Substance expérimentale (n=26)	7,74	1,53	7,31**	1,58*
Huile de maïs (n=20)	7,66	1,26	7,45*	1,32*

\* p<0,1

\*\* p<0,01

Comme il ressort du tableau 8, la composition expérimentale conforme à l'invention fait baisser significativement le cholestérol sérique total chez les patients dont le cholestérol total est supérieur à 7,0 millimoles/litre et fait monter le HDL-cholestérol significativement dans la population complète. Des effets semblables mais plus faibles sont observés dans le groupe prenant l'huile de maïs.

Les compositions conformes à la présente

invention abaissent en outre le LDL-cholestérol de 5 à 10% chez les patients dont le cholestérol total est  $> 7$  millimoles/litre, mais n'ont pas d'effet significatif chez les patients dont le cholestérol total est  $< 6,5$  millimoles/litre.

TABLEAU 9

EFFET DE LA SUBSTANCE EXPERIMENTALE ET DE L'HUILE DE MAÏS SUR LES TRIGLYCERIDES SERIQUES  
Triglycérides (millimoles/litre)

Groupe	n	Avant	Après	Baisse	Valeur de p
Substance expérimentale	87	1,51	1,20	0,31	0,001
Huile de maïs	85	1,57	1,47	0,03	n.s.
<u>Patients dont les triglycérides sont <math>&gt; 2,00</math> millimoles/litre</u>					
Groupe	n	Avant	Après	Baisse	Valeur de p
Substance expérimentale	14	3,28	2,03	1,25	0,0001
Huile de maïs	17	3,22	2,66	0,56	0,01

Comme il ressort du tableau 9, la substance expérimentale a pour effet de faire baisser le taux des triglycérides sériques spécialement chez les patients dont le taux est élevé ( $> 2,0$  millimoles/litre) avant le traitement. Aucun effet significatif n'est obtenu avec l'huile de maïs dans la population complète des volontaires, mais un effet très faible est observé chez les personnes dont les taux de triglycérides sont élevés.

TABLEAU 10

EFFET DE LA SUBSTANCE EXPERIMENTALE ET DE L'HUILE DE  
MAIS SUR L'AGREGATION DES PLAQUETTES SANGUINES

Groupe	n	Collagène 0,2 $\mu$ g/ml		Collagène 0,1 $\mu$ g/ml	
		Avant	Après	Avant	Après
		$\bar{X}$	ET	$\bar{X}$	ET
Substance expérimentale	21	63,4 $\pm$ 4,40	38,8 $\pm$ 5,19	38,0 $\pm$ 5,91	13,7 $\pm$ 3,77
Huile de maïs	21	73,5 $\pm$ 4,40	57,4 $\pm$ 6,37	43,4 $\pm$ 45,5	15,2 $\pm$ 3,32

Comme il ressort du tableau 10, les compositions conformes à l'invention ont un effet anti-agrégant sur les plaquettes sanguines.

Le complexe phospholipidique du facteur VII de coagulation est trouvé dans le plasma d'hommes appartenant à un groupe à haut risque d'affections cardiovasculaires, comme décrit par P.Leren et al, [The Oslo Study, Cardiovascular diseases in middle aged and young Oslo men. Acta Med. Scand. suppl. 588,1-38, (1987)] et 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)] et est considéré comme étant un autre facteur de risque pour les affections cardiovasculaires.

TABLEAU 11

EFFET DE LA SUBSTANCE EXPERIMENTALE ET DE L'HUILE DE  
MAIS SUR L'ACTIVITE DU COMPLEXE PHOSPHOLIPIDIQUE DU  
FACTEUR VII DE COAGULATION (%)

Groupe	n	Avant	Après	Différence
Substance expérimentale	69	9,7	6,6	3,1 **
Huile de maïs	72	8,5	8,8	0,3 n.s.

\*\* p<0,02



Comme il ressort du tableau, l'activité est significativement abaissée au moyen de la composition conforme à l'invention, alors qu'aucun effet n'est obtenu avec l'huile de maïs.

D'après les résultats présentés dans les tableaux 3 à 11 ci-dessus, une composition conforme à l'invention a un effet significatif sur tous les facteurs de risque précités relatifs aux affections cardiovasculaires. La comparaison montre que certains résultats positifs sont obtenus avec l'huile de maïs, mais qu'aucun effet significatif n'est exercé sur la tension artérielle, le taux des triglycérides sériques ou l'activité du facteur VII de coagulation. De surcroît, les effets mesurés pour ces facteurs de risque dans le groupe consommant l'huile de maïs semblent aller dans le sens opposé et être donc nuisibles.

