(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107050457 A
(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201611034149.7

(22)申请日 2013.01.04

(30)优先权数据
61/583796 2012.01.06 US
61/664047 2012.06.25 US
61/669940 2012.07.10 US
61/680622 2012.08.07 US
61/710517 2012.10.05 US
61/713388 2012.10.12 US

(62)分案原申请数据
201380012754.2 2013.01.04

(71)申请人 翁特拉制药公司
地址 美国特拉华州
申请人 克利塞利斯医药有限公司

(72)发明人 T.J.迈恩斯 B.N.M.马基尔斯 B.M.梅塔 G.维斯勒 M.戴维森 P.R.伍德

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 张宇腾 李炳爱

(51)Int.Cl.
A61K 45/06(2006.01)
A61K 9/48(2006.01)
A61K 31/202(2006.01)
A61K 31/366(2006.01)
A61P 3/06(2006.01)

权利要求书4页 说明书74页 附图40页

(54)发明名称

游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的富含DPA组合物

(57)摘要

本发明涉及一种游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的富含DPA组合物。具体而言,本发明提供采用游离酸形式的多不饱和脂肪酸的富含DPA的药物组合物、它们应用的治疗方法、和从鱼油中精制这些组合物的工艺。还提供通过他汀类与本文中所描述药物组合物的辅助给药来治疗高甘油三酯血症(200 mg/dL-500 mg/dL)的方法。其中更多的治疗方法包括:增加血浆EPA:AA比率的治疗、降低载脂蛋白CⅢ(Apo CⅢ)水平的治疗、和降低并防止对血小板聚集抑制剂的耐药性的治疗。

CN 107050457 A

1.一种药物组合物,其包含:
以至少约50%(a/a)的量含有基本上是游离酸形式的EPA;
以至少约15%(a/a)的量含有基本上是游离酸形式的DHA;
以至少约1%(a/a)的量含有基本上是游离酸形式的DPA。
2.如权利要求1所述的药物组合物,其中DPA是以至少约2%(a/a)的量存在。
3.如权利要求1所述的药物组合物,其中DPA是以至少约2.5%(a/a)的量存在。
4.如权利要求1所述的药物组合物,其中DPA是以至少约3%(a/a)的量存在。
5.如权利要求1所述的药物组合物,其中DPA是以至少约3.5%(a/a)的量存在。
6.如权利要求1所述的药物组合物,其中EPA是以至少约51%(a/a)的量存在。
7.如权利要求1所述的药物组合物,其中EPA是以至少约52%(a/a)的量存在。
8.如权利要求1所述的药物组合物,其中EPA是以至少约53%(a/a)的量存在。
9.如权利要求1所述的药物组合物,其中EPA是以至少约54%(a/a)的量存在。
10.如权利要求1所述的药物组合物,其中DHA是以至少约16%(a/a)的量存在。
11.如权利要求1所述的药物组合物,其中DHA是以至少约17%(a/a)的量存在。
12.如权利要求1所述的药物组合物,其中
EPA是以约55%(a/a)至约56%(a/a)的量存在;
DHA是以约19%(a/a)至约20%(a/a)的量存在;和
DPA是以约4%(a/a)至约5%(a/a)的量存在。
13.一种药物组合物,其包含:
以约50%(m/m)至约60%(m/m)的量,基本上是游离酸形式的EPA;
以约15%(m/m)至约25%(m/m)的量,基本上是游离酸形式的DHA;和
以不小于约1%(m/m)的量,基本上是游离酸形式的DPA。
14.如权利要求13所述的药物组合物,其中:
EPA和DHA是以约70%(m/m)至约80%(m/m)的总量存在。
15.如权利要求14所述的药物组合物,其中:
Ω-3多不饱和脂肪酸是以80%(m/m)至约95%(m/m)的总量存在。
16.如权利要求15所述的药物组合物,其中:
Ω-6多不饱和脂肪酸是以不大于约10%(m/m)的总量存在。
17.如权利要求1所述的药物组合物,其中:
氨基甲酸乙酯,若存在,是以不大于约0.1 ppm的量的氨基甲酸乙酯存在。
18.适合于口服给药的单位剂型,其包含:
胶囊;
其中所述胶囊中包封至少250 mg的权利要求1所述的药物组合物。
19.如权利要求18所述的单位剂型,其中:
所述胶囊包封至少500 mg的权利要求1所述的药物组合物。
20.如权利要求18所述的单位剂型,其中:
所述胶囊包封约1000 mg的权利要求1所述的药物组合物。
21.如权利要求18所述的单位剂型,其中所述胶囊壳包含明胶。
22.如权利要求21所述的单位剂型,其中所述胶囊是软明胶胶囊。

23.如权利要求22所述的单位剂型，其中所述软明胶胶囊壳包含猪A型明胶。

24.如权利要求23所述的单位剂型，其中所述软明胶胶囊壳包含充足的猪A型明胶，使得在40℃下贮存至少3个月后所述胶囊在纯化水中于37℃在不大于30分钟的时间段内崩解。

25.如权利要求23所述的单位剂型，其中所述软明胶胶囊壳的明胶包含至少5%的猪A型明胶。

26.如权利要求23所述的单位剂型，其中所述软明胶胶囊壳的明胶包含至少25%的猪A型明胶。

27.如权利要求26所述的单位剂型，其中所述软明胶胶囊壳包含至少50%的猪A型明胶。

28.如权利要求22所述的单位剂型，其中所述软明胶胶囊具有外部包衣。

29.如权利要求28所述的单位剂型，其中所述包衣不是pH敏感的。

30.如权利要求29所述的单位剂型，其中所述包衣包含聚(丙烯酸酯-甲基丙烯酸甲酯)共聚物。

31.如权利要求30所述的单位剂型，其中所述聚(丙烯酸酯-甲基丙烯酸甲酯)共聚物是Eudragit NE-30D。

32.如权利要求29所述的单位剂型，其中在摄入后30分钟之内无包封药物组合物的大幅度释放。

33.如权利要求32所述的单位剂型，其中在摄入后约60分钟之内有包封药物组合物的显著释放。

34.如权利要求28所述的单位剂型，其中所述包衣是pH依赖性肠溶衣。

35.剂量套件，其包含：

多个如权利要求18所述的单位剂型。

36.如权利要求35所述的剂量套件，其中：

所述剂量套件含有至少60个单位剂型。

37.如权利要求35所述的剂量套件，其中：

所述剂量套件含有至少120个单位剂型。

38.治疗严重高甘油三酯血症的方法，其包括：

以将血清或血浆甘油三酯有效降低到低于治疗前水平的量和持续时间，

向具有≥500 mg/dL的治疗前血清或血浆甘油三酯水平的患者口服给予如权利要求1所述的药物组合物。

39.如权利要求38所述的方法，其中所述有效量为至少约每日2 g。

40.如权利要求38所述的方法，其中所述有效量为至少约每日3 g。

41.如权利要求38所述的方法，其中所述有效量为至少约每日4 g。

42.如权利要求38所述的方法，其中所述有效量为约每日2 g。

43.一种治疗严重高甘油三酯血症的方法，其包括：

以将血清或血浆甘油三酯水平有效降低到低于治疗前水平的量和持续时间，

向具有≥500 mg/dL的治疗前血清或血浆甘油三酯水平的患者口服给予如权利要求13所述的药物组合物。

44.如权利要求43所述的方法，其中所述有效量为至少约每日2 g。

45.如权利要求38所述的方法，其中每日给予所述药物组合物达至少30天。

46.如权利要求43所述的方法，其中每日给予所述药物组合物达至少30天。

47.如权利要求38所述的方法，其中采用一个或多个如权利要求20所述的单位剂型的形式而给予所述药物组合物。

48.如权利要求38所述的方法，还包括：

口服给予有效量的他汀类。

49.如权利要求48所述的方法，其中所述他汀类选自：普伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀、阿托伐他汀、氟伐他汀、罗苏伐他汀、和匹伐他汀。

50.通过他汀类疗法来治疗具有约200 mg/dL至约500 mg/dL的血清或血浆甘油三酯水平的患者的方法，其包括：

口服给予有效量的他汀类，和

口服给予有效量的权利要求1所述的药物组合物。

51.在通过他汀类疗法来治疗具有约200 mg/dL至约500 mg/dL的血清或血浆甘油三酯水平的患者的方法中，所述改进包括：

辅助地给予有效量的权利要求1所述的药物组合物。

52.如权利要求50所述的方法，其中权利要求1所述的药物组合物的有效量为至少约每日2 g。

53.如权利要求50所述的方法，其中权利要求1所述的药物组合物的有效量为至少约每日3 g。

54.如权利要求50所述的方法，其中权利要求1所述的药物组合物的有效量为至少约每日4 g。

55.如权利要求50所述的方法，其中权利要求1所述的药物组合物的有效量为约每日2 g。

56.一种治疗具有升高的治疗前血清或血浆甘油三酯的患者的方法，所述方法包括：

以将血浆中花生四烯酸(AA)浓度有效降低至少约5%的量和持续时间，给予权利要求1所述的药物组合物。

57.如权利要求56所述的方法，其中以将血浆花生四烯酸浓度有效降低至少约10%的量和持续时间给予所述药物组合物。

58.如权利要求56所述的方法，其中以将血浆花生四烯酸浓度有效降低至少约20%的量和持续时间给予所述药物组合物。

59.治疗具有升高的治疗前血清或血浆甘油三酯的患者的方法，所述方法包括：

以将血浆花生四烯酸浓度有效降低至少约50 μg/mL的量和持续时间给予权利要求1所述的药物组合物。

60.如权利要求59所述的方法，其中以将血浆花生四烯酸浓度有效降低至少约75 μg/mL的量和持续时间给予所述药物组合物。

61.治疗具有升高的治疗前血清或血浆甘油三酯的患者的方法，所述方法包括：

以将血浆EPA/AA的比率有效提高到至少约0.25的量和持续时间给予权利要求1所述的药物组合物。

62.如权利要求61所述的方法，其中以将血浆EPA/AA的比率有效提高到至少约0.50的

量和持续时间给予所述药物组合物。

63.如权利要求62所述的方法，其中以将血浆EPA/AA的比率有效提高到至少约0.65的量和持续时间给予所述药物组合物。

64.降低血清或血浆ApoCⅢ水平的方法，其包括：

以足以从治疗前水平降低血清或血浆ApoCⅢ的量和持续时间给予权利要求1所述的药物组合物。

65.在制备游离酸形式的多不饱和脂肪酸的药物组合物的方法中，所述改进包括：

使经酯交换鱼油的中间原料经过尿素包合络合的步骤，所述鱼油包含下列的乙基酯类：

EPA，至少约44%(a/a)的量

DHA，至少约14%(a/a)的量，和

DPA，至少约1%(a/a)的量，

其中用于络合的尿素的量是根据式 I(a)、或者根据式I(b)、或者根据式I(a)和式I(b)两者进行计算，其中所述尿素量被设定为在由式I(a)和I(b)的结果所设定并包括其的范围内的值，

$$[\text{尿素}]=F_{\text{富集-DHA}}\times((DHA_{\text{目标}}-DHA\text{-}EE_{\text{输入}})/DHA\text{-}EE_{\text{输入}})) \quad (Ia)$$

$$[\text{尿素}]=F_{\text{富集-EPA}}\times((EPA_{\text{目标}}-EPA\text{-}EE_{\text{输入}})/EPA\text{-}EE_{\text{输入}})) \quad (Ib)，$$

其中$F_{\text{富集-DHA}}$和$F_{\text{富集-EPA}}$各自为约100/0.34。

66.如权利要求65所述的方法，其中：

EPA-EE是以至少约45%(a/a)的量存在于所述中间原料中，

DHA-EE是以至少约15%(a/a)的量存在于所述中间原料中，和

DPA-EE是以至少约2.5%(a/a)的量存在于所述中间原料中。

67.如权利要求65所述的方法，其中所述药物组合物是根据权利要求1所述的药物组合物。

68.根据权利要求1所述的药物组合物，其通过权利要求66所述的方法制造。

游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的富含DPA组合物

本申请是申请号为201380012754.2,申请日为2013年1月4日的发明专利申请的分案申请。

相关申请的交叉引用

[0001] 依据35美国法典§119(e),本申请要求2012年1月6日提交的美国临时专利申请61/583,796、2012年6月25日提交的美国临时专利申请61/664,047、2012年7月10日提交的美国临时专利申请61/669,940、2012年8月7日提交的美国临时专利申请61/680,622、2012年10月5日提交的美国临时专利申请61/710,517、和2012年10月12日提交的美国临时专利申请61/713,388的权益,这些专利申请的全部内容通过援引并入本文中。

1.技术领域

本发明涉及药物领域,特别是涉及一种富含DPA的药物组合物。

2.背景技术

[0002] 业界正在开发富含Ω-3(ω-3或n-3)多不饱和脂肪酸(PUFA)的药物组合物用以治疗多种临床指征。

[0003] 从天然来源(通常是鱼油)中获得的这些产品是异质的组合物并且包含各种类的Ω-3 PUFA、Ω-6 PUFA和其他小组分(包括单不饱和及饱和脂肪酸)。所观察的临床疗效通常归因于该组合物整体,尽管存在于该混合物中的最普遍的PUFA种类(通常是EPA和DHA)被认为贡献了所观察临床疗效中的大部分。因为它们是异质的组合物,所以定义这些产品含有某些必要的多不饱和脂肪酸种类,各在规定的百分率容许(tolerance)范围内。进一步定义该组合物限制某些不希望有的组分,包括来自天然来源(例如某些环境污染物)的那些和有可能在精制工艺中产生的那些组分。

[0004] 最佳组成可能随将应用的临床指征而变化。然而,甚至对于第一个获批准的临床指征,用于严重高甘油三酯血症(TGs>500mg/dl)的治疗的最佳组成仍未确定。

[0005] 因此,用于治疗严重高甘油三酯血症的第一个获批准的药物组合物以大约46:38(EPA:DHA)的重量百分比含有采用乙基酯类形式的Ω-3 PUFA种类二十碳五烯酸(EPA)和二十二碳六烯酸(DHA),其中EPA与DHA一起占到该组合物中全部PUFA种类的大约84%。相反,新近获批准的产品Vascepa®(以前称为AMR101),其被批准用于相同的临床指征,是乙基酯形式的纯EPA>96%的,基本上没有DHA。作为膳食补充剂销售并且部分宣传有助于降低甘油三酯水平的营养食品产品OMAX3,以大约4.1:1的重量比含有EPA和DHA,其中EPA和DHA同样地采用乙基酯的形式,该制剂具有多于84%重量的EPA和DHA及大于90%重量的Ω-3脂肪酸。

[0006] 组合物中的这些宽范围变化反映出用于此临床指征的最优组成的持续不确定性。

[0007] 该不确定性部分是由于相互矛盾的临床目的所致。例如,已知Ω-3 PUFA种类DHA在降低血清甘油三酯方面比EPA更强效,但已知其在提高低密度脂蛋白(LDL)水平方面具有更强的倾向,Mori等人,Am.J.Clin.Nutr.71:1085-94(2000),Grimsgaard等人,

Am.J.Clin.Nutr.66:649-59(1997);LDL的升高被认为在临床上对于具有升高的心血管病风险的受试者是不利的。尽管利用Ω-3 PUFA降低血小板聚集和血栓形成在临床上常常是期望的,但可能的出血时间延长促使某些人提出向富含Ω-3 PUFA的药物组合物中添加一定量的Ω-6 PUFA种类,花生四烯酸(AA)。参见美国核准前公开第2010/0160435号。

[0008] 确定最优组成的困难也部分是由于在某些Ω-3 PUFA种类中的酶互换、以及Ω-3与Ω-6多不饱和脂肪酸之间在它们各自从中链膳食PUFA的生物合成途径中对公用酶的竞争所致(见图1)。

[0009] 设计最优组成中的另一个问题是口服给药的PUFA组合物的生物利用度的变化。已知采用乙基酯类形式的PUFA的吸收例如取决于胰脂肪酶的存在,该胰脂肪酶响应脂肪的摄入而释放。因此PUFA乙基酯类的吸收是低效率的,并且在各受试者和任何单独受试者中基于脂肪的饮食摄入量而有大幅变化。参见Lawson等人的"采用甘油三酯类、游离酸类或乙基酯类形式的鱼油脂肪酸的人体吸收(Human absorption of fish oil fatty acids as triacyglycerols,free acids,or ethyl esters)",Biochem Biophys Res Commun.152:328-35(1988);Lawson等人,Biochem Biophys Res Commun.156:960-3(1988)。尤其在低脂肪饮食的受试者中PUFA的吸收减少,该低脂肪饮食是对具有升高的血清甘油三酯水平或患有心血管疾病的受试者提倡的饮食。

[0010] 就任何特别理想的PUFA药物组合物而言,通过设计精制工艺而生产最终产品,该最终产品具有在预定百分率容许范围内的必要脂肪酸组分并且将某些不希望有的组分限制到低于某些预定容许限的水平,并且具有足够的产率以便使该工艺可适用于工业规模生产且在环境上是可持续的。期望的最终组成中的差异决定了精制工艺中的差异。

[0011] 然而,各种已知的工艺步骤中存在着权衡,该权衡使精制工艺的组成特定的调整和优化变得困难。例如,在乙醇存在下的尿素包合络合(包合作用)经常用于去除饱和及单不饱和长链脂肪酸,从而增加期望的长链Ω-3多不饱和脂肪酸在所形成组合物中的相对比例。太少的尿素降低长链Ω-3 PUFA的富集。然而,过量的尿素可导致无用组分的浓度,并且具有在任何给定的温度和反应时间下导致氨基甲酸乙酯的产生增加的可能性,氨基甲酸乙酯是不允许超过某些规定低限的致癌物。然而,尿素包合的现有替代方法中存在着其他困难。

[0012] 因此,对于富含特别是用于治疗高甘油三酯血症和混合性血脂异常的Ω-3多不饱和脂肪酸的改进药物组合物存在着需求,并对从鱼油中精制这种组合物的改进工艺存在着需求。

3.发明内容

[0013] 在第一方面,本公开提供采用游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的富含DPA药物组合物。DPA含量的富集是工业规模生产过程的非预期和意外的后果。这些富含DPA的药物组合物已被证明在体外实验和人类临床试验中具有优异的药理功效和临床疗效。

[0014] 因此,在另一方面,本公开提供治疗的方法。在一个系列的治疗实施方式中,提供用于治疗严重高甘油三酯血症(TG>500mg/dL)的方法。在另一个系列的治疗实施方式中,提供通过他汀类与本文中所描述药物组合物的辅助给药来治疗高甘油三酯血症(200mg/dL-500mg/dL)的方法。其他治疗方法尤其包括:增加血浆EPA:AA比率的治疗、降低载脂蛋白

CIII(ApoCIII)水平的治疗、和降低或防止对血小板聚集抑制剂的耐药性的治疗。

[0015] 本文中还公开了以工业规模制造所述药物组合物的方法，包括包含尿素包合步骤的方法，在该尿素包合步骤中组成约束批次的经酯交换中间原料经历采用在由新工艺算法所确定范围内的尿素量的尿素包合步骤。

4.附图说明

[0016] 图1示出了由中间(中等)链长度必需脂肪酸生物合成Ω-3和Ω-6长链多不饱和脂肪酸的已知人体内途径。

[0017] 图2是用于制备PUFA乙基酯类中间原料的示例性工艺的流程图。

[0018] 图3A中绘出了通过尿素包合步骤对各类脂肪酸的平均相对纯化，在该尿素包合步骤中将算法确定量的尿素加入到PUFA乙基酯类的组成规定的中间原料中。

[0019] 图3B中示出了在将算法确定量的尿素加入到PUFA乙基酯类的组成规定的中间原料中时各类Ω-3和Ω-6 PUFA乙基酯类的平均差别纯化。

[0020] 图4是说明实施例7中进一步描述的ECLIPSE临床研究的设计的治疗流程图。

[0021] 图5中对在高脂肪和低脂肪餐期中在Lovaza®的单次给药(4g)后总EPA+DHA(基线调整后变化)的生物利用度进行了比较。

[0022] 图6中对在高脂肪饮食期中在(4g)的Lovaza®(“EE-FA”)或Epanova®的单次给药后总EPA+DHA(基线调整后变化)的生物利用度进行了比较，Lovaza®或Epanova®是一种采用游离酸形式(“FFA”)的Ω-3 PUFA的富含DPA组合物。

