

(19)



SUOMI - FINLAND

(FI)

PATENTTI- JA REKISTERIHALLITUS

PATENT- OCH REGISTERSTYRELSEN

FINNISH PATENT AND REGISTRATION OFFICE

(10) FI 893805 A7

**(12) JULKISEKSI TULLUT PATENTTIHAKEMUS
PATENTANSÖKAN SOM BLIVIT OFFENTLIG
PATENT APPLICATION MADE AVAILABLE TO THE
PUBLIC**

(21) Patentihakemus - Patentansökan - Patent application **893805**

(51) Kansainvälinen patenttiluokitus - Internationell patentklassifikation -
International patent classification
C11C 1/02

(22) Tekemispäivä - Ingivningsdag - Filing date **11.08.1989**

(23) Saapumispäivä - Ankomstdag - Reception date **11.08.1989**

(41) Tullut julkiseksi - Blivit offentlig - Available to the public **12.02.1990**

(43) Julkaisupäivä - Publiceringsdag - Publication date **12.06.2019**

(32) (33) (31) Etu oikeus - Prioritet - Priority

11.08.1988 GB 8819110

(71) Hakija - Sökande - Applicant

1 • Norsk Hydro a.s., Bygdoey alle 2, 0257 Oslo, NORJA, (NO)

(72) Keksijä - Uppfinnare - Inventor

1 • Breivik, Harald, Norge, NORJA, (NO)

2 • Boerretzen, Bernt, Norge, NORJA, (NO)

3 • Dahl, Knut Helkås, Norge, NORJA, (NO)

4 • Krokan, Hans Einar, Norge, NORJA, (NO)

5 • Boenaa, Kaare H., Norge, NORJA, (NO)

(74) Asiamies - Ombud - Agent

Kolster Oy Ab, Salmisaarenaukio 1, 00180 Helsinki

(54) Keksinnön nimitys - Uppfinningens benämning - Title of the invention

Rasvahappokoostumus

Fettsyrakomposition

Rasvahappokoostumus

Tämän keksinnön kohteena on rasvahappokoostumus, joka sisältää vähintään 80 paino-% omega-3-polytyydyttymättömiä rasvahappoja, jolloin vähintään 75 paino-% kaikista rasvahapoista on omega-3(kaikki-Z)-5,8,11,14,17-eikosapentaeniinihappoa (EPA) C 20:5 ja (kaikki-Z)-4,7,10,-13,16,29-dokosaheksaeniinihappoa (DHA) C 22:6.

Sydän-verisuonisairaudet, jotka johtavat sairauteen ja ennenaikaiseen kuolemaan, johtuvat monista riskitekijöistä, kuten korkeasta verenpaineesta, veren liiallisesta triglyseridistä, veren runsaasta kolesterolipitoisuudesta, korkeasta verihiutaleaggregaatiosta ja viimeisten löytöjen mukaisesti, veren koagulantitekijän VII fosfolipidikompleksin korkeasta aktiivisuudesta. Viimeisten kolmen vuosikymmenen aikana verenpainetta alentavat lääkkeet ovat vähentäneet sydän-verisuonisairauksista aiheutuvia tauteja ja kuolleisuutta. Kuitenkin on olemassa lisääntynyt huoli sivuvaikutuksista ja myrkyllisyydestä, liittyen nykyiseen verenpainetta alentavaan hoitoon, erityisesti heikosti yliherkässä potilaassa. On tuloksia, jotka osoittavat, että nykyään käytetyt verenpainetta alentavat aineet ovat tehokkaita verepaineen alentamisessa, pulssin tiheys samanaikaisesti kasvaa. Täten on olemassa tarve kehittää lääke, jolla on vähemmän kielteisiä sivuvaikutuksia korkean verenpaineen hoidossa. Olisi erityisen edullista, jos tällaista lääkettä voitaisiin käyttää samanaikaisessa hoidossa kaikille edellä mainituille moniriskitekijöille sydän-verisuonisairauksien yhteydessä, kuten yleensä ei ole asianlaita nykyään saatavissa kohonnutta verenpainetta vastustavissa lääkkeissä.

Viimeisen vuosikymmenen aikana on ilmestynyt lukuisia julkaisuja, joissa esitetään monia dieetikalaöljyvalmisteita, jotka sisältävät omega-3-polytyydyttymättömiä rasvahappoja ja niiden vaikutusta veriseerumin kolesterolo-

liin ja verihiutaleiden aggregaatioon. Näiden vaikutusten ehdotetut mekanismit sijoittuvat yleensä prostanoidisysteemin ympärille. Täten on olemassa tietoa siitä, miten dieettikalaöljyt muuttavat joidenkin prostaglandiinimetaboliittien erityksen, mutta saatavissa oleva tieto poikkeaa monin paikoin.

Verenpaineen alentumisesta on ilmoitettu kala-, raa'an kalaöljyn (lähtien 7 %:n EPA:sta ja 5 %:n DHA:sta) tai heikosti väkevöityjen kalaöljyvalmisteiden (tavallisesti sisältäen 18 % EPA ja 12 % DHA) ottamisen jälkeen, vaikka komponentteja, jotka olivat vastuussa näistä vaikutuksista, ei koskaan tunnistettu. Lisäksi kaikissa tähän asti esitetyissä tutkimuksissa on esiintynyt yksi tai useampi vakava puute, kuten aikaisempien tutkimusten julkaisuissa on esitetty [H.R. Knepp et al., Proceedings of AOCS Short Course on polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids, Ed. W.E.M. Lands, s. 41 - 55, American Oil Chemists Society] ja [K. Bønaa, Tidsskr. Nor Lægeforen nro 28, 1987. 2425 - 8].

