



(12) **PATENT**

(19) NO

(11) 323774

(13) B1

NORGE

(51) Int Cl.

A23L 1/30 (2006.01)
A23L 1/302 (2006.01)
A61K 31/375 (2006.01)
A61K 31/575 (2006.01)
A61K 31/58 (2006.01)
A61K 31/6615 (2006.01)

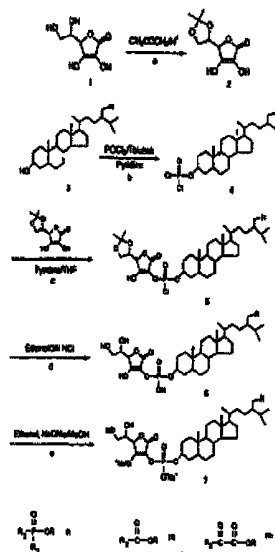
Patentstyret

| | | | | | |
|------|-----------|------------|------|---------------------------|------------------------------|
| (21) | Søknadsnr | 20016294 | (86) | Int.inng.dag og søknadsnr | 2000.06.20 PCT/CA00/00730 |
| (22) | Inng.dag | 2001.12.20 | (85) | Videreføringdag | 2001.12.20 |
| (24) | Løpedag | 2000.06.20 | (30) | Prioritet | 1999.06.23, US, 339903 |
| (41) | Alm.tilgj | 2002.02.22 | | | |
| (45) | Meddelt | 2007.07.02 | | | |

| | | | | |
|------|------------|--|--|--|
| (73) | Innehaver | Forbes Medi-Tech Inc, 750 West Pender Street, Suite 200, BCV6C2T8 VANCOUVER, CA | | |
| (72) | Oppfinner | James P Kutney, 2118 Nanton Avenue, BCV6L3C7 VANCOUVER, CA Yangbing Ding, 222-2730 Acadia Road, BCV6T1R9 VANCOUVER, CA Honming Chen, Vancouver, BC, CA Duanjie Iiou, Vancouver, BC, CA Radka K Milanova, 605-1749 Robson Street, Vancouver, BC V6G 1E1, CA | | |
| (74) | Fullmektig | Zacco Norway AS, Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO | | |

| | | |
|------|-----------------------|---|
| (54) | Benevnelse | Konjugater av fytosterol eller fytostanol med askorbinsyre, ulike anvendelser av disse samt matvare eller drikkevare inneholdende disse. |
| (56) | Anførte publikasjoner | WO A 99 15546 |
| (57) | Sammendrag | |

Nye fytosterol- og/eller fytostanolderivater, som inkluderer saltene derav, er representert ved de generelle formler: (I), (II), (III), hvori R er en fytosterol eller fytostanoldel, R2 er avledet fra askorbinsyre og R3 er hydrogen eller et hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall. Disse derivater er virksomme ved behandling og forebygging av kardiovaskulær sykdom og dens underliggende tilstander som inkluderer aterosklerose og hyperlipedemi.



Den foreliggende oppfinnelse angår konjugater av fytosterol eller fytostanol med askorbinsyre, samt anvendelsen av disse for fremstilling av et preparat for behandling og/eller forebygging av kardiovaskulær sykdom og andre sykdommer. Videre angår foreliggende oppfinnelse en matvare eller drikkevare som inneholder nevnte konjugater.

5

Mens nylige vitenskapelige og teknologiske fremskritt hjelper og forbedrer kvaliteten og øker lengden av et menneskeliv, har man ikke tatt tilstrekkelig hensyn til forebygging av aterosklerose, den underliggende årsaken til kardiovaskulær sykdom ("CVD"). Aterosklerose har en degenerativ prosess som resulterer fra et samspill av

10 arvede (genetiske) faktorer og miljøfaktorer som kosthold og livsstil. Dagens forskning foreslår at kolesterol kan spille en rolle med hensyn til aterosklerose ved å danne ateroskleroseplakker i blodkar som til slutt avskjærer blodtilførselen til hjertemuskelen og alternativt til hjernen eller lemmene, avhengig av stedet hvor plakken befinner seg i arteriestrukturen (arterial tree) (1,2). Oversikter viser at en 1% reduksjon i et

15 menneskes totale serumkolesterol gir en 2% reduksjon av risikoen for kransarterieskade (3). Statistisk kan en 10% reduksjon av gjennomsnittlig serumkolesterol (f.eks. fra 6,0 mmol/L til 5,3 mmol/L) resultere i avverging av 100.000 dødstilfeller årlig i USA (4).

Steroler er naturlig forekommende forbindelser som utfører forskjellige kritiske

20 cellefunksjoner. Fytosteroler som kampesterol, stigmasterol og beta-sitosterol hos planter, ergosterol hos sopp og kolesterol i dyr er primære bestanddeler i celle- og sub-cellemembraner i deres respektive celletyper. Kostholdskilden av fytosteroler hos mennesker er plantematerialer, f.eks. grønnsaker og planteoljer. Det antatte daglige fytosterolinnholdet i et typisk kosthold i den vestlige verden, er ca. 60 – 80 mg i

25 motsetning til et vegetariansk kosthold som ville gi ca. 500 mg pr. dag.

Fytosteroler har fått stor oppmerksomhet på grunn av deres evne til å redusere serum kolesterolnivåer når de gis til flere pattedyrarter, inklusivt mennesker. Mens den nøyaktige virkningsmekanismen forblir stort sett ukjent, er forholdet mellom kolesterol

30 og fytosteroler tydelig på grunn av sine likheter mellom de respektive kjemiske strukturer (forskjellene ligger i sidekjedene til molekylene). Man antar at fytosteroler erstatter kolesterol fra micellefasen og derved reduserer dets absorpsjon eller mulig konkurrerer med reseptorer og/eller bæresteder i kolesterolabsorpsjonsprosessen.

35 For over 40 år siden markedsførte Eli Lilly et sterolpreparat fra tallolje og senere fra soyaolje betegnet CytellinTM som ble funnet å redusere serumkolesterol med ca. 9% ifølge en rapport (5). Forskjellige følgende forskere har undersøkt virkningene av

sitosterolpreparater på plasmalipid og lipoproteinkonsentrasjoner (6) og virkningene av sitosterol og kampesterol fra soya- og talloljekilder på serum kolesteroler (7). En sammensetning av fytosteroler som i stor grad har blitt funnet å være virksom ved reduksjon av serum kolesterol beskrives i US patent med serienr. 5.770.749 av Kutney
5 et al. og omfatter ikke mer enn 70 vekt-% beta-sitosterol, minst 10 vekt-% kampesterol og stigmastanol (beta-sitostanol). Det er i dette patentet vist at det foreligger en form for synergi mellom konstituentfytosterolene som til og med gir bedre kolesterol-reduceringsresultater enn det som ble oppnådd tidligere.

10 Til tross for åpenbare og nå velregistrerte fordeler av fytosteroler, ikke bare ved behandling av CVD og dets underliggende tilstander som hypokolesterolemi, hyperlipidemi, aterosklerose, hypertensjon, trombose, men også ved behandling av andre sykdommer som Type II diabetes, dementia, kreft og aldring, har administrering av fytosteroler og inkorporering derav i næringsmidler, farmasøytiske preparater og
15 andre avleveringsvehikler vært komplisert på grunn av at de i stor grad er hydrofobe (dvs. de har dårlig vannoppløselighet). Studier har blitt gjort på hvordan formen (f.eks. krystallinsk, suspensjon, granulær) i hvilken fytosterolene doseres påvirker deres evne til å redusere serum kolesterolnivået. Etersom fytosteroler i stor grad er hydrofobe, oppløses de ikke i et ønsket omfang i den micellære fasen i fordøyelseskanalen og er
20 derfor ikke i stand til å virksomt blokkere kolesterolabsorpsjon. Oljer og fett er i en viss grad, men ikke tilfredsstillende grad, i stand til å løse frie fytosteroler. Siden kun oppløste fytosteroler inhiberer absorpsjon av kolesterol, må man gjennomføre tilpasninger.

25 Tidligere forskning fokuserte på maling eller knusing av fytosteroler for å forbedre deres oppløselighet (US patent serienr. 3.881.005 og 4.195.084 fra Eli Lilly). I tillegg har forskere undersøkt forestringen av fytosteroler for å forbedre deres oppløselighet. Tysk patent 2035069/28. januar 1971 (analogt til US patent nr. 3.751.569) beskriver tilsats av fytosterol fettsyreestere til kokende olje. Forestringen utføres mellom et fritt
30 sterol og et fettsyreanhydrid med perklorisyre som katalysator. Den betydelige ulempen av denne prosessen, sammen med andre, er anvendelsen av katalysatorer og reagenser som ikke er av typen som anvendes for næringsmidler.

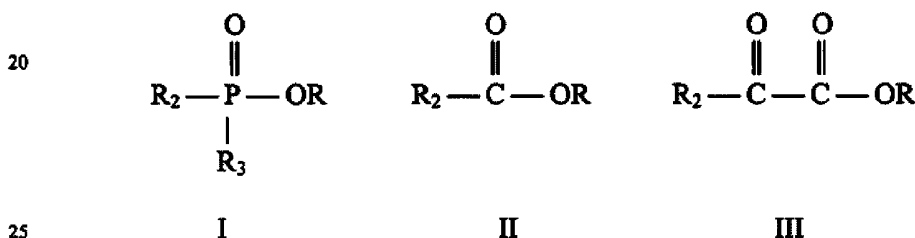
US patent med serienr. 4.588.717 fra David E. Mitchell Medical Research Institute
35 beskriver et vitamintilskudd som innbefatter en fettsyreester av en fytosterol og hvori fettsyreesteren har fra 18 til 20 karbonatomer i hovedkarbonkjeden.

US patentet med serienr. 5.502.045 fra Raison Tehtaat Oy AB beskriver fremstillingen av en beta-sitostanol fettsyreesterblanding. Selv om man i dette patentet forsøker å produsere et oppløselig og stabilt fytostanol-avleveringssystem, foreligger det fremdeles noen problemer med hensyn til langtidsstabiliteten til disse "fettsyre"-forestrede
 5 produkter på grunn av den endelige oksidasjonen av den umettede fettsyredelen.

Følgelig ville tilveiebringelsen av et stabilt vannoppløselig fytosterol/fytostanolderivat som kan administreres oralt og som kan inkorporeres uten ytterligere modifikasjon til
 10 avleveringsvehikler, i stor grad være ønskelig og har hittil ennå ikke blitt tilfredsstillende oppnådd.

Formålet med foreliggende oppfinnelse er å unngå eller begrense de ulemper som er beskrevet ovenfor.

15 Et første aspekt ved oppfinnelsen vedrører en kjemisk struktur som er kjennetegnet ved at den innbefatter fytosterol eller fytostanol og askorbinsyre som har en av de følgende formler:



hvor R er en fytosterol- eller fytostanoldel, R₂ er avledet fra askorbinsyre og R₃ er hydrogen eller et hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall; og alle salter derav.

30 Et andre aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører en sammensetningen som definert i det første aspekt av oppfinnelsen for behandling og/eller forebygging av CVD og dets underliggende tilstander som inkluderer aterosklerose og hyperlipidemi.