[0023] 图7中对在低脂肪饮食期中在(4g)的Lovaza®或Epanova®单次给药后的总血浆EPA+DHA浓度(基线调整后变化)进行了比较。

[0024] 图8中对在低脂肪饮食期中在(4g)的Lovaza®或Epanova®单次给药后的总血浆EPA浓度(基线调整后变化)进行了比较。

[0025] 图9中对在低脂肪饮食期中在(4g)的Lovaza®或Epanova®单次给药后的总血浆DHA浓度(基线调整后变化)进行了比较。

[0026] 图10A和图10B给出了在低脂肪和高脂肪餐期间单独受试者的AUC_{0-t}反应，以低脂肪AUC_{0-t}与高脂肪AUC_{0-t}的比率(%)表示。未绘出负的比率。

[0027] 图11是说明在实施例8中进一步描述的14天对比生物利用度试验的设计的治疗流程图(时间线中未标上刻度)。

[0028] 图12A绘出了在实施例8中进一步描述的14天对比生物利用度试验中Lovaza®的治疗对比Epanova®的治疗的平均未调整总EPA+DHA浓度与时间(线性刻度)的关系图。

[0029] 图12B是显示在图12A中括号中的点的未调整EPA+DHA(nmol/mL)的差异的柱状图。

[0030] 图13中绘出了在14天对比生物利用度研究中Lovaza®的治疗相对于Epanova®的治疗的EPA+DHA平均基线调整的血浆总EPA+DHA浓度与时间(线性刻度)的关系图。

[0031] 图14A是绘出在14天对比生物利用度研究的Lovaza®和Epanova®组中EPA+DHA的未调整血浓度从基线增加到稳态的柱状图。

[0032] 图14B是绘出在14天对比生物利用度研究的Lovaza®和Epanova®组中EPA+DHA的未

调整C_{avg}从基线增加到稳态的柱状图。

[0033] 图15A是绘出在14天对比生物利用度研究的Lovaza®和Epanova®组中DHA的总血浓度从基线增加到稳态的柱状图。

[0034] 图15B是绘出在14天对比生物利用度研究中Epanova®组群与Lovaza®组群比较的DHA C_{avg}水平从基线增加到稳态的柱状图。

[0035] 图16A是绘出在14天对比生物利用度研究的Lovaza®和Epanova®组中血中总EPA水平从基线增加到稳态的柱状图。

[0036] 图16B中绘出了在14天对比生物利用度研究的Epanova®和Lovaza®组群中EPA C_{avg}水平从基线增加到稳态。

[0037] 图17提供说明在实施例10中进一步描述的EVOLVE研究的设计的治疗流程图。

[0038] 图18更详细地总结了EVOLVE试验设计，其中进一步确定了研究访问的时间安排。

[0039] 图19示出了在EVOLVE试验中受试者的处置。

[0040] 图20A-图20D中示出了在EVOLVE试验中各治疗组的EPA(图20A)、DHA(图20B)、DPA(图20C)和AA(图20D)的平均基线和治疗结束时(“EOT”)血浆水平(单位μg/mL)。

[0041] 图20E中对实施例7中所描述ECLIPSE试验的平均基线和EOT EPA水平、实施例8中所描述的14天生物利用度研究、实施例11中所描述他汀类的药物-药物相互作用研究(STATIN DDI)、实施例10中所描述EVOLVE试验的各治疗组及对照组、和使用不同的Ω-3组合物的不相关JELIS试验(JELIS)的文献中早期报道值进行了比较。

[0042] 图21A-图21D中绘出了在EVOLVE试验中EPA(图21A)、DHA(图21B)、DPA(图21C)和AA(图21D)的中值基线和治疗结束时(EOT)血浆水平(单位为μg/mL)。

[0043] 图22A和图22B中绘出了EVOLVE试验的每个治疗组的AA、DHA、EPA和DPA的绝对血浆水平(单位为μg/mL)从基线到EOT的变化。图22A绘出了平均值变化；图22B绘出了中值变化。

[0044] 图23A中绘出了在EVOLVE试验的每个治疗组中AA、DHA、EPA和DPA从基线到EOT的平均值变化，用基线值的百分率表示。图23B中绘出了从基线到EOT的中值百分率变化。

[0045] 图24A-图24I中绘出了在EVOLVE试验中甘油三酯类(图24A)、非-HDL-C(图24B)、HDL-C(图24C)、V-LDL-C(图24D)、LDL-C(图24E)、ApoB(图24F)、ApoCIII(图24G)、RLP(图24H)、LpPLA2(图24I)的平均基线和EOT血浆水平(单位为mg/dL，除了LpPLA2以ng/mL为单位表示)。

[0046] 图25A-图25I中绘出了在EVOLVE试验中甘油三酯类(图25A)、非-HDL-C(图25B)、HDL-C(图25C)、V-LDL-C(图25D)、LDL-C(图25E)、ApoB(图25F)、ApoCIII(图25G)、RLP(图25H)、LpPLA2(图25I)的中值基线和EOT血浆水平(单位为mg/dL，除了LpPLA2以ng/mL为单位表示)。

[0047] 图26A和图26B中绘出了EVOLVE试验的各治疗组的甘油三酯类(TG)、非-HDL-C(“NHDL-C”)、HDL-C、VLDL-C和LDL-C的绝对血浆水平(单位为mg/dL)从基线到EOT的变化，其中图26A中绘出了平均值变化并且图26B中示出了中值变化。

[0048] 图27中绘出了2g剂量和4g剂量Epanova®的、由Y轴给出的EVOLVE试验中受试者的百分比，这些受试者的甘油三酯水平降低了由X轴给出的标示百分率。

[0049] 图28A绘出了在EVOLVE试验的各治疗组中TG、非-HDL-C(NHDL-C)、HDL-C、VLDL-C、

LDL-C、ApoB、ApoCIII、LpLPA2和RLP从基线到EOT的平均值变化，该变化以基线值的百分率表示，并且图28B中绘出了从基线到EOT的中值变化百分率。

[0050] 图29中绘出了在EVOLVE试验中2g和4g剂量的Epanova®之间EPA、DHA、DPA、AA、TG、NHDL-C和HDL-C的血浆水平相对于基线的中值变化百分率的变化率(绝对值)。

[0051] 图30示出了在EVOLVE试验中测量的Epanova®在标示剂量下和由其他人报道的AMR-101(Vascepa)的数据相对甘油三酯(TG)水平的比较数据。

[0052] 图31示出了Epanova®(如EVOLVE试验中所测量的)和AMR-101(Vascepa)对于各种血脂参数的比较数据。AMR-101的数据是由其他人报道。(*)表示小于0.05的p值，(**)表示小于0.01的p值，(***)表示小于0.001的p值。

[0053] 图32示出了Epanova®2g和4g剂量(如EVOLVE试验中测定的)和Lovaza®4g剂量对于各种血脂参数的比较数据。Lovaza®的数据是由其他人报道。(*)表示小于0.05的p值，(**)表示小于0.01的p值，(***)表示小于0.001的p值。

[0054] 图33示出了Epanova®2g和4g剂量(如EVOLVE试验中确定的)和Lovaza®4g剂量(由其他人报道)对于甘油三酯水平的比较数据。上标表示来源于(1)EVOLVE试验、(2)来自Lovaza®新药申请(NDA)的元分析、(3)Lovaza®的获FDA批准的产品标签、和(4)武田(Takeda)研究的数据。(*)表示小于0.05的p值，(**)表示小于0.01的p值，(***)表示小于0.001的p值。

[0055] 图34中绘出了在EVOLVE试验中测量的LDL的变化百分率与ApoCIII的变化百分率之间的相互关系。

[0056] 图35中绘出了如实施例10中进一步描述的EVOLVE研究的标示治疗组的具有大于或等于750mg/dL的TG基线水平的EVOLVE试验受试者亚群中的相对于基线的最小二乘(LS)平均值变化百分率。(*)表示小于0.05的p值，(**)表示小于0.01的p值，(***)表示小于0.001的p值。

[0057] 图36中绘出了如实施例10中所描述的EVOLVE研究的指示治疗组的、患有II型糖尿病的受试者亚群中的相对于基线的最小二乘(LS)平均值变化百分率。(*)表示小于0.05的p值，(**)表示小于0.01的p值，(***)表示小于0.001的p值。

[0058] 图37中绘出了如实施例10中所描述的EVOLVE研究的指示治疗组的、经历同时他汀类治疗的受试者亚群中相对于基线的最小二乘(LS)平均值变化百分率。(*)表示小于0.05的p值，(**)表示小于0.01的p值，(***)表示小于0.001的p值。

[0059] 图38中绘出了相对于对照的甘油三酯类(TG)、非HDL胆固醇(NHDL-C)、HDL-C、LDL-C、TC、VLDL-C和TC/HDL-C的最小二乘(LS)平均值变化百分率，图中对实施例10中所描述EVOLVE研究的使用2g剂量Epanova®进行治疗同时接受(他汀)或者不接受(非他汀)他汀类治疗的受试者进行了比较。(*)表示小于0.05的p值，(**)表示小于0.01的p值，(***)表示小于0.001的p值。

[0060] 图39中绘出了在实施例10中进一步描述的EVOLVE研究的指示治疗组中经历同时他汀类治疗的受试者亚群的TG、NHDL-C、HDL-C、LDL-C、TC、VLDL-C和TC/HDL-C相对于基线的中值变化百分率。(*)表示小于0.05的p值，(**)表示小于0.01的p值，(***)表示小于0.001

的p值。

[0061] 图40提供了说明实施例12中进一步描述的ESPRIT研究的设计的治疗流程图。

[0062] 图41示出了在ESPRIT试验中受试者的处置。

[0063] 图42A和图42B中绘出了来自实施例12中进一步描述的ESPRIT研究的EPA(图42A)和DHA(图42B)相对于基线的中值最小二乘变化百分率。(*)表示小于0.05的p值,(**)表示小于0.01的p值,(***)表示小于0.001的p值。

[0064] 图43中绘出了TG、非-HDL-C和HDL-C相对于基线的最小二乘平均值变化百分率。显示的数据是来自实施例12中进一步描述的ESPRIT研究。(*)表示小于0.05的p值,(**)表示小于0.01的p值,(***)表示小于0.001的p值。

[0065] 图44中绘出了ApoB、LDL-C、VLDL-C和TC/HDL-C相对于基线的最小二乘平均值变化百分率。显示的数据是来自实施例12中进一步描述的ESPRIT研究。(*)表示小于0.05的p值,(**)表示小于0.01的p值,(***)表示小于0.001的p值。

[0066] 图45中绘出了ESPRIT试验中受试者的相对于基线的TG中值变化百分率,其中基于基线TG水平将受试者分组入三分位(tertile)。

[0067] 图46中绘出了ESPRIT试验中受试者的非-HDL-C相对于基线的中值变化百分率,其中基于基线非-HDL-C水平将受试者分组入三分位。

[0068] 图47中绘出了ESPRIT试验中受试者的LDL-C相对于基线的中值变化百分率,其中基于基线LDL-C水平将受试者分组入三分位。

[0069] 图48中绘出了ESPRIT试验的各治疗组的TG相对于基线的中值变化百分率,其中根据同时治疗中所服用他汀类的特征将受试者分组。

[0070] 图49中绘出了ESPRIT试验的各治疗组的TG相对于基线的中值变化百分率,其中根据低或高效能的同时他汀类治疗将受试者分组入两组。

[0071] 图50中绘出了ESPRIT试验的各治疗组的非-HDL-C相对于基线的中值变化百分率,其中根据低或高效能的同时他汀类治疗将受试者分组。

[0072] 图51中绘出了ESPRIT试验的每个治疗组的LDL-C相对于基线的中值变化百分率,其中根据低或高效能的同时他汀类治疗将受试者分组入两组。

[0073] 图52中绘出了TG相对于基线的中值变化百分率,其中根据高基线TG、高基线EPA、或者同时的罗苏伐他汀治疗将ESPRIAT试验的各治疗组中的受试者分组入三组。

[0074] 图53中绘出了根据如ESPRIT试验中所测定粒径进行分组的V-LDL颗粒的粒径分布相对于基线的最小二乘平均值变化百分率。(*)表示小于0.05的p值,(**)表示小于0.01的p值,(***)表示小于0.001的p值。

[0075] 图54中绘出了ESPRIT试验的各治疗组的根据粒径进行分组的LDL颗粒的粒径分布相对于基线的最小二乘平均值变化百分率。(*)表示小于0.05的p值,(**)表示小于0.01的p值,(***)表示小于0.001的p值。

[0076] 图55中绘出了LDL粒径中的最小二乘中值变化百分率,其中根据ESPRIT EOT甘油三酯水平将受试者分组入三组。

[0077] 图56A示出了实施例11中进一步描述的临床试验中的根据在rs174546 SNP处的基因型进行分组的受试者的基线花生四烯酸(AA)血浆水平(单位μg/mL)。图56B示出了根据在rs174546 SNP处的基因型进行分组的受试者在用Epanova®治疗的第15天AA血浆水平相对

于基线的变化百分率。就各基因型而言，由方框表示四分位距，四分位方框内部的水平线表示中值，由菱形框表示平均值。开放的圆表示离群值。触须线(whisker)延伸到最小和最大非离群值的值。评分1标示在主要等位基因处是纯合子的受试者；评分3标示在次要等位基因处是纯合子的受试者；评分2表示杂合子。

5.具体实施方式

5.1.概述：游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸药物组合物，其意外地富含具有优异的临床疗效的DPA

[0078] 尿素包合络合(包合作用(clathration))是鱼油精制中经常采用的标准步骤，用于去除饱和及单不饱和长链脂肪酸，因此在所形成组合物中使期望的长链Ω-3多不饱和脂肪酸富集。尽管有长期应用，但被设计用来描述各种生理化学参数对工艺影响的特征的研究中，尿素包合使长链多不饱和脂肪酸的单独种类富集的程度仍然是不可预知的。尿素包合步骤中的这种残余的不可预知性，外加产生不允许的高水平的氨基甲酸乙酯的可能性(这将会使其他处理成为必须)，这最初使得倾向于从用于生产符合某些理想组成规格的游离酸形式的Ω-3 PUFA的医药级组合物的工业规模精制工艺中省略去尿素包合。

[0079] 然而，如实施例1中的进一步描述，开发无尿素工业规模工艺的早期努力已证明这种工艺不能可靠地生产具有符合要求规格的组成的批次产品。因此，寻找到一种采用尿素包合的工艺，据发现通过对存在于中间乙基酯原料中的PUFA种类实行严格的组成控制外加使用算法确定量的尿素，可以可靠地生产符合要求规格且不超过可接受的氨基甲酸乙酯限值的批次产品。

[0080] 如实施例2中所描述，利用尿素包合步骤制备四个示例性生产批次的采用游离酸形式的多不饱和脂肪酸。将严格的组成控制应用于乙基酯中间原料，仅使用其中规定的多不饱和脂肪酸种类落在定义的范围限值内的批次产品，并且采用落在尿素计算器算法所要求范围内的尿素量。确定全部四个生产批次的药物组合物均符合期望的组成规格。

[0081] 正如预期的，尿素包合步骤大幅降低所形成组合物中饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸的百分率，由此大幅地富集多不饱和脂肪酸。参见图3A。但意外地，实施使用落在算法确定范围内的尿素量的尿素包合对Ω-3多不饱和脂肪酸和Ω-6多不饱和脂肪酸的特定种类的富集具有差别的作用。

[0082] 如下面实施例3中的描述，发现富集了Ω-3二十二碳五烯酸种类DPA(C22:5 n-3)，而具有相同链长度和不饱和度的相应的Ω-6种类二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)则占优势地被减少。尿素包合对这两种异构体的富集的不同影响，连同它们在乙基酯中间原料中的相对浓度的差异，导致它们在最终游离酸药物组合物(API)中的浓度产生对数级的差异。

[0083] 制备其他生产批次，并且如实施例4中所描述，对10个批次API的组成分析证明最终组合物中存在可再现地升高水平的DPA。如实施例5中所描述，对利用尿素包合所制备的21个批次的组成分析证明：与其Ω-6异构体二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)相比存在可再现的Ω-3种类DPA的浓度中的10倍差异。

[0084] 在21个生产批次中，在4.44％(a/a)的平均浓度下，DPA是API中第三最占优势的多不饱和脂肪酸种类，仅被EPA和DHA超过。在此水平下，DPA浓度也是被称为Purepa的采用游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的较早的药物组合物所报道浓度的大约10倍，Purepa中据

报道DPA是以0.5％的浓度存在。参见Belluzzi等人，Dig.Dis.Sci.39(12)：2589-2594(1994)。

[0085] 尽管DPA是从EPA到DHA的生物合成途径中的一个中间体(见图1)，但出人意料地对于DPA的具体生物学效应却了解不多。为了澄清DPA对所述药物组合物的临床疗效的潜在贡献，进行了使用HepG2肝癌细胞的表达概况分析实验。

[0086] 正如实施例6中的进一步描述，DPA对肝细胞基因表达的影响预测富含DPA组合物的更大临床疗效。

[0087] 表达概况分析实验表明DPA在相关的体外浓度下具有显著的生物活性。这些作用明显不同于使用EPA和DHA所看到的作用。

[0088] 在相关的浓度下，观察到DPA在多种代谢途径中影响基因的表达，包括已知与Ω-3多不饱和脂肪酸的临床疗效相关类别中的基因：与脂类代谢有关的基因、与心血管生理有关的基因、和与炎症有关的基因。考虑到编码自身影响基因表达的蛋白质的基因表达中、和在编码影响转录后修饰的蛋白质的基因中所观察到的变化，也可预测产生显著的二级效应。

[0089] 对与脂类代谢有关的若干基因的表达的特定作用表明DPA，在类似的体内浓度下，应当有贡献于各种临床相关脂类参数的改善。特别是，所观察到的DPA驱动的ACADSB(短链/支链酰基辅酶A脱氢酶)的上调，预测较低的血清甘油三酯水平；DPA驱动的HMGCR的下调，类似于他汀类对编码的HMG-辅酶A还原酶的抑制，将会被预测导致总胆固醇：HDL比率的有利下降；由于DPA对SQLE(甾醇合成中的速率限制步骤)的下调，类似地可预测总胆固醇水平的下降。

[0090] 表达概况分析实验也揭示了DPA作用的阈剂量。被选择用来模拟比较早的游离酸Ω-3制剂(Purepa)中的DPA浓度低10倍的较低的测试浓度，实现是较高DPA浓度的1/10的基因表达，被选择用来模拟本文中所描述的预测来自药物组合物的暴露，从而证明较低的DPA浓度提供阈下暴露，并且被期望能提供体内次治疗剂量。

[0091] 人临床试验确认了采用游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的富含DPA药物组合物具有优异的临床疗效。

[0092] 实施例7中给出了ECLIPSE临床试验的结果，该临床试验是一项开放标签、单剂量、随机分组4-通路交叉研究，该研究对在高脂肪和低脂肪膳食两种条件下4g剂量的Lovaza®的生物利用度与4g剂量的本文中所描述采用游离酸形式的Ω-3 PUFA的富含DPA药物组合物(在下文中称为“Epanova®”)的生物利用度进行了比较。根据获FDA批准的产品标签，各1克Lovaza®胶囊中含有至少900mg来源于鱼油的Ω-3脂肪酸的乙基酯类，该乙基酯类主要是二十碳五烯酸(EPA，大约465mg)与二十二碳六烯酸(DHA，大约375mg)的乙基酯类的组合。该试验中所使用Epanova®的批次产品包含57.3％(a/a)的EPA、19.6％(a/a)的DHA、和6.2％(a/a)的DPA，各基本上是采用游离酸的形式。

[0093] 在高脂肪饮食期中，使用Epanova®(采用游离酸形式的Ω-3 PUFA)的总EPA+DHA及单独的EPA和DHA吸收曲线(AUC)中的基线调整后变化显著大于使用Lovaza®(Ω-3-PUFA乙基酯类)的基线调整后变化，并且在低脂肪餐期中明显地更好。此外，膳食中的脂肪含量对Lovaza®的生物利用度具有深刻的影响，但由于仅适度的食物效应因而Epanova®的生物利用度的可预测性要高得多。

[0094] 鉴于NCEP ATP III建议患有高甘油三酯血症和血脂异常的受试者在辅助治疗期间坚持低脂肪饮食，Epanova®比Lovaza®优越的脂肪不依赖性生物利用度在临床上具有重要意义。

[0095] 实施例8中给出了来自14天生物利用度研究的结果，该研究表明在2周的给药期间在单剂量ECLIPSE试验中所观察到的生物利用度的提高得以维持，甚至被增强。另外，解集的(disaggregated)受试者特定数据表明对Epanova®具有最小反应的受试者仍然具有与对Lovaza®具有最佳反应的受试者相比更大的14天EPA+DHA C_{max}。