Eikosapentanoiinihappo C 20:5 omega-3 (EPA) on pidetty tärkeimpänä meri-omega-3-polytyydyttymättömistä rasvahapoista, osittain johtuen sen tehokkaasta aggregointia vastustavasta toiminnasta, kuten on esitetty US-patentissa nro 4 097 602, Silver et al., joka rekisteröitiin elokuussa 1974. Myöhemmin Dyerberg et al. myös kuvaavat samaa vaikutusta julkaisuissa [Lancet, s. 152, tammikuu 21, 1978] ja [Lancet II, s. 117 - 119, heinäkuu 15, 1978]. Pääsyy EPA:n oletetulle tärkeydelle johtuu luultavasti siitä, että se kuuluu eikosanoiideihin, jotka ovat avainyhdisteitä prostaglandiinin metabolismille.

Kuitenkin monien äskettäin ilmestyneiden julkaisujen mukaisesti EPA ei yksinään vaikuta merkittävämmiin korkeaan verenpaineeseen. Julkaisussa ["Effects of highly purified eicosapentaenoic acid to angiotensin II and norepinephrine in the rabbit", Prostaglandins elokuu

1986, Vol. 32, nro 2, s. 179 - 187], ei havaittu mitään verenpaineen alenemista jäniksissä, kun käytettiin hyvin puhdasta EPA:ta, jonka pitoisuus oli 90 %. [Terano et al., Atherosclerosis, 46, 321 - 331, (1983)] ilmoitti, että
 5 valmisteella, jossa oli 75 % EPA ja 6,2 % DHA, ei ollut mitään merkittävää vaikutusta verenpaineeseen terveissä vapaaehtoisissa 3,6 g:n EPA- etyyliesterin ottamisen jälkeen. Vastaavasti [Yoshida et al., Artery, 14, 295 - 303, 1987], ilmoitti, ettei mitään vaikutusta havaittu perus-
 10 verenpaineessa 900 mg:n ottamisen jälkeen EPA-etyyliesteriä 14 päivän tai enemmän aikana. Lisäksi 90-%:isella EPA-metyyliesterillä ei ollut mitään vaikutusta rotissa, joilla luonnostaan oli korkea verenpaine. [K. Yin et al., 1988, Clinical and Experimental Pharmacology and Physi-
 15 ology 15, 275 - 280.]

Vastakohtana tälle, GB-patenttihakemus 2 197 199 kuvaa koostumusta raskaudesta aiheutuvan korkean verenpaineen alentamiseksi, jossa esimerkissä käytetyllä koostumuksella oli EPA-pitoisuus, joka oli 28 - 35 %. Potilailla
 20 ei ollut aiemmin esiintynyt korkeaa verenpainetta. Korkean verenpaineen, joka kehittyy raskauden aikana, arvioidaan johtuvan muista biologisista syistä kuin tavallinen korkea verenpaine, mitä näyttää tukevan tosiasia, että se tavallisesti katoaa raskauden jälkeen.

25 Tietävästi ei ole olemassa mitään, joka viittaa siihen, että pelkästään DHA:lla olisi minkäänlaista vaikutusta verenpaineeseen.

US-patentin 3 082 228 mukaisesti, joka perustuu hakemukseen, joka on rekisteröity 18. joulukuuta 1959,
 30 tuote, joka sisälsi vähintään 60 % polytyydyttymättömiä rasvahappoja, joissa on 20 tai enemmän C-atomeja, alentaa veren kolesterolipitoisuutta huomattavasti. Vaikka muut aikaisemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että kalaöljyt alentavat kokonaiskolesterolia ja LDL-kolesterolia ja ko-
 35 hottavat HDL-kolesterolia, myöhemmissä tutkimuksissa on

yleisesti todettu vastakkainen johtopäätös, kuten W.S. Harris on esittänyt [(n-3)news, 3 (4), 1 - 7]. Täten, kun yhdistetään aihetta käsittelevät 45 artikkelia, havaittiin, että LDL-kolesteroli kasvoi 2 - 30 % riippuen ky-

5 seessä olevasta hyperlipidemiasta.

Julkaisusta PCT/WO 87/02247 tiedetään, että lipidi-emulsio ruoansulatuskanavan ulkopuoliseen käyttöön sisältää emulgointiaineen, vettä ja traaniöljyä, joka sisältää vähintään yhtä omega-3-rasvahappoa, jossa vapaan rasvaha-

10 pon pitoisuus emulsiossa on alle n. 5 meg/l ja jossa traaniöljyn tulee sisältää vähintään 30 paino-% EPA- ja DHA-estereiden yhdistelmää. Tätä lipidiemulsiota käytetään verisuonitukossairauksissa laskimonsisäisellä hoidolla.

On havaittu, että rasvahappokoostumuksilla, jotka sisältävät korkeita pitoisuuksia, vähintään 80 paino-% omega-3-rasvahappoja, sen suoloja tai johdannaisia, joissa EPA ja DHA on läsnä suhteellisissa määrissä 1:2 - 2:1 ja jotka vastaavat vähintään 75 %:sta kaikista rasvahapoista, on yllättävän edullinen vaikutus kaikkiin edellä mainit-

15 tuihin riskitekijöihin sydän-verisuonitauksissa, mutta erityisen hyvä vaikutus lievään korkeaan verenpaineeseen, liikatriglyseridiin ja koagulantitekijä VII fosfolipidikompleksin aktiivisuudelle. Se alentaa veriseerumin LDL-kolesterolia, lisää veriseerumi-HDL-kolesterolia, alentaa

20 veriseerumitriglyseridejä, alentaa systolista ja diastolista verenpainetta ja pulssin tiheyttä ja alentaa veren koagulantitekijä VII fosfolipidikompleksin aktiivisuutta. Vaikka yksityiskohtainen biologinen mekanismi tämän hakemuksen mukaisten koostumusten vaikutuksille ei ole täsmäl-

25 lisesti tunnettua, on merkkejä yllättävästä synergismistä EPA:n ja DHA:n toiminnan välillä.