35 Andre CVD underliggende tilstander er for eksempel hyperkolesterolemi, hyperlipidemi, hypertensjon, trombose, og relaterte sykdommer som Type II diabetes, såvel som andre sykdommer som inkluderer oksideringsskade som del av den underliggende sykdomsprosessen som demens, Alzheimers sykdom, elding og kreft.

Et tredje aspekt ved oppfinnelsen vedrører en matvare eller drikkevare, kjennetegnet ved den innbefatter sammensetningen som definert i det første aspekt ved foreliggende oppfinnelse.

- 5 Et fjerde aspekt ved foreliggende oppfinnelse vedrører anvendelsen av sammensetningen som definert i det første aspekt ved oppfinnelsen, ved fremstillingen av et preparat for behandling og/eller forebygging av CVD og dens underliggende tilstander som inkluderer aterosklerose og hyperkolesterolemi. Andre CVD
- 10 underliggende tilstander er for eksempel hyperlipidemi, hypertensjon, trombose og relaterte sykdommer som Type II diabetes, såvel som andre sykdommer som inkluderer oksideringsskade som del av den underliggende sykdomsprosessen som demens, aldring og kreft.

Fytosterol/fytostanol/askorbinsyrederivatene og saltene derav ifølge den foreliggende

15 oppfinnelsen har mange fordeler overfor ikke-modifiserte fytosteroler/stanol sammensetninger som er tidligere kjent, og som er beskrevet i teknikken. Spesielt har man funnet at oppløseligheten i vandige oppløsninger er forbedret, noe som muliggjør oral administrering per se uten noen som helst ytterligere forbedringer eller modifikasjoner. Følgelig kan derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen

20 fremstilles og anvendes som sådan og de kan på enkel måte inkorporeres i næringsmidler, drikkevarer, farmasøytiske preparater og kostholdstilskudd, uavhengig av om disse "vehikler" er vann-baserte. Denne forbedrede oppløseligheten fører generelt til lavere administreringsdoser av derivatene for å oppnå den ønskede terapeutiske virkningen.

25 En annen fordel med derivatene i den foreliggende oppfinnelsen er at det kan foreligge en additiv eller synergistisk terapeutisk virkning, både ved å redusere serum kolesterol og som et antioksidant, mellom fytosterol/stanolbestanddelen og askorbinsyren. Disse virkninger og andre tydelige fordeler beskrives mer detaljert nedenfor.

30 Foreliggende oppfinnelse er illustrert ved hjelp av de følgende ikke-begrensede tegninger i hvilke:

Figur 1 er et skjema som viser en prosess for fremstilling av fytostanol-fosfat-askorbat

35 og dets natriumsalt;

Figur 2 er et skjema som viser en prosess for fremstilling av fytosterol-karbonat-askorbat og dets natriumsalt;

Figur 3 er et skjema som viser en prosess for fremstilling av fytosterol-oksalat-askorbat og dets natriumsalt;

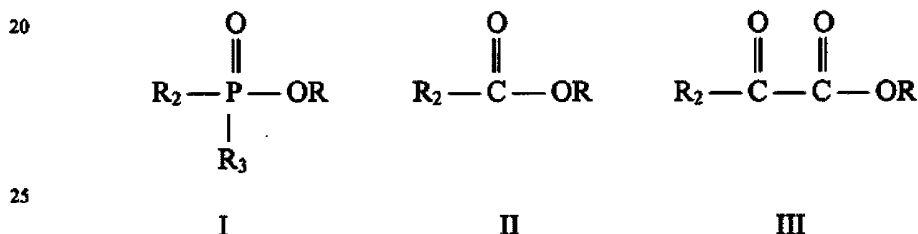
Figur 4 er graf som viser virkningene av Vitosterol på plasma kolesterolnivåer i kolesterol-førede apo E-KO mus;

Figur 5 er en graf som viser virkningene av Vitosterol på plasma triglyceridnivåer i kolesterol-førede apo E-KO mus;

Figur 6 er en graf som viser virkningene av Vitosterol på kroppsvekten til musen; og

Figur 7 er en graf som viser virkningene av Vitosterol på prosentandelen av aterosklerotiske

Formler:



hvor R er en fytosterol eller fytostanol; R₂ er avledet fra askorbinsyre og R₃ er hydrogen eller hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall.

Bestanddelene av derivatet vil bli beskrevet mer detaljert nedenfor. Man bør legge merke til at gjennom hele publikasjonen anvendes uttrykkene "derivat", "struktur" og "analog" om hverandre for å beskrive den nye enheltige forbindelsen som knytter sammen både en fytosterol eller fytostanol og askorbinsyre.

Fytosteroler/fytostanoler

Som anvendt heri, inkluderer uttrykket "fytoosterol" alle fytosteroler uten begrensning, f.eks.: sitosterol, kampesterol, stigmasterol, brassicasterol, desmosterol, kalinosterol, poriferasterol, kliosterol og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav,

som inkluderer isomerer. Uttrykket "fytostanol" inkluderer alle mettede eller hydrogenerte fytosteroler og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav som inkluderer isomerer. Man må forstå at modifikasjoner av fytosteroler og fytostanoler, dvs. å inkludere sidekjeder, også faller innenfor omfanget av denne oppfinnelsen. Det må også forstås at uttrykket "fytosterol" angår både fytosterol og fytostanol, dvs. uttrykkene kan anvendes om hverandre hvis ikke noe annet er spesifisert.

Fytosteroler og fytostanoler for anvendelse i å danne derivater ifølge denne oppfinnelsen kan bli oppnådd fra et flertall av naturlige kilder. De kan f.eks. oppnås fra bearbeidelse av planteoljer (som inkluderer vannplanter) som maisolje og andre vegetabiliske oljer, hvetekimolje, soyaekstrakt, risekstrakt, riskli, rapsfrøolje, solsikkeolje, sesamolje og fiskeolje (og andre oljer fra marine kilder). Foreliggende oppfinnelse poriferasterol, klionasterol og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav, som inkluderer isomerer. Uttrykket "fytostanol" inkluderer alle mettede eller hydrogenerte fytosteroler og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav som inkluderer isomerer. Man må forstå at modifikasjoner av fytosteroler og fytostanoler, dvs. å inkludere sidekjeder, også faller innenfor omfanget av denne oppfinnelsen. Det skal videre forstås at uttrykket "fytosterol" angår både fytosterol og fytostanol, dvs. uttrykkene kan anvendes om hverandre hvis ikke noe annet er spesifisert.

Foreliggende oppfinnelse er ikke begrenset til noen som helst fysterolkilde. US patent med serienr. 4.420.427 viser fremstillingen av steroler fra en masse bestående av vegetabilisk olje ved anvendelse av oppløsningsmidler som metanol. Alternativt kan fytosteroler og fytostanoler oppnås fra talloljemasse eller såpe, side-produkter fra skogbruk, som beskrevet i US patent med serienr. 5.770.749.

I en foretrukket utførelsesform dannes derivatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen med naturlig avledet eller syntetisert beta-sitosterol, kampestanol, sitostanol og kampesterol og hvert av disse derivater som dannes på denne måten kan deretter blandes med en sammensetning før avlevering i forskjellige ratioer. I en annen foretrukket utførelsesform dannes derivatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen med naturlig-avledet eller syntetisert sitostanol eller naturlig-avledet eller syntetisert kampestanol eller blandinger derav.

R2

R2 innbefatter askorbinsyre eller hvilket som helst derivat derav. Det som oppnås innenfor omfanget av den foreliggende oppfinnelsen er dannelsen av en ny struktur eller forbindelse hvori en fytosterol- eller fytostanoldel er kjemisk bundet til askorbinsyre.

5 Sammenkoblingen bedrer og styrker begge deler av denne nye strukturen.

Fytosteroldelen, som tidligere var dårlig oppløselig, blir som en del av det nye derivatet, mye lettere oppløselig i vandige og ikke-vandige medier som oljer og fett. Følgelig blir administrering av fytosterolet mulig uten noen som helst ytterligere forbedring for å modifisere dets avlevering.

10

I mange år har man visst at L-askorbinsyre (vanligvis kjent som vitamin C) er viktig del av en balansert human ernæring og spiller en rolle som en fysiologisk antioksidant.

Likevel er askorbinsyre det minst stabile vitaminet som man arbeider med ettersom det reagerer ekstremt lett med oksygen i atmosfæren hvilket fører til dehydroaskorbinsyre
 15 som videre lett nedbrytes til forbindelser som ikke lenger har vitamin C-effekt. Man tror at den nye strukturen ifølge den foreliggende oppfinnelsen "beskytter" askorbinsyre fra en slik nedbrytning. Ytterligere tror man at de anti-oksidative og andre terapeutiske virkninger av askorbinsyren forbedres på en synergistisk eller additiv måte når en enhetlig forbindelse skapes med fytosterol eller fytostanol. Disse fordelene har man
 20 hittil ikke satt pris på eller utforsket.

Derivatdannelse**a) Esterdannelse**

25

Det finnes mange fremgangsmåter ved hvilke det er mulig å danne nye strukturer som innbefatter fytosteroler og/eller fytostanoler og askorbinsyre. Generelt blandes det valgte fytosterolet eller stanolet (eller halofosfat, halokarbonat eller halooksalatderivater derav) og askorbinsyre sammen under reaksjonsbetingelser som tillater en kondensering
 30 av "syre"-delen med "alkohol" (fytoesterol). Disse betingelser er de samme som de som anvendes i andre vanlige forestringsreaksjoner som Fisher-forestringsprosessen der syrebestanddelen og alkoholbestanddelen tillates å reagere direkte eller i nærvær av en egnet syrekatalysator som mineralsyre, svovelsyre, fosforsyre, p-toluensulfonsyre. De organiske oppløsningsmidler som anvendes generelt i slike forestringsreaksjoner, er
 35 estere som dietyler, tetrahydrofuran eller benzen, toluen eller lignende aromatiske oppløsningsmidler og temperaturene kan variere fra rom- til økte temperaturer avhengig av reaktiviteten av reaktantene som gjennomgår reaksjonen.

I en foretrukket utførelsesform innbefatter prosessen for å danne esterderivatet "å beskytte" hydroksylgruppene av askorbinsyren eller derivatene derav som estere (f.eks. som acetatestere) eller etere (f.eks. metyletere) og deretter å kondensere den beskyttede askorbinsyren med fytosterol/fytostanol halofosfatet, halokarbonatet eller halooksalatet under egnede reaksjonsbetingelser. Generelt gjennomføres slike kondenseringsreaksjoner i et organisk oppløsningsmiddel som dietyleter, tetrahydrofuran eller benzen, toluen eller lignende aromatiske oppløsningsmidler. Avhengig av naturen og reaktiviteten av reaktantene kan reaksjonstemperaturen variere fra lav (-15°C) til økte temperaturer.

Figur 1 er et skjema som viser dannelsen av den "beskyttede" askorbinsyren (trinn a), dannelsen av mellom-klorfosfat/stanolderivatet (trinn b) og kondenseringsreaksjonen (alternativt trinn c eller d) som gir ett av de nye derivater ifølge den foreliggende oppfinnelsen basert på formel I: fytostanol-fosfat-askorbat (vist som struktur 6).