[0096] 实施例10中给出了EVOLVE试验的结果，该试验是基于在500-2,000mg/dL范围内高甘油三酯水平进行选择的患者(严重高甘油三酯血症)的12周、双盲、橄榄油对照研究。主要研究终点是血浆甘油三酯水平从基线到治疗结束时(EOT)的变化百分率。次要研究终点是血浆非高密度脂蛋白胆固醇(non-HDL-C)从基线到EOT的变化百分率。

[0097] 如图20-图23中所见，使用Epanova®的12周治疗导致EPA、DHA和DPA的血浆水平显著增加。

[0098] EPA、DHA和DPA的血浆水平增加伴随着血浆AA水平的显著降低，并且4g给药方案实现18%的平均值下降、25.9%的中值下降、和23.2%的最小二乘(LS)平均值下降。尽管有外源性花生四烯酸的给药但观察到这些血浆花生四烯酸水平下降，花生四烯酸在此试验中所使用Epanova®批次中是以2.446%(a/a)的含量而存在。

[0099] 在4g剂量的治疗结束时(EOT)，EPA血浆水平的增加连同同时发生的AA血浆水平下降导致EPA/AA比的显著提高，在基线处从大约0.10提高到大约0.67(平均值)和0.62(中值)。已有报道EPA/AA比率构成冠状动脉粥样硬化的一个独立危险因素，Nakamua&Maegawa，Endocrine Abstracts(2012)29 OC19.1，在用他汀类治疗的冠状动脉疾病患者中较低的该比率与冠状动脉粥样硬化的发展有关，Nozue等人，Am J Cardiol.2013 Jan 1;111(1):6-1(印刷出版前的电子版)。

[0100] 而且，使用Epanova®的治疗导致甘油三酯水平的大幅下降(见图26A和图26B)、非-HDL-C和VLDL-C的下降、和HDL-C的增加。LDL-C水平是升高的，这是在治疗时有助于LDL粒径增加的观察(在实施例12中进一步论述)。

[0101] EVOLVE试验还表明Epanova®治疗大幅降低载脂蛋白CIII(ApoCIII)。已发现ApoCIII的水平升高是心血管疾病(CHD)危险的一个独立预测因素，而在基因方面ApoCIII的水平下降与心血管疾病的防护有关并且也与寿命增加相关。

[0102] Epanova®中Ω-3 PUFA的极高生物利用度显示了以前未知且非预期的各种PUFA种类中药代动力学反应中的差异。

[0103] 图29中绘出了在2g与4g剂量的Epanova®之间EPA、DHA、DPA、AA、TG、非-HDL-C、和HDL-C(绝对值)血浆水平相对于基线的中值变化百分率中的变化率。在将Epanova®的剂量从2g/日加倍到4g/日时DHA和DPA的血浆水平有小幅增加或者没有增加，相对于基线的中值变化百分率的变化率(斜率)接近零，预测如果进一步增加剂量将会实现DHA和DPA血浆水平进一步的小幅提高。在甘油三酯水平、HDL-C水平、和非-HDL-C水平(数据未示出)中看到类似的反应稳定状态。

[0104] 相反，EPA的变化率仍然高，具有0.59的斜率；预测通过将Epanova®的剂量增加到超过4g/日可获得EPA血浆水平的进一步增加。显著地，当把Epanova®的剂量从2g加倍到4g/日时AA水平的变化率(下降)甚至高于EPA；当把Epanova®的剂量增加到超过4g/日时，预测AA的血浆水平会进一步下降。因此，Epanova®在升高EPA水平、降低AA水平的能力方面显示出前所未有的效能，并且提高EPA:AA比。

[0105] 如图38中所示，与2g治疗组中不接受同时他汀类治疗的受试者相比较，EVOLVE试验的2g治疗组中正在接受同时他汀类治疗的受试者亚群相对于对照显示TG、非-HDL-C、HDL-C、LDL-C、TC、VLDL-C和TC/HDL-C的更大幅度的变化百分率(最小二乘差平均值)。接受同时他汀类治疗的受试者显示对Epanova®的剂量依赖性反应，如图39中Epanova®2g与Epanova®4g的比较数据中所示。

[0106] 实施例12描述了ESPRIT临床试验，通过实施该临床试验对在基线他汀类治疗中的患者进行研究，这些患者具有在200-500mg/dL之间的甘油三酯水平，该水平低于参加实施例10中所描述EVOLVE研究的患有严重高甘油三酯血症的患者。

[0107] 当与橄榄油安慰剂进行比较时，观察到甘油三酯类的剂量依赖性下降、非-HDL-C的下降、和HDL-C的增加(参见图43)。而且，观察到VLDL-C和TC/HDL-C的剂量依赖性下降(参见图44)。合起来看，这些结果(汇总于图42-图44中)证明在甘油三酯水平在200-500mg/dL之间的患者中Epanova®作为他汀类治疗的附加治疗的效能。

[0108] 图45-图52说明了在基线患者病症范围内Epanova®作为低效能和高效能他汀类的附加治疗是有效的。如图48中所见，就接受同时罗苏伐他汀、阿托伐他汀、和辛伐他汀治疗的患者而言，观察到甘油三酯水平的下降。无论是否有低效能或者高效能他汀类的联合给药，均观察到对甘油三酯类、非-HDL-C和LDL-C水平的有统计学意义的作用，如图49-图51中所示。

5.2采用游离酸形式的富含DPA的Ω-3组合物

[0109] 因此，在第一方面，本公开提供采用游离酸形式的多不饱和脂肪酸(PUFA)的改进组合物。在各种实施方式中，该组合物是适合于口服给药的药物组合物。在多种实施方式中，该组合物是适合于口服给药的营养食品组合物。

5.2.1典型的实施方式

[0110] 所述组合物包含多种Ω-3 PUFA种类，各基本上以游离酸的形式存在。

[0111] 该组合物包含二十碳五烯酸(C20:5 n-3)(EPA，也称为timnodonic acid)、二十二碳六烯酸(C22:6 n-3)(DHA，也称为cervonic acid)、和二十二碳五烯酸(C22:5 n-3)(DPA，也称为clupodonic acid)，各自基本上采用游离酸的形式。

[0112] 所述组合物以至少约45％(45％(a/a))的量含有EPA，该量是以所述组合物中所有脂肪酸的气相色谱的面积的百分比计算的。在各种实施方式中，该组合物以至少约46％(a/a)47％(a/a)、48％(a/a)、49％(a/a)、或至少约50％(a/a)的量含有EPA。在某些实施方式中，该组合物以至少约51％(a/a)、至少约52％(a/a)、至少约53％(a/a)、至少约54％(a/a)、至少约55％(a/a)、至少约56％(a/a)、至少约57％(a/a)、至少约58％(a/a)，甚至至少约59％(a/a)、至少约60％(a/a)、至少约61％(a/a)、62％(a/a)、63％(a/a)、64％(a/a)、或

65%(a/a)的量含有EPA。

[0113] 在某些实施方式中,所述组合物以约45至约65%(a/a)的量含有EPA。在具体实施方式中,EPA是以约50至约60%(a/a)的量而存在。在各种实施方式中,EPA是以约52至约58.0%(a/a)的量而存在。在一些实施方式中,EPA是以约55%(a/a)至约56%(a/a)的量而存在。在一些实施方式中,EPA是以约55%(a/a)的量而存在。

[0114] 在各种实施方式中,所述组合物以约50%(m/m)至约60%(m/m)的量含有EPA,该量是以该组合物中所有脂肪酸的质量的百分率的形式进行计算(%(m/m))。在某些实施方式中,EPA是以约55%(m/m)的量而存在。

[0115] 所述组合物以至少约13%(a/a)的量含有DHA。在各种实施方式中,所述组合物以至少约14%(a/a)、至少约15%(a/a)、至少约16%(a/a)、至少约17%(a/a)、至少约18%(a/a)、至少约19%(a/a)、或者至少约20%(a/a)的量含有DHA。在所选择的实施方式中,所述组合物以至少约21%(a/a)、至少约22%(a/a)、至少约23%(a/a)、至少约24%(a/a)、甚至至少约25%(a/a)的量含有DHA。

[0116] 在各种实施方式中,所述组合物以约13%(a/a)至约25%(a/a)的量含有DHA。在某些实施方式中,DHA是以约15%(a/a)至约25%(a/a)的量而存在。在若干个实施方式中,DHA是以约17%(a/a)至约23%(a/a)的量而存在。在某些实施方式中,DHA是以约19%(a/a)至约20%(a/a)的量而存在。

[0117] 在各种实施方式中,所述组合物以约15%(m/m)至约25%(m/m)的量含有DHA。在某些实施方式中,DHA是以约17%(m/m)至约23%(m/m)的量而存在。在某些实施方式中,DHA是以约20%(m/m)的量而存在。

[0118] 所述组合物以至少约1%(a/a)的量含有DPA。在各种实施方式中,所述组合物以至少约1.5%(a/a)、2%(a/a)、2.5%(a/a)、3%(a/a)、3.5%(a/a)、4%(a/a)、4.5%(a/a)、甚至至少约5%(a/a)的量含有DPA。在所选择的实施方式中,所述组合物以至少约6%(a/a)、至少约7%(a/a)、至少约8%(a/a)、或者至少约9%(a/a)的量含有DPA。

[0119] 在多种实施方式中,所述组合物以约1%(a/a)至约8%(a/a)的量含有DPA。在某些实施方式中,所述组合物以约2%(a/a)至约7%(a/a)的量含有DPA。在所选择的实施方式中,所述组合物以约3%(a/a)至约6%(a/a)的量含有DPA。在具体实施方式中,所述组合物以约4%(a/a)至约5%(a/a)的量含有DPA。

[0120] 在各种实施方式中,以在该组合物中全部脂肪酸的质量的百分率的形式进行计算,所述组合物以不小于约1%(m/m)的量含有DPA。在各种实施方式中,所述组合物以约1%(m/m)至约8%(m/m)的量含有DPA。在具体实施方式中,所述组合物以不大于约10%(m/m)的量含有DPA。

[0121] 所述组合物以至少约60%(a/a)的总量含有EPA和DHA。在各种实施方式中,所述组合物以至少约61%(a/a)、62%(a/a)、63%(a/a)、64%(a/a)、65%(a/a)、66%(a/a)、67%(a/a)、68%(a/a)、69%(a/a)、或至少约70%(a/a)的总量含有EPA和DHA。在具体实施方式中,所述组合物以至少约71%(a/a)、72%(a/a)、73%(a/a)、74%(a/a)、75%(a/a)、76%(a/a)、77%(a/a)、78%(a/a)、79%(a/a)、甚至至少约80%(a/a)的总量含有EPA和DHA。在某些实施方式中,所述组合物以至少约81%(a/a)、82%(a/a)、至少约83%(a/a)、84%(a/a)、甚至至少约85%(a/a)的总量含有EPA和DHA。

[0122] 在各种实施方式中，所述组合物以约70.0％(m/m)至约80.0％(m/m)的量含有EPA和DHA。在某些实施方式中，所述组合物包含约75％(m/m)的EPA加DHA。

[0123] 所述组合物以至少约61％(a/a)的总量含有EPA、DHA和DPA。在典型的实施方式中，所述组合物以至少约62％(a/a)、63％(a/a)、64％(a/a)、65％(a/a)、66％(a/a)、至少约67％(a/a)、至少约68％(a/a)、至少约69％(a/a)、或者至少约70％(a/a)的总量含有EPA、DHA和DPA。在某些实施方式中，所述组合物以至少约71％(a/a)、72％(a/a)、73％(a/a)、74％(a/a)、75％(a/a)、76％(a/a)、77％(a/a)、78％(a/a)、79％(a/a)、80％(a/a)、甚至至少约81％(a/a)、82％(a/a)、83％(a/a)、84％(a/a)、85％(a/a)、86％(a/a)、87％(a/a)、甚至至少约88％(a/a)的总量含有EPA、DHA和DPA。

[0124] 在各种实施方式中，所述组合物以在约70％(a/a)至约90％(a/a)之间的总量含有EPA、DHA和DPA。

[0125] 在一个特定系列的实施方式中，EPA是以约55％(a/a)至约56％(a/a)的量而存在；DHA是以约19％(a/a)至约20％(a/a)的量而存在；DPA是以约4％(a/a)至约5％(a/a)的量而存在。

[0126] 在某些实施方式中，所述组合物还包含选自以下组的一种或多种Ω-3多不饱和脂肪酸种类：α-亚麻酸(C18:3 n-3)、十八碳四烯酸(C18:4 n-3，也称为十八碳四烯酸)、二十碳三烯酸(C20:3 n-3)、二十碳四烯酸(C20:4 n-3)、和二十一碳五烯酸(C21:5 n-3)。

[0127] 在具体实施方式中，所述组合物包含EPA、DHA、DPA和十八碳四烯酸，各自基本上采用游离酸的形式。在多种实施方式中，所述组合物包含EPA、DHA、DPA、十八碳四烯酸、和二十一碳五烯酸，各自基本上采用游离酸的形式。在具体实施方式中，所述组合物包含EPA、DHA、DPA、十八碳四烯酸、二十一碳五烯酸、和二十碳四烯酸，各自基本上采用游离酸的形式。在所选择的实施方式中，所述组合物包含EPA、DHA、DPA、α-亚麻酸(C18:3 n-3)、十八碳四烯酸(C18:4 n-3)、二十碳三烯酸(C20:3 n-3)、二十碳四烯酸(C20:4 n-3)、和二十一碳五烯酸(C21:5 n-3)。

[0128] 在各种实施方式中，定义为α-亚麻酸(C18:3 n-3)、十八碳四烯酸(C18:4 n-3)、二十碳三烯酸(C20:3 n-3)、二十碳四烯酸(C20:4 n-3)、二十碳五烯酸(EPA)(C20:5 n-3)、二十一碳五烯酸(C21:5 n-3)、二十二碳五烯酸(C22:5 n-3)和二十二碳六烯酸(DHA)(C22:6 n-3)的总和的总Ω-3脂肪酸构成所述组合物中所有脂肪酸的约80％(a/a)至约95％(a/a)。在多种实施方式中，总Ω-3脂肪酸构成所述组合物中全部脂肪酸的约80至约95％(m/m)。

[0129] 在各种实施方式中，所述组合物还包含一种或多种Ω-6 PUFA种类，各种类基本上是以游离酸的形式存在。

[0130] 在某些实施方式中，所述组合物包含选自以下组的一种或多种Ω-6 PUFA的种类：亚油酸(C18:2 n-6)、γ-亚麻酸(C18:3 n-6)、二十碳二烯酸(C20:2 n-6)、二高-γ-亚麻酸(C20:3 n-6)(DGLA)、花生四烯酸(C20:4 n-6)(AA)、和二十二碳五烯酸(C22:5 n-6，也称为osbond acid)。

[0131] 在具体实施方式中，所述组合物包含亚油酸(C18:2 n-6)、γ-亚麻酸(C18:3 n-6)、二十碳二烯酸(C20:2 n-6)，二高-γ-亚麻酸(C20:3 n-6)(DGLA)、花生四烯酸(C20:4 n-6)(AA)、和二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)，各自基本上是采用游离酸的形式存在。

[0132] 在各种实施方式中，AA是以不大于所述组合物中脂肪酸的约5％(a/a)量而存在。

在某些实施方式中，AA构成不大于约4.5％(a/a)的所述组合物中的脂肪酸。在具体实施方式中，AA是以不大于所述组合物中脂肪酸的约4％(a/a)的量而存在。

[0133] 在某些实施方式中，AA是以不大于所述组合物中脂肪酸的约5％(m/m)的量而存在。在某些实施方式中，AA包含不大于约4.5％(m/m)的所述组合物中的脂肪酸。在具体实施方式中，AA是以不大于所述组合物中脂肪酸的约4％(m/m)的量而存在。

[0134] 在某些实施方式中，被定义为亚油酸(C18:2 n-6)、γ-亚麻酸(C18:3 n-6)、二十碳二烯酸(C20:2 n-6)、二高-γ-亚麻酸(C20:3 n-6)、花生四烯酸(C20:4 n-6)和二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)的总和的总Ω-6多不饱和脂肪酸构成不大于约10％(a/a)的所述组合物中的脂肪酸。在某些实施方式中，被定义为亚油酸(C18:2 n-6)、γ-亚麻酸(C18:3 n-6)、二十碳二烯酸(C20:2 n-6)、二高-γ-亚麻酸(C20:3 n-6)、花生四烯酸(C20:4 n-6)和二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)的总和的总Ω-6多不饱和脂肪酸构成不大于约10％(m/m)的所述组合物中的脂肪酸。

[0135] 在具体实施方式中，由表11给出组成，并且本文中确定的PUFA的各种类分别落在所列举平均值的约-3SD至约+3SD的范围内。在某些实施方式中，其中所确定的各PUFA种类分别落在所列举平均值的约-2SD至约+2SD的范围内。在某些实施方式中，各种类分别落在所列举平均值的约-1SD至约+1SD的范围内。

[0136] 在所选择的实施方式中，由表13给出组成，并且其中所确定的各PUFA种类分别落在所列举平均值的约-3SD至约+3SD的范围内。在某些实施方式中，各种类分别落在所列举平均值的约-2SD至约+2SD范围内。在某些实施方式中，各PUFA种类分别落在所列举平均值的约-1SD至约+1SD的范围内。

[0137] 在某些实施方式中，除Ω-3和Ω-6多不饱和脂肪酸以外的多不饱和脂肪酸是以不大于约5％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，除Ω-3和Ω-6多不饱和脂肪酸以外的多不饱和脂肪酸是以不大于约5％(m/m)的量而存在。

[0138] 在多种实施方式中，所述组合物中多种Ω-3 PUFA种类中的各种类的至少90％是采用游离酸的形式。在某些实施方式中，所述组合物中各Ω-3 PUFA种类的至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、甚至至少99％是以游离酸的形式存在。在示例性实施方式中，所述组合物中Ω-3多不饱和脂肪酸总含量的至少90％是以游离酸的形式存在。在某些实施方式中，所述组合物中总Ω-3多不饱和脂肪酸含量的至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、甚至至少99％是以游离酸的形式存在。

[0139] 在各种实施方式中，所述组合物中多种Ω-6 PUFA种类中的各种类的至少90％是以游离酸的形式存在。在某些实施方式中，所述组合物中各Ω-6 PUFA种类的至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、甚至至少99％是以游离酸的形式存在。在示例性实施方式中，所述组合物中至少90％的总Ω-6多不饱和脂肪酸含量是以游离酸的形式存在。

[0140] 在各种实施方式中，所述组合物中至少90％的总多不饱和脂肪酸是采用游离酸的形式存在。在某些实施方式中，所述组合物中至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、甚至至少99％的总多不饱和脂肪酸是以游离酸的形式存在。

[0141] 在典型的实施方式中，所述组合物包含不大于约3.0％(a/a)的饱和脂肪酸、和不大于约5.0％(a/a)的单不饱和脂肪酸。在各种实施方式中，所述组合物包含不大于约3.0％(m/m)的饱和脂肪酸、和不大于约5.0％(m/m)的单不饱和脂肪酸。

[0142] 在典型的实施方式中，所述组合物有用地还包含抗氧化剂。在某些实施方式中，抗氧化剂是丁基羟基苯甲醚(BHA)。在一些实施方式中，抗氧化剂是α-生育酚。在一些实施方式中，α-生育酚是以约0.20％至0.40％(m/m)的量而存在。在各种实施方式中，α-生育酚是以约0.25％至约0.35％(m/m)的量而存在。在具体实施方式中，α-生育酚是以约0.27％至约0.33％(m/m)的量而存在。

[0143] 在典型的实施方式中，所述组合物包含不大于约0.1ppm的氨基甲酸乙酯。在一些实施方式中，所述组合物包含不大于0.1ppm的氨基甲酸乙酯。在各种实施方式中，所述组合物包含小于0.1ppm的氨基甲酸乙酯。

5.2.2其他实施方式

[0144] 在某些其他实施方式中，以所述组合物中所有脂肪酸的气相色谱的面积的百分比计算，所述组合物以约45.0％-约65.0％(a/a)的量含有EPA，。在某些实施方式中，EPA是以约50.0％至约60.0％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，EPA是以约52.0％至约58.0％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，EPA是以约55.0％(a/a)的量而存在。

[0145] 在某些实施方式中，EPA是以约55.0％至约58.4％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，EPA是以约55.6％至约57.9％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，EPA是以约56.7％(a/a)的量而存在。

[0146] 在各种实施方式中，以全部脂肪酸在所述组合物中的质量百分率计算，所述组合物以约50.0-60.0％(m/m)的量含有EPA。在某些实施方式中，EPA是以约55％(m/m)的量而存在。

