



SCHWEIZERISCHE EIDGENOSSENSCHAFT
BUNDESAMT FÜR GEISTIGES EIGENTUM

(51) Int. Cl.³: A 61 K 31/20
A 61 K 31/23
A 23 D 5/00
A 23 C 15/00

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

(12) PATENTSCHRIFT A5

(11)

644 267

(21) Gesuchsnummer: 4903/79

(73) Inhaber:
The Wellcome Foundation Limited, London NW1
(GB)

(22) Anmeldungsdatum: 25.05.1979

(72) Erfinder:
Hans Olaf Bang, Aalborg (DK)
Jorn Dyerberg, Aalborg (DK)
John Robert Vane, Keston/Kent (GB)
Salvador Enrique Moncada, West
Wickham/Kent (GB)

(24) Patent erteilt: 31.07.1984

(74) Vertreter:
Andrew Kerr, Arlesheim

(54) **Pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide.**

(57) Eine pharmazeutische Zubereitung enthält die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff.

Die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder deren pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide können zur Behandlung oder Prophylaxe von thrombo-embolischen Zuständen, zur Verlängerung der Blutungszeit, zur Auflösung oder Verteilung bereits gebildeter Thromben oder Thrombozytenaggregaten oder zur Modifizierung oder Verhinderung der Haftung der Thrombozyten an verletztem Gewebe eingesetzt werden. Sie können weiter zur Behandlung von Thrombozyten verwendet werden, um deren Neigung zur Aggregationsbildung zu verringern und/oder um deren Ablösung voreinander zu beschleunigen. Sie können weiter als Zusatz zu Blut in einem extrakorporalen Kreislauf eingesetzt werden.

PATENTANSPRÜCHE

1. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff enthält, wobei mindestens 50 Gew.-% des Fettsäureanteils der Zubereitung aus der (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder einem ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide besteht.
2. Zubereitung nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 90 Gew.-% ihres Fettsäureanteils aus der (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder einem ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide besteht.
3. Zubereitung nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass ihr Fettsäureanteil etwa 2% Ara-chidonsäure und etwa 2% Di-homo-γ-linolensäure mit Docosahexaensäure, Docosapentaensäure, Palmitinsäure, Ölsäure oder anderen Fettsäuren oder ihren pharmazeutisch annehmbaren Salzen, Estern oder Amiden enthält.
4. Zubereitung nach Patentanspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass sie im wesentlichen frei von anderen weniger ungesättigten Säuren oder deren Salzen, Estern oder Amiden ist.
5. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass sie praktisch frei von Vitaminen ist.
6. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Eikosapentaensäure in Form ihres Natrium- oder Kaliumsalzes enthält.
7. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Eikosapentaensäure in Form ihres Triglycerids oder Äthylesters enthält.
8. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Eikosapentaensäure in freier Form enthält.
9. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Antioxydans enthält.
10. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie ein Geschmacksmittel enthält.
11. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Arzneiträger enthält, der entweder eine Kapsel ist oder eine Kapsel enthält, welche den Rest der Zubereitung einschliesst.
12. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie die Eikosapentaensäure, ihr Salz, ihren Ester oder ihr Amid als disperse Phase in einem flüssigen Trägerstoff enthält.
13. Zubereitung nach Patentanspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie in einer Kapsel vorliegt.
14. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass sie in Tablettenform vorliegt, wobei der Trägerstoff ein Feststoff ist.
15. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie in Einzeldosisform vorliegt.
16. Zubereitung nach Patentanspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie 0,25 bis 1,0 g Eikosapentaensäure in freier Form oder als ihr Salz, Ester oder Amid enthält.
17. Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 16, dadurch gekennzeichnet, dass sie praktisch frei von gesättigten Fettsäuren oder deren Salzen, Estern oder Amiden ist.
18. Zubereitung nach Patentanspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie in Form einer Tablette vorliegt und ein festes pharmazeutisch annehmbares Salz, Ester oder Amid der (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure enthält.

19. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff enthält, wobei die Zubereitung im wesentlichen frei von anderen weniger ungesättigten Säuren oder ihren Salzen, Estern oder Amiden ist.
20. Pharmazeutische Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester, Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff enthält, jedoch praktisch frei von Vitaminen ist.
21. Speiseöl- oder Fettzubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass sie die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer Salze, Ester oder Amide in einer Menge enthält, dass der Gewichtsanteil der Eikosapentaensäure entweder in freier Form oder in Form eines ihrer genannten Derivate mindestens 3 Gew.-% beträgt.
22. Fettzubereitung nach Patentanspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass sie in Form einer Margarine- oder Butterzubereitung vorliegt.
23. Margarinezubereitung nach Patentanspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass sie in Form einer Emulsion vorliegt.
24. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung nach einem der Patentansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, dass man die Komponenten miteinander wirksam assoziiert.
25. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung nach Patentanspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass man die Komponenten miteinander wirksam assoziiert.
26. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung nach Patentanspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass man die Komponenten miteinander wirksam assoziiert.

40

Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff sowie ein Verfahren zur Herstellung dieser Zubereitungen.

Obwohl man weiss, dass viele Substanzen eine Thrombozytenaggregation bewirken, kann aufgrund des Wissens um die Wirkung einer bestimmten Substanz auf die Aggregation der Thrombozyten *in vitro* nicht vorhergesagt werden, ob die Substanz eine hemmende oder stimulierende (oder neutrale) Wirkung auf die Thrombusbildung *in vivo* hat. Das hängt weitgehend davon ab, dass es nicht bekannt ist, was die Bildung eines Thrombus oder Embolus, beispielsweise bei einem Schlaganfall oder einem Herzinfarkt, einleitet. Als Beispiel für diese Unvorhersehbarkeit sei Aspirin genannt, welches ein gutes Hemmittel gegen die Thrombozytenaggregation *in vitro* und *in vivo* ist, jedoch kein Antithrombosemittel ist, da es im besonderen einen vorgeformten Thrombus nicht dispergieren kann.

M.J. Silver, J.B. Smith et al. zeigten in Prostaglandins, Band 4, Nr. 6, Dezember 1973, auf den Seiten 863 bis 875, dass viele Verbindungen *in vitro* die eine Thrombozytenaggregation hervorruhende Wirkung der essentiellen Nahrungskomponente beeinflussen können (Arachidonsäure: 5,8,11,14-Eikosatetraensäure, alternativ C20 : 4; n-6 Säure, d.h. eine Fettsäure, welche 20 Kohlenstoffatome mit 4 Koh-