Par conséquent, les compositions d'acides gras conformes à l'invention sont potentiellement intéressantes pour le traitement et la prophylaxie de nombreux facteurs de risque connus pour les affections cardiovasculaires, telles que l'hypertension, l'hypertriglycémie et une haute activité du complexe phospholipidique du facteur VII de coagulation.

Les doses de la composition de la présente invention qui sont nécessaires pour un effet thérapeutique ou prophylactique varient avec le mode d'administration. Au cours des essais à grande échelle, la Demanderesse a administré la composition expérimentale à raison de 6 grammes par personne et par jour. En règle générale, pour l'adulte moyen, les doses peuvent s'échelonner de 1,0 à 10 grammes suivant la taille de l'individu et la gravité de l'état qu'il faut traiter.

Les compositions conformes à la présente invention peuvent être administrées en outre comme médicaments complémentaires d'un médicament hypotenseur habituel pour le traitement de l'hypertension. Il est à présumer que les doses se situent alors dans la partie inférieure de l'intervalle posologique précité.

D'autres indications médicales possibles pour une administration des compositions conformes à la présente invention sont la polyarthrite chronique, l'artérite psoriasique, la périartérite noueuse, le lupus érythémateux disséminé (LED), la sclérodermie, la maladie de Crohn, la colite ulcéreuse, le psoriasis, la dermatite atopique et la migraine, comme il est ressorti d'expériences in vivo courantes.

De préférence, les composés actifs sont administrés par voie orale sous la forme de pilules, de capsules molles ou analogues. Toutefois, l'administration pourrait se faire aussi par toute autre voie par laquelle les constituants actifs peuvent être absorbés et utilisés efficacement, par exemple par voie intraveineuse, sous-cutanée, rectale, vaginale ou éventuellement topique.

Les compositions pharmaceutiques peuvent éventuellement comprendre, en plus des constituants actifs AEP et ADH tels que définis, un ou plusieurs excipients pharmaceutiquement acceptables bien connus. Les compositions peuvent aussi contenir des charges, des stabilisants, des diluants, des liants, des humectants, des tensio-actifs, des lubrifiants et analogues qui sont connus pour la formation des compositions pharmaceutiques.

En outre, des antioxydants, comme l'hydroxytoluène butylé, la quinone, le tocophérol, l'acide ascorbique et ainsi de suite, des conservateurs, des

colorants, des parfums, des aromatisants et d'autres agents pharmaceutiques peuvent être utilisés.

EXEMPLE DE COMPOSITION PHARMACEUTIQUE

Capsules de gélatine molle à 1g par capsule

Composition:

Ester éthylique d'AEP	525 mg/capsule
Ester éthylique d'ADH	315 mg/capsule
d-alpha Tocophérol	4 UI/capsule
Gélatine	246 mg/capsule
Glycérol	118 mg/capsule
Oxyde de fer rouge	2,27 mg/capsule
Oxyde de fer jaune	2,27 mg/capsule

Les constituants actifs et les excipients sont pesés, puis homogénéisés avec un agitateur à grande vitesse. Le mélange est ensuite passé au broyeur colloïdal et désaéré dans un récipient en acier inoxydable en vue de l'encapsulement. Le mélange est introduit dans des capsules de gélatine molle n° 20 oblongues (poids moyen 1,4 g) à l'aide d'une machine ordinaire à remplir les capsules.

## R E V E N D I C A T I O N S

1 - Composition d'acides gras, caractérisée en ce qu'elle comprend au moins 80% en poids d'acides oméga-3-gras, parmi lesquels l'acide (tout-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque (AEP) C 20:5 et l'acide (tout-Z)-4,7,10,13,16,19-docosaénoïque (ADH) C 22:6 sont présents en quantités relatives de 1:2 à 2:1 et constituent au moins 75% du poids des acides gras totaux.

2 - Composition suivant la revendication 1, caractérisée en ce que d'autres acides gras à longue chaîne présents sont l'acide (tout-Z C 21:5)-6,9,12,15,18-heneicosapentaénoïque et/ou l'acide (tout-Z C 22:5)-7,10,13,16,19-eicosahexaénoïque et/ou l'acide (tout-Z C 18:4)-6,9,12,15-octadécatétraénoïque.