[0147] 在某些其他实施方式中，以所述组合物中的所有脂肪酸的气相色谱的面积的百分比计算，所述组合物以约13.0％至约25.0％(a/a)的量含有DHA。在某些实施方式中，DHA是以约15.0％至23.0％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，DHA是以约17.0％至21.0％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，DHA是以约19.0％至约20.0％(a/a)的量而存在。

[0148] 在某些实施方式中，DHA是以约17.7％至约22.2％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，DHA是以约18.4％至约21.4％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，DHA是以约19.9％(a/a)的量而存在。

[0149] 在各种实施方式中，以所有脂肪酸在所述组合物中的质量百分率计算，所述组合物以约15.0-25.0％(m/m)的量含有DHA。在某些实施方式中，DHA是以约20.0％(m/m)的量而存在。

[0150] 在各种其他实施方式中，以所述组合物中所有脂肪酸的气相色谱的面积的百分比计算，所述组合物以约67.0％-约81.0％(a/a)的总量含有EPA和DHA。在某些实施方式中，所述组合物包含约69.0％至约79.0％(a/a)的总量的EPA和DHA。在各种实施方式中，所述组合物包含约71.0％-约77.0％(a/a)的总量的EPA加DHA。在某些实施方式中，所述组合物包含约74.0％-约75.0％(a/a)的总量的EPA+DHA。

[0151] 在各种实施方式中，以全部脂肪酸在所述组合物中的质量百分率的形式计算，所述组合物以约70.0-80.0％(m/m)的总量含有EPA+DHA。在某些实施方式中，所述组合物包含

约75.0％(m/m)的EPA加DHA。

[0152] 在还包含α-亚麻酸(C18:3 n-3)的其他实施方式中，α-亚麻酸是以约0.07％至约1.10％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，a-亚麻酸是以约0.24％至约0.91％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，α-亚麻酸是以约0.40％至约0.80％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，α-亚麻酸是以约0.50％至约0.600％(a/a)的量而存在。

[0153] 在还包含十八碳四烯酸(C18:4 n-3)的其他那些实施方式，十八碳四烯酸是以约0.01％-约7.90％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，十八碳四烯酸是以约0.25％-约6.40％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，十八碳四烯酸是以约1.70％-约4.90％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，十八碳四烯酸是以约3.25％(a/a)的量而存在。

[0154] 在还包含二十碳三烯酸(C20:3 n-3)的其他那些实施方式中，二十碳三烯酸是以约0.75％-约3.50％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，二十碳三烯酸是以约1.20％-约3.00％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，二十碳三烯酸是以约1.60％-约2.60％(a/a)量而存在。在某些实施方式中，二十碳三烯酸是以约2.10％(a/a)的量而存在。

[0155] 在还包含二十碳四烯酸(C20:4 n-3)的其他那些实施方式中，二十碳四烯酸是以约0.01％-约0.40％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，二十碳四烯酸是以约0.01％-约0.30％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，二十碳四烯酸是以约0.03％-约0.22％(a/a)的而存在量。在一些实施方式中，二十碳四烯酸是以约0.12％(a/a)的量而存在。

[0156] 在还包含二十一碳五烯酸(C21:5 n-3)的其他实施方式中，二十一碳五烯酸是以约0.01％-4.10％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，二十一碳五烯酸是以约0.01％-约3.20％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，二十一碳五烯酸是以约0.60％-约2.35％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，二十一碳五烯酸是以约1.50％(a/a)的量而存在。

[0157] 在各种其他实施方式中，DPA是以约0.90％-约7.60％(a/a)的量而存在。在多种实施方式中，DPA是以约2.00％-约6.50％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，DPA是以约3.10％-5.40％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，DPA是以约4.25％(a/a)的量而存在。

[0158] 在各种其他实施方式中，DPA是以约2.13％-约8.48％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，DPA是以约3.19％-约7.42％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，DPA是以约4.25％-约6.37％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，DPA是以约5.31％(a/a)的量而存在。

[0159] 在各种实施方式中，总Ω-3脂肪酸构成约80.0-约95％(m/m)的所述药物组合物中的全部脂肪酸。

[0160] 在包含DGLA的其他实施方式中，以所述组合物中所有脂肪酸的气相色谱的面积百分比计算，DGLA是以约0.01％至约4.40％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，DGLA是以约0.01％至约3.30％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，DGLA是以约0.01％至约2.20％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，DGLA是以约1.10％(a/a)的量而存在。

[0161] 在一些实施方式中，DGLA是以约0.28％至约0.61％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，DGLA是以约0.33％至约0.56％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，DGLA是以约0.44％(a/a)的量而存在。

[0162] 在包含AA的其他实施方式中，AA是以约0.01％至约6.90％(a/a)的量而存在，该量是以所述组合物中所有脂肪酸的气相色谱的面积百分比的形式进行计算。在各种实施方式

中，AA是以约0.01％至约5.40％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，AA是以约0.70％至约3.80％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，AA是以约2.25％(a/a)的量而存在。

[0163] 在各种实施方式中，AA是以约1.41％至约4.87％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，AA是以约1.99％至约4.30％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，AA是以约2.57％至约3.72％(a/a)的量而存在。

[0164] 在各种实施方式中，所述组合物以不大于约4.5％(a/a)的量含有AA。在一些实施方式中，所述组合物以不大于约3.14％(a/a)的量含有AA。

[0165] 在还包含亚油酸(C18:2 n-6)的其他那些实施方式中，亚油酸是以约0.25％至约1.30％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，亚油酸是以约0.40％至约1.20％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，亚油酸是以约0.60％至约0.95％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，亚油酸是以约0.80％(a/a)的量而存在。

[0166] 在还包含γ-亚麻酸(C18:3 n-6)的其他实施方式中，γ-亚麻酸是以约0.01％至约0.65％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，γ-亚麻酸是以约0.03％至约0.51％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，γ-亚麻酸是以约0.15％至约0.40％(a/a)的量而存在。在数个实施方式中，γ-亚麻酸是以约0.27％(a/a)的量而存在。

[0167] 在还包含二十碳二烯酸(C20:2 n-6)的其他那些实施方式中，二十碳二烯酸是以约0.01％至约0.30(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，二十碳二烯酸是以约0.04％至约0.24％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，二十碳二烯酸是以约0.09％至约0.20％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，二十碳二烯酸是以约0.14％(a/a)的量而存在。

[0168] 在还包含二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)的其他那些实施方式中，二十二碳五烯酸是以约0.01％-0.95％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)是以约0.01％-约1.05％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，二十二碳五烯酸(C22:5n-6)是以约0.05-约0.71％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，二十二碳五烯酸(C22:5n-6)是以约0.01-约0.48％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，二十二碳五烯酸(C22:5n-6)是以约0.24％(a/a)的量而存在。

[0169] 在一些实施方式中，二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)是以约0.01％至约1.19％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)是以约0.16％至约0.98％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)是以约0.57％(a/a)的量而存在。

[0170] 在某些实施方式中，所述组合物包含不大于约10.0％(a/a)的总Ω-6脂肪酸。

[0171] 在这些其他实施方式中的典型实施方式中，所述组合物包含不大于约3.0％(a/a)的饱和脂肪酸、不大于约5.0％(a/a)的单不饱和脂肪酸、和不大于约0.1ppm的氨基甲酸乙酯。在一些实施方式中，所述组合物包含不大于0.1ppm的氨基甲酸乙酯。在各种实施方式中，所述组合物包含小于0.1ppm的氨基甲酸乙酯。

5.3单位剂型

[0172] 在另一方面，将上面部分5.2中描述的富含DPA的采用游离酸形式的Ω-3 PUFA的药物或营养食品组合物有用地封装在用于口服给药的单位剂型中。

[0173] 在具体实施方式中，剂型是胶囊。在某些实施方式中，剂型是明胶胶囊。在具体实施方式中，明胶胶囊是硬明胶胶囊。在其他实施方式中，剂型是软明胶胶囊。

[0174] 在各种实施方式中，胶囊包含A型明胶。在一些实施方式中，胶囊包含A型和B型明胶两者。用于生产A型或B型明胶的胶原的来源包括但不限于牛、猪和鱼。

[0175] 在各种实施方式中，胶囊是软明胶胶囊，该胶囊包含足够的A型明胶使得在40℃下贮存至少3个月后胶囊在纯化水中于37℃在不大于30分钟的时间段内崩解。在某些实施方式中，胶囊是软明胶胶囊，该胶囊包含足够的猪A型明胶使得在40℃下贮存6个月后胶囊在纯化水中于37℃在不大于30分钟的时间段内崩解。在某些实施方式中，胶囊是软明胶胶囊，该胶囊包含充分的猪A型明胶使得在40℃下贮存12个月后胶囊在纯化水中于37℃在不大于30分钟的时间段内崩解。

[0176] 在各种实施方式中，胶囊是软明胶胶囊，该胶囊包含足够的猪A型明胶使得在30℃下贮存至少3个月后该胶囊在纯化水中于37℃在不大于30分钟的时间段内崩解。在某些实施方式中，胶囊是软明胶胶囊，该胶囊包含足够的猪A型明胶使得在30℃下贮存6个月后胶囊在纯化水中于37℃在不大于30分钟的时间段内崩解。在一些实施方式中，胶囊是软明胶胶囊，该胶囊包含足够的猪A型明胶使得在30℃下贮存12个月后胶囊在纯化水中于37℃在不大于30分钟的时间段内崩解。

[0177] 在某些实施方式中，胶囊是软明胶胶囊，该胶囊包含猪A型明胶和B型明胶的混合物。在各种此类实施方式中，至少1％、2％、3％、4％、5％、10％、15％、20％、25％、30％、40％、甚至至少约50％(w/w)的明胶是猪A型明胶。在所选择的实施方式中，至少约55％、60％、65％、70％、75％(w/w)的明胶是猪A型明胶。在具体实施方式中，至少80％、85％、90％、甚至95％(w/w)的明胶是猪A型明胶。

[0178] 在各种实施方式中，胶囊是软明胶胶囊，其中明胶基本上是由猪A型明胶构成。

[0179] 在一些实施方式中，胶囊是还原的交联明胶胶囊，例如美国专利7,485,323中所描述的，该专利的全部内容以参考的方式并入本文中。

[0180] 在某些实施方式中，胶囊包含琥珀酰明胶。

[0181] 在多种实施方式中，胶囊是由并非动物副产品的物质制成，例如琼脂、角叉菜聚糖、果胶、魔芋、瓜尔胶、食物淀粉、改性玉米淀粉、马铃薯淀粉、木薯淀粉。可以用于制造可用于本文中所描述口服单位剂型的胶囊的非动物来源材料描述于美国专利2011/0117180中，该专利的内容以参考的方式并入本文中。在一些实施方式中，使用Vegicaps®胶囊(Catalent)。

[0182] 在某些胶囊状口服单位剂型的实施方式中，胶囊未被包衣。

[0183] 在其他胶囊状口服单位剂型的实施方式中，胶囊被包衣。

[0184] 在某些包衣胶囊的实施方式中，以时间依赖性方式释放所述脂肪酸组合物。在各种实施方式中，在摄入后至少30分钟内没有PUFA组合物的大量释放。在某些实施方式中，当进行体外释放测试时，至少在30分钟内没有PUFA组合物的大量释放。在某些实施方式中，当进行体外测试时，不大于约20％的PUFA组合物在前30分钟内被释放。在所选择的实施方式中，当进行体外测试时，不大于约25％、30％、甚至不大于约35％的PUFA组合物在前30分钟内被释放。在具体实施方式中，依照由Bharat Mehta于2013年1月4日提交的名称为“用于Ω-3多不饱和脂肪酸的释放测试方法”的临时专利申请61/749,124中所描述的步骤对体外释放性能进行评估，该专利申请的全部公开内容以参考的方式并入本文中。

[0185] 在具体实施方式中，到摄入后约60分钟时大量的PUFA组合物被释放。在某些实施

方式中，当进行体外测试时，到约60分钟时大量的PUFA组合物被释放。在所选择的实施方式中，当进行体外测试时，到约60分钟时至少约40％的PUFA组合物被释放。在各种实施方式中，当进行体外测试时，到约60分钟时至少约45％、50％、55％、60％、甚至至少约65％的PUFA组合物被释放。在具体实施方式中，依照由Mehta于2013年1月4日提交的题目为“Ω-3多不饱和脂肪酸的释放测试的方法”的临时专利申请61/749,124中所描述的步骤对体外释放性能进行评估，该专利申请的全部公开内容以参考的方式并入本文中。

[0186] 在某些实施方式中，以如美国专利5,792,795和5,948,818中所描述的方式将胶囊包衣，这些专利的公开内容以参考的方式并入本文中。在各种包衣的实施方式中，包衣材料是聚(丙烯酸乙酯-丙烯酸甲酯)共聚物。在一些实施方式中，包衣材料是Eudragit NE30-D(Evonik Industries AG)，该材料具有约800,000的平均分子量。

[0187] 在其他包衣胶囊的实施方式中，将胶囊用肠溶包衣材料进行包衣，该包衣材料防止胶囊在胃中溶解或崩解但在小肠中所遇到的pH值下溶解。

[0188] 在各种实施方式中，口服单位剂型含有约100mg至约2000mg的PUFA组合物。在一些实施方式中，口服剂型含有约250mg的PUFA组合物。在一些实施方式中，口服剂型含有约500mg的PUFA组合物。在某些实施方式中，口服剂型含有约750mg的PUFA组合物。在一些实施方式中，口服剂型含有约1000mg的PUFA组合物。在其他实施方式中，口服进行含有约1500mg的PUFA组合物。在某些实施方式中，单位剂型含有在100mg和2000mg之间的非整数的重量的PUFA组合物。

5.4给药套件

[0189] 在另一方面，可将如上所述的多个单位剂型有用地共同封装在一个给药套件中以提高易用性和患者依从性。

[0190] 在某些实施方式中，给药套件是药瓶。在其他实施方式中，将多个剂型封装在泡罩包装中，任选地可将多个泡罩包装共同封装在药盒或其他壳套(enclosure)中。通常，无论是否在一个药瓶或者一个或多个泡罩包装中，多个单位剂型足够用于30天、60天、或90天的给药。因此，在所选择的实施方式中，单位剂型是含有大约1克的如上所述的药物组合物的胶囊，给药套件中包含30、60、90、120、150、180、240、270、或300粒这种胶囊。

[0191] 在各种实施方式中，在惰性气体(例如氮气或稀有气体)中将多个单位剂型进行封装，或者在真空中进行封装。

5.5治疗的方法

[0192] 在另一方面，提供治疗的方法。

5.5.1严重甘油三酯血症(>500mg/dL)的治疗

[0193] 在第一系列的治疗实施方式中，提供治疗严重高甘油三酯血症的方法。

[0194] 这些方法包括：以足以将血清或血浆甘油三酯水平降低到低于治疗前水平的量和持续时间，向具有≥500mg/dL的治疗前血清或血浆甘油三酯水平的患者口服给予上面部分5.2中描述的药物组合物。在典型的实施方式中，以一个或多个的上面部分5.3中所描述单位剂型的方式给予各剂量的所述药物组合物。

[0195] 在各种实施方式中，以将血清或血浆甘油三酯水平有效降低到比治疗前水平低至少约5％、6％、7％、8％或者至少约9％的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以将血清或血浆甘油三酯水平有效降低到比治疗前水平低至少10％、11％、12％、

13%、14%、15%、16%、17%、18%或19%的量和持续时间给予所述组合物。在具体实施方式中，以将血清或血浆甘油三酯水平有效降低到比治疗前水平低至少约20%的量和持续时间给予所述组合物。在各种实施方式中，以将血清或血浆甘油三酯类有效降低至比治疗前水平低至少约25%、30%、35%、40%、45%、甚至至少约50%的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0196] 在一系列实施方式中，以将血清或血浆甘油三酯水平有效降低至少约50mg/dL、60mg/dL、70mg/dL、80mg/dL、90mg/dL、甚至至少约100mg/dL的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以将血清或血浆甘油三酯水平有效降低至少约110mg/dL、120mg/dL、130mg/dL、140mg/dL、甚至至少约150mg/dL的量和持续时间给予所述组合物。在具体实施方式中，以将血清或血浆甘油三酯水平有效降低至少约160mg/dL、170mg/dL、180mg/dL、甚至至少约190mg/dL或200mg/dL的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0197] 在一些实施方式中，以将非-HDL-c水平有效降低到比治疗前水平低至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、甚至至少约10%的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0198] 在各种实施方式中，以将HDL-C水平有效提高到比治疗前水平高至少约1%的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以足以将HDL-C增加到比治疗前水平高至少约2%、3%、4%、甚至至少约5%、6%、7%、8%、9%、或10%的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0199] 在某些实施方式中，以将总胆固醇:HDL-C(TC/HDL)比有效降低到比治疗前水平低至少约1%的量和持续时间给予所述药物组合物。在一些实施方式中，以足以将TC/HDL比降低到比治疗前水平低至少约2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、甚至至少约9%或至少约10%的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0200] 在一些实施方式中，以将VLDL-c水平有效降低到比治疗前水平低至少约5%、6%、7%、8%、9%、或者至少约10%的量和持续时间而给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以足以将VLDL-c水平降低至比治疗前水平低至少约11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、甚至至少约18%、19%、或20%的量和持续时间给予所述药物组合物。在具体实施方式中，以足以将VLDL-c水平降低到比治疗前水平低至少约21%、22%、23%、24%、甚至至少约25%的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0201] 在多种实施方式中，以有效降低ApoCIII水平的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以足以将ApoCIII水平降低到比治疗前水平低至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、甚至至少约8%、9%或10%的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0202] 在一些实施方式中，以将血浆EPA水平有效提高到比治疗前水平高至少100%的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以将血浆EPA水平比治疗前水平有效提高至少约200%、250%、300%、甚至至少约350%、400%、450%、或至少约500%的量和持续时间给予所述药物组合物。在所选择的实施方式中，以将血浆EPA水平比治疗前水平有效提高至少约550%、600%、650%、甚至至少约700%的时间和量给予所述药物组合物。

[0203] 在各种实施方式中，以将血浆DHA水平比治疗前水平有效提高至少约50%的量和持续时间给予所述药物组合物。在具体实施方式中，以将血浆DHA水平比治疗前水平有效提高至少约55%、60%、65%、70%、甚至至少约75%、80%、85%、或90%的量和持续时间给予

所述药物组合物。

[0204] 在一系列实施方式中，以将血浆DPA水平比治疗前水平有效提高至少约50％的量和持续时间给予所述药物组合物。在一些实施方式中，以将血浆DPA水平比治疗前水平有效提高至少约55％、60％、65％、70％、75％，甚至至少约80％、85％、90％、95％、或100％的量和持续时间给予所述药物组合物。在所选择的实施方式中，以将血浆DPA水平比治疗前水平有效提高至少约110％、120％、甚至至少约125％量和持续时间给予所述药物组合物。

[0205] 在一系列实施方式中，以将血浆中花生四烯酸(AA)浓度有效降低到比治疗前水平低至少约5％的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以将血浆中的花生四烯酸(AA)浓度有效降低到比治疗前水平低至少约6％、7％、8％、9％、10％、甚至至少约11％，12％、13％、14％、甚至至少约15％、16％、17％、18％、19％、20％、或21％、22％、23％、24％、甚至至少约25％的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0206] 在某些实施方式中，以将血浆花生四烯酸浓度有效降低至少约25μg/mL量和持续时间给予所述药物组合物。在一些实施方式中，以足以将血浆AA水平降低至少约50μg/mL、55μg/mL、60μg/mL、65μg/mL、甚至至少约70μg/mL、75μg/mL、80μg/mL、85μg/mL、90μg/mL、甚至至少约95μg/mL或100μg/mL的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0207] 在某些实施方式中，有效量为至少约2g/日。在各种实施方式中，有效量为至少约3g/日。在具体实施方式中，有效量为至少约4g/日。在典型的实施方式中，有效量为约2g/日。在某些实施方式中，有效量为约4g/日。

[0208] 在典型的实施方式中，将所述药物组合物给药至少30天。在某些实施方式中，将所述药物组合物给药至少60天。在具体实施方式中，将所述药物组合物给药至少90天、120天、180天、240天、或至少360天。在某些实施方式中，不确定地给予所述药物组合物。

[0209] 在一些实施方式中，每天给予所述药物组合物。在其他实施方式中，每隔一天给予所述药物组合物。

[0210] 在具体实施方式中，以单一每日剂量给予每日剂量的药物组合物。在其他实施方式中，以分剂量给予所述药物组合物，并且将每日剂量划分为一天中的二次给药、三次给药、或者甚至四次给药。

[0211] 在某些实施方式中，与食物一起给予所述药物组合物。在某些实施方式中，与低脂肪膳食一起给予所述药物组合物。在其他实施方式中，在无食物的情况下给予所述药物组合物。在某些实施方式中，在禁食状态下给予所述药物组合物。