lenstoff-Kohlenstoff-cis-Doppelbindungen aufweist, von denen eine an der höchstbezifferten Stellung in einer Stellung, welche sechs Bindungen von dem der Carboxylgruppe entfernten Ende des Moleküls aufweist, angeordnet ist und wobei n die Zahl der Kohlenstoffatome in der geraden Kette bedeutet). Diese In-vitro-Tests in menschlichem thrombozyten-reichem Citratplasma können nicht unzweideutig auf das In-vivo-Verhalten bei einem für die Thrombenbildung empfänglichen Säugetier, einschliesslich des Menschen, bezogen werden. M. J. Silver et al. fanden in ihren Tests, dass die durch Arachidonsäure als Natriumsalz vorliegende induzierte Thrombozytenaggregation mittels vieler Substanzen gehemmt werden kann, so beispielsweise durch Adenosin, β -Naphthol, nichtsteroide entzündungshemmende Wirkstoffe, wie beispielsweise Indomethacin, Natriumsalicylat und Aspirin, ferner menschliches Albumin, ungesättigte Fettsäuren, wie z.B. 11,14,17-Eikosatriensäure, 8,11,14-Eikosatriensäure (Di-homo- γ -linolensäure, DHLA), ferner 5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure, 5,8,11,14-Eikosatetraensäure und 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure. Sie stellten auch fest, dass die durch Kollagen induzierte Thrombozytenaggregation und eine zweite durch Adenosindiphosphat (ADP) induzierte Thrombozytenaggregations-Phase durch β -Naphthol, Aspirin, 8,11,14-Eikosatriensäure, 5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure und Humanalbumin gehemmt werden können. Ferner fanden Silver et al. heraus, dass verschiedene Fettsäuren von sich aus keine Thrombozytenaggregation herbeiführen. Dabei erwähnten sie Säuren, wie beispielsweise 8,11,14-Eikosatriensäure, 11,14,17-Eikosatriensäure, 5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure, 5,8,11,14-Eikosatetraensäure, 4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure, Linolensäure, Linolsäure, Ölsäure, Arachidinsäure, Stearinsäure und die Caprinsäure.

Es liegt auf der Hand, dass viele der von Silver et al. als aggregationshemmend gefundenen Verbindungen zur Verwendung in der Therapie ungeeignet sind. So wird beispielsweise Adenosin rasch von den Zellen absorbiert und würde im Körper nicht lange genug vorliegen, um wirksam zu sein. β -Naphthol ist toxisch, da es eine phenolische Verbindung ist. Albumin ist ungeeignet, da es unerwünscht stark die Nieren belasten und dort eine beträchtliche Schädigung der Glomerulie bewirken würde. Das nichtsteroide entzündungshemmende Mittel häufig zu Magenschäden führen, sollten sie von Vorteil bei jeder Therapie vermieden werden, welche über längere Zeit eine prophylaktische orale Darreichung erfordert, wie dies häufig bei cardiovaskulären Behandlungen erwünscht ist.

Silver et al. scheinen zu folgern, dass die Arachidonsäure einen wichtigen Platz bei der Blutstillung und Thrombose einnimmt und dass ihre Wirkungen in vitro durch verschiedene Verbindungen, insbesondere durch Albumine, gehemmt werden können. Sie vermuten, dass Albumin ein wesentlicher Kontrollfaktor bei der Haemostase ist und dass die Fähigkeit des Albumins, die Arachidonsäure im zirkulierenden Blut zu binden, der Weg ist, durch den es die Wirkungen der Arachidonsäure hemmt. Ferner nehmen sie an, dass die netzbindende Fähigkeit des Albumins für Arachidonsäure beispielsweise von dem Vorhandensein bindender Stellen und Gegenpunkte zwischen Arachidonsäure, anderen Fettsäuren und anderen Substanzklassen für diese bindenden Stellen abhängen kann. Vermutlich werden, je mehr konkurrenzierende Substanzen verfügbar sind, insbesondere andere Fettsäuren, um so mehr freie Arachidonsäure für die Auslösung der Thrombozytenaggregation zur Verfügung stehen. Werden deshalb diese Phänomene miteinander in Verbindung gebracht, um so wahrscheinlicher findet eine Thrombusbildung statt. Es liegt deshalb nahe, dass andere Fettsäuren aus der Nahrung entfernt werden sollten.

Es sind bereits Versuche gemacht worden, beim Menschen die Wirkungsweisen verschiedener Fettsäuren auf Krankheiten, welche eine Thrombusbildung einschliessen, zu erforschen, aber es konnten noch keine klaren Schlüsse gezogen werden.

So wurde beispielsweise das Norwegian Vegetable Oil Experiment von 1965–66 vor der Arbeit von Silver et al. durchgeführt und wovon durch H. Natvig, Chr. F. Borchgrevink et al. in Scand. J. Clin. Lab. Invest. 22 Suppl. 105 (1968) Seiten 1 bis 20 berichtet. Die Studie verglich die Wirkungen auf die menschlichen Sterblichkeitsziffern, verursacht durch verschiedene coronare Herzkrankheiten, einschliesslich Herzinfarkt, im Vergleich mit zwei Diäten, wobei die eine Sonnenblumensamenöl (ungefähr 63% Linolsäure) und die andere Leinsamenöl (ungefähr 55% Linolensäure) enthielt. Dabei wurden jeweils täglich 10 ml des jeweiligen Öls genommen. Die Gruppe, welche die stärker ungesättigte Linolensäure nahm, wurde als die risikoreichere Gruppe erkannt, als die Gruppe, welche die Linolsäure nahm.

Die Linolsäure und bei Ratten, die Eikosapentaensäure und die Docosahexaensäure, setzen bekanntlich den Cholesterinspiegel im Blutplasma herab, von dem man glaubt, dass er mit der Atherosklerose zusammenhängt. Atherosklerose wird häufig bei Personen gefunden, welche an einem Herzinfarkt litten. Jedoch scheint kein kausaler Zusammenhang vorzuliegen, da Robertson [Lancet, Band i (1959) Seite 44] feststellte, dass in Jamaika, obwohl dort bei der eingeborenen Bevölkerung bei der Autopsie regelmässig eine ausgedehnte Atherosklerose gefunden wurde, die sehr selten mit sekundären Thromben oder mit einem Herzinfarkt verbunden sind. Ferner können Herzinfarkte auch in Abwesenheit einer stark entwickelten Atherosklerose auftreten.

Ein weiterer möglicher Nahrungsmittelfaktor, welcher naheliegt, eine Thrombose zu hemmen, ist die DHLA [P. B. Kernoff, A. L. Willis, K. J. Stone, J. A. Davis und G. P. McNicol, British Med. J., Band 2, (1977) Seiten 1441 bis 1444]. Die DHLA ist eine biosynthetische Vorstufe des Prostaglandins E₁ (PGE₁), welche eine starke Hemmwirkung auf die Thrombozytenaggregation ausübt und von dem man sagt, dass es als Antithrombosedmittel geeignet sei. Es stellte sich heraus, dass dabei, wie erhofft, ein Anstieg (im Mittel 55%) bei der Bildung des erwünschten PGE₁ auftrat, wobei jedoch bei 6 der 8 untersuchten Menschen eine Zunahme (im Mittel 33%) der Bildung des unerwünschten Prostaglandins E₂ (PGE₂) festgestellt wurde. Darüber hinaus standen diese Resultate nicht in einem Zusammenhang mit der Dosierung. Darüber hinaus bestand auch eine Herabsetzung der Heparin-neutralisierenden Wirkung des Plasmas, und man hat herausgefunden, dass diese Wirkung bei thrombotischen Zuständen besonders gross ist. Jedoch wusste der Autor nichts von dem Mass, in dem die Heparin-neutralisierende Wirkung die grundlegenden pathologischen Mechanismen widerspiegelt, und so war ihr Verhältnis zur Thrombose unklar.

Die Autoren der Schrift vermuteten theoretisch, dass «vielleicht kleine Dosen DHLA gleich, wenn nicht wirksamer als grössere Nahrungsmittelmanipulationen für die Verhütung oder Behandlung dieser Zustände», d.h. Atherosklerose und coronare Herzkrankheiten, seien. Jedoch war der Autor eines Leitartikels in derselben Ausgabe des Journals (Seiten 1437 und 1438) vorsichtiger und gab dem Gedanken Ausdruck, dass «Versuche mit den Wirkstoffen und Diäten, welche den Thrombozyten-Prostaglandin-Mechanismus modifizieren, zuerst durchgeführt werden müssen, bevor eine Aussage über die von McNicol und seinen Kollegen erhaltenen Resultate irgendeine klinische Anwendung finden können». Die Gründe für seine Vorsicht lagen in der bestehenden Unkenntnis der Mechanismen, welche bei throm-

botischen Zuständen *in vivo* vorliegen, wenn die Forschungstests nur mit entnommenem Blut durchgeführt worden sind.