Mer detaljert viser prosessen i figur 1 det følgende: askorbinsyre er innledningsvis beskyttet fra nedbrytning ved dannelsen av 5,6-isopropyliden-askorbinsyre (struktur 2). Dette kan oppnås ved å blande aceton med askorbinsyre og en sur katalysator som svovelsyre eller hydroklorisyre under egnede reaksjonsbetingelser (referer til Eksempel 1 nedenfor). Fytostanol klorfosfat (struktur 4) fremstilles ved å blande en oppløsning av fytostanol i toluen og pyridin (selv om andre nitrogenbaser som alifatiske og aromatiske aminer alternativt kan anvendes) og behandle denne oppløsningen med et fosforderivat som fosforoksyklorid. Resten som dannes etter filtrering og konsentrering av moder væsken på denne måten er fytostanol klorofosfat (struktur 4). Den sistnevnte blandes deretter med 5,6-isopropyliden-askorbinsyre og, etter tilsats av en egnet alkohol som etanol og HCl (trinn d), konsentreres det. Alternativt kan pyridin/THF tilsettes (trinn c) og produktet konsentreres. Etter et avsluttende vasketrinn og tørking (trinn e), er det resulterende nye produktet fra begge trinn c eller d fytostanol-fosfat-askorbat (struktur 6).

Alternativt beskyttes askorbinsyre ved hydroksylstedene, ikke som 5,6-isopropyliden-askorbinsyre men, som estere (f.eks. som acetater, fosfater og lignende). Den sistnevnte kan deretter kondenseres med fytosteroler eller fytostanoler, derivatiseres som beskrevet over, ved anvendelse av kjente forestringsfremgangsmåter for å fremstille strukturene ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Dannelsen av mono- og difosfater av askorbinsyre beskrives grundig i litteraturen. US patent med serienr. 4.939.128 fra Kato

et al., viser f.eks. dannelsen av fosforsyreestere av askorbinsyre. På samme måte viser US patent med serie nr. 4.999.437 fra Dobler et al., fremstilling av askorbinsyre 2-fosfat. I Dobler et al. blir kjernereaksjonen, hvor askorbinsyre eller askorbinsyrederivatene fosforyleres med POCl_3 i nærvær av tertiære aminer (beskrevet i tysk "Laid Open" søknad 2.719.303), forbedret ved tilsats av en magnesiumforbindelse, foretrukket en vandig oppløsning av en magnesiumforbindelse til reaksjonsoppløsningen. Hvilken som helst av disse kjente askorbinsyrederivater kan anvendes innenfor omfanget av den foreliggende oppfinnelsen.

- 10 Figur 2 er et skjema som viser dannelsen av den "beskyttede" askorbinsyren (trinn a), dannelsen av mellom-klorkarbonat/stanolderivatet (trinn b) og kondenseringsreaksjonen (eventuelt trinnene c eller d) som gir struktur 9 (10 er den samme), en av de nye derivater ifølge den foreliggende oppfinnelsen basert på formel II: fytostanol-karbonat-askorbat. Disse klorkarbonatderivater kan fremstilles med den samme prosessen vist
15 detaljert ovenfor med hensyn til figur 1; imidlertid erstattes fosforoksyklorid (som vist i trinn b i figur 2) med fosgen.

Figur 3 er et skjema som viser dannelsen av den "beskyttede" askorbinsyren (trinn a), dannelsen av mellom-klor-oksalat/stanolderivatet (trinn b), og kondenseringsreaksjonen
20 (eventuelt trinn c eller d) som gir ny struktur 13 (samme som 14), ett av de nye derivater ifølge den foreliggende oppfinnelsen basert på formel III: fytostanol-oksalat-askorbat (betegnet som struktur 14). Disse klor-oksalatderivater kan fremstilles med den samme prosessen som vist i detalj ovenfor med hensyn til figur 1; imidlertid erstattes fosforoksyklorid (som vist i trinn b i figur 3) med oksalyklorid.

25

b) Saltdannelse

Den foreliggende oppfinnelsen angår ikke bare hovedforbindelsene, omfattende fytosteroler eller fytostanoler og askorbinsyre (f.eks. de foretrukne strukturene vist som struktur 5 og 6 i figur 1, strukturene 9 og 10 i figur 2 og strukturer 13 og 14 i figur 3),
30 men også saltene derav. Disse saltene er enda mer vannoppløselige enn de tilsvarende hovedforbindelser (utgangsforbindelse), og derfor er deres effektivitet og evaluering mye forbedret, både in vitro og in vivo.

- 35 Saltdannelsen av derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan på enkel måte gjøres ved behandling av utgangsforbindelsen med en serie av baser (f.eks. natriummetoksid eller andre metallalkoksider) for å fremstille de tilsvarende

alkalimetallsalter. Andre metallsalter av kalsium, magnesium, mangan, kobber, sink og lignende kan dannes ved å reagere utgangsforbindelsen med egnede metallalkoksider. Med hensyn til formel I, representerer R3 enten hydrogen (utgangsforbindelse) eller et hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall (saltet).

5

c) Reduksjon ved katalytiske (hydrogenering) og kjemiske fremgangsmåter

Hvis ønsket kan fytosterolderivatene i den foreliggende oppfinnelsen eller konstituentdelene derav (enten fytosterol eller askorbinsyren) før eller etter
10 derivatdannelsen hydrogeneres eller mettes. Hydrogeneringen av heterocykliske ringsystemer til delvise eller fullstendige reduserte analoger er en velkjent prosess. Den katalytiske og/eller kjemiske reduksjonen av ringen av askorbinsyren til det tilsvarende dihydroanaloget, f.eks., utføres på enkel måte under en atmosfære av hydrogen og en
15 metallkatalysator som platina, palladium eller Raney nikkel. Generelt utføres denne reduksjonen i et organisk oppløsningsmiddel som etanol, etylacetat eller lignende medier og enten under atmosfæretrykk eller ved lavt trykk (3 – 5 psi) ved romtemperatur eller litt økte temperaturer.

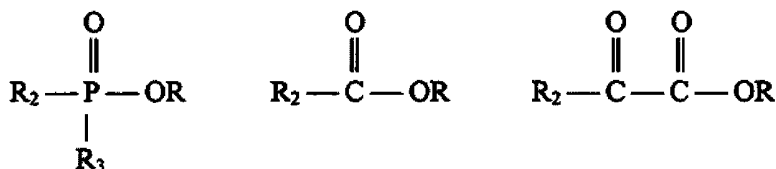
De kjemiske reduksjonene av slike systemer involverer reduksjon med en familie av
20 "hydrid" reagenser som natriumborhydrid, litiumaluminiumhydrid og deres analoger. Disse reduksjoner utføres generelt i vannfritt inert medium som involverer etyleter, tetrahydrofuran, dioksan eller benzen, toluen eller lignende aromatiske oppløsningsmidler ved rom- til tilbakestrømningstemperaturer.

25 Lignende katalytiske eller kjemiske prosesser kan anvendes ved alle fytosterolanalogene ifølge den foreliggende oppfinnelsen. Følgelig inkluderer den foreliggende oppfinnelsen innenfor dens omfang, alle fullstendige eller delvis reduserte derivater hvori ringen av askorbinsyren er delvis eller fullstendig redusert og/eller hvori fytosteroldelen er fullstendig eller delvis hydrogenert.

30

Derivater

Foreliggende oppfinnelse innbefatter alle derivater som innbefatter fytosterol og/eller fytostanol og askorbinsyre, som inkluderer saltene derav representert ved de generelle
35 formler:



5

hvori R er en fytosterol eller fytostanoldel; R₂ er avledet fra askorbinsyre og R₃ er hydrogen eller hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall. Mest foretrukket innbefatter den foreliggende oppfinnelsen alle halofosfat, halokarbonat og halooksalat/fytostanol/askorbatderivater som vist i figurene 1 til 3 som strukturer 5, 6, 7, 9, 10, 11, 13, 14 og 15. Man må imidlertid forstå at disse strukturer er kun utvalgt av mange nye derivater som faller innenfor omfanget av formlene I, II og III. Man må også forstå at selv om natriumsaltet er vist i struktur 7, 11 og 15, er andre salter inkludert innenfor omfanget av oppfinnelsen, som beskrevet over.

15

Kombinasjon av derivater med HMG-koenzym A reduktaseinhibitorer

I en ytterligere utførelsesform kan derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kombineres, før administrering, med ett eller flere midler eller forbindelser som inhiberer kolesterolsyntesen. Disse forbindelsene inkluderer, men er ikke begrenset til 3-hydrokxy-3-metyl glutaryl-koenzym-A (HMG-CoA) reduktaseinhibitorer. Kombinasjonen av disse kolesterolsyntese-inhiberende forbindelser og fytosterolderivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen er synergistisk og initierer og øker både "systemiske eller indre (enteric)" og "ytre (extrinsic)"-virkninger.

25

Selv om virkningsmekanismen av derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen ikke er klar, tror man at kolesterolnivåer reduseres via en prosess som betegnes som "billiær diversjon", frakoblingen av kommunikasjon mellom de billiære enterocytene og hepatocytene. Indre (enteric) kolesterolproduksjon kan øke, men kolesterol frigis i gallen og reabsorberes ikke gjennom enterocytene. Hvilken som helst kolesterolsyntese inhiberende forbindelse vil fungere sammen med disse derivater ettersom mekanismen av det førstnevnte er reduksjon av enterisk kolesterolsyntese og gallekolesterolavsondring. Ettersom kolesterolsyntesen er redusert, øker fytosterol/kolesterol-intestinalforholdet som videre reduserer kolesterolabsorpsjon og øker fytosteroltransporten via entrocytt-shuttle-mekanismen. Oppdagelsen av denne synergistiske ko-virkningen mellom fytosterolderivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen og forbindelsene som inhiberer kolesterolsyntesen, som statiner, er svært

35

viktig fordi doseringen av disse sistnevnte forbindelser kan være betydelig redusert når de administreres sammen med derivatene beskrevet heri. Man har i det siste oppdaget at det er noen kritiske bivirkninger med hensyn til statiner, slik som Lovastatin, slik at doseringsreduksjonen oppnådd på grunn av synergien med derivatene beskrevet heri, er
5 essensiell. Eksempler på andre statiner med hvilke derivatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan kombineres, inkluderer: atorvastatin (Lipitor™), superstatin, simvastatin (Zocor™) og pravastatin (Pravachol™).