30

Eräs tämän hakemuksen mukaisten koostumusten eduista on se, että ne ovat hyvin kestävyisiä eivätkä aiheuta mitään vakavia sivuvaikutuksia.

Tämän hakemuksen mukainen erityisen edullinen koostumus sisältää vähintään 90 paino-% pitkäketjuisia, polyydyttymättömiä omega-3-rasvahappoja, joista EPA ja DHA muodostavat vähintään 85 paino-% kaikista rasvahapoista ja ovat läsnä suhteessa EPA/DHA 1:1 - 2:1, erityisesti 3:2.

Tämän keksinnön mukaisesti EPA:n ja DHA:n eristämiseksi korkeapitoisesta seoksesta, erityinen menetelmä kehitettiin luonnon kalaöljyjen pitkäketjuisten rasvahappojen puhdistamiseksi ja eristämiseksi. Tämän hakemuksen mukaisia koostumuksia voidaan valmistaa EP-patenttihakemuksen nro 86 906 964.1 mukaisen menetelmän mukaisesti. Analyysi paino-%:eissa perustuu etyyliestereihin, vaikka niiden muut johdannaiset tai suolat tai hapot muodostavat osan tästä keksinnöstä.

Tämän keksinnön mukainen koostumus valmistetaan edullisesti seuraavan menetelmän mukaisesti. Ensin traaniöljyraaka-aine esteröidään ja väkevöidään ureafraktioidulla tai vastaavalla, jossa olosuhteet ovat riittävän herkäät, niin että vältetään tuotteiden hajoaminen. Toinen vaihe on molekyylitislauus.

Alkufraktiointi poistaa pääosan estereistä, joiden pituus on alle C 20. Sen jälkeen pääfraktio poistetaan, joka koostuu pääosin C 20- ja C 22 -happojen estereistä. Koska ureafraktiointi poistaa tyydyttyneet ja vähemmän tyydyttymättömät esterit, nämä fraktiot sisältävät korkeita EPA ja DHA pitoisuuksia, tämän menetelmän mukaisesti vähintään 75 paino-%. Pitkäketjuisten omega-3-happojen kokonaismäärä on vähintään 80 paino-%. Tämän hakemuksen mukainen toinen edullinen koostumus sisältää vähintään 95 paino-%, EPA- ja DHA-pitoisuuksien ollessa vähintään 90 paino-%. Toinen tämän hakemuksen mukainen koostumus sisältää vähintään 85 paino-% omega-3-rasvahappoja ja EPA ja DHA määrä on vähintään 80 paino-%.

Muita C 20-, C 21- ja C 22 -sarjan omega-3-happoja saadaan suunnilleen niiden alkuperäisinä pitoisuuksina, esim. 3 - 5 paino-%, tavallisesti vähintään 4,5 %. Täten erityinen ja pariton omega-3-kaikki-Z 6, 9, 12, 15, 19-
 5 heneikosapentaenoiinihappo C 21:5 on tavallisesti läsnä pitoisuuksina, jotka ovat vähintään 1,5 paino-% ja omega-3-kaikki Z 7, 10, 13, 16, 19-dokosapentaenoiinihappo on tavallisesti läsnä pitoisuuksina n. 3,0 paino-%.

Ureasakan poistamisen jälkeen käytetty liuotin,
 10 tavallisesti etanolia, poistetaan osittain tai kokonaan haihduttamalla ja näin eristetyt esterit voidaan lisäpuhdistaa pesemällä vedellä tai hiukan emäksisellä vesiliuoksella, mikäli puhtaat esterit ilman happojen kontaminaatiota haluttaisiin eristää.

15 Vapaita happoja voidaan muodostaa tunnetuilla hydrolysointimenetelmillä.

EPA-fraktion kasvattaminen, jotta saataisiin painosuhte EPA:DHA 1:1 - 2:1, erityisesti 3:2 tai kasvattamalla DHA-fraktiota, jotta saataisiin EPA:DHA painosuhte 1:1-
 20 1:2, voidaan saavuttaa molekyylitislusvaiheessa. Menetelmä mahdollistaa myös ylikriittisen nesteuuton ja/tai kromatografian käytön toisessa vaiheessa CO₂:lla, joka mahdollisesti sisältää polaarisemman modifioijan, kuten etanolia, jotta EPA- ja/tai DHA-fraktio väkevöityisi.

25 Ureafraktiointi ja sitä seuraava molekyylitislus suoritetaan varovaisesti hyvin pysymättömien omega-3-happojen hapettumisen ja/tai isomeroitumisen estämiseksi. Kuten seuraavista taulukoista 1 ja 2 nähdään, joissa esitetään tämän keksinnön mukaisella menetelmällä saatujen
 30 tuotteiden analyysituloksia, ei ollut enempää kuin 1 % tuntemattomia komponentteja puhdistetussa tuotteessa. On kuitenkin olemassa tietty määrä vähäpitoisia tuotteita, kuten C-16- ja C-18-happoja, kuten yksityiskohtaisista analyysituloksista käy ilmi taulukossa 2.

Pääosin nämä tuotteet ovat rasvahappoestereiden fraktioita, joita tavallisesti on läsnä kalaöljyssä, mutta jokaisen erillisen esterin pitoisuus lopputuotteessa on vähemmän kuin 0,2 %, lukuun ottamatta omega-3-oktadekate-
 5 raenoiinihappoa C 18:4 n-3, jota on läsnä suunnilleen samassa määrässä kuin lähtöaineessa.