Diese mindestens teilweise attraktive Arbeit mit DHLA lässt an der weitverbreiteten Ansicht zweifeln, dass ungesättigte Fettsäuren in der Nahrung nützlicher seien als ihre gesättigten Analoge, insbesondere wie die sogar wenig gesättigte Linolsäure und Linolensäure, die zur DHLA im Stoffwechsel übergeführt werden können. Dieser Zweifel wird durch die Tatsache noch verstärkt, dass die unerwünschte Arachidonsäure (siehe Silver et al. und Kernoff et al. l.c.) sogar ungesättigter ist (4 Kohlenstoff-Kohlenstoff-cis-Doppelbindungen) als die DHLA (3 cis-Kohlenstoff-Kohlenstoff-Doppelbindungen).

Es wurde nun überraschenderweise gefunden, dass unter den vielen Fettsäuren die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder ihre pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide dazu verwendet werden können, um eine wirksame Behandlung oder eine wirksame Prophylaxe gegen thrombo-embolische Zustände, nachfolgend einfach als Thrombosen bezeichnet, vorzunehmen. Beispiele von Krankheitszuständen, für die diese Befunde von Nutzen sein können, sind z. B. die Behandlung oder Prophylaxe einer cardiovaskulären Erkrankung, die durch die Bildung eines Thrombus oder von Thromben vermittelt ist, wie beispielsweise ein Herzinfarkt, ein Schlaganfall oder tiefe Venenthrombose während chirurgischer Operationen.

Es wurde gefunden, dass die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure (nachfolgend der Einfachheit halber als Eikosapentaensäure bezeichnet, auch unter dem Namen Ikosapentaensäure bekannt) die Blutungszeit bei Kaninchen, wenn sie ihnen intravenös injiziert wird, verlängert, wodurch aufgezeigt werden kann, dass die Tendenz des Blutes, Thromben zu bilden oder an verletztem Gewebe anzuhafsten, verringert wird, wodurch wiederum eine Modifizierung und/oder Kontrolle der Wundheilung ermöglicht wird. Wird die Eikosapentaensäure in Kaninchenglungen infundiert, so bewirkt dies die Bildung einer Substanz, welche eine sehr starke aggregationshemmende Wirkung auf Thrombozyten besitzt.

Die Eikosapentaensäure weist auch die unübliche und wichtige Fähigkeit auf, bereits gebildete Thromben oder Thrombozytenaggregate zu dispergieren oder zu verteilen. So liess man beispielsweise Blut eines anästhesierten Kaninchens über einen kontinuierlich gewogenen Kollagenstreifen aus der Achillessehne eines anderen Kaninchens trüpfeln. Sobald das Blut über den Streifen floss, begannen Thrombozyten und andere Zellen an ihm haften zu bleiben und einen Thrombus zu bilden, bis kein weiterer Gewichtsanstieg auf dem Streifen mehr erfolgte. Das Blut wurde unter Schwerkraft dem ersten Kaninchen wieder zugeführt. Wurde Eikosapentaensäure in das Blut infundiert während es über dem belasteten Streifen floss, so konnte eine Gewichtsabnahme beobachtet werden, was zeigte, dass mindestens Teile der aggregierten Thrombozyten und anderer Zellen von dem belasteten Streifen abgelöst worden sind. Diese Fähigkeit der Eikosapentaensäure, eine Dispersion oder eine Zerteilung des Thrombus zu bewirken, ist sowohl für die Behandlung als auch für die Prophylaxe einer Thrombose wichtig. Wird in einer Arterie oder Vene ein Thrombus gebildet, so tritt eine Verminderung des Blutstromes ein, wobei der Blutstrom auch vollständig aufgehalten werden kann, wenn das Gefäß total verschlossen wird. Diese Reduktion des Blutstromes bringt eine Ischämie mit sich, welche Schmerzen verursacht. Der reduzierte Blutstrom kann jedoch therapeutisches Material zum Sitz der Thrombenbildung bringen. In vivo kann nun der restliche Blutstrom mit Eikosapentaensäure und jeder Blutstrom im kollateralen

Kreislauf die Säure zum Sitz der Thrombenbildung bringen, wo die Eikosapentaensäure und ihre Metaboliten den Thrombus zerteilen und den vollen Blutstrom wieder herstellen können. Demnach kann mittels der vorliegenden Verbindung ein Verfahren angegeben werden, mittels dessen der volle Blutstrom in einem teilweise verschlossenen Blutgefäß durch Verabreichung von Eikosapentaensäure wieder hergestellt wird. Die Darreichung kann auch prophylaktisch erfolgen, um die Blutgefäße sauberzuhalten.

Ferner wurde gefunden, dass menschliche Thrombozyten, wenn sie mit Eikosapentaensäure voraus inkubiert wurden und sodann mit Arachidonsäure inkubiert und mit ADP stimuliert werden, weniger leicht aggregieren, als wenn die Vorinkubation mit Arachidonsäure durchgeführt wird. Dies liess vermuten, dass menschliche Thrombozyten, wenn sie mit Eikosapentaensäure «grundiert» werden könnten, weniger anfällig für die ADP-Stimulierung sein würden und somit weniger zur Thrombenbildung neigen würden.

Es wird angenommen, obwohl nicht erwünscht ist, bei dieser Annahme behaftet zu werden, dass *in vivo* die Eikosapentaensäure im Gegensatz zur Arachidonsäure nicht nur selbst eine aggregationshemmende Wirkung auf die Thrombozyten besitzt, sondern dass auch ihre Metaboliten, vermutlich die Prostaglandine der Δ-17-Reihen, eine aggregationshemmende Wirkung auf die Thrombozyten besitzen oder schlimmstenfalls eine reversible zusammenballende Wirkung aufweisen. Dahingegen haben viele Metaboliten der Arachidonsäure, wie beispielsweise PGH₂ und TXA₂, eine irreversible aggregationsbildende Wirkung auf Thrombozyten. Es wird vermutet, dass dieses antiaggregierende Netzprofil für die Eikosapentaensäure für ihre überraschend nützlichen Eigenschaften verantwortlich ist.

Die für eine therapeutische oder prophylaktische Wirkung notwendige Dosierung der Eikosapentaensäure hängt von der Darreichungsform und der Art des zu behandelnden Zustandes ab, liegt aber im allgemeinen bei mindestens 1 g, vorzugsweise 1,5 bis 7,5 g, täglich, am besten bei 2 bis 6 g, z. B. 5 g, pro Tag. Dies ist die Dosis für einen Menschen mit einem Durchschnittsgewicht von 70 kg. Die Dosis für andere Menschen oder Tiere variiert im allgemeinen jeweils aufgrund ihres Gewichtes, d. h. von etwa 20 bis 100 mg/kg Körpergewicht.

Eikosapentaensäure kann ausserhalb eines Körpers zirkulierendem Blut zugesetzt werden, um im wesentlichen oder vollständig die Aggregation der Thrombozyten zu verhindern, die durch den Kontakt mit der Maschine oder mit anderem nichtgeweblichem Material verursacht wird.