Potensielle fordeler ved nye fytosterolanaloger

10

De nye derivater ifølge den foreliggende oppfinnelsen, hvori askorbinsyren er knyttet til fytosteroldelen, gir mange kostholds- og terapeutiske fordeler sammenlignet med
anvendelsen av fytosteroler/fytostanoler uten en slik forbindelse. Først og fremst er oppløseligheten av de nye derivatene i stor grad forbedret, både i vandige oppløsninger
15 og ikke-vandige medier som oljer og fett. Med denne forbedrede oppløseligheten kan virksomme diett og terapeutiske doseringer og i det følgende kostnader, reduseres. Videre er det meget sannsynlig at det til og med er en synergistisk og additiv virkning mellom fytosteroldelen og askorbinsyren når de settes sammen til en struktur, i sammenheng med forebygging eller behandling av kardiovaskulær sykdom og dens
20 underliggende tilstander som inkluderer aterosklerose og hyperlipidemi, men også sykdommer som har oksideringsskade i deres patologi som kreft, elding, demens og Alzheimers sykdom. I tillegg tillater dannelsen av disse derivater det fulle potensialet av askorbinsyre som således kan realiseres mens man eliminerer nedbrytningen. Ytterligere er disse derivatene varmestabile (stabile overfor oksidering og hydrolyse)
25 som er viktig for ytterligere bearbeidelse i f.eks. ekstrudere og næringsmiddelprosessorer.

Avleveringssystemer

30 Selv om man forventer at derivatene ifølge oppfinnelsen kan administreres til dyr, spesielt mennesker, direkte og uten noen som helst form av ytterligere modifisering, er det mulig å ta ytterligere trinn for å forsterke avlevering og til og med sikre fordeling via næringsmidler, drikkevarer, farmasøytiske preparater, kosttilskudd og lignende til hvilke de tilsettes. Man forstår imidlertid at disse trinn er fullt mulig. En slik
35 forbedring kan oppnås ved et antall egnede hjelpemidler som f.eks. oppløsning eller dispergering av derivatene for å danne emulsjoner, oppløsninger og dispersjoner eller selv-emulgerende systemer; lyofilisering, spraytøking, kontrollert presipitering eller en

kombinasjon derav; dannelse av faste dispersjoner, suspensjoner, hydrerte lipidsystemer; dannelse av innslutningskomplekser med cyclodekstriner; og anvendelse av hydrotoper og formuleringer med gallesyrer og deres derivater.

- 5 Hver av metodene som kan anvendes i samsvar med den foreliggende oppfinnelsen, er beskrevet nedenfor.

Emulsjoner

- 10 Emulsjoner er finfordelte eller kolloidale dispersjoner som innbefatter to ublandelige faser, f.eks. olje og vann, hvor en av de (den indre eller kontinuerlige fase) er dispergert som dråper innenfor den andre (eksterne eller diskontinuerlige fase). Således består en olje-i-vann-emulsjon av olje som den indre fasen og vann som den diskontinuerlige eksterne fasen, og vann-i-olje-emulsjonen er den motsatte. Et vidt mangfold av
- 15 emulgerte systemer kan dannes som innbefatter fytosterol- eller fytostanolderivater som innbefatter standard emulsjoner, mikroemulsjoner og de systemene som er selv-emulgerende (emulgerer ved utsettelse for rørte vandige fluider som mage- eller tarmfluider).
- 20 Generelt kan emulsjoner inkludere olje og vannfase, emulgatorer, emulsjonsstabilisatorer og eventuelt konserveringsmidler, aromastoffer, pH-innstillingsmidler og buffere, chelatdannere, antiskummidler, tonisitet-innstillingsmidler og antioksidanter. Egnede emulgatorer (hvori numrene i parentes angår de foretrukne HLB-verdier) inkluderer: anioniske overflateaktive stoffer som alkohol, etersulfater,
- 25 alkylsulfater (30-40), såpe (12-20) og sulfosuccinater; kationiske overflateaktive midler som kvaternære ammoniumforbindelser; zwitterioniske overflateaktive midler som alkylbetainderivater; amfotære overflateaktive midler som fettaminsulfater, difettalkyltrietanolaminderivater (16-17); og ikke-ioniske overflateaktive midler som polyglykoleterderivater av alifatiske eller sykloalifatiske alkoholer, mettede fettsyrer og
- 30 alkylfenoler, vannoppløselige polyetylenoksyaddukter på polypropylenglykol og alkylpolypropylenglykol, nonylfenol polyetoksyetanoler, risinusolje polyglykoletere, polypropylen/polyetylenoksidaddukter, tributylfenoksy-polyetoksyetanol, polyetylenoksy-polyetoksyetanol, lanolinalkoholer, polyoksyetylerter (POE) alkylfenoler (12-13), POE fettamider, POE fettalkoholetere, POE fettaminer,
- 35 POE fettestere, poloksamerer (7-19), POE glykolmonoetere (13-16), polysorbater (17-19) og sorbitanestere (2-9). Listen er ikke ment å være uttømmende ettersom andre emulgatorer på samme måte er egnet.

Egnede emulsjonsstabilisatorer inkluderer, men er ikke begrenset til, lyofile kolloider som polysakkarider, acacia, agar, alginsyre, karragenan, guar gummi, karayagummi, tragakant, xantangummi; amfotære stoffer (f.eks. gelatin) og syntetiske eller semi-syntetiske polymerer (f.eks. karbomerharpikser, celluloseetere og estere, 5 karboksymetylchitin, polyetylen glykol-n (etylenoksidpolymer $H(OCH_2CH_2)_nOH$); finfordelte faststoffer som inkluderer leire (f.eks. attapulgit, bentonitt, hektoritt, kaolin, magnesiumaluminiumsilikat og montmorillonite), mikrokrySTALLINSKE celluloseoksider og hydroksider (f.eks. aluminiumhydroksid, magnesiumhydroksid og silisium); og 10 cybotaktiske fremmere/geldannelsesmidler (som inkluderer aminosyrer, peptider, proteiner, lecitin og andre fosfolipider og poloksamerer).

Egnede antioksidanter for anvendelse ved dannelse av emulsjoner inkluderer: chelatdannelsesmidler som sitronsyre, EDTA, fenylalanin, fosforsyre, vinsyre og 15 tryptofan; fortrinnsvis oksiderte forbindelser som askorbinsyre, natriumbisulfitt og natriumsulfitt; vannoppløselige kjedeavsluttere som tioler og lipidoppløselige kjedeavsluttere som alkylgallater, askorbylpalmitat, t-butyl hydrokinon, butylerte hydroksyanisol, butylert hydroksytoluen, hydrokinon, nordihydroguaiaretinsyre og alfa-tokoferol. Egnede konserveringsmidler, pH-innstillingsmidler og buffere, 20 chelatdannere, osmosemidler, fargestoffer og aromastoffer, diskuteres nedenfor under "suspensjoner", men er på samme måte anvendelig med hensyn til dannelsen av emulsjoner.

Den generelle fremstilling av emulsjoner er som følger: de to faser (olje og vann) 25 oppvarmes separat til en egnet temperatur, den samme i begge tilfeller, generelt 5 - 10°C over smeltepunktet av de høyeste smeltende bestanddeler i tilfellet av en fast eller semifast olje, eller hvor oljefasen er flytende, en egnet temperatur som bestemt ved rutineeksperimenter). Vannoppløselige bestanddeler oppløses i den vandige (vann) fasen og oljeoppløselige bestanddeler oppløses i oljefasen. For å danne en olje-i-vann- 30 emulsjon blandes oljefasen grundig i vannfasen for å lage en egnet dispersjon og produktet blir kjølt ned ved en kontrollert hastighet med omrøring. En vann-i-olje-emulsjon dannes på motsatt måte, dvs. vannfasen tilsettes til oljefasen. Når hydrofile kolloider er en del av systemet som emulsjonsstabilisatorer, kan en fase inversjonsmetode anvendes hvorved kolloider blandes inn i oljefasen heller enn den 35 vandige fasen, før tilsats til den vandige fasen. Ved anvendelse av hvilke som helst fytosterol- eller fytostanolderivater, er det foretrukket å tilsette disse til oljefasen før oppvarming.

Mikroemulsjoner, kjennetegnet ved en partikkelstørrelse på minst en størrelsesorden mindre (10 – 100 nm) enn standardemulsjoner og definert som "et system av vann, olje og amfifil som er en enkel optisk isotropisk og termodynamisk stabil væske" (8), kan
5 også dannes som innbefatter fytosterol- eller fytostanolderivater. I en foretrukket form innbefatter mikroemulsjon et overflateaktivt middel eller overflateaktiv middelblanding, et ko-overflateaktivt middel (vanligvis en kortkjedet alkohol) de utvalgte fytosterol- eller fytostanolderivater, vann og eventuelt andre tilsetningsstoffer.

- 10 Dette systemet har forskjellige fordeler som et avleveringssystem for derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen. For det første har mikroemulsjonene tendens til å bli dannet spontant, dvs. uten at det behøves en stor grad av grundig blanding for å danne standardemulsjoner. Fra et kommersielt synspunkt forenkler det fremstillingsprosessen. For det andre kan mikroemulsjoner steriliseres ved anvendelse av
15 mikrofiltreringsmetoder uten å ødelegge mikrostrukturen på grunn av den lille diameteren til mikrodråpene. For det tredje er mikroemulsjoner i stor grad termodynamisk stabile. For det fjerde har mikroemulsjonene en stor oppløsningsstyrke som er spesielt viktig fordi de ytterligere kan forbedre oppløsningen av derivatene.
- 20 Overflateaktivt middel eller blanding av overflateaktive midler som er egnet for anvendelse i dannelsen av mikroemulsjoner kan være anioniske, kationiske, amfotære eller ikke-ioniske og ha HLB (hydrofil-lipofil balanse) verdier innenfor området på 1 – 20, mer foretrukket i områdene 2 – 6 og 8 – 17. Spesielt foretrukne midler er ikke-ioniske overflateaktive stoffer, valgt fra gruppen som består av polyglykolederivater
25 av alifatiske eller cykloalifatiske alkoholer, mettede fettsyrer og alkylfenoler, vann-oppløselige polyetylenoksyaddukter på polypropylenglykol og alkylpolypropylenglykol, nonylfenol polyetoksyetanoler, risinusolje, polyglykoletere, polypropylen/polyetylenoksidaddukter, tributylfenoksy-polyetoksyetanol, polyetylen glykol, oktylfenoksy-polyetoksyetanol, lanolinalkoholer, polyoksyetylert
30 (POE) alkylfenoler (12-13), POE fettamider, POE fettalkoholetere, POE fettaminer, POE fettestere, poloksamerer (7-19), POE glykolmonoetere (13-16), polysorbater (10-17) og sorbitanestere (2-9).

Det er et antall metoder som er kjent og anvendt av personer med kunnskap innenfor
35 fagområdet for fremstilling av mikroemulsjoner. I en fremgangsmåte for å lage mikroemulsjoner, blandes et overflateaktivt middel, et ko-overflateaktivt middel og

fytosterol- eller fytostanolderivat (foroppløst i en egnet del av en passende olje) og deretter blandes det med vann inntil man oppnår et system av en ønsket klarhet.

- I en ytterligere foretrukket utførelsesform kan dannelsen av mikroemulsjoner oppnås ved å blande fytosterol- eller fytostanolderivater med hydrotropemidler og overflateaktive stoffer som er egnet for næringsmidler (refererer til 9).