Täten on ymmärrettävä, että menetelmän sivutuotteiden kokonaispitoisuus on hyvin alhainen. Menetelmä on kyllin joustava vaikuttaakseen pitkäketjuisten C 20-, C 21-
 10 ja C 22 -rasvahappojen, joita tavallisesti on läsnä kalaöljyraaka-aineissa, välisiin suhteellisiin pitoisuuksiin. Se ei ainoastaan aiheuta yksittäisten happojen pitoisuuden kasvua, vaan niiden välinen suhde pysyy tietyn vaihtelun sisäpuolella, joka on optimaalinen luonnossa. Samanaikaisesti on mahdollista kompensoida joskus niitä huomattavia
 15 vaihteluita, joita voi esiintyä luonnollisesti, kuten seuraavassa. Tätten on mahdollista valmistaa tuote, jolla on vakio ja ennalta määrätty koostumus.

Kalaöljyt voivat myös sisältää sivutuotteita ja
 20 kontaminantteja, kuten pestisidejä, kloorattuja hiilivetyjä, raskasmetalleja, kolesterolia ja vitamiineja. Konsentraatin valmistuksen aikana näiden komponenttien pitoisuuksia alennetaan huomattavasti verrattuna käsittelemättömiin kalaöljyihin.

25 Luonnossa EPA:n ja DHA:n suhteelliset pitoisuudet ja myös muiden pitkäketjuisten omega-3-happojen pitoisuudet riippuvat merilajista ja myös kausimaisista vaihteluista samassa lajissa. USA:ssa kalaöljy valmistetaan nykyisin pääosin menhadenista. Tämä öljy sisältää tavallisesti 14 - 19 % EPA:ta ja 5 - 8 % DHA:ta. Analyysi yhdestä
 30 turskanmaksaöljyerästä osoitti pitoisuudeksi 6,9 EPA ja 8,4 DHA. Villakuoreessa EPA-arvot vaihtelivat välillä 8,6 - 11,4 tammikuusta 1973 elokuuhun 1973, kun DHA-arvot vaihtelivat 6,7 %:sta 11 %:iin saman ajanjakson aikana.
 35 Norjan rannikon sillissä oli lokakuussa 1973 6,4 % EPA:ta

ja 9,8 % DHA:ta, kun tulokset marraskuussa 1983 osoittivat vähenemistä arvoihin 1,7 % ja 1,1 %, vastaavasti.

Nämä vaihtelut tarkoittavat, että kalaöljyjen tai pelkästään kalan ruokavalionauttaminen ei tavallisesti
5 varmista jatkuvaa omega-3-happojen täydennystä. Vaikka kaikki pitkäketjuiset C 20-, C 21- ja C 22 -omega-3-hapot eivät ollenkaan tai ainoastaan hiukan nousevat pitoisuuksiltaan menetelmän aikana, ne säilyvät vähintään niiden alkuperäisissä pitoisuuksissa.

10 Taulukon 1 vasemmanpuoleinen sarake kuvaa tavallisia vaihteluja tämän keksinnön koostumusten yksittäisten pitkäketjuisten happojen pitoisuuksissa, kun taas oikeanpuoleinen sarake esittää testinäytteen tarkan analyysin, jota näytettä käytettiin biologisten vaikutusten tutkimis-
15 sessä, joiden tulokset on esitetty seuraavissa taulukoissa 4 - 8.

Taulukko 1

	Tavallinen tuotevaihtelu	Koenäyte
20		
	C 20:4 omega-6	1- 2
	C 20:5 omega-3	40-60 p-%
	C 21:5 omega-3	1- 4 "
	C 22:5 omega-3	1- 3 "
25	C 22:6 omega-3	25-45 "
	alemmat hapot	3- 8,5 "
	tuntematon	1 "
	omega-3-rasvahappojen summa	90,1 "
	summa EPA + DHA	86,6 "
30	EPA : DHA	3,3 : 2

Taulukko 2 esittää yksityiskohtaisen analyysin lähtöaine-erästä ja tämän keksinnön toisesta koostumuksesta, joka saatiin siitä.

Taulukko 2

Rasvahappokoostumus (%)		
Rasvahappo	Lähtöaine kalaöljy	Tuote etyyliesteri Koenäyte
5		
	C14:0	7,6
	pristanaatti	0,4
	C16:0	19,1
	C16:1 n7	7,2
	7-Me16:0	0,3
10	C16:2 n6	0,5
	C16:2 n4	1,2
	fyтанаatti	0,3
	C16:3 n4	0,5
	C16:4 n1	1,0
	C18:0	2,3
	C18:1 n9	9,1
	C18:1 n7	3,0
15	C18:1 n5	0,4
	C18:2 n6	1,1
	C18:2 n4	0,2
	C18:3 n6	0,2
	C18:3 n3	0,7
	C18:4 n3	2,5
	C18:4 n1	0,1
20	C20:1 n9+7	5,9
	C20:1	0,1
	C20:2 n6	0,2
	C20:3 n6	0,1
	C20:4 n6	0,7
	C20:4 n3	1,2
	C20:5 n3	16,5
25	C22:1 n11+9	4,6
	C22:2 n6	0,7
	C21:5 n3	0,9
	C22:4 n6	0,1
	C22:5 n6	0,1
	C22:5 n3	2,0
	C22:6 n3	7,9
	summa tuntematon	1,0
30	omega-3-rasvahappo-	
	jen summa	31,7
	sis. C 18	3,2
	summa EPA + DHA	24,4
	EPA : DHA	2,1 : 1
		3,1 : 2

Taulukko 3 esittää päärasvahappopitoisuudet monille tämän hakemuksen mukaisille koostumuksille.