3 - Composition suivant la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la concentration totale en acides oméga-3-gras est d'au moins 90% en poids, parmi lesquels AEP et ADH constituent au moins 85% du poids des acides gras totaux et sont présents en quantités relatives AEP:ADH de 1:1 à 2:1 et spécialement d'environ 3:2 et les autres acides à longue chaîne oméga-3 en C 20, C 21 et C 22 constituent au moins 4,5% en poids.

4 - Composition suivant l'une quelconque des revendications 1 à 3, caractérisée en ce que la concentration totale des acides oméga-3-gras à longue chaîne est d'au moins 95% en poids, parmi lesquels AEP et ADH constituent au moins 90% du poids des acides gras totaux et les autres acides oméga-3 à longue chaîne en C 20, C 21 et C 22 constituent au moins 4,5% en poids.

5 - Composition suivant la revendication 1 ou 2, caractérisée en ce que la concentration totale

en acides oméga-3-gras à longue chaîne est d'au moins 85% en poids, parmi lesquels AEP et ADH constituent au moins 80% en poids et les autres acides oméga-3 à longue chaîne en C 20, C 21 et C 22 constituent au moins 4,5% en poids.

6 - Composition suivant la revendication 4 ou 5, caractérisée en ce que AEP et ADH sont présents en quantités relatives de 1:1 à 2:1.

7 - Composition suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les acides gras sont présents sous la forme de sels pharmaceutiquement acceptables.

8 - Composition suivant l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisée en ce que les acides gras sont présents sous la forme de dérivés.

9 - Composition suivant la revendication 8, caractérisée en ce que le dérivé est un ester et spécialement un ester alcoylique.

10 - Composition suivant la revendication 9, caractérisée en ce que les acides gras sont présents sous la forme des esters éthyliques.

11 - Composition suivant l'une quelconque des revendications ci-dessus, pour le traitement ou la prophylaxie des facteurs de risques multiples des affections cardiovasculaires.

12 - Procédé de préparation d'une composition d'acide gras suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10, caractérisé en ce que de l'huile de poisson brute est soumise aux opérations suivantes dans un ordre quelconque: transestérification, concentration par fractionnement à l'urée ou analogue, distillation moléculaire et/ou extraction ou chromatographie avec un fluide supercritique, de façon qu'une fraction principale consistant essentiellement en esters des acides oméga-3 en C 20:5 et C 22:6 soit

isolée pour donner une quantité totale d'esters d'acides oméga-3-gras à longue chaîne d'au moins 80% en poids, le fractionnement par l'urée et la distillation moléculaire étant exécutés dans des conditions modérées pour éviter l'oxydation et l'isomérisation des acides oméga-3.

13 - Utilisation d'un concentré d'huile de poisson contenant au moins 80% d'acides oméga-3-gras à longue chaîne ou de leurs sels ou dérivés, dans lequel l'acide (tout-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque (AEP) C 20:5 et l'acide (tout-Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque (ADH) C 22:6 sont présents en quantités relatives de 1:2 à 2:1 et constituent au moins 75% du poids des acides gras à longue chaîne totaux, pour la préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prophylaxie des facteurs de risques multiples des affections cardiovasculaires.

14 - Procédé de traitement ou de prophylaxie des facteurs de risques multiples des affections cardiovasculaires, caractérisé en ce qu'on administre une composition suivant l'une quelconque des revendications 1 à 10, éventuellement en mélange avec un excipient pharmaceutiquement acceptable.

15 - Procédé de préparation d'une composition pharmaceutique destinée au traitement ou à la prophylaxie des facteurs de risques multiples des affections cardiovasculaires, caractérisé en ce qu'on incorpore à un excipient ou diluant pharmaceutiquement acceptable un concentré d'huile de poisson contenant au moins 80% en poids d'acides oméga-3-gras à longue chaîne ou de leurs sels ou dérivés, dans lequel l'acide (tout-Z)-5,8,11,14,17-eicosapentaénoïque (AEP) C 20:5 et l'acide (tout-Z)-4,7,10,13,16,19-docosahexaénoïque (ADH) C 22:6 sont présents en quantités relatives de

1:2 à 2:1 et constituent au moins 75% du poids des acides gras totaux.