Oppløsninger og dispersjoner

- 10 Fytosterol- eller fytostanolderivater kan oppløses eller dispergeres i en egnet oljevehikkel, med eller uten ytterligere eksipienter, og anvendes i denne formen, f.eks. ved generell næringsmiddelbruk, for å behandle (basting) kjøtt og fisk og for inkorporering i dyrefôr.
- 15 Egnede oppløsende midler inkluderer alle oljer av næringsmidler, som planteoljer, oljer fra havdyr (marine oils) (som fiskeolje) og vegetabiliske oljer, monoglycerider, diglycerider, triglycerider, tokoferoler og lignende og blandinger derav.

Selv-emulgerende systemer

- 20 Fytosterol- eller fytostanolderivater kan blandes med egnede eksipienter, f.eks. overflateaktive midler, emulsjonsstabilisatorer (beskrevet over) og lignende, oppvarmet (hvis nødvendig) og kjølt for å danne et semifast produkt som er i stand til å danne en spontan emulsjon ved kontakt med vandige medier. Dette semifaste produktet kan anvendes i uttallige andre former som f.eks. som fyllmateriale i to-dels harde eller myke gelatinkapsler, eller kan adapteres for anvendelse i andre avleveringssystemer.

Faste dispersjoner

- 30 En alternativ måte for ytterligere å øke oppløseligheten/dispersjonsevnen av derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, omfatter anvendelsen av faste dispersjonssystemer. Dispersjonene kan inkludere molekylære oppløsninger (eutectics), fysiske dispersjoner eller en kombinasjon av begge.
- 35 Faste dispersjoner kan f.eks. typisk fremstilles ved å anvende vann-oppløselige polymerer som bærere. Uten begrensning kan disse bærere inkludere, enten alene eller i kombinasjon: fast-type polyetylen glykoler (PEG'er), med eller uten tilsats av flytende-

type PEG'er; polyvinylpyrrolidoner eller deres kopolymerer med vinylacetat og celluloseetere og estere. Andre eksipienter, som ytterligere medlemmer av glykolfamilien, f.eks. propylenglykol, polyoler, f.eks. glyceroler, osv. kan også inkluderes i dispersjonene.

5

Faste dispersjoner kan fremstilles på et antall måter som er kjent av personer med kunnskap innenfor fagområdet. Disse inkluderer, uten begrensning, de følgende fremgangsmåter:

- 10 (a) smelting av bestanddelene, fulgt av kontrollert nedkjøling for å tillate stivning og etterfølgende mekanisk maling for å fremstille et egnet pulver. Alternativt kan den smeltede (sammensmeltede) dispersjonen sprøytes inn i en strøm av nedkjølt luft i en forstøvningstørker for å danne faste partikler (forstøvningskrystallisering) eller ført gjennom en ekstruder og sferonisor for å
- 15 danne faste masser med en kontrollert partikkelstørrelse. I et ytterligere alternativ fylles den smeltede dispersjonen direkte inn i todels harde gelatinkapsler;
- (b) oppløsning av bestanddelene i et egnet oppløsningssystem (organisk, blandet
- 20 organisk, organisk-vandig) og deretter fjerning av oppløsningsmidlene f.eks. ved fordampning ved atmosfæretrykk eller i vakuum, forstøvningstørking, lyofilisering og lignende; eller i en variasjon av det tidligere nevnte, og
- (c) å oppløse bestanddelene i et egnet oppløsningssystem, følgende presipitering av
- 25 de fra oppløsningen ved anvendelse av et ublandelig oppløsningsmiddel i hvilket bestanddelene har liten eller ingen oppløselighet, filtrering, fjerning av oppløsningsmiddelet, tørking og eventuelt maling for å tilveiebringe en egnet pulverform.

30 **Suspensjoner**

Suspensjoner, som kan anvendes for å forbedre ytterligere oppløseligheten og/eller dispersjonsevnen av derivatene, omfatter en fast, mulig finfordelt, indre fase dispergert i en oljeaktig eller vandig ytre fase (vehikkel). I tillegg kan den faste indre fasen tilsettes

35 til en emulsjon som beskrevet over i løpet av dens dannelse for å tilveiebringe et avleveringssystem som har egenskaper som er vanlig for både suspensjoner og emulsjoner.

Tallrike eksipienter, som vanligvis anvendes i teknikken, kan være egnet for fremstilling av en suspensjon. Typisk omfatter en suspensjon et oljeaktig eller vandig vehikkel, den dispergerte (suspenderte) indre fasen, dispergerings og/eller vætemidler (overflateaktive midler), pH-innstillingsmidler/buffere, chelatdanningsmidler, antioksidanter, midler for å innstille ionestyrken (osmotiske midler), fargestoffer, aromastoffer, substanser for å stabilisere suspensjonen og øke viskositet (suspenderingsmidler) og konserveringsmidler.

Egnede vehikler inkluderer, men er ikke begrenset til: vann, oljer, alkoholer, polyoler, eller spiselige forbindelser eller forbindelser egnet for næringsmidler i hvilke fytosterolsammensetningen er delvis eller ikke oppløselig og blandinger derav. Egnede dispergeringsmidler inkluderer, men er ikke begrenset til: lecitin; fosfolipider; ikke-ioniske overflateaktive midler som polysorbat 65, oktoksynol-9, nonoksynol-10, polysorbat 60, polysorbat 80, polysorbat 40, poloksamer 235, polysorbat 20 og poloksamer 188; anioniske overflateaktive midler som natriumlaurylsulfat og docusatnatrium; fettsyrer, salter av fettsyrer, andre fettsyreestere og blandinger derav.

Midler/buffere for pH-innstilling inkluderer sitronsyre og dens salter, vinsyre og dens salter, fosforsyre og dens salter, eddiksyre og dens salter, saltsyre, natriumhydroksid og natriumbikarbonat. Egnede chelateringsmidler inkluderer edetater (dinatrium, kalsiumdinatrium og lignende), sitronsyre og vinsyre. Egnede antioksidanter inkluderer askorbinsyre og dens salter, askorbyl palmitat, tokoferoler (spesielt alfa-tokoferol), butylert hydroksytoluen, butylert hydroksyanisol, natriumbisulfat og metabisulfat. Egnede osmotiske midler inkluderer monovalente, divalente og trivalente elektrolytter, monosakkarider og dsakkarider. Egnede konserveringsmidler inkluderer parabener (Me, Et, Pr, Bu og blandinger derav), sorbinsyre, timerosal, kvaternære ammoniumsalter, benzylalkoholer, benzosyre, klorheksidinglukonat og fenyletanol. Fargestoffer og aromastoffer kan tilsettes etter behov og kan velges fra alle naturlige, natur-identiske og syntetiske varianter.

30

Hydrerte lipidsystemer

I en ytterligere utførelsesform av den foreliggende oppfinnelse kan oppløseligheten/dispergeringsevnen av derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen ytterligere forbedres ved dannelsen av fosfolipidsystemet som liposomer og andre hydrerte lipidfaser, ved fysisk inneslutning. Denne inneslutningen refererer til innfangning av molekyler uten dannelsen av en kovalent binding og anvendes i stort

35

omfang for å forbedre oppløseligheten og etterfølgende dissolusjon av aktive bestanddeler.

Hydrerte lipidsystemer, som inkluderer liposomer, fremstilles ved å anvende et
5 mangfold av lipid og lipidblandinger, som inkluderer fosfolipider som fosfatidylcholin (lecitin), fosfoglycerid og sfingolipider, glykolipider og lignende. Lipidene kan fortrinnsvis anvendes i kombinasjon med ladede substanser som ladede fosfolipider, fettsyrer og kalium og natriumsalter derav for å stabilisere de resulterende lipidsystemer. En typisk dannelsesprosess for liposomer er som følger:

10

- 1) dispersjon av lipid eller lipider og fytosterolene eller fytostanolene eller blandinger derav og tokotrienolbestanddelen i et organisk oppløsningsmiddel (som kloroform, diklormetan, eter, etanol eller en annen alkohol, eller en kombinasjon derav). En ladet forbindelse kan tilsettes for å redusere
15 etterfølgende aggregering i løpet av liposomdannelsen. Antioksidanter (som askorbyl palmitat, alfa-tokoferol, butylert hydroksytoluen og butylert hydroksyanisol) kan også tilsettes for å beskytte ethvert umettet lipid, hvis det foreligger noen;
- 2) filtrering av blandingen for å fjerne mindre uoppløselige bestanddeler;
- 20 3) fjerning av oppløsningsmidler under tilstander (trykk, temperatur) for å sikre at ingen faseparasjon av bestanddelene oppstår;
- 4) hydrering av den "tørre" lipidblandingen ved å utsette den for et vandig medium som inneholder oppløste løsningsprodukter, som inkluderer buffersalter, chelateringsmidler, kryobeskyttere og lignende; og
- 25 5) reduksjon av liposompartikkelstørrelsen og modifikasjon av lamellaritet ved hjelp av egnede teknikker som homogenisering, ekstrusjon, osv.

Hvilken som helst prosedyre for dannelse og ladning av hydrert lipid med aktive bestanddeler, kjent for personer med kunnskap innenfor fagområdet, kan anvendes
30 innenfor omfanget av denne oppfinnelsen. Egnede prosesser for fremstilling av liposomer er f.eks. beskrevet i referanser 10 og 11. Variasjoner av disse prosesser er beskrevet i US patent med serienr. 5.096.629.

US patent med serienr. 4.508.703 beskriver en fremgangsmåte for fremstilling av
35 liposomer ved oppløsning av den amfifile lipidbestanddelen og den hydrofobe bestanddelen for å danne en oppløsning og deretter forstøve oppløsningen i en strøm av gass for å produsere en pulverblanding.