[0212] 在某些实施方式中，所述方法还包括给予他汀类。在具体实施方式中，他汀类药物是选自以下：普伐他汀、洛伐他汀、辛伐他汀、阿托伐他汀、氟伐他汀、罗苏伐他汀、替伐他汀、和匹伐他汀。

5.5.2高甘油三酯血症的治疗(200-500mg/dL)

[0213] 在另一系列治疗实施方式中，提供治疗具有约200mg/dL至约500mg/dL的治疗前血清或血浆甘油三酯水平的患者的方法。在某些实施方式中，这些患者已接受他汀类治疗；在这些患者中，治疗前血清或血浆甘油三酯水平是在上面部分5.2中所描述药物组合物的给药之前在他汀类治疗期间所测量的水平。

[0214] 所述方法包括口服给予有效量的他汀类，并且进一步以足以将血清或血浆甘油三酯水平降低到低于用本文中所描述药物组合物治疗前测量水平的量和持续时间口服给予

本文部分5.2中描述的药物组合物。在相同的给药计划中或者甚至在同一天，部分5.2中描述的药物组合物和他汀类药物无需在相同时间给药。可以在患者同时从这两种药物获得治疗益处的充分接近的时间，给予这两种药物。

[0215] 在某些实施方式中，以足以将血清或血浆甘油三酯水平降低到比治疗前水平低至少约5％的量和持续时间给予部分5.2中所描述的药物组合物。在各种实施方式中，以足以将血清或血浆甘油三酯水平降低到比治疗前水平低至少约6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、甚至至少约16％、17％、18％、19％、或至少约20％的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0216] 在一些实施方式中，以足以将非-HDL-胆固醇降低到比治疗前水平低至少约1％、至少约2％、至少约3％、4％、5％、甚至至少约7％、8％、9％、或至少约10％的量和持续时间给予本文部分5.2中所描述的药物组合物。

[0217] 在一系列实施方式中，以足以将HDL-c水平提高到至少比治疗前水平高约1％、2％、3％、或更高的量和持续时间给予本文部分5.2中所描述的药物组合物。

[0218] 在一些实施方式中，以将血浆EPA水平比治疗前水平有效提高至少100％的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以将血浆EPA水平比治疗前水平有效提高至少约200％、250％、300％、甚至至少约350％、400％、450％、或至少约500％的量和持续时间给予所述药物组合物。在所选择的实施方式中，以将血浆EPA水平比治疗前水平有效提高至少约550％、600％、650％、甚至至少约700％的时间和量给予所述药物组合物。

[0219] 在各种实施方式中，以将血浆DHA水平有效提高到比治疗前水平高至少约50％的量和持续时间给予所述药物组合物。在具体实施方式中，以将血浆DHA水平比治疗前水平有效提高至少约55％、60％、65％、70％、甚至至少约75％、80％、85％、或90％量和持续时间给予所述药物组合物。

[0220] 在一系列实施方式中，以将血浆DPA水平比治疗前水平有效提高至少约50％的量和持续时间给予所述药物组合物。在一些实施方式中，以将血浆DPA水平比治疗前水平有效提高至少约55％、60％、65％、70％、75％、甚至至少约80％、85％、90％、95％、或100％的量和持续时间给予所述药物组合物。在所选择的实施方式中，以将血浆DPA水平比治疗前水平有效提高至少约110％、120％、甚至至少约125％量和持续时间给予所述药物组合物。

[0221] 在一系列实施方式中，以将血浆中的花生四烯酸(AA)浓度有效降低到比治疗前水平低至少约5％的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以将血浆中的花生四烯酸(AA)浓度有效降低到比治疗前水平低至少约6％、7％、8％、9％、10％、甚至至少约11％、12％、13％、14％、甚至至少约15％、16％、17％、18％、19％、20％、或21％、22％、23％、24％、甚至至少约25％的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0222] 在某些实施方式中，以将血浆花生四烯酸浓度有效降低至少约25μg/mL的量和持续时间给予所述药物组合物。在一些实施方式中，以足以将血浆AA水平降低至少约50μg/mL、55μg/mL、60μg/mL、65μg/mL、甚至至少约70μg/mL、75μg/mL、80μg/mL、85μg/mL、90μg/mL、甚至至少约95μg/mL或100μg/mL的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0223] 在各种实施方式中，在如上面部分5.3中所描述的单位剂型中给予文中部分5.2中描述的药物组合物。

[0224] 在各种实施方式中，以至少约1g/日的量给予所述药物组合物。在一些实施方式

中，以至少约2g/日的量给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以至少约3g/日的量给予所述药物组合物。在具体实施方式中，以至少约4g/日的量给予所述药物组合物。在典型的实施方式中，以约2g/日的量给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以约3g/日或约4g/日的量给予所述药物组合物。

5.5.3增加血浆EPA:AA比的治疗

[0225] 还提供用于无论患者治疗前血浆甘油三酯水平如何均可提高EPA:AA比的方法。所述方法包括：以足以将患者的EPA:AA比提高到至少约0.25的量和持续时间，向具有低于约0.25的EPA:AA比的患者给予本文部分5.2中描述的药物组合物。在一些实施方式中，以足以将患者的EPA:AA比提高到至少约0.3、至少约0.35、至少约0.40、至少约0.45、至少约0.50、甚至至少约0.55、0.60、0.61、0.62、0.63、0.64、或0.65的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0226] 在某些实施方式中，所述方法包括以将血浆EPA水平有效提高到比治疗前水平高至少100％的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以将血浆EPA水平比治疗前水平有效提高至少约200％、250％、300％、甚至至少约350％、400％、450％、或至少约500％的量和持续时间给予所述药物组合物。在所选择的实施方式中，以将血浆EPA水平比治疗前水平有效提高至少约550％、600％、650％、甚至至少约700％的时间和量给予所述药物组合物。

[0227] 在各种实施方式中，以将血浆DHA水平比治疗前水平有效提高至少约50％的量和持续时间给予所述药物组合物。在具体实施方式中，以将血浆DHA水平比治疗前水平有效提高至少约55％、60％、65％、70％、甚至至少约75％、80％、85％、或90％的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0228] 在一系列实施方式中，以将血浆DPA水平有效提高到比治疗前水平高至少约50％的量和持续时间给予所述药物组合物。在一些实施方式中，以将血浆DPA水平比治疗前水平有效提高至少约55％、60％、65％、70％、75％、甚至至少约80％、85％、90％、95％、或100％量和持续时间给予所述药物组合物。在所选择的实施方式中，以将血浆DPA水平比治疗前水平提高至少约110％、120％、甚至至少约125％量和持续时间给予所述药物组合物。

[0229] 在一系列实施方式中，以将血浆中的花生四烯酸(AA)浓度有效降低到比治疗前水平低至少约5％的量和持续时间给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以将血浆中的花生四烯酸(AA)浓度有效降低到比治疗前水平低至少约6％、7％、8％、9％、10％、甚至至少约11％、12％、13％、14％、甚至至少约15％、16％、17％、18％、19％、20％、或21％、22％、23％、24％、甚至至少约25％的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0230] 在某些实施方式中，以将血浆花生四烯酸浓度有效降低至少约25μg/mL的量和持续时间给予所述药物组合物。在一些实施方式中，以足以将血浆AA水平降低至少约50μg/mL、55μg/mL、60μg/mL、65μg/mL、甚至至少约70μg/mL、75μg/mL、80μg/mL、85μg/mL、90μg/mL、甚至至少约95μg/mL或100μg/mL的量和持续时间给予所述药物组合物。

[0231] 在各种实施方式中，在如上面部分5.3中描述的单位剂型中给予本文部分5.2中描述的药物组合物。

[0232] 在各种实施方式中，以至少约1g/日的量给予所述药物组合物。在一些实施方式中，以至少约2g/日的量给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以至少约3g/日的量给予

所述药物组合物。在具体实施方式中，以至少约4g/日的量给予所述药物组合物。在典型的实施方式中，以约2g/日的量给予所述药物组合物。在某些实施方式中，以约3g/日或约4g/日的量给予所述药物组合物。

5.5.4.用于降低血清或血浆ApoCIII水平的治疗

[0233] 也提供用于无论患者治疗前血浆甘油三酯水平如何提高患者血清或血浆ApoCIII水平的方法。这些方法包括：以足以降低患者血清或血浆ApoCIII水平的量和持续时间，向需要较低ApoCIII水平的患者给予本文部分5.2中描述的药物组合物。在典型的实施方式中，患者具有患心血管疾病的危险。

[0234] 在某些实施方式中，以足以将ApoCIII水平降低到比治疗前水平低至少约1％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、甚至至少约8％、9％或10％的量和持续时间给予所述药物组合物。

5.5.5.其他治疗方法

[0235] 在另一方面，将本文中描述的药物组合物用于治疗其他病症，包括非酒精性脂肪肝炎(NASH)、高脂蛋白血症(包括III型高脂蛋白血症)、和代谢综合症中的一种或多种疾病。

[0236] 在某些实施方式中，将所述药物组合物用于降低对血小板聚集抑制剂(例如Plavix)的耐药性，包括使用于美国专利申请13/620,312中所描述方法的血小板聚集抑制剂，该专利的全部公开内容以参考的方式并入本文中。

5.6方法

[0237] 在另一方面，提供一种用于将鱼油精制成包含采用游离酸形式的PUFA的药物组合物，尤其是用于将鱼油精制成本文部分5.2中所描述药物组合物的改进方法。

5.6.1中间原料的制备

[0238] 中间原料是通过利用在本领域众所周知的标准技术对从鱼(例如来自鳀科、鲱科和鲭科的鱼)中所获得鱼体油进行酯交换而制备，其中对方法参数进行调整以便获得落在下面部分5.6.2中所描述容限内的组成。

[0239] 合适的标准方法步骤描述于例如美国专利5,656,667、5,719,302、5,945,318、6,204,401、6,518,049、6,528,669、7,491,522、7,550,613、7,678,930、7,718,698、7,732,488以及美国专利5,472,705、5,750,572、5,776,978、5,869,714、7,541,480、7,553,870、和7,619,002，这些专利的内容以参考的方式并入本文中。

[0240] 在一个示例性方法中，从鱼(例如鳀鱼、沙丁鱼、鲭鱼和鲱鱼)中提取粗甘油三酯油。然后对该粗甘油三酯油进行碱精制，例如使用氢氧化钠，并进行除臭、研磨和干燥。然后通过酯交换将PUFA转变成酯类，例如甲基酯类或乙基酯类。可以例如通过在乙醇和乙醇钠存在下的乙醇解反应来进行酯交换，以产生乙基酯类。在酯交换之后至少是一次通常多次的蒸馏。

[0241] 在另一个示例性方法中，对甘油三酯油进行碱精制和除臭，与乙醇进行酯交换，例如通过在乙醇和乙醇钠存在下的乙醇解反应，然后经过一次或多次的蒸馏。

[0242] 图2给出了用于生产中间原料的示例性方法的流程图。在此方法中，将鱼在水中煮并且将所形成的液体与固体的混合物过滤，再将液体部分离心以去除水相。将从前面的步骤余留下的油组分用碱处理以中和任何存在的游离脂肪酸，接着进行水洗。此后，例如通过

蒸馏对采用甘油三酯形式的碱精制鱼油进行除臭，并且减少环境污染物。利用与乙醇的反应，通过使用乙醇钠进行催化，将干燥的除臭鱼油转变成乙基酯形式。反应结束后，通过蒸馏去除过量的乙醇，将乙基酯类用柠檬酸溶液洗涤然后用水洗涤。在此示例性方法中，将乙基酯类蒸馏以获得要求浓度的用作中间原料的EPA乙基酯类(EPA-EE)和DHA乙基酯类(DHA-EE)。在一些实施方式中，实施多次蒸馏。基于输入乙基酯组合物的组成来调整所采用的提取条件，从而获得要求浓度的用作中间原料的EPA-EE和DHA-EE，正如下面部分5.6.2中的详细描述。

[0243] 这些方法步骤的替代步骤是众所周知的，并且只要所形成中间原料的组成落在下面部分5.6.2中定义的容现内便可视情况而采用。

5.6.2中间原料组合物

5.6.2.1典型实施方式

[0244] 中间原料组合物包含多种的Ω-3 PUFA种类，各种类基本上采用乙基酯的形式存在。

[0245] 中间原料组合物包含EPA、DHA和DPA，各种类基本上采用乙基酯的形式。

[0246] 在各种实施方式中，中间原料组合物以分别落在表9中所列举平均值的-3SD至+3SD范围内的量含有EPA乙基酯类(EPA-EE)、DHA-EE、和DPA-EE，该量是以该组合物中所有脂肪酸乙基酯类的气相色谱的面积百分比方式计算。在某些实施方式中，每个EPA-EE、DHA-EE和DPA-EE分别落在所列举平均值的-2SD至+2SD内。在某些实施方式中，每个EPA-EE、DHA-EE和DPA-EE分别落在所列举平均值的-1SD至+1SD内。在某些实施方式中，中间原料组合物在由表8中所描述批次中的各自最小和最大面积百分比所设定范围内的量含有EPA-EE、DHA-EE和DPA-EE。

[0247] 在某些实施方式中，所述组合物还包含一种或多种Ω-3多不饱和脂肪酸，各自基本上采用乙基酯的形式，选自以下：α-亚麻酸(C18:3 n-3)、十八碳四烯酸(C18:4 n-3)、二十碳三烯酸(C20:3 n-3)、二十碳四烯酸(C20:4 n-3)、和二十一碳五烯酸(C21:5 n-3)。在各种实施方式中，一种或多种其他Ω-3-EE种类，若存在，是以分别落在表9中所列举平均值的-3SD至+3 SD范围内的量而存在，该量是以组成中所有脂肪酸乙基酯类的气相色谱的面积百分比的形式而计算。在某些实施方式中，各种类分别落在所列举平均值的-2SD至+2 SD内。在某些实施方式中，各种类分别落在所列举平均值的-1SD至+1SD的范围内。在某些实施方式中，一种或多种其他Ω-3-EE种类，若存在，是以落在由表8中所描述批次中的各自最小和最大面积百分比所设定范围内的量而存在，该量是以组合物中所有脂肪酸乙基酯类的气相色谱的面积百分比的形式而计算。

[0248] 在某些实施方式中，中间原料组合物还包含至少一种Ω-6PUFA种类。在各种实施方式中，所述组合物包含选自以下组的一种或多种Ω-6多不饱和脂肪酸的乙基酯类：亚油酸(C18:2 n-6)、γ-亚麻酸(C18:3 n-6)，二十碳二烯酸(C20:3 n-6)、二高-γ-亚麻酸(“DGLA”)(C20:3 n-6)、花生四烯酸(C20:4 n-6)(“AA”)、和DPA(C22:5 n-6)。各Ω-6 PUFA种类基本上是以乙基酯形式存在。

[0249] 在各种实施方式中，Ω-6-EE的一种或多种种类，若存在，是以分别落在表9中所列举平均值的-3SD至+3 SD范围内的量而存在，该量是以组合物中所有脂肪酸乙基酯类的气相色谱的面积百分比的形式进行计算。在某些实施方式中，各种类分别落在所列举平均值

的-2SD至+2 SD内。在某些实施方式中，各种类分别落在所列举平均值的-1SD至+1SD内。在某些实施方式中，一种或多种其他的Ω-3-EE种类，若存在，是以落在由表8中所描述批次的各自最小和最大面积百分比所设定的范围内的量而存在，该量是以组合物中所有脂肪酸乙基酯类的气相色谱的面积百分比的方式而计算。

5.6.2.2其他实施方式

[0250] 在各种其他实施方式中，中间原料组合物以约45.0％至约53.0％(a/a)的量含有EPA乙基酯类(EPA-EE)，该量是以组合物中所有脂肪酸乙基酯类的气相色谱的面积百分比的方式进行计算。在某些实施方式中，EPA-EE是以约48.40％至约50.04％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，EPA-EE是以约48.67％至约49.77％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，中间原料组合物以约48.95％至约49.49％(a/a)的量含有EPA-EE。在某些实施方式中，中间原料组合物以约49.22％(a/a)的量含有EPA-EE。

[0251] 在各种实施方式中，EPA-EE是以约44.20％(a/a)至约46.92％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，EPA-EE是以约45.56％(a/a)的量而存在。

[0252] 在各种实施方式中，EPA-EE是以约425-460mg/g的量而存在。

[0253] 在各种其他实施方式中，中间原料组合物以约13.0％至约20.0％(a/a)的量含有DHA乙基酯类(DHA-EE)，该量是以组合物中所有脂肪酸乙基酯类的气相色谱的面积百分比的形式而计算。在各种实施方式中，DHA-EE是以约16.43％至18.28％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，中间原料以约16.74％至约17.98％(a/a)的量含有DHA-EE。在一些实施方式中，中间原料组合物以约17.05％至约17.67％(a/a)的量含有DHA-EE。在某些实施方式中，中间原料以约17.4％(a/a)的量含有DHA-EE。

[0254] 在一些实施方式中，中间原料以约14.77％(a/a)-约17.87％(a/a)的量含有DHA。在一些实施方式中，中间原料以约16.32％(a/a)的量含有DHA。

[0255] 在一些实施方式中，中间原料以150至170mg/g的量含有DHA。

[0256] 在各种其他实施方式中，DPA-EE是以约4.10％至约6.74％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，DPA-EE是以约4.54％至约6.30％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，DPA-EE是以约4.98％至约5.86％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，DPA-EE是以约5.42％(a/a)的量而存在。

[0257] 在各种实施方式中，DPA-EE是以约0.41％至约0.70％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，DPA-EE是以约0.56％(a/a)的量而存在。

[0258] 在各种实施方式中，中间原料组合物还包含花生四烯酸(C20:4 n-6)的乙基酯。在各种实施方式中，AA-EE是以约1.72％至约2.81％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，花生四烯酸乙基酯是以约1.9％至约2.63％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，花生四烯酸乙基酯是以约2.09％至约2.45％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，花生四烯酸乙基酯是以约2.27％(a/a)的量而存在。

[0259] 在某些实施方式中，花生四烯酸乙基酯是以不大于3.0％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，花生四烯酸乙基酯是以不大于4.0％(a/a)的量而存在。

[0260] 在还包含α-亚麻酸乙基酯的中间原料的实施方式中，在某些实施方式中，α-亚麻酸乙基酯是以约0.3％至约0.45％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，α-亚麻酸乙基酯是以约0.4％(a/a)的量而存在。

[0261] 在一些实施方式中，α-亚麻酸乙基酯是以约0.24％(a/a)至0.62％(a/a)的量而存在。

[0262] 在一些实施方式中，α-亚麻酸乙基酯是以约0.43％(a/a)的量而存在。

[0263] 在还包含十八碳四烯酸(C18:4 n-3)乙基酯的中间原料的某些实施方式中，十八碳四烯酸乙基酯是以约0.60％至约2.03％(a/a)的量而存在，该量是以组合物中所有脂肪酸乙基酯类的气相色谱的面积百分比的形式而计算。在一些实施方式中，十八碳四烯酸乙基酯是以约0.84％至约1.80％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，十八碳四烯酸乙基酯是以约1.10％至约1.60％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，十八碳四烯酸乙基酯是以约1.32％(a/a)的量而存在。

[0264] 在各种实施方式中，十八碳四烯酸乙基酯是以约0.64％至约1.93％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，十八碳四烯酸乙基酯是以约1.28％(a/a)的量而存在。

[0265] 在还包含二十碳三烯酸(C20:3 n-3)乙基酯的中间原料的多种实施方式中，二十碳三烯酸乙基酯是以小于约0.1％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，二十碳三烯酸乙基酯是以小于约0.4％(a/a)的量而存在。

[0266] 在还包含二十碳四烯酸(C20:4 n-3)乙基酯的中间原料的实施方式中，在某些实施方式中二十碳四烯酸乙基酯是以约1.57％至约2.10％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，二十碳四烯酸乙基酯是以约1.66至约2.02％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，二十碳四烯酸乙基酯是以1.75至约1.93％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，二十碳四烯酸乙基酯是以约1.84％(a/a)的量而存在。

[0267] 在某些实施方式中，二十碳四烯酸乙基酯是以约1.42％至约2.49％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，二十碳四烯酸乙基酯是以约1.95％(a/a)的量而存在。

[0268] 在还包含二十一碳五烯酸(C21:5 n-3)乙基酯的中间原料的多种实施方式中，二十一碳五烯酸乙基酯是以约2.25％至约2.36％(a/a)的量而存在。在各种实施方式中，二十一碳五烯酸乙基酯是以约2.27％至约2.34％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，二十一碳五烯酸乙基酯是以约2.29％至约2.32％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，二十一碳五烯酸乙基酯是以约2.31％(a/a)的量而存在。