Man weiss, dass die Eikosapentaensäure in Austern und anderen Meerestieren, in Dorschlebertran und in anderen Ölen, z. B. in Menhadenöl, vorkommt, woraus sie nach den bekannten und beschriebenen Verfahren extrahiert werden kann. Die Eikosapentaensäure kann auch nach den herkömmlichen Herstellungsverfahren der organischen Chemie synthetisiert werden. Die jeweils gewählte Herstellungsweise hängt von der Verfügbarkeit geeigneter Ausgangsmaterialien und von den relativen Kosten der verschiedenen zur Verfügung stehenden Herstellungsverfahren ab, um eine Eikosapentaensäure der richtigen Qualität für die Verwendung in der Human- oder Veterinärmedizin zu erhalten. Bei den Extraktions- und Synthesemethoden sollte darauf geachtet werden, dass man die Isomerisierung der cis-Doppelbindungen in die trans-Doppelbindungen vermeidet oder aber niedrig hält.

Die natürlich vorkommenden Mengen Eikosapentaensäure oder die einfach zu extrahierenden Materialien, wie beispielsweise Dorschlebertran oder Menhadenöl, sind derart, dass es nicht möglich ist, die gewünschte Menge Eikosapentaensäure durch Verabreichung der Materialien zu er-

halten, da man sonst zuviel Kalorien in Form anderer Fettsäuren verabreichen würde. Darüber hinaus sind Lebertran und andere Fischöle reich an Vitamin A [mindestens 850 Internationale Einheiten (I.E.) pro Gramm] und an Vitamin D (mindestens 85 I.E. pro Gramm), so dass es bei der Verabreichung einer Menge Dorschlebertran, die ausreicht, um die nötige Menge Eikosapentaensäure zu verabreichen, dazu führen würde, dass die Vitaminmengen die empfohlene Tagesdosis für Menschen in einem Ausmass überschreiten würde, welches zu einer Hyper-Vitaminose führen würde. Die empfohlenen Tagesdosen für Vitamin A sind 5000 I.E. und für Vitamin D 400 I.E. beim Menschen. In den USA hat die Food and Drugs Administration festgelegt, dass die tägliche Einnahme von Vitamin A 10 000 I.E. und von Vitamin D 400 I.E. nicht überschreiten sollte. Mengen oberhalb dieser empfohlenen Werte erfordern die Verschreibung durch einen Arzt.

Um Komplikationen zu vermeiden, die dadurch auftreten könnten, wenn der Empfänger Vitamindosen aus anderen medizinischen Gründen oder aus eigener Initiative heraus erhält, wird vorzugsweise eine Zubereitung hergestellt, die die Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff enthält, wobei die Zubereitung im wesentlichen frei von Vitaminen ist.

Aufgrund der komplexen und in einem gewissen Mass ungewissen Wirkungsweisen der weniger ungesättigten Säuren als die Eikosapentaensäure wird vorzugsweise eine Zubereitung vorgesehen, welche die Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff enthält, wobei die Zubereitung im wesentlichen frei von anderen weniger ungesättigten Säuren oder deren Salzen, Estern oder Amiden ist. In der Eikosapentaensäure, welche man aus natürlichen Quellen, wie beispielsweise Fischölen, gewinnt, ist für gewöhnlich ein Anteil an (All-Z)-7,10,13,16,19-Docosapentaensäure (nachfolgend als Docosapentaensäure bezeichnet) und/oder (All-Z)-4,7,10,13,16,19-Docosahexaensäure (nachfolgend als Docosahexaensäure bezeichnet) enthalten, wobei diese in freier Form oder als ihre Derivate, d. h. als ihre Ester, Salze oder Amide, vorliegen können. Es ist nicht notwendig zu versuchen, diese gleich oder stärker ungesättigten Säuren oder ihre Derivate zu entfernen, da anzunehmen ist, dass sie in gleicher Weise wie Eikosapentaensäure wirken, jedoch weniger aktiv sind.

Die oben erwähnte übermäßige Kalorieneinnahme, wenn beispielsweise Dorschlebertran oder Menhadenöl als Quelle für Eikosapentaensäure verwendet wird, kann im wesentlichen vermieden werden, obwohl eine gewisse Kontrolle der Kalorieneinfnahme in der Nahrung noch notwendig sein kann, wenn man eine Zubereitung verabreicht, welche Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff enthält, wobei mindestens 50%, z. B. mehr als 56 Gew.-%, des Fettsäureanteils der Zubereitung durch die Eikosapentaensäure gestellt wird. Soll jedoch die Eikosapentaensäure ohne Änderung der Diät des Patienten verabreicht werden, so sollte die Säure (und jede Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure) zu mindestens 90 Gew.-%, vorzugsweise mindestens 95 Gew.-%, oder vollständig den Fettsäuregehalt des verabreichten Materials ausmachen.

Arachidonsäure sollte vorzugsweise abwesend sein oder höchstens 5% des Fettsäuregehaltes ausmachen. So enthält beispielsweise eine Vorzugsqualität der Eikosapentaensäure wenigstens 90% dieser Säure und etwa 2% Arachidon- und Dihomo- γ -linolensäure und zum Ausgleich Docosahexaen-

säure, Docosapentaensäure, Palmitinsäure oder Ölsäure und andere pharmazeutisch annehmbare Fettsäuren. Liegen Vitamine vor, was sein kann, so sollten sie vorzugsweise nicht in Mengen vorliegen, die ihre empfohlene Tagesdosis überschreiten würde.

Die Zubereitungen der vorliegenden Erfindung sollten auch frei von gesättigten Fettsäuren und ihren Salzen, Estern oder Amiden sein. Vorzugsweise sollten die Zubereitungen frei von unverseifbarem Material sein.

- 10 Wird die Eikosapentaensäure in einer Menge von mindestens 50%, vorzugsweise mindestens 90%, des Fettsäureanteils verabreicht, so sollte es möglich sein, eine wesentliche Änderung der Nahrung des Patienten zu vermeiden, außer, dass vielleicht der Kaloriengehalt der Nahrung etwas reduziert wird, um die von der Eikosapentaensäure und den anderen Fettsäuren stammenden zusätzlichen Kalorien zu kompensieren. Bei Bedarf kann es jedoch möglich sein, die Eikosapentaensäure zu verabreichen, indem man beispielsweise Butter und/oder gewöhnliche Margarine durch eine
- 15 Spezialmargarine, beispielsweise des Emulsionstyps, ersetzt, die derart zusammengesetzt ist, dass bei normaler Verwendung der Empfänger die erforderliche Menge Eikosapentaensäure aufnehmen würde. Speiseöle und Fette könnten ebenfalls auf die gleiche Weise mit einem Gehalt an Eikosapentaensäure hergestellt werden. Erfindungsgemäße Speiseöl- und Fettzubereitungen sind in den Patentansprüchen 21 und 22 angegeben.