Cyklodekstrinkomplekser

- Cyklodekstriner er en klasse av sykliske oligosakkaridmolekyler som innbefatter glykopyranose underenheter og som har en toroidal sylindrisk romkonfigurasjon. Vanlig tilgjengelige medlemmer av denne gruppen innbefatter molekyler som inneholder seks (alfa-cyklodekstrin), syv (beta-cyklodekstrin) og åtte (gamma-cyklodekstrin) glukopyranosemolekyler, med de polare (hydrofile) hydroksylgrupper orientert til utsiden av strukturen og de apolare (lipofile) skjelettkarboner og eteriske oksygener som ligger i det indre hulrommet av toroidet. Dette hulrommet er i stand til å huse (lagre) den lipofile delen av en aktiv bestanddel (gjestemolekylet, her derivatet av den foreliggende oppfinnelsen) ved å binde den på en ikke-kovalent måte for å danne et inneslutningskompleks.
- De ytre hydroksylsubstituenten av cyclodekstrinmolekylet kan være modifisert for å danne derivater som har forbedret oppløselighet i vandige medier sammen med andre forbedringer som redusert toksisitet, osv. Eksempler på slike derivater er: alkylerte derivater som 2,6-dimetyl-beta-cyklodekstrin; hydroksyalkylerte derivater som hydroksypropyl-beta-cyklodekstrin; forgrenede derivater som diglukosyl-beta-cyklodekstrin; sulfoalkylderivater som sulfobutyleter-beta-cyklodekstrin; og karboksymetylerede derivater som karboksymetyl-beta-cyklodekstrin. Andre typer av kjemiske modifikasjoner, kjent for personer med kunnskap innenfor fagområdet, er også inkludert innenfor omfanget av denne oppfinnelsen.
- Cyklodekstrinkomplekset gir ofte egenskaper som forbedret oppløselighet, dispergeringsevne, stabilitet (kjemisk, fysikalsk og mikrobiologisk), biotilgjengelighet og redusert toksisitet på gjestemolekylet (her, derivatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen).
- Det er et antall måter som er kjent innenfor fagområdet, for å fremstille et cyclodekstrinkompleks. Komplekser kan f.eks. fremstilles ved anvendelse av de følgende basisfremgangsmåter: røre ett eller flere derivater i en vandig eller blandet vann-organisk oppløsning av cyclodekstrinet, med eller uten oppvarming; gjennomknaing, oppslemming eller blanding av cyclodekstrinet og den foreliggende sammensetningen i en egnet anordning med tilsats av en egnet mengde av en vandig, organisk eller blandet vann-organisk væske, med eller uten oppvarming; eller ved fysikalsk blanding av cyclodekstrinet og sammensetningen ifølge den foreliggende

oppfinnelsen ved anvendelse av en egnet blandedanordning. Isolering av det dannede inneslutningskomplekset kan oppnås ved kopresipitering, filtrering og tørking; ekstrudering/sferonisering og tørking; oppdeling av den fuktige massen og tørking; forstøvningstørking; lyofilisering eller ved andre egnede teknikker som er avhengig av den anvendte prosessen for å danne cyclodekstrinkomplekset. Et ytterligere mulig trinn for mekanisk maling av det isolerte faste komplekset kan anvendes.

Disse cyclodekstrinkomplekser forbedrer ytterligere oppløseligheten og disintegrasjonshastigheten og øker stabiliteten av derivatene. For en gjennomgang av cyclodekstrinkompleksdannelse, refereres til 12.

Kompleksdannelse med gallesalter

Gallesyre, deres salter og konjugerte derivater, egnet formulert, kan anvendes for å oppløse derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, og forbedrer derved oppløseligheten og dispersjonsegenskapene til disse sammensetninger. Eksempler på egnede gallesyrer inkluderer: kolinsyre, chenodeoksykolinsyre, dioksykolinsyre, dehydrokolinsyre og litokolinsyre. Eksempler på egnede gallesalter inkluderer: natriumkolat, natriumdeoksykolat og deres andre saltformer. Eksempler på egnede konjugerte gallesyrer inkluderer: glykochenodeoksykolinsyre, glykolinsyre, taurochenodeoksykolinsyre, turokolinsyre, taurodeoksykolinsyre og deres salter.

Et egnet system for ytterligere forbedring av oppløseligheten til derivatet ifølge den foreliggende oppfinnelsen består av ett eller flere derivater pluss en eller flere gallesyrer, salter eller konjugerte gallesyrer. Ytterligere materialer kan tilsettes for å tilveiebringe formuleringer som har ytterligere oppløselighetskapasitet. Disse materialer inkluderer, men er ikke begrenset til: fosfolipider, glykolipider og monoglycerider. Disse bestanddeler kan formuleres enten i den faste fasen eller ved anvendelsen av egnede oppløsningsmidler eller bærervehikler, med egnet isolering og eventuelt, partikkelstørrelsesreduksjon ved anvendelse av teknikker beskrevet heri ovenfor.

Ettersom gallesyre og deres derivater har en ubehagelig smak og kan irritere de mukøse membraner i magen og øvre regioner av mage- og tarmtrakten, kan et egnet enterisk overtrekk anvendes ved de faste formuleringspartikler, ved å anvende teknikker som er kjent for personer med kunnskap innenfor fagområdet. Typiske enteriske overtrekk inkluderer blant annet: celluloseacetat trialat, cellulose acetat trimellitat,

hydroksypropylmetylcellulose ftalat, hydroksypropylmetylcellulose acetat succinat, polyvinylacetat ftalat, akrylatpolymerer og deres derivater (f.eks. egnede medlemmer av EudragitTM serien), etylcellulose eller kombinasjoner derav. Ytterligere eksipienter kan tilsettes til overtrekksformuleringer for å modifisere membranfunksjonaliteten eller for å
 5 hjelpe i forbindelse med overtrekksprosessen (f.eks. overflateaktive stoffer, plastiseringsmidler, kanaldannelsesmidler, permeabilitetmodifiserer og lignende). Overtrekksformuleringsvehikler kan innbefatte vandige eller organiske systemer, eller blandinger av begge.

10 **Hydrotropisk kompleksdannelse**

Forbindelser som er i stand til å åpne opp vannstrukturen assosiert med hydrofobe (lipofile) og andre molekyler er betegnet som hydrotrope. Disse forbindelsene kan anvendes for å forbedre ytterligere den vandige oppløseligheten til derivatene.

- 15 **Eksempler på hydrotroper inkluderer, blant annet, natriumbenzoat, natriumhydroksybenzoater, natriumsalicylat, nikotinamid, natriumnikotinat, natriumgentisat, gentisinsyre, etanolamin, natriumtoluater, natriumaminobenzoater, natriumantranilat, natriumbutylmonoglykolsulfat, resorcinol og lignende.**
- 20 **Kompleksdannelse som er i og for seg ikke-kovalent, kan oppnås ved blanding av ett eller flere derivater og hydrotopen eller blandinger derav i et egnet flytende vehikkel som kan være vandig, organisk eller en kombinasjon av begge. Ytterligere eksipienter som overflateaktive midler, polyoler, disakkarider, osv. kan tilsettes for å forenkle kompleksdannelsen eller for å hjelpe med hensyn til dispersjonsevnen. Det resulterende**
 25 **komplekset isoleres som et tørt pulver ved hvilken som helst prosess kjent for personer med kunnskap på området (ko-presipitering og tørking, fordamping av det flytende vehikkelet, forstøvningstørking, lyofilisering, osv.). Partikkelstørrelser kan reduseres ved hvilken som helst standardteknikk som de beskrevet tidligere heri, hvis ønskes. Det resulterende hydrotrope komplekset kan anvendes uten ytterligere modifikasjon eller kan**
 30 **omgjøres til et mangfold av andre formuleringer eller vehikler etter behov.**

Fremgangsmåter

- 35 **Derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan administreres, direkte og uten ytterligere modifikasjoner, til dyr, spesielt mennesker, eller de kan behandles for å ytterligere forbedre oppløseligheten og/eller dispergeringsevnen til sammensetningen som beskrevet ovenfor. Alternativt, og eventuelt sammen med hvilken som helst av**

disse oppløselighets- og/eller dispergerbarhetsforbedringsmetoder, kan derivatene inkorporeres i forskjellige vehikler som beskrevet ytterligere nedenfor, for å behandle og/eller forebygge CVD, dens underliggende tilstander som hyperkolesterolemi, hyperlipidemi, arteriosklerose, hypertensjon, trombose, relaterte sykdommer som Type 5 II diabetes såvel som andre sykdommer som inkluderer oksideringsskade som en del av den underliggende sykdomsprosessen som demens, elding og kreft. Hos populasjoner som betraktes som "høyrisiko grupper" med hensyn til CVD eller hvilken som helst oksideringsrelatert sykdom, er det foreslått at derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen anvendes i primære, sekundære og tertiære behandlingsprogrammer.

10

Uten å begrense generaliteten av det tidligere nevnte, kan derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen blandes med forskjellige bærere eller adjuvanter som kan bistå i sammenheng med direkte administrering eller i å hjelpe med hensyn til inkorporering av sammensetningen i næringsmidler, drikkevarer, kosttilskudd eller 15 farmasøytiske preparater. For å illustrere mulige avleverings vehikler av derivatene er det tilveiebrakt en liste nedenfor. Dosene av derivatene vil variere avhengig av, ved siden av andre faktorer, avleveringsmåten, pasientens vekt og tilstand, resultatet som skal oppnås, så vel som andre faktorer som er kjent for personer med kunnskap innenfor fagområdet, som omfatter næringsmiddeltilsetningsstoffer og medisinske midler.

20 Generelt er det imidlertid foretrukket at derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen administreres til et menneske i en form som innbefatter opp til 6 g fytosteroler og/eller fytostanoler pr. dag. Man vil forstå at anvendelsen av mye større daglige doser av derivatene ikke er skadelig for dyreverten ettersom overskudd på enkel måte vil passere gjennom vanlige avsondringskanaler.

25

1) Farmasøytiske doseringsformer:

Det er innbefattet i omfanget av den foreliggende oppfinnelsen at derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan være inkorporert i forskjellige konvensjonelle 30 farmasøytiske preparater og doseringsformer som tablett (jevn og overtrukket) for oral, bukal eller lingual anvendelse, kapsler (hard og myk gelatin, med eller uten ytterligere overtrekk), pulvere, granulater (som inkluderer boblende ("effervescent") granulater), pellets, mikropartikler, oppløsninger (som miceller, sirup, eliksirer og dråper), stikkpiller, pastiller, ampuller, emulsjoner, mikroemulsjoner, salver, kremer, 35 drops, geler, transdermale plastre og modifiserte avgivningsdoseringsformer sammen med egnede eksipienter og/eller fortynningsmidler og stabilisatorer.

Derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, adaptert til den egnede doseringsformen som beskrevet over, kan administreres til dyr, inkludert mennesker, oralt, ved injeksjon (intravenøst, subkutant, intra-peritonealt, intradermalt eller intramuskulært), topikalt eller på andre måter. Selv om den presise virkningsmekanisme ikke er avklart, reduserer derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen, administrert intravenøst, serum kolesterol. Man tror at visse fytosterolbaserte produkter kan ha, i tillegg til rollen som inhibitorer av kolesteroladsorpsjon i tarmen, en systemisk virkning på kolesterol homeostase gjennom galleesyresyntese, entero-cytt og gallekolesterolutsondring, galleesyreavsondring og forandringer med hensyn til enzymkinetikk og kolesteroltransport mellom forskjellige deler av kroppen (PCT/CA97/00474 som ble publisert 15. januar 1998). Se også publikasjonen av Peter Jones (under publikasjon).