[0269] 在一些实施方式中，二十一碳五烯酸乙基酯是以约1.42％至约2.76％(a/a)的量而存在。在具体实施方式中，二十一碳五烯酸乙基酯是以约2.09％(a/a)的量而存在。

[0270] 在还包含Ω-6 PUFA即亚油酸(C18:2 n-6)乙基酯(亚油酸-EE)的中间原料的一系列实施方式中，亚油酸乙基酯是以约0.53％至约0.56％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，亚油酸乙基酯是以约0.53％至约0.55％(a/a)的量而存在。在一些实施方式中，亚油酸乙基酯是以约0.54％至约0.55％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，亚油酸乙基酯是以约0.54％(a/a)的量而存在。

[0271] 在一些实施方式中，亚油酸乙基酯是以约0.38％至约0.83％(a/a)的量而存在。在某些实施方式中，亚油酸乙基酯是以约0.60％(a/a)的量而存在。

[0272] 在还包含γ-亚麻酸(C18:3 n-6)乙基酯(γ-亚麻酸-EE)的中间原料的实施方式中，在示例性实施方式中，γ-亚麻酸乙基酯是以小于0.1％(a/a)的量而存在。在还包含γ-亚麻酸(C18:3 n-6)的乙基酯的中间原料的实施方式中，γ-亚麻酸乙基酯是以小于0.4％(a/a)的量而存在。

[0273] 在还包含二十碳二烯酸(C20:2 n-6)乙基酯(二十碳二烯酸-EE)的中间原料的实施方式中,在各种示例性实施方式中二十碳二烯酸乙基酯是以约0.00%至约0.63%(a/a)的量而存在。在一些实施方式中,二十碳二烯酸乙基酯是以约0.00%至约0.45%(a/a)的量而存在。在某些实施方式中,二十碳二烯酸乙基酯是以约0.00%至约0.27%(a/a)的量而存在。在具体实施方式中,二十碳二烯酸乙基酯是以约0.09%(a/a)的量而存在。

[0274] 在某些实施方式中,二十碳二烯酸乙基酯是以约0.00%至约0.54%(a/a)的量而存在。在具体实施方式中,二十碳二烯酸乙基酯是以约0.25%(a/a)的量而存在。

[0275] 在还包括二高-γ-亚麻酸(C20:3 n-6)乙基酯(DGLA-EE)的中间原料的多个实施方式中,DGLA-EE是以约0.35%至约0.68%(a/a)的量而存在。在一些实施方式中,二高-γ-亚麻酸乙基酯是以约0.41%至约0.63%(a/a)的量而存在。在一些实施方式中,二高-γ-亚麻酸乙基酯是以约0.46%至约0.57%(a/a)的量而存在。

[0276] 在一些实施方式中,二高-γ-亚麻酸乙基酯是以约0.26%至约0.55%(a/a)的量而存在。在一些实施方式中,二高-γ-亚麻酸乙基酯是以约0.40%(a/a)的量而存在。

[0277] 某些其他实施方式还包含采用乙基酯形式的二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)的中间原料。在多种这些实施方式中,二十二碳五烯酸-EE是以约0.54%至约0.80%(a/a)的量而存在。在一些实施方式中,二十二碳五烯酸-EE是以约0.59%至约0.76%(a/a)的量而存在。在各种实施方式中,二十二碳五烯酸-EE是以约0.63%至约0.72%(a/a)的量而存在。在具体实施方式中,二十二碳五烯酸-EE是以约0.67%(a/a)的量而存在。

[0278] 在一些实施方式中,二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)-EE是以约1.45%至约7.21%(a/a)的量而存在。在一些实施方式中,二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)-EE是以约4.33%(a/a)的量而存在。

5.6.3尿素包合

[0279] 具有如上定义组成的中间经酯交换的原料进行尿素包合。在典型实施方式中,用于包合的尿素的量落在算法确定的范围内。

[0280] 因此,在另一方面,提供一种用于将鱼油精制成包含采用游离酸形式的PUFA的药物组合物的改进方法、尤其是用于将鱼油精制成本文中所描述药物组合物的改进方法。改进包括使在规定百分率范围内含有各种Ω-3和Ω-6 PUFA种类的乙基酯类的酯交换鱼油的中间原料经历尿素包合步骤,其中用于包合的尿素的量是在根据(i)式I(a)、或(ii)根据式I(b)、或者(iii)根据式I(a)和式I(b)两者,并且将尿素量设定为在由公式I(a)和I(b)的结果所设定范围内(包括端值)的值,例如其平均值,其中公式如下:

$$[\text{尿素}]=F_{\text{富集-DHA}}*((\text{DHA}_{\text{目标}}-\text{DHA-EE}_{\text{输入}})/\text{DHA-EE}_{\text{输入}}))\quad(\text{Ia})$$

$$[\text{尿素}]=F_{\text{富集-EPA}}*((\text{EPA}_{\text{目标}}-\text{EPA-EE}_{\text{输入}})/\text{EPA-EE}_{\text{输入}}))\quad(\text{Ib})。$$

[0281] 基于期望的最终组成来选择DHA和EPA目标值。富集因子$F_{\text{富集-DHA}}$和$F_{\text{富集-EPA}}$可以是相同或不同的。在一个典型的实施方式中,$F_{\text{富集-DHA}}$与$F_{\text{富集-EPA}}$是相同的,具有约100/0.34或者约300的值。

[0282] 使用算法确定量的尿素并按照标准技术进行包合。参见例如美国专利4,377,526、5,106,542、5,243,046、5,679,809、5,945,318、6,528,669、6,664,405、7,541,480、7,709,668、和8,003,813,这些专利的公开内容以参考的方式并入本文中。

[0283] 在一个示例性实施方式中,将中间原料与尿素的乙醇溶液混合。于60℃-80℃下进

行包合，然后使该混合物冷却，此后将该混合物过滤或离心以取出尿素包合物。通过蒸馏去除乙醇，将油用水洗脱数次。

5.6.4.包合后的后处理

[0284] 在取出尿素包合物后，通过标准技术将未包合的PUFA酯类水解成游离脂肪酸。在水解之前或者之后通过蒸馏将该组合物进一步纯化，并且利用一种或多种的以下标准技术做进一步处理：使用活性炭的处理、层析纯化、溶剂去除、漂白(例如用漂白粘土)、和超临界提取。添加抗氧化剂，例如BHA或α-生育酚。

6.实施例

6.1实施例1：满足规格要求的采用游离酸形式的Ω-3 PUFA组合物的可靠生产需要尿素包合

[0285] 尿素包合络合(包合)是鱼油精制中经常采用的标准步骤，用以去除饱和及单不饱和长链脂肪酸，因此在所形成组合物中富集期望的长链Ω-3多不饱和脂肪酸。尽管长期应用，但(参见例如美国专利4,377,526)，和设计用来表征各种生理化学参数对工艺的影响的特征的研究(参见例如Hayes等人的“Triangular Phase Diagrams To Predict The Fractionation Of Free Fatty Acid Mixtures Via Urea Complex Formation”，Separation Sci.Technol.36(1)：45-58(2001)和Hayes的“Purirfication of Free Fatty Acids via Urea Inclusion Compounds”《功能性脂类的手册(Handbook of Functional Lipids)》(Taylor&Francis Group)(2005))，尿素包合富集包含Ω-3 PUFA和Ω-6 PUFA两种类的长链多不饱和脂肪酸的单独种类的程度仍然是不可预测的。尿素包合步骤中此残余的不可预测性、和尿素包合产生不允许水平的氨基甲酸乙酯(这将会必须做进一步处理)的可能性，最初使得倾向于从用于生产符合下面表1中所述规格的采用游离酸形式的Ω-3 PUFA的医药级组合物的工业规模精制工艺中省略尿素包合。

表1
初始目标规格

参数 (所有种类是以游离酸的形式存在)	规格界限
EPA	50.0-60.0%(m/m)
DHA	15.0-25.0%(m/m)
EPA+DHA	70.0-80.0%(m/m)
总Ω-3脂肪酸	80.0-90.0%(m/m)
花生四烯酸	nmt 4.5%(a/a)
饱和脂肪酸	nmt 3.0%(a/a)
单不饱和脂肪酸	nmt 5.0%(a/a)
Ω-6脂肪酸	nmt 10.0%(a/a)
其他不饱和脂肪酸	nmt 5.0%(a/a)
超过0.1%的总未确定物	nmt 2.0%(a/a)

“(m/m)”组合物中所有脂肪酸的重量的百分比

“(a/a)”组合物中所有脂防酸的气相色谱的面积的百分比

“nmt”不大于。

[0286] 然而，开发无尿素方法的早期努力表明这种方法不能可靠地以工业规模生产符合所需目标组成规格的药物组合物。下面的表2中给出了两个这种批号的数据。给落在期望规格范围外的值加上下划线。

表2

参数 (所有种类是以游离酸形式存在)	规格界限	批次1 (未去硬脂的)		批次2 (去硬脂的)	
		(m/m)	(a/a)	(m/m)	(a/a)
EPA	50.0-60.0%(m/m)	49.0	51.5	49.8	53.0
DHA	15.0-25.0%(m/m)	19.6	20.3	19.6	20.9
EPA + DHA	70.0-80.0%(m/m)	68.3	71.8	69.4	73.9
总Ω-3 脂肪酸	80.0-90.0%(m/m)	78.0	81.2	79.3	83.7
花生四烯酸	Nmt 4.5%(a/a)	2.8	2.8	2.9	2.8
饱和脂肪酸	Nmt 3.0%(a/a)	1.9	2.6	0.6	0.5
单不饱和脂肪酸	nmt 5.0%(a/a)	6.6	5.1	6.7	5.1
Ω-6 脂肪酸	nmt 10.0%(a/a)	4.2	5.3	4.3	5.2
其他不饱和脂肪酸	nmt 5.0%(a/a)	2.7	0.3	2.1	0.4
超过0.1%的总未确定物	nmt 2.0%(a/a)	5.4	5.5	6.3	5.4

[0287] 因此，探索出了一种采用尿素包合的工艺，并且发现通过对存在于中间乙基酯原料中的PUFA种类的严格组成控制加上采用算法确定范围内的尿素量，可以可靠地生产不超过可接受氨基甲酸乙酯限值的符合表1中所述规格的药物组合物。

[0288] 部分5.6.2及实施例2和4给出了中间乙基酯原料的组成要求。见表3-6、8-9。

[0289] 发现需使用的尿素的最佳量是(i)根据公式I(a)，或(ii)根据公式I(b)，或(iii)同时根据公式I(a)和公式I(b)而确定的，并且将尿素量设定为在由公式I(a)和I(b)的结果所设定范围内的值(包括终端)，例如这两个结果的平均值，其中公式如下：

$$[\text{尿素}] = F_{\text{富集-DHA}} \times ((DHA_{\text{目标}} - DHA - EE_{\text{输入}}) / DHA - EE_{\text{输入}})) \quad (Ia)$$

$$[\text{尿素}] = F_{\text{富集-EPA}} \times ((EPA_{\text{目标}} - EPA - EE_{\text{输入}}) / EPA - EE_{\text{输入}})) \quad (Ib)。$$

富集因子$F_{\text{富集-DHA}}$与$F_{\text{富集-EPA}}$可以是相同或不同的。使用实施例2和4中所描述中间原料批次的代表值已被发现为约100/0.34(即，约300)。

6.2实施例2：采用受控尿素包合的四个示例性生产批次的组成分析确认符合规格要求

[0290] 制备四个示例性生产批次的采用游离酸形式的多不饱和脂肪酸。对仅使用其中指定的多不饱和脂肪酸种类落在规定范围界限内的批次的乙基酯中间原料实施严格的组成控制。首先使用小测试批次的乙基酯中间原料并改变尿素的浓度由此改变油:尿素:乙醇比，在实验室规模下经验性确定用于以生产规模进行包合的尿素量。由测试规模测定所建议的最佳浓度被确认落在由实施例1中描述的算法所要求的范围内，并且用于生产规模制造。

[0291] 通过气相色谱法测量中间酯交换原料和最终药物组合物(“活性药物成分”或“API”)的组成。将结果汇总于下面的表3-表6中。

表 3

PUFA 种类		中间原料	API
(常用名)	(特性)	(经酶交换的乙基酯类) (% a/a)	(最终的游离脂肪酸组合物) (% a/a)
亚油酸	18:2 n-6	0.54	0.55
γ - 亚麻酸	18:3 n-6	0.00	0.15
α - 亚麻酸	18:3 n-3	0.45	0.39
十八碳四烯酸	18:4 n-3	1.52	1.70
二十碳二烯酸	20:2 n-6	0.00	0.10
二高 - γ - 亚麻酸	20:3 n-6	0.47	0.33
花生四烯酸(AA)	20:4 n-6	2.11	2.43
二十碳三烯酸	20:3 n-3	0.00	0.15
二十碳四烯酸	20:4 n-3	1.78	2.18
二十碳五烯酸(EPA)	20:5 n-3	49.42	57.25
二十一碳五烯酸	21:5 n-3	2.32	2.79
二十二碳五烯酸	22:5 n-6	0.71	0.83
二十二碳五烯酸(DPA)	22:5 n-3	5.80	6.23
二十二碳六烯酸(DHA)	22:6 n-3	17.09	19.58
聚集测量			
	总计%	99.41	98.43
	PUFA%	82.77	96.30
	总 Ω-3	78.37	90.26
	总 Ω-6	3.83	4.41
	剩余的 PUFA	0.57	1.63
	饱和物%	4.34	0.35
	单不饱和物%	12.30	1.34
	未知物%	0.60	0.42

表 4

PUFA 种类		中间原料	API
(常用名)	(特性)	(经酯交换的乙基酯类) (% a/a)	(最终游离脂肪酸的组合物) (% a/a)
亚油酸	18:2 n-6	0.54	0.49
γ - 亚麻酸	18:3 n-6	0.00	0.14
α - 亚麻酸	18:3 n-3	0.45	0.34
十八碳四烯酸	18:4 n-3	1.52	1.67
二十碳二烯酸	20:2 n-6	0.00	0.13
二高 - γ - 亚麻酸	20:3 n-6	0.47	0.39
花生四烯酸(AA)	20:4 n-6	2.11	2.45
二十碳三烯酸	20:3 n-3	0.00	0.25
二十碳四烯酸	20:4 n-3	1.78	2.02
二十碳五烯酸(EPA)	20:5 n-3	49.42	57.64
二十碳五烯酸	21:5 n-3	2.32	2.75
二十二碳五烯酸	22:5 n-6	0.71	0.79
二十二碳五烯酸(DPA)	22:5 n-3	5.80	6.22
二十二碳六烯酸(DHA)	22:6 n-3	17.09	19.65
聚集测量			
	总计%	99.41	98.60
	PUFA%	82.77	96.35
	总 Ω-3	78.37	90.54
	总 Ω-6	3.83	4.38
	剩余的 PUFA	0.57	1.43
	饱和物%	4.34	0.31
	单不饱和物%	12.30	1.25
	未知物%	0.60	0.69

表 5

PUFA 种类		中间原料	API
(常用名)	(特征)	(经酯交换的乙基酯类) (% a/a)	(最终游离脂肪酸的组合物) (% a/a)
亚油酸	18:2 n-6	0.54	0.59
γ - 亚麻酸	18:3 n-6	0.00	0.12
α - 亚麻酸	18:3 n-3	0.38	0.38
十八碳四烯酸	18:4 n-3	1.09	1.16
二十碳二烯酸	20:2 n-6	0.00	0.12
二高 - γ - 亚麻酸	20:3 n-6	0.57	0.45
花生四烯酸	20:4 n-6	2.42	2.84
二十碳三烯酸	20:3 n-3	0.00	0.22
二十碳四烯酸	20:4 n-3	1.97	2.11
二十碳五烯酸(EPA)	20:5 n-3	49.20	53.81
二十一碳五烯酸	21:5 n-3	2.30	2.72
二十二碳五烯酸	22:5 n-6	0.64	0.13
二十二碳五烯酸(DPA)	22:5 n-3	5.06	5.46
二十二碳六烯酸(DHA)	22:6 n-3	17.64	19.45
聚集测量			
	总计%	99.60	98.76
	PUFA%	82.48	93.77
	总 Ω-3	77.64	87.31
	总 Ω-6	4.36	4.24
	剩余的 PUFA	0.48	2.22
	饱和物%	5.15	0.24
	单不饱和物%	11.98	2.97
	未知物%	0.40	1.79

表 6

PUFA 种类		中间原料	API
(常用名)	(特性)	(经酯交换的乙基酯类) (% a/a)	(最终游离脂肪酸的组合物) (% a/a)
亚油酸	18:2 n-6	0.55	0.55
γ-亚麻酸	18:3 n-6	0.00	0.12
α-亚麻酸	18:3 n-3	0.38	0.37
十八碳四烯酸	18:4 n-3	1.13	1.26
二十碳二烯酸	20:2 n-6	0.36	0.00
二高-γ-亚麻酸	20:3 n-6	0.56	0.42
花生四烯酸(AA)	20:4 n-6	2.43	2.86
二十碳三烯酸	20:3 n-3	0.00	0.16
二十碳四烯酸	20:4 n-3	1.82	2.09
二十碳五烯酸(EPA)	20:5 n-3	48.84	57.08
二十一碳五烯酸	21:5 n-3	2.38	2.78
二十二碳五烯酸	22:5 n-6	0.63	0.10
二十二碳五烯酸(DPA)	22:5 n-3	5.02	5.49
二十二碳六烯酸(DHA)	22:6 n-3	17.61	20.00
聚集测量			
	总计%	99.49	98.74
	PUFA%	82.11	94.94
	总 Ω-3	77.09	89.22
	总 Ω-6	4.53	4.05
	剩余的 PUFA	0.49	1.67
	饱和物%	5.42	0.40
	单不饱和物%	11.96	1.57
	未知物%	0.51	1.84

[0292] 全部四个生产批次的API均符合上面表1中描述的组成规格。

6.3实施例3:受控的尿素包合差别地富集所选择的Ω-3和Ω-6种类

[0293] 正如预期的,尿素包合步骤显著地降低饱和脂肪酸和单不饱和脂肪酸在所形成的组合物中的百分率,由此显著地富集多不饱和脂肪酸。见表3-表6和图3A。然而,意外地实施采用落在算法确定范围内的尿素量的尿素包合,对Ω-3多不饱和脂肪酸和Ω-6多不饱和脂肪酸的个别种类的富集具有差别的作用。

[0294] 表7提供对各种多不饱和脂肪酸种类的富集的定性评估，对在乙基酯中间原料中的含量与在游离酸API中的含量进行了比较，这些含量是表3-表6中所描述四个生产批次的平均值。也参见图3B。

表 7

多不饱和脂肪酸种类	受控尿素包合的定性作用
亚油酸(C18:2 n-6)	中性
γ-亚麻酸(C18:3 n-6)	富集
α-亚麻酸(C18:3 n-3)	减少
十八碳四烯酸(C18:4 n-3)	富集
二十碳二烯酸(C20:2 n-6)	中性
二高-γ-亚麻酸(C20:3 n-6)	减少
花生四烯酸(C20:4 n-6)(AA)	富集
二十碳三烯酸(C20:3 n-3)	富集
二十碳四烯酸(C20:4 n-3)	富集
二十碳五烯酸(C20:5 n-3)(EPA)	富集
二十一碳五烯酸(C21:5 n-3)	富集
二十二碳五烯酸((C22:5 n-6)	减少
二十二碳五烯酸(C22:5 n-3)(DPA)	富集
二十二碳六烯酸(C22:6 n-3)(DHA)	富集

[0295] 尽管作为一类的Ω-3多不饱和脂肪酸被显著地富集，但尿素包合对作为一类的Ω-6 PUFA的影响是不可预测的。平均地，一般Ω-6种类DGLA和二十二碳五烯酸的含量减少；γ-亚麻酸和花生四烯酸的含量增加；对亚麻酸和二十碳二烯酸有较小影响或者没有影响。

[0296] 我们尤其注意到Ω-3二十二碳五烯酸种类DPA(C22:5 n-3)被富集，然而具有相同链长度和不饱和度的相应的Ω-6种类二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)的含量一般减少。尿素包合对这两种异构体富集的不同作用连同它们在乙基酯中间原料中相对浓度的差异导致它们在最终游离酸API中浓度的数量级的差异。将表3-表6中给出的四个批次的API平均，Ω-3二十二碳五烯酸种类DPA是以5.85％(a/a)的浓度存在于最终API中，然而Ω-6二十二碳五烯酸种类是以0.46％(a/a)的平均浓度而存在。