Taulukko 3

5	Rasvahappo	Koostumus (%)					
10	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
15	C22:6 n3	28,7	31,0	38,0	34,9	42,4	58,5
	summa n3FA	95,9	95,1	89,6	93,2	94,9	95,7
	sis. C 18						
	summa EPA+DHA	83,4	83,7	80,2	83,4	83,4	90,2
20	EPA : DHA	1,9:1	1,7:1	1,1:1	1,4:1	1:1	1:1,8

n3FA kuvaa omega-3-rasvahappoja

Biologiset vaikutukset

- Jotta saataisiin selville tämän keksinnön mukaisen koostumuksen vaikutus verenpaineeseen, pulssinopeuteen, triglyseridipitoisuuksiin, veriseerumikolesteroliin ja HDL-kolesteroliin, verihiutaleaggregaatioon ja koaguloit-
- 25 titekiä VII fosfolipidikompleksiaktiivisuuteen, pienen norjalaisen kaupungin koko väestö, jonka ikä oli 34 - 60 vuotta, kutsuttiin terveystarkastukseen ja näistä 22 000 ihmistä käytiin läpi seuraavien kriteerien mukaan:
- hoitamaton lievä kohonnut verenpaine, jossa diastolinen
- 30 verenpaine (DBP) oli alueella 89 - 111 mmHg ja systolinen verenpaine (SBP) alueella 110 - 180 mmHg,
- ei aikaisempia sydänsairauksia eikä ole käyttänyt sydän-
- lääkkeitä,
- ei vakavampia tauteja,
- 35 ei huomattavaa ylipainoa,

ei alkoholismia,

veriseerumin kolesteroli vähintään 6,0 mmol/litra.

Näillä kriteereillä valittu vapaaehtoisten ryhmä koostui 172 ihmisestä. Vapaaehtoisia tutkittiin kuuden
5 kuukauden sisäänajojakson aikana, jolloin varmistettiin verenpaineen stabiilisuus ennen koeaineen antamista.

Kaikki verenpainemittaukset tehtiin automaattisella laitteella (Dina map) ja jokaisella kerralla tehtiin kolme mittausta (kahden minuutin välein) istuen ja seisten kont-
10 rolloiduissa olosuhteissa. Kahden viimeisen määrityksen (seisten ja istuen) keskiarvoa käytettiin.

Tutkimus oli kontrolloitu kaksinkertainen sokea koe. 172 vapaaehtoista valittiin sattumanvaraisesti kah-
teen yhtä suureen ryhmään. Toista ryhmistä käsiteltiin
15 plasebokapseleilla, joista kukin sisälsi 1 g maissiöljyä, johon oli lisätty 0,3 % E-vitamiinia. Toinen ryhmä sai kapseleita, jotka sisälsivät 1 g testiainetta, jonka koostumus on esitetty taulukossa 1. Molemmat kapseliryhmät tehtiin värillisestä pehmeästä gelatiinista sokkovaikutuk-
20 sen varmistamiseksi. Vapaaehtoisia pyydettiin ottamaan kolme kapselia kahdesti päivässä joko koe- tai kontrolliainetta 11 - 12 viikkoa. 171 vapaaehtoista vei tutkimuksen loppuun ja keskimäärin n. 90 % kapseleista nautittiin.

Kuten seuraavista taulukoista 4 ja 5 käy ilmi,
25 maissiöljyllä ei ollut tilastollisesti merkittävää vaikutusta verenpaineeseen. Testiaineen vaikutus verenpaineeseen määritettiin ensin koko ryhmälle, jotka söivät testiainetta ja sen jälkeen niille henkilöille, joilla oli korkeampi verenpaine. Keskimääräinen verenpaine potilail-
30 le, joilla oli korkeampi verenpaine, ennen ja jälkeen, hoidettaessa tämän keksinnön aktiivisella koeaineella, on annettu taulukossa 4 (diastolinen verenpaine) ja taulukossa 5 (systolinen verenpaine).

Taulukko 4

Koeaineen ja maissiöljyn vaikutus

5	DBP - alue	Potilaiden lukumäärä	Keskimääräi- nen DBP ennen hoitoa (mmHg)	Keskimääräi- nen DBP hoi- don jälkeen (mmHg)	Keskimääräi- nen DBP-ale- neminen (mmHg)	Merkit- sevyys
	Koeaine					
	85-109	62	95,8	93,4	2,4	p<0,05
	98-109	22	102	96,2	5,8	p<0,01
	maissiöljy					
10	85-109	57	95,7	96,0	0	e.v.
	98-109	26	101,8	100,7	1,1	e.v.

e.v. = ei vaikutusta

Taulukko 515 Koeaineen ja maissiöljyn vaikutus systoliseen ve-
renpaineeseen

20	Potilai- den SBP (mmHg)	Potilaiden lukumäärä	Keskimääräi- nen SBP ennen hoitoa (mmHg)	Keskimääräi- nen SBP hoi- don jälkeen (mmHg)	Keskimääräi- nen SBP ale- neminen (mmHg)	Merkit- sevyys
	koeaine					
	> 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
	maissiöljy					
	> 135	62	148,5	149,6	0	e.v.
	> 150	23	159,1	158,0	1,1	e.v.
25	> 155	17	161,8	159,6	2,2	e.v.

Kuten edeltävistä taulukoista käy ilmi, testiai-
neella oli hyvin merkittävä verenpainetta alentava vaiku-
tus sekä systoliselle että diastoliselle verenpaineelle.
On myös selvää, että vaikutus on voimakkain niissä poti-
laissa, joilla oli korkein verenpaine. Mitään merkittävää
vaikutusta ei havaittu maissiöljyryhmässä.