2) Næringsmidler/drikkevarer/kosttilskudd

I en annen form av den foreliggende oppfinnelsen kan derivatene ifølge oppfinnelsen være inkorporert i næringsmidler, drikkevarer og kosttilskudd, som inkluderer, uten begrensning, det følgende:

- 1) Meieriprodukter – som ost, smør, melk og andre meieridrikkevarer, smørbare produkter og melkeblandinger, iskrem og yoghurt;
- 2) Fett-baserte produkter – som margariner, smørbare produkter, majones, bakefett, stekeoljer og dressinger;
- 3) Cereal-baserte produkter – som innbefatter korn (f.eks. brød og pasta-typer) som kan være kokt, bakt eller behandlet på en annen måte;
- 4) Søtvareprodukter – som sjokolade, sukkertøy, tyggegummi, desserter, ikke-melkebaserte toppings (f.eks. Cool Whip™), sorbet, sukkerglasurer og andre fyllprodukter;
- 5) Drikkevarer - enten alkoholisk eller ikke-alkoholisk som inkluderer colatyper og andre brustyper, juicedrikker, kosttilskuddsdrikker og drikke som erstatter måltidene som de solgt under varemerke Boost™ og Ensure™, og

- 6) Forskjellige produkter – som innbefatter egg og eggprodukter, bearbejdede næringsmidler som supper, forbehandlede pastasauser, forbehandlede måltider og lignende.
- 5 Derivatene ifølge den foreliggende oppfinnelsen kan inkorporeres direkte og uten ytterligere modifikasjoner inn i næringsmiddelet, kosttilskuddet eller drikkevaren ved teknikker som blanding, infusjon, injeksjon, røring, dispergering, emulgering, immersjon, forstøvning og elting. Alternativt kan derivatene påføres direkte på et næringsmiddel eller blandes i en drikkevare av konsumenten før inntak. Disse er enkle og økonomiske avleveringsmåter.
- 10

EKSEMPLER

Den foreliggende oppfinnelsen er beskrevet ved hjelp av de følgende ikke-begrensede eksempler:

15

Eksempel 1 – Beskyttelse av askorbinsyre

Oleum (24%, 8,3 g) ble tilsatt dråpevis til aceton (50 ml). Askorbinsyre (12 g) ble tilført blandingen ved 0°C og reaksjonsblanding ble rørt ved 0°C i 6 timer. De oppnådde krystallene ble avfiltrert under avsugning, den filtrerte kaken ble presset til tørrhet og deretter vasket med aceton (30 ml). Produktet, 5,6-isopropyliden-askorbinsyre (14 g) ble oppnådd.

20

25 Eksempel 2 – Kobling til fytosteranoler

En oppløsning av fytosteranolblanding (24 g) (kampestanol: 36,4%; sitostanol: 62,3%) i toluen (500 ml) og pyridin (25 ml) ble tilsatt dråpevis til en blanding av fosforoksyklorid (9 ml) i toluen (200 ml) ved 0°C. Blanding ble rørt ved romtemperatur i 3 timer. Pyridinhydrokloridet ble avfiltrert og moder væsken ble konsentrert for å tilbakevinne toluenet. Resten ble oppløst i tørt THF (100 ml) og en oppløsning av den ovenfor fremstilte beskyttede askorbinsyren (14 g) i tørt THF (400 ml) ble tilsatt dråpevis ved 0°C. Omrøringen ved romtemperatur ble opprettholdt i 1 time. Oppløsningen ble konsentrert for å fjerne oppløsningsmiddelet. Etanol (400 ml) og 3M HCl (200 ml) ble tilsatt, blandingen ble oppvarmet til 50°C i 30 minutter og konsentrert. Etylacetat (600 ml) ble tilsatt, den resulterende oppløsningen ble vasket

30

med vann (3x300 ml), tørket over natriumsulfat, konsentrert og produktet (fytostanol-fosfat-askorbat) ble oppnådd som et hvitt pulver 22g.

Eksempel 3 – Omdannelse til natriumsalt

5

Den ovenfor fremstilte syren (17 g) ble oppløst i etanol (100 ml) og en oppløsning av natriummetoksid (2,7 g) i etanol (50 ml) ble tilsatt ved omrøring og ved romtemperatur. Omrøringen ble opprettholdt i 30 minutter etter tilsetningen. Den resulterende hvite kaken ble avfiltrert, tørket og veid for å gi et hvitt pulver 20 g (fytostanol-fosfat-askorbat natrium).

10

Eksempel 4 – Virkninger av derivatet på lipidnivåer og aterosklerotisk lesjonsstørrelse i Apo-E defisiente mus

15 Bakgrunn

Vitamin C (fra Aldrich-Sigma) har blitt kjemisk forbundet med en blanding av fytosteroler/fytostanoler som innbefatter beta-sitosterol, sitostanol, kampesterol og kampestanol (betegnet som "FCP-3P4"). Det nye derivatet, som er gjenstand av den foreliggende oppfinnelsen (VitoSterol eller FCP-VP4) er vannoppløselig. Virkningene av VitoSterol og dets utgangsforbindelser (3P4 og vitamin C) har blitt undersøkt hos (0,2% vekt/vekt) hann apo E-KO mus i en periode på 12 uker. VitoSterol ble administrert ved hjelp av både vann (2% vekt/volum) og kost (2% vekt/vekt).

20

25 Mål

- å undersøke lipid-reduksjonsvirkningen av VitoSterol i apo E-KO mus
- å undersøke anti-aterogene virkninger av VitoSterol i apo E-KO mus

Spesifikke mål

30

1. Å undersøke virkningene av VitoSterol ved enten kosttilskudd- eller drikkevann-administreringsveien på plasma kolesterol og triglycridnivåer hos apo E-KO mus.
2. Å evaluere funksjonen (compliance) av VitoSterol spesielt i drikkevann og dets virkning på kroppsvekten til musene.

35

Materialer og fremgangsmåter

Førtiåtte 4 uker gamle hann apolipoprotein E knockout (apo E-KO) mus ble kjøpt fra Jackson laboratoriet og huset i dyrefasilitetene ved Research Center, BC Children's Hospital. VitoSterol ble fremstilt av Forbes Medi-Tech Inc. ("FMI").
Utgangsmaterialet av VitoSterol, fytosteroler (Forbes Batch # 98 – 694) og vitamin C (kjøpt fra Aldric-Sigma) ble tilveiebrakt av FMI. Kolesterol ble kjøpt fra Sigma og 9 vekt-% PicoLab mus mat ble kjøpt fra Jameison's Pet Food distributor, Delta, BC. Laboratoriekjemikalier og reagenser ble fremstilt og anvendt som tidligere beskrevet (13-16).

Eksperimentell planlegging:

Dyr og kosthold: Basert på våre egne tidligere eksperimenter er 8 dyr i hver gruppe tilstrekkelig for å detektere statistisk betydelige behandlings-relaterte virkninger på plasma kolesterolnivåene og utvikling av aterosklerotiske lesjoner. Således, som vist nedenfor, ble 48 hann apo E-KO mus delt inn i 6 grupper av 8 med lignende gjennomsnittlig plasma kolesterolnivå og kroppsvekt. Dyrene ble føret med eksperimentkosten i 14 uker. Kostfremstillingen ble utført basert på tidligere publiserte metoder (13-16). Sammenfatningen av de eksperimentelle grupper av mus og kosthold vises i Tabell 1. Blod ble tatt fra halen til dyrene ved basislinjen og i løpet av eksperimentet for måling av plasma lipidnivåene. Ved slutten av undersøkelsen ble musene avlivet ved anvendelse av CO₂ gass og blod ble tatt fra hjertet. Hjertene og aorta ble fjernet og lagt i formalin for undersøkelse av aterosklerotiske lesjoner.
Alikvoter av plasma ble sent til BRI laboratoriet, Burnaby, BC, for måling av vitamin C og plantesterolkonsentrasjoner. Alikvoter av plasma ble sent til Dr. Kitts laboratorie, UBC, for undersøkelse med hensyn til antioksidantene.

Tabell 1: Eksperimentgrupper av mus og kosthold

| Gruppe(r) | Behandling (type kosthold) |
|-----------|---|
| 1 (8) | Kontrollmus før med 9% fett & 0,15% (vekt/vekt) kolesterol (MC) |
| 2 (8) | MC + 2% (vekt/vekt) VitoSterol |
| 3 (8) | MC + 2% (vekt/volum) VitoSterol i drikkevann |
| 4 (8) | MC + 1,3% (vekt/vekt) fytosteroler (ekvivalent mengde av den som gis til gruppe 2) |
| 5 (8) | MC + 0,7% (vekt/vekt) vitamin C (ekvivalent mengde av den som gis til gruppe 2) |
| 6 (8) | MC + 1,3% (vekt/vekt) fytosteroler og 0,7% (vekt/vekt) vitamin C (ekvivalente mengder av de som gis til gruppe 2) |

Biokjemiske og histologiske undersøkelser: Plasma kolesterolnivåer ble bestemt ved basislinjen og ved 4 – 6 ukers intervaller i løpet av eksperimentet og ved slutten av eksperimentet som beskrevet tidligere (13-16) i det kliniske laboratoriet ved St. Paul's Hospital. Alikvoter av plasmaprøver ble anvendt for å bestemme vitamin C og plantesterolkonsentrasjoner ved anvendelse av væskrokromatografiteknikker i BRI. Aorta rotseksjoner ble anvendt for evaluering av aterosklerotisk lesjonsutvikling som beskrevet tidligere (13-14).

Resultater

A: Totale plasma kolesterolnivåer

Figur 1 viser virkningene av VitoSterol og dets utgangsstoffer på totale plasma kolesterolnivåer. Både vannopløsning og kostholds VitoSterol hadde en tydelig kolesterolreducerende virkning. Denne tydelige virkningen var konsistent i løpet av de 12 undersøkelsesukene.

B: Plasma triglycider

Figur 2 viser virkningene av forbindelsene på plasmatriflyceridnivåer. VitoSterol hadde en mindre TG-reducerende virkning. Som vist var triglyceridvirkningene av VitoSterol redusert i uke 12.

C: Kroppsvekt

Figur 3 viser kroppsvekten. Redusert kroppsvekt hos kostholds-VitoSterol-gruppen skyldes sannsynligvis fremstilling av føret. Reduksjon av kroppsvekt ser ut til å være
5 relatert til næringsmiddelinntak og fremstilling av føret.

D: Fekale kolesterolnivåer

Tidligere resultater viser en tydelig inhibering av kolesterolabsorpsjon med VitoSterol.
10 Resultatene omfattes nedenfor.

| Gruppe | Fetal kolesterol (% vekt/vekt) |
|--------------------|--------------------------------|
| Kontrollgruppe | 0,12 |
| Kost-VitoSterol | 0,8 |
| 15 Vann-VitoSterol | 0,7 |
| 3P4 | 0,2 |

E: Aterosklerotisk lesjonsstørrelse

20 Figur 4 viser at FM-VP4 reduserer aterosklerotisk lesjonsstørrelse med 75% sammenlignet med kontrollgruppen. Behandlingsgruppene ble nummerert på følgende måte:

25 **Tabell 2: Eksperimentgrupper av mus og kosthold for lesjonsstørrelsesundersøkelse**

| Gruppe(r) | Behandling (type kosthold) |
|-----------|---|
| 1 (8) | Kontrollmus før med 9% fett & 0,2% (vekt/vekt) kolesterol (MC) |
| 2 (8) | MC + 0,2% kolesterol + 2% (vekt/vekt) VitoSterol (dvs. i næringsmiddel) |
| 30 3 (8) | MC + 0,2% (vekt/vekt) kolesterol og 1,2% (vekt/vekt) fytosteroler |
| 4 (8) | MC + 0,2% (vekt/vekt) kolesterol og 0,5% (vekt/vekt) vitamin C |
| 5 (8) | MC + 0,2% (vekt/vekt) kolesterol + 1,2% fytosteroler + 0,5% vitamin C |
| 6 (8) | MC + 0,2% (vekt/vekt) kolesterol + 2% VitoSterol (vekt/volum) i vann |

Konklusjoner

VitoSterol er et sterkt kolesterol-reduserende middel med en ytterligere triglycerid-reduserende virkning. Vi observerte ingen åpenbare bivirkninger i løpet av 12 ukers eksperiment. Man fant ut at VitoSterol reduserer kolesterolnivåer med 75% og triglyceridnivåer med 44%. Dette er utmerkede resultater. I tillegg observerte man dramatiske resultater med hensyn til aterosklerotiske lesjonsstørrelser (71 til 86% reduksjon i VitoSterol (nye derivater) behandlingsgrupper sammenlignet med kontrollgruppen).