Die Eikosapentaensäure und andere Säuren brauchen nicht als reine Säuren verwendet werden, sondern können auch als ihre pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide verwendet werden, welche als ihre Säureäquivalente berechnet würden. Es können Ester oder Amide, die in vivo in die Säure übergeführt werden können, und andere pharmazeutisch annehmbare Produkte verwendet werden, wobei der bevorzugte Ester der Triglycerid- oder Äthylester ist, jedoch kann auch der Methylester unter Umständen verwendet werden. Der zu der Veresterung der Säure verwendete Alkohol sollte vorzugsweise nicht polymer sein und vorzugsweise nicht mehr als drei Hydroxygruppen im Molekül aufweisen. Weiter sollte der verwendete Ester vorzugsweise kein Cholesterylester sein, da dies zu etwas freiem Cholesterin führen könnte, der wiederum zu einem Ansteigen des Serumcholesterinspiegels führen könnte. Aus dem gleichen Grund sollte die vorliegende Zubereitung vorzugsweise frei von Cholesterin sein, und zwar frei von der freien Form oder frei von einem Derivat, welches im Körper des Empfängers in freies Cholesterin übergeführt werden könnte. Die bevorzugten Salze sind das Natrium- oder Kaliumsalz oder alle anderen pharmazeutisch annehmbaren festen Salze, da diese für die Herstellung von Tabletten besser geeignet sind. Tabletten können ein pharmazeutisch annehmbares festes Derivat, z. B. ein Salz, der Eikosapentaensäure enthalten. Da die Eikosapentaensäure stark ungesättigt ist, sind sie und ihre Derivate leicht oxydierbar und die Zubereitungen, welche sie enthalten, sollten deshalb vorzugsweise ebenso ein Antioxidans, wie beispielsweise butyliertes Hydroxytoluol, butyliertes Hydroxyanisol, Propylgallat, ein pharmazeutisch annehmbares Chinon und α -Tokopherol, enthalten. Einige Antioxidantien können auch die anti-thrombo-embolische Wirkung unterstützen.

Obwohl vorzugsweise der Wirkstoff Eikosapentaensäure oder ihre Salze, Ester oder Amide oral verabreicht werden, da dies eine herkömmliche Art der routinemässigen Darreichung ist, kann der Wirkstoff auch auf jede andere Weise verabfolgt werden, mittels der er erfolgreich absorbiert werden kann, z. B. parenteral (d. h. subkutan, intramuskulär oder intravenös), rektal oder bei Frauen vaginal.

Obwohl es bei dem vorliegenden Wirkstoff möglich ist,

ihn als Rohprodukt oder als einfache Mischung der Komponenten zu verabreichen, so wird er doch vorzugsweise als pharmazeutische Zubereitung präsentiert. Die Zubereitungen sowohl für die Verwendung in der Veterinär- als auch der Humanmedizin enthalten im vorliegenden Fall den Wirkstoff wie oben definiert zusammen mit einem oder mehreren annehmbaren Trägerstoffen und gegebenenfalls anderen therapeutischen Ingredienzen. Der oder die Trägerstoffe müssen «annehmbar» im Hinblick auf ihre Verträglichkeit mit den anderen Bestandteilen der Zubereitung sein und für den Empfänger nicht schädlich sein. Zubereitungen, welche die Eikosapentaensäure selbst enthalten, sind vorzugsweise nicht wässrig. Einzeldosen, z. B. Tabletten oder Kapseln, einer Zubereitung enthalten für gewöhnlich 0,25 bis 1,0 g, z. B. 0,5 g, des Wirkstoffs. Im allgemeinen werden täglich drei Dosen verabreicht. Verwendbare Zubereitungsformen sind Arzneiformen für die orale, rektale, vaginale und parenterale (einschliesslich subkutane, intramuskuläre oder intravenöse) Darreichung.

Da die Eikosapentaensäure selbst eine Flüssigkeit und unschmackhaft ist, wird sie vorzugsweise oral in einer Kapsel, z. B. in einer Weichgelatinekapsel, verarbeitet, so dass die Eikosapentaensäure nicht geschmeckt werden muss. Die Kapsel soll zweckmässig so gross sein, um die erforderliche Dosis Eikosapentaensäure in einer, zwei oder drei Kapseln bei jeder Einnahme zu verabreichen. Deshalb ist die Kapselgrösse für gewöhnlich etwa 0,5 ml. Eine andere Art, den Geschmack der Säure zu vertuschen, besteht darin, sie zu einer Emulsion zu verarbeiten, die oral genommen werden kann. Die Säure könnte auch derart zubereitet werden, dass sie bei der oralen Einnahme unmittelbar vorher emulsiert ist oder vor der Verabreichung verdünnt werden kann. Eine Emulsion könnte auch als der Mehrfachtyp vorliegen, so könnte beispielsweise die Säure in eine Öl-in-Wasser-Emulsion mit einem pharmazeutisch annehmbaren oberflächenaktiven Mittel gebracht werden und sodann die Emulsion weiter in einem anderen Öl, z. B. Erdnussöl, emulgiert werden. Anderseits könnte die Säure auf die gleiche Weise in eine Wasser-in-Öl-Emulsion gebracht werden und sodann diese Emulsion wiederum in Wasser emulgiert werden. Die verschiedenen Emulsionsarten könnten als orales Gel oder als steife Emulsion, wie beispielsweise eine Emulsionsmargarine, präsentiert werden. Andere Methoden zur Vertuschung des Geschmacks bestehen darin, die Säure auf einem oder mehreren Trägerstoffen zu absorbieren, wie beispielsweise auf Kaolin, Kreide, Calciumphosphat, Calciumsulfat, Stärke, einer mikro-kristallinen Cellulose oder auf Methyl- oder anderer modifizierter Cellulose. Das resultierende Pulver könnte als solches oder aromatisiert verkauft werden und vielleicht zu Tabletten oder Kapseln verarbeitet werden, wobei jede Tablette oder Kapsel beispielsweise 0,5 g Eikosapentaensäure als solche oder in Form eines festen Derivats enthält. Tabletten können einen Film- oder Zuckerüberzug aufweisen.

Was die Salze, z. B. die Natrium- oder Kaliumsalze, betrifft, so neigen auch sie dazu, unschmackhaft zu sein. Deshalb sollten Tabletten, die sie enthalten und beispielsweise 0,5 g Säure aufweisen, vorzugsweise einen Film- oder Zuckerüberzug aufweisen. Andere orale Darreichungsformen, z. B. Cachets oder Lutschtabletten, können unter gegebenen Umständen auch verwendet werden. Die Ester oder Amide können auf die gleiche Weise wie die Säuren oder die Salze zubereitet werden, je nachdem, ob sie flüssig oder fest sind.

Bei Bedarf kann eine orale Zubereitung mit fortlaufender Wirkstofffreigabe hergestellt werden, beispielsweise in Form von Kügelchen oder Mikrokapseln in einer Kapsel.

Eine Zubereitung zur intramuskulären Darreichung könnte in Form einer Emulsion vorliegen. Eine Zubereitung

zur intravenösen Injektion könnte in Form einer Mixtur vorliegen, welche bei der Injektion spontan emulgieren würde.

Für die rektale Darreichung könnten die Säuren oder ihre Derivate zu einem Suppositorium mit einer Triglyceridgrundlage eingebracht werden, beispielsweise mit Kakaobutter, «Witepsol» oder «Suppocire» oder in eine Weichgelatine-Suppositorienkapsel gegeben werden.

Die Zubereitungen können für gewöhnlich in Einzeldosisform vorliegen und auf jede bekannte Art *lege artis* hergestellt werden. Bei jeder Zubereitung wird der Wirkstoff in Verbindung mit dem Trägerstoff, der aus einem oder mehreren Hilfsstoffen besteht, in Verbindung gebracht. Im allgemeinen werden die Zubereitungen durch einheitliches und inniges Vermischen des Wirkstoffes mit den flüssigen Trägerstoffen oder den feinverteilten festen Trägerstoffen oder mit beiden hergestellt und sodann, falls notwendig, das Produkt in die gewünschte Form gebracht. In der vorliegenden Beschreibung umfasst der Ausdruck «Trägerstoff» einen Stoff, der für die Darreichung an einem Patienten geeignet ist und im wesentlichen den Wirkstoff einschliesst, z. B. die Kapselform oder den Überzug bei einer überzogenen Tablette.