Taulukko 6

Koeaineen ja maissiöljyn vaikutus systoliseen ja diastoliseen verenpaineeseen nautittaessa kalaruokavaliota (annoksia viikossa)

5

Annoksia viikossa	Potilaiden lukumäärä	Keskimääräinen BP ennen hoitoa (mmHg)	Keskimääräinen BP hoidon jälkeen (mmHg)	Keskimääräinen BP aleneminen (mmHg)	Merkitys	
koeaine						
10	0-2	44	SBP 145,3	139,3	-6,9	p=0,005
			DBP 99,8	94,0	-5,7	p=0,0001
	3-5	34	SBP 143,6	141,2	-2,4	p=0,2
			DBP 97,7	96,3	-1,4	p=0,2
	maissiöljy					
	0-2	34	SBP 145,2	146,8	+1,6	p=0,4
		DBP 98,3	100,2	+1,9	p=0,1	
3-5	44	SBP 142,3	143,4	+1,1	p=0,5	
		DBP 97,4	97,9	+0,5	p=0,7	

15

Kuten taulukosta 6 ilmenee, hyvä verenpainetta alentava vaikutus saavutetaan tämän keksinnön mukaisella koostumuksella, yllättävää myös siinä ryhmässä, joilla on runsaasti kalaa sisältävä ruokavalio, 3 - 5 annosta viikossa. Verrattaessa ei mitään hyödyllisiä vaikutuksia saavutettu maissiöljyllä.

Edeltävät tulokset osoittavat, että tämän hakemuksen mukaisella koostumuksella on yllättävän paljon parempi vaikutus kuin osittiin odottaa nautittaessa kalaruokavaliota tai hiukan väkevöityä traaniöljyä. Tämä johtuu luultavasti EPA:n ja DHA:n synergistisestä vaikutuksesta.

Verrattuna aikaisemmin suoritetuissa kokeissa saattuihin koetuloksiin, joissa nautittiin kalaöljyruokavaliota, tämän hakemuksen mukaisella koostumuksella saavutetut tulokset osoittavat yllättävää parantavaa vaikutusta diastolisessa ja systolisessa verenpaineessa lievästi korkeaa verenpainetta potevassa potilaassa ja vastaavasti korkeampaa verenpainetta potevassa potilaassa ja joka vaikutus on 30 % ja 45 %.

Taulukko 7

Koeaineen ja maissiöljyn vaikutus pulssin nopeuteen
(kautta minuutti)

	Ryhmä	Ennen	Jälkeen	Muutos	Merkitsevyys
5	Koeaine				
	istuesssa	75,4	73,2	-2,2	p<0,02
	seistessä	82,9	80,2	-2,7	p<0,005
	Maissiöljy				
	istuesssa	74,3	75,1	+0,8	p=0,3
10	seistessä	80,9	82,2	+1,3	p=0,2

Pulssintiheystutkimuksessa oli ryhmässä 78 ihmistä, jotka saivat koeainetta ja 77 ihmistä toisessa ryhmässä.

- 15 Kuten edeltävästä taulukosta käy ilmi, saavutetaan huomattava pulssintiheyden aleneminen tämän keksinnön mukaisella koeaineella ja pieni, mutta merkittävä pulssintiheyden kasvu maissiöljyllä.

Taulukko 8

Koeaineen ja maissiöljyn vaikutus veriseerumikolesteroliin (mmol/l)

Ryhmä	Ennen		Jälkeen	
	kokonaisko- lesteroli	HDL-ko- lesteroli	kokonaisko- lesteroli	HDL-ko- lesteroli
5				
Kaikki potilaat:				
koeaine				
10 (n=78)	6,58	1,35	6,57	1,41**
maissiöljy				
(n=78)	6,68	1,33	6,64	1,41**
Kokonaisko- lesteroli > 7				
15 koeaine				
(n=26)	7,74	1,53	7,31**	1,58*
maissiöljy				
(n=20)	7,66	1,26	7,45*	1,32*
* < p 0,1				
20 ** < p 0,01				

Kuten taulukosta 8 käy ilmi, tämän hakemuksen mukainen koekoostumus alentaa kokonaisveriseerumikolesterolia huomattavasti potilaissa, joiden kokonaiskolesteroli on yli 7,0 mmol/l ja nostaa HDL-kolesterolia huomattavasti koko populaatiossa. Samantapaisia, mutta heikompia vaikutuksia saatiin maissiöljyryhmässä.

Tämän hakemuksen mukaiset koostumukset alentavat lisäksi LDL-kolesterolia 5 - 10 %:lla potilaissa, joiden kokonaiskolesteroli > 7 mmol/l, mutta sillä ei ole merkittävää vaikutusta potilaissa, joiden kokonaiskolesteroli < 6,5 mmol/l.

Taulukko 9

Testiaineen ja maissiöljyn vaikutus seerumitriglyseridiin

		<u>Triglyseridi (mmol/l)</u>			
5	Ryhmä	n	Ennen	Jälkeen	Aleneminen p-arvo
	koeaine	87	1,51	1,20	0,31 0,001
	maissiöljy	85	1,57	1,47	0,03 e.v.
<u>Potilaat, joiden triglyseridit > 2,00 mmol/l</u>					
	Ryhmä	n	Ennen	Jälkeen	Aleneminen p-arvo
10	koeaine	14	3,28	2,03	1,25 0,0001
	maissiöljy	17	3,22	2,66	0,56 0,01

Kuten taulukosta 9 käy ilmi, koeaine vaikuttaa alentavasti seerumitriglyseridipitoisuuksiin erityisesti potilaissa, joilla on korkeat pitoisuudet (> 2,0 mmol/l) ennen hoitoa. Mitään merkittävää vaikutusta ei aikaansaatu maissiöljyllä koko vapaaehtoisten ryhmässä, kun taas hyvin pientä vaikutusta havaitaan henkilöissä, joilla on korkeita triglyseridipitoisuuksia.