[0297] 在5.85％(a/a)的平均浓度下，DPA是API中的多不饱和脂肪酸的第三最占优势种类，仅被EPA和DHA超过。在此水平下，DPA浓度是被称为Purepa的采用游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的之前药物组合物所报道浓度的10倍，其中据报道DPA是以0.5％的浓度而存在。参见Belluzzi等人，Dig.Dis.Sci.39(12)：2589-2594(1994)。

6.4实施例4：十(10)个示例性生产批次的API的组成分析证明可重复的DPA水平升高

[0298] 根据实施例2中描述的方法制备其他生产批次。

[0299] 下面的表中给出了来自十(10)个批次API的数据，包括实施例2中的表3-表6中描述的由八(8)个不同批次中间酯交换(乙基酯)原料所生产的四个批次。表8中示出了每个中间原料批次的组成。表9中给出了用于每个所列出(乙基酯)种类的8个批次中间原料的平均值(AVG)、标准差(STDEV、SD)、和Δ(Δ，在+1SD和-1SD之间、+2SD和-2SD之间的绝对差，等)。下面的表10中示出了最终API的10个批次的各组成；表11给出了在API的这10个批次中每个所列出(游离酸)种类的平均值、标准差、和Δ值。

表 8

	中间(乙基酯)原料批次							
	批次 1	批次 2	批次 3	批次 4	批次 5	批次 6	批次 7	批次 8
BV 编号	319021	319553	319554	320613	320766	320941	320824	320862
ONC 编号	22581	24876	24906	27008	27824	27824	28069	28139
特性	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%
C18:2(n-6)	0.552	0.516	0.522	0.571	0.689	0.712	0.657	0.611
C18:3(n-6)	0.166	0.146	0.141	0.157	0.253	0.218	0.283	0.159
C18:3(n-3)	0.379	0.368	0.351	0.422	0.516	0.498	0.419	0.491
C18:4(n-3)	1.405	0.991	1.008	1.160	1.432	1.462	1.372	1.505
C20:2(n-6)	0.156	0.181	0.194	0.167	0.423	0.366	0.274	0.212
C20:3(n-6)	0.314	0.384	0.421	0.376	0.415	0.473	0.446	0.398
C20:4(n-6)	1.977	2.362	2.316	2.805	2.867	2.884	3.306	2.152
C20:3(n-3)	0.171	0.200	0.216	0.181	0.270	0.223	0.220	0.245
C20:4(n-3)	1.855	1.908	1.870	1.653	2.159	2.142	1.896	2.132
C20:5(n-3)	46.131	45.698	44.908	45.317	45.131	45.675	45.416	46.185
C21:5(n-3)	2.239	2.105	2.156	2.165	1.763	1.761	2.140	2.407
C22:5(n-6)	0.658	0.575	0.556	0.508	0.535	0.524	0.509	0.572
C22:5(n-3)	5.341	4.634	4.598	5.178	2.858	2.874	4.324	4.834
C22:6(n-3)	15.875	16.102	15.997	15.700	16.861	17.046	16.128	16.852

表 9

中间(乙基酯)原料

8 个批次的统计

特性	常用名	AVG	SD	-3SD	-2SD	-1SD	+1SD	+2SD	+3SD	1SD Δ	2SD Δ	3SD Δ
C18:2(n-6)	亚油酸	0.60	0.08	0.38	0.45	0.53	0.68	0.76	0.83	0.15	0.30	0.45
C18:3(n-6)	γ-亚麻酸	0.19	0.05	0.03	0.08	0.14	0.24	0.30	0.35	0.11	0.22	0.32
C18:3(n-3)	α-亚麻酸	0.43	0.06	0.24	0.30	0.37	0.49	0.56	0.62	0.13	0.26	0.38
C18:4(n-3)	十八碳四烯酸	1.28	0.21	0.64	0.86	1.07	1.50	1.71	1.93	0.43	0.86	1.28
C20:2(n-6)	二十碳二烯酸	0.25	0.10	-0.05	0.05	0.15	0.35	0.45	0.54	0.20	0.40	0.60
C20:3(n-6)	二高-γ-亚麻酸	0.40	0.05	0.26	0.31	0.36	0.45	0.50	0.55	0.10	0.19	0.29
C20:4(n-6)	花生四烯酸	2.58	0.45	1.23	1.68	2.13	3.03	3.48	3.93	0.90	1.80	2.70
C20:3(n-3)	二十碳三烯酸	0.22	0.03	0.12	0.15	0.18	0.25	0.28	0.31	0.07	0.13	0.19
C20:4(n-3)	二十碳四烯酸	1.95	0.18	1.42	1.60	1.77	2.13	2.31	2.49	0.36	0.71	1.07
C20:5(n-3)	EPA	45.56	0.45	44.20	44.65	45.10	46.01	46.46	46.92	0.91	1.81	2.72
C21:5(n-3)	二十一碳五烯酸	2.09	0.22	1.42	1.64	1.87	2.32	2.54	2.76	0.45	0.90	1.34
C22:5(n-6)	二十二碳五烯酸	0.56	0.05	0.41	0.46	0.51	0.60	0.65	0.70	0.10	0.20	0.30
C22:5(n-3)	DPA	4.33	0.96	1.45	2.41	3.37	5.29	6.25	7.21	1.92	3.84	5.76
C22:6(n-3)	DHA	16.32	0.52	14.77	15.29	15.80	16.84	17.36	17.87	1.04	2.07	3.10

表 10

		最终(游离酸)API 批次									
		批次 1	批次 2	批次 3	批次 4	批次 5	批次 6	批次 7	批次 8	批次 9	批次 10
	API 批号	36355	36395	37225	37289	38151	38154	38157	38300	38303	38306
	中间批号	1	1	2	3	4	4	5	7	8	6
特性	常用名	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%	面积%
C18:2(n-6)	亚油酸	0.55	0.49	0.59	0.55	0.60	0.61	0.78	0.62	0.53	0.72
C18:3(n-6)	γ-亚麻酸	0.15	0.14	0.12	0.12	0.17	0.16	0.16	0.22	0.15	0.15
C18:3(n-3)	α-亚麻酸	0.39	0.34	0.38	0.37	0.45	0.45	0.55	0.41	0.44	0.50
C18:4(n-3)	十八碳四烯酸	1.70	1.67	1.16	1.26	1.37	1.37	1.87	1.65	1.77	1.81
C20:2(n-6)	二十碳二烯酸	0.10	0.13	0.12	0.09	0.10	0.10	0.27	0.12	0.11	0.12
C20:3(n-6)	二高-γ-亚麻酸	0.35	0.39	0.45	0.42	0.42	0.45	0.52	0.51	0.42	0.51
C20:4(n-6)	花生四烯酸	2.43	2.45	2.84	2.86	3.50	3.50	3.64	4.02	2.57	3.60
C20:3(n-3)	二十碳三烯酸	0.15	0.25	0.22	0.16	0.20	0.17	0.25	0.18	0.17	0.23
C20:4(n-3)	二十碳四烯酸	2.18	2.02	2.11	2.09	1.96	1.90	2.64	2.13	2.34	2.54
C20:5(n-3)	EPA	57.25	57.64	55.81	57.08	56.25	56.38	56.88	56.30	56.72	57.15
C21:5(n-3)	二十一碳五烯酸	2.79	2.75	2.72	2.78	2.68	2.60	2.15	2.57	2.88	2.18
C22:5(n-6)	二十二碳五烯酸	0.20	0.17	0.72	0.71	0.61	0.62	0.66	0.63	0.71	0.66
C22:5(n-3)	DPA	6.23	6.22	5.46	5.49	6.12	5.97	3.41	5.15	5.59	3.43
C22:6(n-3)	DHA	19.58	19.65	19.45	20.00	19.16	18.79	20.60	20.10	20.97	21.01

表 11

最终(游离酸)API 10 个批次的统计

特性	常用名	AVG	SD	-3 SD	-2 SD	-1 SD	+1 SD	+2 SD	+3 SD	1SD A	2SD A	3SD A
C18:2(n-6)	亚油酸	0.61	0.09	0.34	0.43	0.52	0.69	0.78	0.87	0.18	0.35	0.53
C18:3(n-6)	γ-亚麻酸	0.15	0.03	0.07	0.10	0.13	0.18	0.21	0.24	0.06	0.11	0.17
C18:3(n-3)	α-亚麻酸	0.43	0.06	0.23	0.30	0.36	0.49	0.56	0.62	0.13	0.26	0.39
C18:4(n-3)	十八碳四烯酸	1.56	0.25	0.81	1.06	1.31	1.81	2.06	2.31	0.50	1.00	1.50
C20:2(n-6)	二十碳二烯酸	0.13	0.05	-0.03	0.02	0.07	0.18	0.23	0.29	0.11	0.21	0.32
C20:3(n-6)	二高-γ-亚麻酸	0.44	0.06	0.28	0.33	0.39	0.50	0.56	0.61	0.11	0.22	0.33
C20:4(n-6)	花生四烯酸	3.14	0.58	1.41	1.99	2.57	3.72	4.29	4.87	1.15	2.30	3.46
C20:3(n-3)	二十碳三烯酸	0.20	0.04	0.08	0.12	0.16	0.24	0.28	0.32	0.08	0.16	0.24
C20:4(n-3)	二十碳四烯酸	2.19	0.24	1.46	1.71	1.95	2.43	2.68	2.92	0.49	0.97	1.46
C20:5(n-3)	二十碳五烯酸(EPA)	56.74	0.56	55.07	55.63	56.19	57.30	57.86	58.42	1.12	2.23	3.34
C21:5(n-3)	二十一碳五烯酸	2.61	0.25	1.85	2.11	2.36	2.86	3.12	3.37	0.51	1.01	1.52
C22:5(n-6)	二十二碳五烯酸	0.57	0.21	-0.05	0.16	0.36	0.78	0.98	1.19	0.41	0.83	1.24
C22:5(n-3)	二十二碳五烯酸(DPA)	5.31	1.06	2.13	3.19	4.25	6.37	7.42	8.48	2.12	4.23	6.35
C22:6(n-3)	二十二碳六烯酸(DHA)	19.93	0.75	17.68	18.43	19.18	20.68	21.43	22.18	1.50	2.99	4.49

[0300] 如从表11中所见,API中Ω-3二十二碳五烯酸种类DPA(C22:5 n-3)和Ω-6二十二碳五烯酸异构体(C22:5 n-6)的相对浓度中的数量级差异被保持在:DPA(C22:5 n-3)的5.31%(a/a)相对于二十二碳五烯酸(C22:5 n-6)的0.57%(a/a),DPA浓度为据Belluzzi等人报道的之前Ω-3游离酸Purepa制剂相比增加到10倍(5.31相对于0.5%)。

6.5实施例5:21个示例性生产批次的组成分析证明可再现的DPA水平升高

[0301] 现在已在利用尿素包合所生产的21个批次API中,观察到Ω-3二十二碳五烯酸种

类DPA的高绝对浓度和相对浓度，如下面表12和表13中总结的。

表12
最终(游离酸)API的21个批次的统计

特性	常用名	Min %(a/a)	Max %(a/a)	AVG %(a/a)
C18:2(n-6)	亚油酸	0.49	1.00	0.74
C18:3(n-6)	γ-亚麻酸	0.12	0.52	0.24
C18:3(n-3)	a-亚麻酸	0.34	0.83	0.54
C18:4(n-3)	十八碳四烯酸(十八碳-4,8,12,15-四烯酸)	1.16	5.83	2.83
C20:2(n-6)	二十碳二烯酸	0.10	0.27	0.15
C20:3(n-6)	二高-γ-亚麻酸	0.24	0.52	0.40
C20:4(n-6)	花生四烯酸**(AA)**	2.32	4.02	3.17
C20:3(n-3)	二十碳三烯酸	0.10	0.25	0.16
C20:4(n-3)	二十碳四烯酸	1.40	2.82	2.13
C20:5(n-3)	二十碳五烯酸(二十碳五烯酸)**(EPA)**	48.61	57.64	55.40
C21:5(n-3)	二十一碳五烯酸	1.81	2.88	2.33
C22:5(n-6)	二十二碳五烯酸	0.17	0.73	0.58
C22:5(n-3)	二十二碳五烯酸**(DPA)**	2.77	6.23	4.44
C22:6(n-3)	二十二碳六烯酸**(DHA)**	15.99	21.78	19.35

表 13

最终(游离酸)API 的 21 个批次的统计

特性	常用名	AVG %(a/a)	SD	-3SD	-2SD	-1SD	+1SD	+2SD	+3SD	1SD λ	2SD λ	3SD λ
C18:2(n-6)	亚油酸	0.74	0.16	0.26	0.42	0.58	0.90	1.07	1.23	0.32	0.65	0.97
C18:3(n-6)	γ-亚麻酸	0.24	0.11	-0.09	0.02	0.13	0.35	0.46	0.58	0.22	0.44	0.66
C18:3(n-3)	α-亚麻酸	0.54	0.15	0.09	0.24	0.39	0.69	0.84	0.99	0.30	0.60	0.90
C18:4(n-3)	十八碳四烯酸(十八碳-4,8,12,15-四烯酸)	2.83	1.49	-1.63	-0.15	1.34	4.31	5.80	7.28	2.97	5.94	8.92
C20:2(n-6)	二十碳二烯酸	0.15	0.04	0.02	0.07	0.11	0.20	0.24	0.28	0.09	0.17	0.26
C20:3(n-6)	二高-γ-亚麻酸	0.40	0.07	0.18	0.25	0.32	0.47	0.55	0.62	0.15	0.30	0.45
C20:4(n-6)	花生四烯酸	3.17	0.51	1.65	2.16	2.67	3.68	4.19	4.70	1.01	2.03	3.04
C20:3(n-3)	二十碳三烯酸	0.16	0.05	0.01	0.06	0.11	0.21	0.26	0.31	0.10	0.20	0.31
C20:4(n-3)	二十碳四烯酸	2.13	0.41	0.92	1.32	1.73	2.54	2.94	3.35	0.81	1.62	2.43
C20:5(n-3)	二十碳五烯酸(EPA)	55.40	2.13	49.00	51.13	53.27	57.53	59.66	61.80	4.26	8.53	12.79
C21:5(n-3)	二十一碳五烯酸	2.33	0.34	1.29	1.64	1.98	2.67	3.02	3.36	0.69	1.38	2.07
C22:5(n-6)	二十二碳五烯酸	0.58	0.16	0.11	0.27	0.43	0.74	0.90	1.06	0.31	0.63	0.94
C22:5(n-3)	二十二碳五烯酸(DPA)	4.44	1.16	0.98	2.13	3.29	5.60	6.75	7.91	2.31	4.62	6.93
C22:6(n-3)	二十二碳六烯酸(DHA)	19.35	1.69	14.28	15.97	17.66	21.04	22.73	24.42	3.38	6.76	10.14

6.6实施例6:DPA对肝细胞基因表达的作用预测富含DPA组合物具有较好的临床疗效

[0302] DPA是以上实施例中被分析药物组合物中第三最占优势的多不饱和脂肪酸种类，并且以之前采用游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的药物组合物Purepa中浓度的10倍浓度而存在。尽管DPA是从EPA到DHA的生物合成途径的中间体(见图1)，但出人意料地对于DPA的特定生物学效应却了解不多。见Kaur等人，“Docosapentaenoic acid(22:5n-3):a review of its biological effects”,Prog.Lipid Res.50:28-34(2011)。为了澄清DPA对

所述药物组合物的临床疗效的潜在贡献，进行了表达概况分析实验。

6.6.1方法

[0303] 细胞培养和处理-将Hep G2肝癌细胞在含有4.5g/l葡萄糖、1-谷氨酰胺、$NaHCO_3$和盐酸吡哆素并补充有1％(体积比)的非必需氨基酸、1％丙酮酸钠、1％青霉素/链霉素、和10％(体积比)无脂肪酸牛血清白蛋白(BSA)的无血清达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)(Sigma-Aldrich)中进行培养，上述试剂全部从Gibco BRL购得。

每周通过胰蛋白酶消化将细胞培养物转化，并且于37℃在含有5％CO_2的加湿培养箱中进行培养。在5周的细胞培养后，将EPA(二十碳五烯酸，批号0439708-2，Cayman Chemicals)、DPA(二十二碳五烯酸，批号163481-26，Cayman Chemicals)、和DHA(二十二碳六烯酸，批号0437083-5，Cayman Chemicals)在使用于无血清DMEM之前加以稀释，一式三份地以下面表14中描述的最终有效浓度加入到孔中(250,000细胞/孔)。

[0304] 选择EPA(100μM)、DHA(40μM)和DPA(11μM)的比率以便接近部分5.2和实施例5(参见表12和表13)中所描述药物组合物(API)中的EPA、DHA和DPA的比率。对绝对浓度加以选择以便在由期望的组成比所设置的约束条件和由培养条件所设置的约束条件内最佳地接近在EVOLVE试验的2g和4g治疗组中(见实施例10)所观察的血浆范围。选择较低的DPA浓度(1μM)以便接近从被称为Purepa的采用游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的之前药物组合物的使用将预期的系统暴露，其中据报道DPA是以本发明药物组合物中所见水平的1/10水平而存在。

[0305] 在细胞采集和RNA提取之前，将HepG2细胞与所确定的脂肪酸(EPA、DHA、DPA，或者指定的混合物)总共培养48小时。

表 14

样品编号	PUFA 种类	每孔的最终浓度	孔	RNA 的品质 (260/280)
GL01	EPA	30 μM	a	2.0
GL02	EPA	30 μM	b	2.1
GL03	EPA	30 μM	c	2.0
GL04	EPA	100 μM	a	1.98
GL05	EPA	100 μM	b	2.05
GL06	EPA	100 μM	c	2.0
GL07	DHA	12 μM	a	2.0
GL08	DHA	12 μM	b	2.04
GL09	DHA	12 μM	c	2.0
GL10	DHA	40 uM	a	2.0
GL11	DHA	40 uM	b	2.0
GL12	DHA	40 uM	c	2.11
GL13	DPA	0.3 μM	a	2.07
GL14	DPA	0.3 μM	b	2.0
GL15	DPA	0.3 μM	c	2.0
GL16	DPA	3.0 μM	a	2.09
GL17	DPA	3.0 μM	b	2.0
GL18	DPA	3.0 μM	c	1.99
GL19	DPA	1 μM	a	2.2
GL20	DPA	1 μM	b	2.03
GL21	DPA	1 μM	c	2.03
GL22	DPA	11 μM	a	2.0
GL23	DPA	11 μM	b	2.08
GL24	DPA	11 μM	c	2.06
GL25	EPA:DHA:DPA 100:40:1(50:20:0.5)	合计 200 μM	a	2.05
GL26	EPA:DHA:DPA 100:40:1(50:20:0.5)	合计 200 μM	b	2.0
GL27	EPA:DHA:DPA 100:40:1(50:20:0.5)	合计 200 μM	c	2.0
GL28	EPA:DHA:DPA 100:40:11(50:20:5.5)	合计 200 μM	a	2.0
GL29	EPA:DHA:DPA	合计 200 μM	b	2.06

表 14

样品编号	PUFA 种类	每孔的最终浓度	孔	RNA 的品质 (260/280)
	100:40:11(50:20:5.5)			
GL30	EPA:DHA:DPA 100:40:11(50:20:5.5)	合计 200 μM	c	2.07
GL31	EPA:DHA:DPA 30:12:0.3(50:20:0.5)	合计 60 μM	a	2.07
GL32	EPA:DHA:DPA 30:12:0.3(50:20:0.5)	合计 60 μM	b	2.13
GL33	EPA:DHA:DPA 30:12:0.3(50:20:0.5)	合计 60 μM	c	2.05
GL34	EPA:DHA:DPA 30:12:3(50:20:5.5)	合计 60 μM	a	2.0
GL35	EPA:DHA:DPA 30:12:3(50:20:5.5)	合计 60 μM	b	2.12
GL36	EPA:DHA:DPA 30:12:3(50:20:5.5)	合计 60 μM	c	2.01
GL37	BSA(无脂肪酸)		a	2.03
GL38	BSA(无脂肪酸)		b	2.00
GL39	BSA(无脂肪酸)		c	2.00

细胞采集和RNA分离

[0306] 按照生产商的说明书(Invitrogen公司)使用TRIzol对总RNA加以分离。用Nanodrop 8000分光光度计(Thermo Scientific公司)对RNA的品质进行评估。如上面表14中的描述,用于各处理的每个RNA提取物具有在2.0和2.2之间的260/280比。然后用Qiagen RNeasy柱将RNA进一步纯化。在利用Eberwine步骤的反转录后,使用Illumina TotalPrep RNA扩增试剂盒(Ambion)由每次制备的总RNA的300ng产生经扩增的生物素化cRNA。将经处理的等分试样和对照RNA样品送至基因表达核心实验室进行分析。将剩余的总RNA样品于-70℃下贮存。