Um die Wirksamkeit der Eikosapentaensäure noch zu verbessern, kann die Zubereitung auch einen Phosphodiesterasehemmer, wie beispielsweise Theophyllin oder Dipyridamol, enthalten.

Demgemäss umfasst die vorliegende Erfindung:

a) eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff, wobei mindestens 50% des Fettsäuregehaltes der Zubereitung die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure (d. h. als solche oder als ihre Salze, Ester oder Amide) ausmacht;

b) eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff, wobei die Zubereitung im wesentlichen frei von Vitaminen ist;

c) eine pharmazeutische Zubereitung, enthaltend (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer pharmazeutisch annehmbaren Salze, Ester oder Amide und einen pharmazeutisch annehmbaren Trägerstoff, wobei die Zubereitung im wesentlichen frei von anderen, weniger ungesättigten Säuren (d. h. als solche oder als ihre Salze, Ester oder Amide) ist;

d) ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zubereitung entsprechend a), b) oder c); und

e) eine Speiseöl- oder Fettzubereitung, beispielsweise eine Margarine- oder Butterzubereitung, welche die (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer Salze, Ester oder Amide in einer Menge enthält, dass die Eikosapentaensäure (d. h. als solche oder als ihre Salze, Ester oder Amide) mindestens 3 Gew.-% der Zubereitung ausmachen.

Die erfindungsgemässen pharmazeutischen Zubereitungen oder Speiseöl- oder Fettzubereitungen können verwendet werden:

1) zur Behandlung oder Prophylaxe eines thromboembolischen Zustandes bei einem Säugetier oder Menschen;

2) zur Verlängerung der Blutungszeit bei einem Säugetier oder Menschen;

3) zur Dispergierung oder Zerteilung eines bereits gebildeten Thrombus oder Thrombozytenaggregates in einem Säugetier oder Menschen;

4) zur Modifizierung und/oder Verhütung des Anhaftens von Thrombozyten an verletztem Gewebe bei Säugetieren oder Menschen;

5) zur Rückgabe von Thrombozyten an ein Säugetier

oder einen Menschen, die weniger leicht aggregieren und/ oder leichter voneinander zu trennen sind;

6) zur Errichtung eines ausserhalb des Körpers zirkulierenden Blutkreislaufes zu und von einem Säugetier oder Menschen; bei dem man dem Blut entweder intrakorporal oder extrakorporal eine wirksame Menge (All-Z)-5,8,11,14,17-Eikosapentaensäure oder eines ihrer Salze, Ester oder Amide zusetzt, um die Aggregation der Thrombozyten entweder im wesentlichen oder vollständig zu verhindern; und

7) zur Wiederherstellung oder Aufrechterhaltung eines vollen Blutstromes in einem teilweise verschlossenen Blutgefäß bei einem Säugetier oder Menschen.

Die Wirkungsweise der Eikosapentaensäure sowie die Ausführung der vorliegenden Erfindung sind in den nachfolgenden Beispielen noch näher erläutert.

Beispiel 1

Aus der vor dem Ellbogen gelegenen Vene wurde Blut freiwilliger Versuchspersonen, welche zwei Wochen vor dem Versuch kein Aspirin genommen hatten, entnommen und in Natriumcitrat (0,11 Mol) aufgenommen, wobei das Verhältnis der Citratlösung zum Blut 1 : 9 betrug. Das Plasma wurde aus dem Blut durch Zentrifugieren bei 160 g (5 Minuten lang) als thrombozytenreiches Plasma (PRP) abgetrennt.

Es wurden Untersuchungen bei den Thrombozyten mit Arachidonsäure (AA), Eikosapentaensäure (EPA) in Form ihres Kaliumsalzes (siehe K. Schröder, S. Moncada, F. B. Ubabu und J. R. Vane in Eur. J. Pharmac. 47 (1978) S. 103] und mit ADP oder mit Thrombin in einer Koagulationsvorrichtung, beispielsweise im «Fibromate» (Bie & Bernsted, Kopenhagen, Dänemark) durchgeführt.

Die Aggregation wurde sowohl turbidimetrisch als auch nephelometrisch in einer zylindrischen Küvette registriert, wobei letztere 300 µl PRP bei 37 °C enthielt und magnetisch bei 800 Umdrehungen/Minute gerührt wurde. Anderseits wurde ein «Payton»-Doppelkanal-Aggregometer mit 500 µl PRP verwendet.

Im Gegensatz zu AA bewirkte EPA keine Aggregation in menschlichem PRP in Konzentrationen des EPA von 1,33, 2,66 und 5,3 mMol, wobei diese Konzentrationen 4mal oder um noch ein Vielfaches grösser waren als die der AA (0,33, 0,66 und 1,3 mMol). Bei niedrigeren Konzentrationen im Bereich von etwa 0,01 bis 0,5 mMol hemmte die EPA etwas die durch ADP (2 µMol) in menschlichem PRP induzierte Thrombozytenaggregation.

Die aggregationshemmende Wirkung der EPA (0,065 mMol) beruhte jedoch nicht aufgrund ihrer Umwandlung durch die Thrombozyten-Cyclo-Oxygenase, da die aggregationshemmende Wirkung bei mit Aspirin behandelten Thrombozyten vorlag, welche nicht auf die AA (0,065 mMol) ansprachen, welche aber durch Thrombin (0,04 bis 0,4 E/ml) zusammengeballt worden waren. Die aggregationshemmende Wirkung lag auch in der ersten Aggregationsphase, welche durch ADP (2 bis 5 µMol) bei mit Aspirin behandelten Thrombozyten, vor.

Beispiel 2

Gefäßgewebe (aus der Brust- und Bauchaorta) wurde von frisch getöteten Ratten erhalten. Etwa 100 mg des Gewebes wurde zerkleinert und einmal in eiskaltem Tris-Puffer (0,05 Mol, pH 7,5) gewaschen. Nach dem Prüfen auf seine Fähigkeit, die thrombin-induzierte Thrombozytenaggregation zu hemmen, wenn es zu der Thrombozyten-Küvette gegeben wird, wurde das Gewebe mehrere Male in 10 ml eiskaltem Tris-Puffer gewaschen, um Blut und anhaftende Thrombozyten zu entfernen. Das Gewebe wurde sodann rasch auf -60 °C eingefroren, zu einem groben Pulver zer-

stossen und wiederum in 5 Volumenteilen Tris-Puffer suspendiert. Diese Suspension des vaskulären Gewebes wurde während der Versuche auf Eis gehalten und für Inkubationsversuche verwendet.

5 Von freiwilligen Versuchspersonen, die 3 Tage lang vor der Blutprobe täglich 1,5 g Aspirin genommen hatten, wurde aus der vor dem Ellbogengelenk gelegenen Vene Blut entnommen. Ausser diesem Blut wurden gewaschene menschliche Thrombozyten nach dem von B. B. Vargaftig, Y. Tranier und M. Chignard beschriebenen Verfahren [Prostaglandins, Band 8 (1974) S. 133] gewonnen. Die Aggregationsversuche wurden wie in Beispiel 1 durchgeführt.