20

Taulukko 10

Testiaineen ja maissiöljyn vaikutus veren hiutaleaggregaatioon

25	Ryhmä	n	Ennen	Jälkeen	Ennen	Jälkeen
			$\bar{X}$ SEM	$\bar{X}$ SEM	$\bar{X}$ SEM	$\bar{X}$ SEM
	Koeaine	21	63,4±4,40	38,8±5,19	38,0±5,91	13,7±3,77
	maissi- öljy	21	73,5±4,40	57,4±6,37	43,4±45,5	15,2±3,32

30

Kuten taulukosta 10 nähdään, tämän hakemuksen mukaisilla koostumuksilla on verihiutaleiden aggregaatiota vastustava vaikutus

35 Koagulointitekijä VII fosfolipidikompleksia löydetään ihmisten, jotka kuuluvat sydän-verisuonitautien kor-

keaan riskiryhmään, veriplasmassa, kuten on kuvattu julkaisuissa [P. Leren et al., The Oslo Study, Cardiovascular diseases in middle aged and young Oslo men. Acta Med. Scand. suppl. 588, 1 - 38, (1987)] ja [Dalaker et al., A novel
 5 form of factor VII in plasma from men at risk for cardiovascular disease, Br. J. Haematol., 61, 315 - 322, (1958)] ja sitä pidetään toisena riskitekijänä sydän-verisuonisairauksille.

10 Taulukko 11

Testiaineen ja maissiöljyn vaikutus koagulantitekijä VII fosfolipidikompleksin aktiivisuudelle (%)

	Ryhmä	n	Ennen	Jälkeen	Erotus
	koeaine	69	9,7	6,6	3,1**
15	maissiöljy	72	8,5	8,8	0,3 e.v.

**p > 0,02

Kuten taulukosta nähdään, aktiivisuus alenee huomattavasti tämän keksinnön mukaisella koostumuksella, kun
 20 taas mitään merkittävää vaikutusta ei havaittu maissiöljyllä.

Edeltävissä taulukoissa 3 - 11 esitettyjen tulosten mukaisesti tämän hakemuksen mukaisella koostumuksella on huomattava vaikutus kaikkiin edellä mainittuihin sydän-
 25 verisuonisairauksien riskitekijöihin. Vertailun vuoksi joitakin positiivisia tuloksia saatiin maissiöljyllä, mutta mitään merkittävää vaikutusta sillä ei ollut verenpaineeseen, veriseerumitriglyseridien pitoisuuteen tai koagulantitekijä VII aktiivisuuteen. Lisäksi mitatut vaikutukset
 30 maissiöljyryhmässä näiden riskitekijöiden suhteen näyttävät suuntautuvan vastakkaiseen suuntaan, ollen haitallisia.

Täten tämän keksinnön mukaiset rasvakoostumukset ovat tehokkaita monien tunnettujen riskitekijöiden, jotka
 35 aiheuttavat sydän-verisuonisairauksia, kuten korkean ve-

renpaineen, liikatriglyseridisyyden ja korkean koaguloititekiä VII fosfolipidikompleksiaktiivisuuden, hoidossa ja estossa.

Tämän keksinnön koostumuksen tarvittavat annokset
 5 terapeuttisen tai estävän vaikutuksen aikaansaamiseksi vaihtelevat antomuodon mukaan. Laajoissa kokeissa annettiin 6 g henkilöä kohti päivässä koekoostumusta. Yleensä keskimääräisen aikuisen ihmisen annokset voivat vaihdella alueella 1,0 - 10 g, riippuen henkilön koosta ja hoidet-
 10 tavan sairauden vakavuudesta. Tämän hakemuksen mukaisia koostumuksia voidaan lisäksi käyttää lisälääkkeenä korkean verenpaineen lääkkeissä korkean verenpaineen hoidossa. Annokset ovat oletettavasti edellä mainitun annosalueen alaosassa. Muita mahdollisia lääkehoitoaiheita, joihin
 15 tämän hakemuksen mukaisia yhdisteitä voidaan antaa, ovat krooninen moniniveltulehdus, valtimon hilsetystauti, valtimon kyhmytulehdus, iho-oireiden kollageenisairaus (LED), ihon kovettumistauti, Crohn'in tauti, haavainen paksusuolen tulehdus, psoriasis, atooppinen ihotulehdus ja migree-
 20 ni, kuten on havaittu standardi in vivo -kokeissa.

Edullisesti aktiiviset yhdisteet tulisi antaa suun kautta pillereiden, pehmeiden kapsleiden tai vastaavien muodossa. Kuitenkin antaminen voidaan myös suorittaa mitä tahansa muuta tietä, jossa aktiiviset aineosat tehokkaasti
 25 absorboituvat ja hyödynnetään, esim. laskimonsisäisesti, ihonalaisesti, peräsuolen kautta, vaginaalisesti tai mahdollisesti paikallisesti.

Farmaseuttinen koostumus voi mahdollisesti sisältää EPA:n ja DHA:n lisäksi aktiivisia aineosia, kuten on määritetty, yhtä tai useampaa farmaseuttisesti hyväksyttävää
 30 kanninta, kuten hyvin alalla tiedetään. Koostumukset voivat sisältää täyteaineita, stabilointiaineita, jatkoaineita, sideaineita, kostuttimia, pinta-aktiivisia aineita, voiteluaineita ja vastaavia, kuten farmaseuttisen koostu-
 35 muksen formuloinnin alalla tiedetään.

Lisäksi voidaan käyttää antioksidantteja, esimerkiksi hydroksitolueenia, butyraattia, kinoaia, tokoferolia, askorbiinihappoa jne., säilöntäaineita, väriaineita, hajusteita, makuaineita ja muita farmaseuttisia aineita.

5 Esimerkki farmaseuttisesta valmisteesta

Pehmeitä gelatiinikapseleita, jotka sisältävät
1 g/kapseli

Koostumus:

	EPA-etyyliesteri	525 mg/kapseli
10	DHA-etyyliesteri	315 mg/kapseli
	d- α -Tocopherol	4 IU/kapseli
	gelatiini	246 mg/kapseli
	glyseroli	118 mg/kapseli
	punainen rautaoksidi	2,27 mg/kapseli
15	keltainen rautaoksidi	2,27 mg/kapseli

20 Aktiiviset aineosat ja täyteaineet punnitaan ja homogenoidaan korkean nopeuden sekoittajalla. Sitten seos kolloidimyllytetään ja ilma poistetaan ruostumattomassa teräsastiassa valmiiksi kapselointia varten. Seos täytetään pehmeisiin gelatiinikapseleihin, joiden koko on 20 oblongia (keskimääräinen paino 1,4 g) käyttäen standardi-kapselointikonetta.