REFERANSER:

1. Law M.R., Wald N.J., Wu., Hacksaw ZA., Bailey A.; Systemic underestimation of association between serum cholesterol concentration and ischemic heart disease in observational studies: Data from BUPA Study; *Br. Med. J.* 1994; 308:363-366
2. Law M.R., Wald N.J., Thompson S.G.; By how much and how quickly does reduction in serum cholesterol concentration lower risk of ischemic heart disease? *Br. Med. J.* 1994; 308:367-373
3. La Rosa J.C., Hunninghake D., Bush D. et al.; The cholesterol facts: A summary of the evidence relating to dietary fats, serum cholesterol and coronary heart disease: A joint statement by the American Heart Association and the National Heart, Lung and Blood Institute. *Circulation* 1990; 81:1721-1733
4. Havel R.J., Rapaport E.. Drug Therapy: Management of Primary Hyperlipidemia. *New England Journal of Medicine*, 1995; 332:1491-1498
5. Kuccodkar et al.; Effects of plant sterols on cholesterol metabolism. *Atherosclerosis*, 1976; 23:239-248
6. Lees R.S., Lees A.M. Effects of sitosterol therapy on plasma lipid and lipoprotein concentrations. In: Greten H (Ed) *Lipoprotein Metabolism*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1976:119-124
7. Lees A.M., Mok H.Y.I., Lees R.S., McCluskey M.A., Grundy S.M. Plant sterols as cholesterol-lowering agents: clinical trials in patients with hypercholesterolemia and studies of sterol balance. *Atherosclerosis* 1977; 28: 325-338

8. Attwood D. Microemulsions. In *Colloidal Drug Delivery Systems* (J. Kreuter ed.) Marcel Dekker, New York, 1994:32

5 1. Eugster C., Rivara G., Forni G and Vai S. Marigenol Concentrates comprising Taxol and/or Taxan esters as active substances. *Panmimerva Med*, 199638:234-242

10 10. *Liposome Drug Delivery Systems*, Technomic Publishing Co. Inc., Lancaster, PA 1993

11. *Pharmaceutical Technology: Liposomes as Drug Delivery Systems Parts I , II and III*, October 1992, November 1992 and January 1993 respectively.

15 12. Rajewski R.A. and Valentino J.S. Pharmaceutical Applications of Cyclodextrins/In vivo Drug Delivery System. *J. Pharm. Sci.* 1996: 85:1142-1169

13. Moghadasian et al. Pro-atherogenic and anti-atherogenic effects of probucol and phytosterols in apo E knockout mice: Possible mechanism of action. *Circulation* 1999;99:1733-1739.

20 14. Moghadasian et al. "Tail oil"-derived phytosterols reduce atherosclerosis in apo E-deficient mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:119-126.

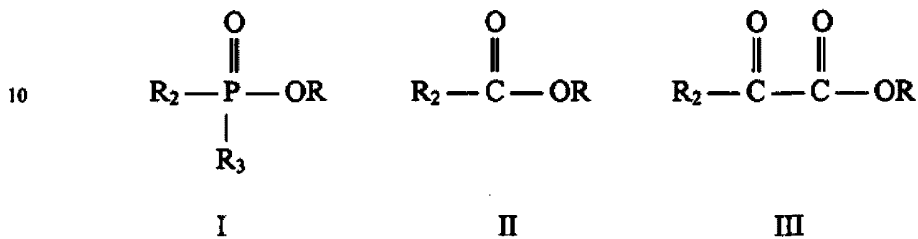
25 15. Moghadasian et al. Histologic, hematologic, and biochemical characteristics of apo E-deficient mice: effects of dietary cholesterol and phytosterols. *Lab Invest* 1999;79:355-364.

30 16. Moghadasian et al. Lack of regression of atherosclerotic lesions in phytosterol-treated apo E-deficient mice. *Life Sci* 1999;64:1029-10

P a t e n t k r a v

1.

En kjemisk struktur, k a r a k t e r i s e r t v e d at den
 5 innbefatter fytosterol eller fytostanol og askorbinsyre som har en av de følgende
 formler:



15

hvor R er en fytosterol- eller fytostanoldel, R2 er avledet fra askorbinsyre og R3 er
 hydrogen eller et hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall; og alle
 salter derav.

20 2.

Struktur ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 fytosteroler er valgt fra gruppen som består av fytosterol, kampesterol, stigmasterol,
 brassikasterol, desmosterol, kalinosterol, poriferasterol, klionasterol og alle naturlige og
 syntetiserte former og derivater derav, som inkluderer isomerer.

25

3.

Struktur ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 fytostanoler er valgt fra gruppen som består av alle mettede eller hydrogenerte
 fytosteroler og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav, som inkluderer
 30 isomerer.

4.

Struktur ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at
 fytostanol er sitostanol.

35

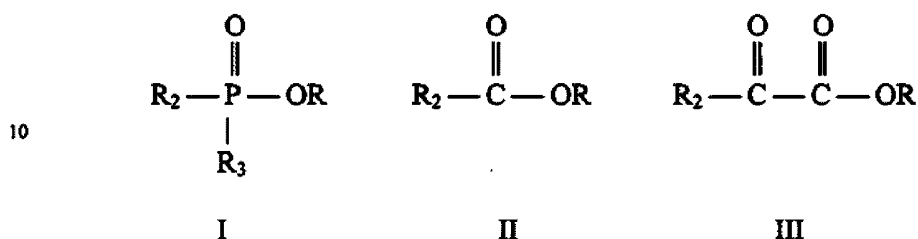
5.

Struktur ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at R3 er
 valgt fra gruppen som består av kalsium, magnesium, mangan, kobber, sink, natrium,
 kalium og litium.

6.

Sammensetning for behandling og forebygging av kardiovaskulær sykdom og dens underliggende tilstander som inkluderer atherosklerose og hyperlipidemi,

karakterisert ved at den innbefatter en eller flere av
5 strukturene som har de følgende formler:



15 hvori R er en fytosterol- eller fytostanoldel, R2 er avledet fra askorbinsyre og R3 er hydrogen eller et hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall; og alle salter av disse strukturer; og en farmasøytisk akseptabel bærer derav.

7.

20 Sammensetning ifølge krav 6, karakterisert ved at fytosterolene er valgt fra gruppen som består av sitosterol, kampesterol, stigmasterol, brassikasterol, desmosterol, kalinosterol, poriferasterol, klionosterol og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav, som inkluderer isomerer.

8.

25 Sammensetning ifølge krav 6, karakterisert ved at fytostanol er valgt fra gruppen som består av alle mettede eller hydrogenerte fytosteroler og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav, som inkluderer isomerer.

9.

30 Sammensetning ifølge krav 6, karakterisert ved at fytostanolen er sitostanol.

10.

35 Sammensetning ifølge krav 6, karakterisert ved at R3 er valgt fra gruppen som består av kalsium, magnesium, mangan, kobber, sink, natrium, kalium og litium.

11.

Sammensetning ifølge krav 6, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den ytterligere innbefatter minst ett middel som reduserer kolesterolsyntese i mennesker.

5

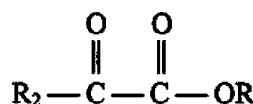
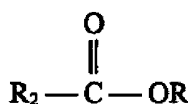
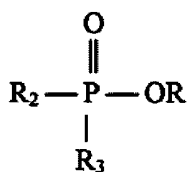
12.

Sammensetning ifølge krav 11, k a r a k t e r i s e r t v e d a t middelet er en 3-hydrokxy-3-metylglutaryl-koenzym-A (HMG-CoA) reductaseinhibitor.

10 13.

En matvare eller drikkevare, k a r a k t e r i s e r t v e d a t den innbefatter en eller flere av strukturene som har følgende formler:

15



20

I

II

III

hvor R er en fytosterol- eller fytostanoldel, R₂ er avledet fra askorbinsyre og R₃ er hydrogen eller hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall; og alle salter av disse strukturer.

25

14.

Matvare eller drikkevare ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fytosterolen er valgt fra gruppen som består av sitosterol, kampesterol, stigmasterol, brassikasterol, desmosterol, kalinosterol, poriferasterol, klionosterol og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav, som inkluderer isomerer.

30

15.

Matvare eller drikkevare ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t v e d a t fytostanolen er valgt fra gruppen som består av alle mettede eller hydrogenerte fytosteroler og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav, inkluderende isomerer.

35

16.

Matvare eller drikkevare ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t
v e d at fytostanolen er sitostanol.

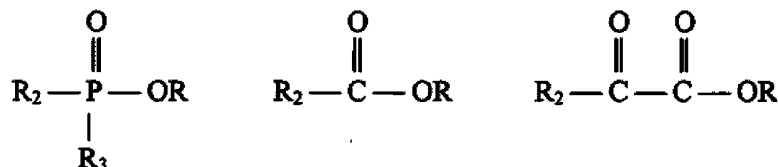
5 17.

Matvare eller drikkevare ifølge krav 13, k a r a k t e r i s e r t
v e d at R3 er valgt fra gruppen som består av kalsium, magnesium, mangan,
kobber, sink, natrium, kalium og litium.

10 18.

Anvendelse av ett eller flere fytosterol- og/eller fytostanolderivater som har de følgende
formler:

15



20

hvor R er en fytosterol- eller fytostanoldel, R2 er avledet fra askorbinsyre og R3 er
hydrogen eller et hvilket som helst metall, jordalkalimetall eller alkalimetall; og alle
salter derav for fremstilling av et preparat for behandling eller forebygging av

25 kardiovaskulær sykdom og dens underliggende tilstand, som inkluderer aterosklerose og
hyperkolesterolemi.

19.

Anvendelse ifølge krav 18, hvori fytosterolet er valgt fra gruppen som består av

30 sitosterol, kampesterol, stigmasterol, brassikasterol, desmosterol, kalinosterol,
poriferasterol, klionasterol og alle naturlige eller syntetiserte former og derivater derav,
som inkluderer isomerer.

20.

35 Anvendelse ifølge krav 18, hvori fytostanolen er valgt fra gruppen som består av alle
mettede eller hydrogenerte fytosteroler og alle naturlige eller syntetiserte former og
derivater derav, som inkluderer isomerer.

21.

Anvendelse ifølge krav 18, hvori fytostanolen er sitostanol.

22.

- 5 Anvendelse ifølge krav 18, hvori R3 er valgt fra gruppen som består av kalsium, magnesium, mangan, kobber, sink, natrium, kalium og litium.