Um zu sehen, ob die Suspension des vaskulären Gewebes irgendein Material synthetisieren könnte, welches eine aggregationshemmende Wirkung auf menschliche Thrombozyten aufweist, wurden die auf die oben beschriebene Weise gewonnenen Thrombozyten von Versuchspersonen verwendet, die Aspirin genommen hatten, so dass ihre Thrombozyten keine Prostaglandin-Endoperoxide produzieren könnten, welche vom vaskulären Gewebe dazu verwendet werden könnten, aggregationshemmendes Material zu produzieren. Darüber hinaus wurden gewaschene Thrombozyten verwendet, um jegliche Möglichkeit der Verwendung von AA im Plasma durch das vaskuläre Gewebe zu vermeiden. Unter 15 diesen Bedingungen konnte die aggregationshemmende Wirkung durch das vaskuläre Gewebe nur durch endogen oder exogen hinzugefügte Vorstufen bewirkt werden.

Die oben beschriebene anfängliche Suspension des vaskulären Gewebes (10 bis 50 µl) hemmte die durch Thrombin 30 (0,04 bis 0,4 E/ml) induzierte Aggregation. Diese Hemmwirkung wurde durch wiederholtes Waschen (5- bis 20mal) des Gewebes aufgehoben, wobei letzteres 30 Sekunden lang in einer «Eppendorf-Zentrifuge» zentrifugiert wurde, die überstehende Flüssigkeit abgegossen und in 0,5 ml frischer Pufferlösung resuspendiert wurde. Der Standardwert der Hemmwirkung gegenüber der durch ADP (2 bis 5 µMol) induzierten primären Aggregationsphase oder der durch Thrombin (0,04 bis 0,4 E/ml) induzierten Aggregation konnte durch Zugabe von gewaschenem vaskulärem Gewebe und 35 EPA zu den gewaschenen Thrombozyten von mit Aspirin behandelten Versuchspersonen wiederhergestellt werden. Die Erzeugung der aggregationshemmenden Wirkung wurde durch die Vorbehandlung des gewaschenen vaskulären Gewebes mit Indometacin (5 bis 10 µg/ml) verhindert. So 40 konnte die Cyclo-Oxygenase aus der Gefässwand die EPA zur Erzeugung einer aggregationshemmenden Wirkung verwenden.

Die erzeugte aggregationshemmende Wirkung müsste durch die Verdrängung der endogenen AA durch die EPA 50 und nicht durch die direkte Verwendung der EPA bewirkt worden sein. Jedoch führten die gleichen Konzentrationen von DHLA, welche mit gewaschenem vaskulärem Gewebe inkubiert worden waren, nicht zur Bildung aggregationshemmenden Materials, und somit ersetzt die DHLA nicht die AA.

Beispiel 3 Die Wirkung der Eikosapentaensäure auf die Blutungszeit bei Kaninchen

60 Vier weibliche weisse Neuseeland-Kaninchen (Ranch) mit einem Gewicht von 2,0 bis 2,5 kg wurden mit 40 mg/kg Natrium-pentobarbiturat anästhesiert. In die Randvene des Ohres wurde zur Infusion der Eikosapentaensäure (0,1 ml/ Min.) eine Kanüle eingeführt. Das Kaliumsalz der Eikosapentaensäure (Reinheit 95% und Gehalt an etwa 2% AA und 2% DHLA, Ausgleich-C-18-Fettsäuren) wurde in 65 50 mMol Tris-HCl-Puffer mit einem pH von 8,0 gelöst und lichtgeschützt auf Eis gehalten. Die Infusion entweder des

Tris-Arzneistoffträgers oder der Eikosapentaensäure wurde 5 Minuten vor oder fortlaufend während der Messung der Blutungszeit durchgeführt.

Die innere Oberfläche des Ohres ohne Kanüle wurde sorgfältig rasiert. Das Ohr wurde durchleuchtet, so dass die Blutgefäße klar sichtbar waren. Ungefähr 0,4 cm lange und genügend tiefe Schnitte, um ein Aufwallen des Blutes innerhalb von 15 Sekunden zu bewirken, wurden mit einer neuen Skalpellklinge an einer von sichtbaren Blutgefäßen freien Stelle und in paralleler Richtung zu dem nächsten Blutgefäß gemacht. Der Schnitt wurde alle 15 Sekunden mit Filterpapier (Whatman Nr. 1) sanft abgetupft.

Die Blutungszeit wurde von den ersten 15 Sekunden nach dem Einschnitt an bis zu dem Zeitpunkt gemessen, als keine Blut tropfen auf dem Filterpapier mehr sichtbar waren. Tritt ein Plasmaexudat auf dem Schnitt auf, so wird als Endpunkt die Zeit genommen, zu der das Exudat keine rötliche Färbung mehr aufweist. Beträgt die Blutungszeit länger als 10 Minuten, so wird der Schnitt alle 30 Sekunden abgetupft. Die Blutungszeit jeder Dosis ist das Mittel von drei Bestimmungen.

Zwei Kaninchen wurden 4 Stunden vor dem Versuch mit einer intravenösen Injektion von 100 mg/kg Aspirin vorbehandelt. An zwei Kaninchen wurden auf die gleiche Weise zur Kontrolle 0,5 ml Tris mit einem pH-Wert von 7,5 in 4 ml Kochsalzlösung verabreicht. Die erhaltenen Ergebnisse sind in den Tabellen I und II aufgeführt.

Tabelle 1
Kontrolle, d. h. kein Aspirin

EPA-Dosis µg/kg/Min.	Blutungszeit* Minuten Kaninchen 1	Kaninchen 2
0	3,5	3,0
50		16,0
100	19,8	16,5
200		**23,0

Tabelle 2
Kaninchen, 4 Stunden vor Testbeginn mit I.-v.-Injektion von 100 mg/kg Aspirin vorbehandelt.

EPA-Dosis µg/kg/Min.	Blutungszeit* Minuten Kaninchen 3	Kaninchen 4
0	5,3	4,7
100	7,3	6,3
200	4,5	**7,5

* Mittel aus 3 Bestimmungen

** Infusionsgeschwindigkeit 0,2 ml/Min.

Demzufolge zeigten die mit Aspirin behandelten Kaninchen nur einen geringen oder keinen Anstieg bei der Blutungszeit.

Ein mit 75% reiner EPA behandeltes Kaninchen zeigte ähnliche Ergebnisse aufgrund der niedrigeren Reinheit der Säure.

Beispiel 4

Umwandlung der Eikosapentaensäure im Kreislauf des Hundes

Die intravenöse Infusion der Eikosapentaensäure (0,2 bis 2 mg kg⁻¹ Min.⁻¹) wirkte eine systemische und pulmonale Hypotension bei mit α-Monochloräthylen-D-glukose anästhesierten Hunden. Es ist bekannt, dass isolierte Streifen einer Rinderkoronararterie und einer Kaninchenbauchar-

terie in einem Blutbad durch das stark aggregationshemmende Material PGI₂ (5 bis 10 ng/ml) entspannt werden. Bei der Behandlung mit den Antagonisten von Katecholamine und Angiotensin II entspannen diese in arteriellem Blut gebadeten Gewebe für die biologische Prüfung während der Infusion von Eikosapentaensäure (0,6 bis 2 mg kg⁻¹ Min.⁻¹, 2 Hunde), und zwar durch eine Menge, welche ungefähr 10 bis 20 ng/ml PGI₂ bei den höchsten Werten. Bei einem dieser Hunde bewirkte nach der Verabfolgung von 5 mg/kg Indometacin die darauffolgende Infusion der Eikosapentaensäure (2 mg kg⁻¹ Min.⁻¹ während 10 Minuten) noch eine Hypotension, setzte jedoch keine nachweisbare Wirkung bei den Geweben für die biologische Prüfung frei.