Patenttivaatimukset:

1. Menetelmä rasvahappokoostumusten valmistamiseksi, joka sisältää vähintään 80 paino-% omega-3-rasvahappoja, joista (kaikki-Z⁹-5,8,11,14,17-eikosapentaenoiinihappoa (EPA) C 20:5 ja (kaikki-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosa-¹¹enoiinihappoa (DHA) C 22:6 on läsnä suhteellisina määrinä 1:2 - 2:1 ja muodostavat vähintään 75 paino-% kaikista rasvahapoista, t u n n e t t u siitä, että traaniöljy-
 5 raaka-aine saatetaan seuraaviin vaiheisiin valinnaisessa järjestyksessä: transesterointi, väkevöinti ureafraktioidilla tai vastaavalla, molekyylitislauk ja/tai ylikriittinen nesteutus tai kromatografia, jonka jälkeen pääfraktiot, joka sisältää pääosin omega-3 C 22:5 ja C 22:6 hap-
 10 pojen estereitä, eristetään antamaan pitkäketjuisia omega-3-rasvahappoestereitä, joiden kokonaismäärä on vähintään 80 paino-%, ureafraktiointi ja molekyylitislauk suoritetaan varovaisesti omega-3-happojen hapettumisen ja isome-
 15 roitumisen estämiseksi.
2. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että muut läsnä olevat pitkäketjuiset rasvahapot ovat (kaikki-Z C 21:5)-6,9,12,15,18-he-
 20 neikosapentaenoiinihappo ja/tai (kaikki-Z C 22:5)-7,10,-13,16,19-eikosaheksaenoiinihappo ja/tai (kaikki-Z C 18:4)-
 25 6,9,12,15-oktadekatetraenoiinihappo.
3. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pitkäketjuisten omega-3-rasvahappojen kokonaispitoisuus on vähintään 90 paino-%, jos-
 30 ta EPA ja DHA käsittävät vähintään 85 paino-% kaikista rasvahapoista ja niitä on läsnä suhteellisina määrinä EPA:DHA alueella 1:1 - 2:1, erityisesti n. 3:2 ja muut pitkäketjuiset omega-3 C 20-, C 21- ja C 22 -hapot käsit-
 tävät vähintään 4,5 paino-%.
4. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä,
 35 t u n n e t t u siitä, että pitkäketjuisten omega-3-ras-

vahappojen kokonaispitoisuus on vähintään 95 paino-%, jossa EPA ja DHA käsittävät vähintään 90 paino-% kokonaisrasvahapoista ja muut pitkäketjuiset C 20-, C 21- ja C 22-hapot käsittävät vähintään 4,5 paino-%.

5 5. Patenttivaatimuksen 1 tai 2 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että pitkäketjuisten omega-3-rasvahappojen kokonaispitoisuus on vähintään 85 paino-%, josta EPA ja DHA käsittävät vähintään 80 paino-% ja muut pitkäketjuiset C 20-, C 21- ja C 22 -hapot käsittävät vähintään 4,5 paino-%.

10 6. Patenttivaatimuksen 4 tai 5 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että EPA:ta ja DHA:ta on läsnä suhteellisina määrinä 1:1 - 2:1.

15 7. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rasvahappoja on läsnä farmaseuttisesti hyväksyttävien suolojen muodossa.

8. Patenttivaatimuksen 1 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että rasvahappoja on läsnä johdannaisen muodossa.

20 9. Patenttivaatimuksen 8 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että johdannainen on esteri, erityisesti alkyyliesteri.

25 10. Patenttivaatimuksen 9 mukainen menetelmä, t u n n e t t u siitä, että läsnä olevat rasvahapot ovat etyyliestereiden muodossa.

30 11. Menetelmä farmaseuttisen koostumuksen valmistamiseksi sydän-verisuonitautien moniriskitekijöiden hoitamiseksi tai estämiseksi, t u n n e t t u siitä, että koostumukseen lisätään farmaseuttisesti hyväksyttävää kantainta tai laimeaa traaniöljykonsentraattia, joka sisältää vähintään 80 paino-% pitkäketjuisia omega-3-rasvahappoja tai niiden suoloja tai johdannaisia, joissa (kaikki-Z)-5,8,11,14,17-eikosapentaenoiinihappoa (EPA) C 20:5 ja (kaikki-Z)-4,7,10,13,16,19-dokosaheksaenoiinihappoa (DHA) C 22:6 on läsnä suhteellisina määrinä alueella 1:2 - 2:1 ja käsittävät vähintään 75 paino-% kaikista rasvahapoista.

Viitejulkaisuja - Anförda publikationer

Julkisia suomalaisia patenttihakemuksia: - Offentliga finska patentansökningar

Hakemus-, kuulutus- ja patenttijulkaisuja: - Ansökningspublikationer,
utläggnings- och patentskrifter:

FI _____

CH _____

DE _____

DK _____

FR _____

GB H 2197199 AGIK 31/20

H 2148 713 —

NO _____

SE _____

US _____

Merkitse hakemusjulkaisun (esim. saksal. Offenlegungsschrift) numeron
eteen H ja vastaavasti kuulutus- ja patenttijulkaisun numeron eteen K ja P.

EP H 175 468 AGIK 3/23

WO H 87/03899 CIB 3/00
H 87/02247 AGIK 3572

Muita julkaisuja: - Andra publikationer:



Allekirjoitus