Beispiel 5

Auflösende Wirkung der Eikosapentaensäure bei Kaninchen

2 bis 3 kg schwere Kaninchen wurden mit 30 mg/kg Pentobaritalnatrium anästhetisiert und mit 2000 E/kg Heparin behandelt. Eine Halsschlagader wurde präpariert und Blut entzogen, welches mittels einer Rollenpumpe weiterbefördert wurde, um einen Kollagenstreifen aus der Achillessehne eines anderen Kaninchens zu überfluten. Sobald das Blut über den Sehnenstreifen floss, nahm der Streifen während eines Zeitraumes von 35 Minuten bis zu maximal 180 bis 200 mg an Gewicht zu. Danach beruhte jegliche Gewichtsabnahme auf einer Ablösung der Thrombozyten. Intravenös infundierte Eikosapentaensäure (50 bis 500 µg kg⁻¹ Min.⁻¹) bewirkte bei 5 Kaninchen eine geringfügige ablösende Wirkung auf die Thrombozyten (annähernd 20 mg). Diese Wirkung der Eikosapentaensäure konnte durch die Vorbehandlung der Kaninchen mit Aspirin (150 mg/kg) verhindert werden.

Beispiel 6

Eine Weichgelatinekapsel mit einem Inhalt von etwa 0,5 ml wurde sterilisiert und sodann mit einer Zubereitung aus mehr als 90% EPA, etwa 2% AA, etwa 2% DHLA und dem Palmitinsäuren und Oleinsäuren enthaltenden Ausgleich gefüllt. Die Kapsel wurde sodann verschlossen. Die verwendete Kapsel kann durchsichtig oder gefärbt sein und kann auch aus Hartgelatine oder beispielsweise Polymethylmethacrylat bestehen.

Beispiel 7

Tablettenzubereitung aus:

Natriumsalz der Eikosapentaensäure	281 mg
Stärke	62 mg
Milchzucker	250 mg
Polyvinyl-pyrrolidon	3,5 mg
Magnesiumstearat	3,5 mg
butyliertes Hydroxytoluol	2 ppm
	600 mg

Die Tabletten wurden mit Zucker überzogen, obwohl auch andere Überzugsstoffe verwendet werden könnten.

Beispiel 8

Die in Beispiel 7 beschriebene Zubereitung kann in unverpresster Pulverform auch dazu verwendet werden, um Hartgelatinekapseln mit 600 mg der Zubereitung zu füllen.

Beispiel 9

Etwa 250 g einer herkömmlichen Weichmargarinezubereitung wurde sorgfältig mit 8 g Eikosapentaensäure vermischt, bis eine weiche Konsistenz erzielt wurde.

Beispiel 10

Männlichen Neuseeland-Kaninchen mit einem Gewicht von 2 bis 2,5 kg wurde Aspirin (10 oder 100 mg/kg i.v.) ver-

abreicht. Eine Kontrollgruppe erhielt nur den flüssigen Trägerstoff, der für die Lösung des Aspirins verwendet wurde. 2 bis 4 Stunden später wurden die Tiere mit Pentobarbital anästhesiert, und es wurden die Blutungszeiten auf die in Beispiel 3 beschriebene Weise vor und während der Infusion von EPA (Kaliumsalz, 95% rein wie in Beispiel 3) bei verschiedenen Geschwindigkeiten (1, 50, 200 oder 400 $\mu\text{g kg}^{-1}\text{Min.}^{-1}$) gemessen. Für jeden Versuch wurden 2- oder 3malige Messungen vorgenommen. Die erhaltenen Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 3 aufgeführt. Aspirin (10 mg/kg) bewirkte einen kleinen, aber kennzeichnenden Anstieg der Blutungszeit ($p < 0,0001$). Der Durchschnitt der dreifachen Bestimmung bei 5 Kaninchen betrug 489 ± 27 s (Mittel \pm s.e.m.), vergleichen mit den Kontrollwerten

278 ± 48 s. Der Wert von 288 ± 11 s. bei den mit einer hohen Dosis (100 mg/kg) Aspirin behandelten Tieren war nicht wesentlich höher als bei den Kontrolltieren.

Bei der Gruppe, welche kein Aspirin erhalten hatten, verlängerte die EPA ($1 \mu\text{g kg}^{-1}\text{Min.}^{-1}$) die Blutungszeit um mehr als 100% ($p < 0,00001$). Ein weiterer Anstieg der Blutungszeit wurde bei höheren Infusionsgeschwindigkeiten beobachtet, und es wurde ein Plateauwert von ungefähr 1000 Sekunden bei der Geschwindigkeit von $50 \mu\text{g kg}^{-1}\text{Min.}^{-1}$ erreicht.

Bei den mit Aspirin (10 oder 100 mg/kg) behandelten Tieren versagte die EPA, um eine kennzeichnende Modifizierung der Blutungszeit hervorzurufen.

Tabelle 3

Vorbehandlung	EPA $\mu\text{g kg}^{-1}\text{Min.}^{-1}$	0	1	50	200	400
Nichts	278 ± 48 n=8	642 ± 69 n=5	861 ± 69 n=5	961 ± 87 n=4	1020 ± 89 n=4	
ASA 10 mg/kg	489 ± 27 n=5	607 ± 97 n=5	678 ± 115 n=5	839 ± 160 n=5	693 ± 114 n=4	
ASA 100 mg/kg	288 ± 11 n=3	309 ± 13 n=3	327 ± 82 n=3	428 ± 86 n=4	364 ± 26 n=3	

Mittlere Blutungszeit in Sek. \pm s. e. m.

ASA = Aspirin.

Beispiel 11

Auf die in Beispiel 3 beschriebene Weise wurden die Wirkungen verschiedener Fettsäuren auf die durch $11\alpha,9\alpha$ -Epoxymethan-15-hydroxyprosta-5,13-diensäure (ein Analogon zu PGH₂) (Upjohn) induzierte Aggregation aspirinbehandelter Thrombozyten in menschlichem PRP untersucht.

Bei jedem Testversuch wurde die Fettsäure mit den Thrombozyten etwa 6 Minuten lang inkubiert, bevor das PGH₂-Analogon hinzugefügt wurde. Die verwendete Fett säuremenge betrug etwa 1,5 mMol. Die nach 6 Minuten nach Zugabe des PGH₂-Analogs erhaltenen Hemmungs werte sind in der Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4

Säure	Hemmung %
Eikosapentaensäure	100
(All-Z)-9,12,15-Octadecatriensäure	40
(All-Z)-9,12-Octadecadiensäure	55
(All-Z)-6,9,12-Octadecatriensäure	63
Z-9-Octadecaensäure	68
Kontrolle	0

Die Eikosapentaensäure zeigte bei einer Konzentration von 1,0 mMol eine 100%ige Hemmwirkung und bei einer Konzentration von 0,5 mMol eine etwa 95%ige Hemmwirkung.

Ferner sei noch bemerkt, dass die (All-Z)-9,12,15-Octadecatriensäure und die (All-Z)-6,9,12-Octadecatriensäure,

welche 2,3-Di-nor-Analoga der 11,14,17-Eikosatriensäure und der 8,11,14-Eikosatriensäure sind, welche in der erwähnten Arbeit von Silver et al. (I.c.) verwendet wurden, als aggregationshemmende Mittel, verglichen mit der Eikosapentaensäure, nicht sehr wirksam sind.