[0307] 基因表达测试和数据分析-在直接杂交到Illumina HT-12微球阵列v.4.0.之后,利用荧光成像对在生物素化cRNA内部的特定转录进行测量。利用Ingenuity® iReport™软件(Ingenuity Systems,Redwood City,CA)对基因表达数据进行分析。

6.6.2结果

6.6.2.1表达概况分析证明DPA具有不同于EPA和DHA的生物学效应

[0308] 尽管DPA是从EPA到DHA的生物合成途径中的中间体,而且尽管已知DPA在体内逆转化成EPA(Kaur等人,Prog.Lipid Res.50:28-34(2011)),但在与DPA共同培养后,和EPA和与DHA共同培养所看见作用相比,我们观察到明显不同的对肝细胞基因表达的作用。

[0309] 在对基因表达作用中的相同点和不同点的高水平评估中,我们使用Ingenuity® iReport软件来查询在暴露到各EPA(100μM)、DHA(40μM)、和DPA(11μM)之后、由Ingenuity® iReport算法进行排列的、在各种有疗效的的基因类别内部所见的应答在前5的基因表达数据。将结果汇总于下面的表15中。下面的表16中给出了一个采用不同分类的类似评估。所使用的符号为:“|”属性对指定的脂肪酸种类是特有的;“□”属性是与另一种脂肪酸种类共有的;“◆”在全部3个脂肪酸种类中共同观察到的属性。

表 15

	EPA	DHA	DPA
疾病和失调			
癌症	◆	◆	◆
结缔组织病	|		
皮肤病		□	□
发育障碍		|	
血液病			|
免疫性疾病	|		
传染病	◆	◆	◆
炎症性疾病	|		
肾病和泌尿系疾病		|	
生殖系统疾病			|
分子和细胞功能			
细胞调和(cellular compromise)	|		
细胞死亡和存活	□	□	
细胞发育	◆	◆	◆
细胞功能和维持	|		
细胞生长和增殖	◆	◆	◆
细胞运动		|	
细胞至细胞信号传导和相互作用		□	□

表 15

	EPA	DHA	DPA
基因表达			|
RNA 转录后修饰			|
生理系统发育和功能			
结缔组织发展和功能		|	
血液系统的发展和功能	□		□
血细胞生成	|		
免疫细胞运输			|
淋巴组织的结构和发育	|		
生殖系统的发育和功能	□	□	
骨骼和肌肉系统的发育和功能		|	
组织发育		□	□
组织形态			|
肿瘤形态	◆	◆	◆
首要的规范途径(top canonical pathway)			
淋巴细胞中的 CD27 信号传导			|
气道细胞中的 IL-17A 信号传导		□	□
胃细胞中的 IL-17A 信号传导		□	□
IL-8 信号传导	|		
中性粒细胞的 IMLP 信号传导	|		
IL-17F 在过敏性气道炎性疾病中的作用		|	
IL-17A 在关节炎中的作用	◆	◆	◆
IL-17A 在银屑病中的作用		□	□
巨噬细胞、成纤维细胞和内皮细胞在类风湿性关节炎中的作用	|		
TREM1 信号传导	|		

表 16

	EPA	DHA	DPA
毒性列表			
心肌肥厚			
肝胆汁淤积	◆	◆	◆
肝星状细胞活化			
增加线粒体和线粒体膜的跨膜电位			
肝坏死/细胞死亡			
肝细胞增殖	□	□	
过氧化物酶增殖剂经由 PPARα 对基因进行调控的机制			
PPARα/RXRα 活化		□	□
原发性肾小球肾炎生物标记物板(人)			
肾坏死/细胞死亡	□		□
临床化学和血液学			
提高的白蛋白水平			

表 16

	EPA	DHA	DPA
提高的肌酸酐水平	◆	◆	◆
提高的血细胞比容水平			
提高的血红细胞水平	□	□	
心脏毒性			
心律失常			
心脏损害			
心功能障碍			
心肌纤维化	□	□	
心肌肥厚	◆	◆	◆
心肌炎	◆	◆	◆
心肌坏死/细胞死亡	□		□
心脏细胞增殖			
先天性心脏病			
肝毒性			
胆道增生			
肝胆汁淤积	◆	◆	◆
肝损伤			
肝肿大		□	□
肝炎		□	□
肝脏炎症	◆	◆	◆
肝坏死/细胞死亡			
肝细胞增殖	□	□	
肾毒性			
肾损伤	□	□	
肾积水			
肾炎症	◆	◆	◆
肾坏死/细胞死亡	◆	◆	◆
肾炎	◆	◆	◆
肾细胞增殖	◆	◆	◆

[0310] 这些数据强调了在多种类型中DPA、EPA和DHA的作用的明显差异。

[0311] 利用不同的分析方法也观察到对基因表达的作用的差异，其中确定了各EPA(100μ

M)、DHA(40μM)和DPA(11μM)最显著地上调和下调的特定基因。将数据分别汇总于下面的表17(上调的基因)和表18(下调的基因)中。使用的符号是:"→"在两种DPA浓度下受影响的表达;"□"与另一种脂肪酸种类一样被调控的基因表达,标示在圆括弧中;"◆"被全部三个脂肪酸种类调控的基因。

表17
经上调的首要基因(top gene)

脂肪酸种类	浓度(μM)	基因	
DPA	11	↑ MST1(包括 EG:15235)	→□(DHA)
		↑ MGC16121	→
		↑ AMT	→
		↑ AHSA2	→◆
		↑ SRSF1	→□(EPA)
		↑ HNRNPA2B1	
		↑ ALDOC	
		↑ TOP3B	
		↑ STK36	
		↑ SRSF5	
DHA	40	↑ HIST2H2AA3/HIST2H2AA4	□(EPA)
		↑ AHSA2	◆
		↑ MT1X	
		↑ SNORA62	
		↑ HIST1H3A(包括其他)	
		↑ MST1(包括 EG:15235)	□(DPA)
		↑ HIST2H2AC	
		↑ LOX	□(EPA)
		↑ LSMD1	
		↑ MRPS34	
EPA	100	↑ HIST2H2BE(包括其他)	
		↑ AHSA2	
		↑ SRSF1	□(DPA)
		↑ RGS2(包括 EG:19735)	
		↑ HIST2H2AA3/HIST2H2AA4	□(DHA)
		↑ MAT2A	
		↑ ZNF91	
		↑ HIST1H3A(包括其他)	□(DHA)
		↑ LOX	□(DHA)
		↑ GNAI3	

表 18
经下调的首要基因

脂肪酸种类	浓度(μM)	基因
DPA	11	↓ IL8 ◆ ↓ CDKN2AIPNL ◆ ↓ CATSPER2 →◆ ↓ CCBE1 □(DHA) ↓ ALPP □(DHA) ↓ CCL20 ◆ ↓ DDX51 □(DHA) ↓ QRFPR ↓ ZNF14 ↓ RELB □(EPA)
DHA	40	↓ CATSPER2 ◆ ↓ IL8 ◆ ↓ CCL20 ◆ ↓ CDKN2AIPNL ◆ MAP2K2 DDX51 □(DPA) ↓ CCBE1 □(DPA) ↓ JOSD1 ↓ ALPP □(DPA) ↓ ZNF652
EPA	100	↓ IL8 ◆ ↓ CCL20 ◆ ↓ NFKBIA ◆ ↓ IER3 ↓ RELB □(DPA) ↓ CATSPER2 ◆ ↓ CDKN2AIPNL ◆ ↓ G0S2 ↓ ZFP38 ↓ HERDSPUD1

[0312] 通过对其表达独特地受各Ω-3 PUFA种类影响的基因进行比较，可容易地看到DPA、EPA和DHA的作用的差异。

表 19
DPA 独特地调控的首要基因(11 μM)

基因	EPA	DHA	DPA
1. ALDOC			↑
2. AMT			↑
3. HNRNPA2B1			↑
4. MGC16121			↑
5. PRKCD			←
6. RELA(被抑制)			←
7. SRSF5			↑
8. STK36			↑
9. TLR7(被抑制)			←
10. TOP3B			↑
11. QRFPR			↓
12. ZNF14			↑

表 20
DHA 独特地调控的首要基因(40 μM)

基因	EPA	DHA	DPA
1. FOXO3		←	
2. LSMD1		↑	
3. MAP2K2		↓	
4. MRPS34		↑	
5. MT1X		↑	
6. NFKB1		←	
7. SNORA62		↑	
8. TNFSF11		←	
9. ZNF652		↓	

表 21
EPA 独特地调控的首要基因(100 μM)

基因	EPA	DHA	DPA
1. β-雌二醇(被抑制)	←		
2. GNAI3	↑		
3. G0S2	↓		
4. HERPUD1	↓		
5. HIST2H2BE(包括其他)	↑		
6. IL2(被抑制)	←		
7. IER3	↓		
8. 脂多糖(被抑制)	←		
9. MAT2A	↑		
10. NFkB(复合物)(被抑制)	←		
11. NFKBIA	↓		
12. RGS2(包括 EG:19735)	↑		

[0313] 通过对其表达最显著地受至少两种多不饱和脂肪酸种类影响的基因进行比较，也可以看到DPA、EPA和DHA对基因表达的作用的差异。

表 22
通常由 DHA 和 DPA 调控的首要基因（top gene）

基因	EPA	DHA	DPA
1. AHSA2	↑	↑	↑
2. ALPP		↓	↓
3. CATSPER2	↓	↓	↓
4. CCL20	↓	↓	↓
5. CDKN2AIPNL	↓	↓	↓
6. CCBE		↓	↓
7. DDX51		↓	↓
8. IL8	↓	↓	↓
9. MST1(包括 EG:15235)		↑	↑

表23
通常由EPA和DPA调控的首要基因

基因	EPA	DHA	DPA
1. AHSA2	↑	↑	↑
2. CATSPER2	↓	↓	↓
3. CCL20	↓	↓	↓
4. CDKN2AIPNL	↓	↓	↓
5. IL8	↓	↓	↓
6. RELB	↓		↓
7. SRSF1	↑		↑

[0314] 这些分析共同地证明EPA、DHA和DPA在多种生理学、药理学和生物化学类型的作用中存在明显差异。EPA、DHA和DPA的作用是不相同的;存在于Ω-3 PUFA组合物中的特定种类与在给药时所述组合物将产生的生理作用之间明显具有关系。

6.6.2.2在较高但并非较低的浓度下DPA具有显著活性

[0315] 对两个浓度的DPA进行了评估。如上所述,选择较高DPA浓度(11μM)使得EPA(100μM)、DHA(40μM)和DPA(11μM)的比率将会接近部分5.2和实施例5中所描述药物组合物(API)的EPA、DHA和DPA的比率,在由期望的组成比所设置的约束条件和由培养条件所设置的约束条件内,将绝对浓度选择成最佳地接近在EVOLVE试验的治疗组中所观察的血浆范围(见实施例10)。选择较低的DPA浓度(1μM)以便接近将会从被称为Purepa的采用游离酸形式的Ω-3多不饱和脂肪酸的之前药物组合物的使用中所期望的系统暴露,其中据报道DPA是以本发明药物组合物中所见水平的1/10水平而存在。

[0316] 总体上讲,310个基因独特地对较高但并非较低的DPA水平产生应答。在基因表达中显示统计学意义变化的大量基因,预测在体内当DPA达到较高浓度时将产生有意义的生物学效应。相反,较低的DPA浓度显然是阈下剂量,至少在对这些310个基因的调控方面,并且在此较低的体内血浆浓度下将会预测产生少得多的应答。

[0317] 当对由iReport软件广义地分类为影响分子和细胞功能的基因所产生作用进行评价时,两种亚类型独特地出现在由Ingenuity® iReport™算法排列的前5个中,在较高但并非较低的DPA浓度下,与基因表达有关的那些,并且影响RNA转录后修饰的那些。考虑到由编码自身影响基因表达的蛋白质的基因表达的变化和编码影响转录后修饰的蛋白质的基因的变化所引起多效性二级效应的可能性,这些结果表明DPA在较高但并非较低的浓度下能够调节大量的代谢途径。

[0318] 通过集中在已知与Ω-3多不饱和脂肪酸临床疗效相关的以下三种类型的基因,也可以看到阈剂量效应:与脂类代谢有关的基因、与心血管生理有关的基因、和与炎症有关的基因(自动地由iReport软件所确定类型的基因的定位)。将结果汇总于下面的表24中。

表24

	总基因应答 低[DPA]	总基因应答 高[DPA]	共同的基因应答
脂类代谢	2	22	0
心血管	10	51	6
炎症	18	22	4

[0319] 如表24中所示,仅2个与脂类代谢有关的基因对1μM浓度的DPA产生应答,然而在11μM DPA存在下,22个脂类代谢基因独特地以培养时具有有统计学意义的表达变化产生应

答。集中于脂类代谢，1μM DPA显然是阈下剂量，然而11μM具有显著影响。

[0320] 更大量的基因被证明在心血管生理类别中对1μM DPA剂量产生应答，我们观察到在11μM DPA剂量下受影响基因数量的5倍(而不是10倍)增加。甚至更大量的与炎症通路有关的基因对1μM DPA产生应答，并且在11μM下仅观察到基因数量的较小增加。

[0321] 11μM的体外浓度低于在4g/日EVOLVE研究患者中所观察到的约90μM的血浆浓度。见实施例10。因此，这些结果预测部分5.2和实施例5中描述的富含DPA组合物的临床相关剂量(参见表12和表13)将具有显著的代谢作用，包括对脂类代谢、心血管生理和炎症的作用。如果有的话，这些DPA特异性作用中预期很少会有之前Purepa制剂中所见DPA水平的1/10的水平。

6.6.2.3 DPA在较高浓度下影响多个脂类代谢基因的表达

[0322] 下面的表25中确定了在11μM但并非1μM的DPA浓度下显示表达中的统计学显著变化的22个脂类代谢基因。

表 25

对 11 μM DPA 应答的脂类代谢基因

符号	Entrez 基因名称	人的 Entrez 基因号	倍数变化	已知影响表达的药物
APOA2	载脂蛋白 A-II	336	-1.229	
CD83	CD83 分子	9308	-1.629	
DGAT1	二酰基甘油 O-酰基转移酶 1	8694	1.602	ω-3 脂肪酸乙酯(Omacor)
DNAJB1	DnaJ(Hsp40)同系物，亚家族 B，成员 1	3337	-1.489	
FGFR3	成纤维细胞生长因子受体 3	2261	1.336	帕唑帕尼
GNAI3	鸟嘌呤核苷酸结合蛋白(G 蛋白)，α 抑制活性多肽 3	2773	1.455	
IL8	白细胞介素 8	3576	-2.535	
IL32	白细胞介素 32	9235	-1.629	
IL18(包括 EG:16173)	白细胞介素 18(γ-干扰素诱导因子)	3606	-1.347	
IP6K1	肌醇六磷酸激酶 1	9807	-1.242	
IP6K2	肌醇六磷酸激酶 2	51447	1.319	达沙替尼、舒尼替尼、帕唑帕尼、tivozanib、OSI-930、替拉替尼(telatinib)、担质替尼、伊马替尼、索拉非尼
KIT	v-kit 哈泼-朱克曼 4 猫肉瘤病毒癌基因同系物	3815	1.239	
NFKBI	B 细胞中 κ- 轻链多肽基因增强子的抑制子	4792	-1.386	
PDPN(包括 EG:10630)	平足蛋白(podoplanin)	10630	-1.307	
PGF	胎盘生长因子	5228	-1.284	阿柏西普(aflibercept)
PIP4K2B	磷脂酰肌醇-5-磷酸 4-激酶，II 型，β	8396	-1.578	
PLA2g16	磷脂酶 A2，XVI 组	11145	-1.337	
PLIN5	围脂滴蛋白 5	440503	-1.371	
PTGR2	前列腺素还原酶 2	145482	-1.416	
PTX3	正五聚蛋白 3，长	5806	-1.536	
RGS2(包括 EG:19735)	G 蛋白信号传导 2 的调节因子，24kDa	5997	1.289	
STIP1	应激诱导磷蛋白 1	10963	-1.469	

[0323] DPA对这些基因中若干基因的表达的作用表明DPA在类似的体内浓度下，应导致各种临床相关脂类参数的改善。

[0324] 例如，DPA在11μM下上调ACADSB(短链/支链酰基辅酶A脱氢酶)。ACADSB基因产物与甘油三酯类分解有关；预测上调将会导致较低的血清甘油三酯水平。被下调的HMGCR编码HMG-辅酶A还原酶(胆固醇合成的限速酶和他汀类抑制的靶)。因此，类似于他汀类的作用，HMGCR基因的表达被DPA下调应导致有利的总胆固醇:HDL比率的下降。也被下调的SQLE编码角鲨烯环氧酶，该酶催化甾醇生物合成中的第一个氧合步骤并且被认为是此途径中的一个限速酶。SQLE的下调也应导致总胆固醇水平的下降。

6.6.2.4表达概况分析结果的总结

[0325] 我们的使用肝细胞系的表达概况分析实验表明：在接近在富含DPA药物组合物的示例性批次的4g每日剂量给药的人类患者中所观察到的血浆水平的浓度下DPA具有显著的生物活性。

[0326] 在此浓度下，DPA在多种代谢途径中影响基因的表达，包括已知与Ω-3多不饱和脂肪酸临床疗效相关的类型中的基因：与脂类代谢有关的基因、与心血管生理有关的基因、和与炎症有关的基因。考虑到我们在编码自身影响基因表达的蛋白质的基因表达中所观察到的变化和在编码影响转录后修饰的蛋白质的基因中所观察到的变化，预测显著的二级效应。

[0327] 对与脂类代谢有关的若干基因的表达的特异性影响表明：DPA在类似的体内浓度下应导致各种临床相关的脂类参数的改善。特别是，我们观察到DPA驱动的ACADSB(短链/支链酰基-辅酶A脱氢酶)的上调，预计会导致较低的血清甘油三酯水平；HMGCR的下调，类似于用他汀类的治疗，应导致总胆固醇:HDL比的有利的下降；和SQLE中的下调，该下调应类似地导致下降的总胆固醇水平。

[0328] 这些作用可与使用EPA和DHA中所观察的作用加以区别。

[0329] 我们的实验证明DPA的具有统计学显著性的剂量依赖性作用，并且通过选择较低浓度来模拟之前的游离酸Ω-3制剂中的DPA浓度的1/10的浓度，实现比较高DPA浓度1/10的基因，通过选择该较高浓度来模拟这里所描述富含DPA药物组合物的临床试验中所观察的血浆暴露。至少有关于独特地由较高DPA浓度调节的300个基因，特别地包括有利地影响脂类代谢的基因，较低的DPA浓度提供阈下暴露，并且将会预期在体内提供次治疗剂量。

6.7.实施例7:ECLIPSE临床试验

6.7.1.药物

[0330] Lovaza®-处方药Lovaza®胶囊是通过美国的商业来源而获得。根据获FDA批准的产品标签，各Lovaza®的1克胶囊中含有至少900mg来源于鱼油的Ω-3脂肪酸乙基酯类，主要地是二十碳五烯酸(EPA，大约465mg)乙基酯与二十二碳六烯酸(DHA，大约375mg)乙基酯的组合。不进行独立的组成分析。

[0331] 研究药物(Epanova®)-制备用Eudragit NE30-D(Evonik Industries AG)包衣的A型猪软明胶胶囊，各胶囊含有1克的PUFA组合物，其中多不饱和脂肪酸是以游离脂肪酸(API)的形式存在。被包封的API具有表26中描述的组成。

表 26

PUFA 种类		API
(常用名)	(碳链长度:双键数，Ω系列)	(最终游离脂肪酸组合物) (% a/a)
亚油酸	18:2 n-6	0.55
γ-亚麻酸	18:3 n-6	0.15
α-亚麻酸	18:3 n-3	0.39
十八碳四烯酸	18:4 n-3	1.70
二十碳二烯酸	20:2 n-6	0.10
二高-γ-亚麻酸(DGLA)	20:3 n-6	0.35
花生四烯酸(AA)	20:4 n-6	2.43
二十碳三烯酸	20:3 n-3	0.15
二十碳四烯酸	20:4 n-3	2.18
二十碳五烯酸(EPA)	20:5 n-3	57.25
二十一碳五烯酸	21:5 n-3	2.79
二十二碳五烯酸	22:5 n-6	0.83
二十二碳五烯酸(DPA)	22:5 n-3	6.23
二十二碳六烯酸(DHA)	22:6 n-3	19.58
	总计%	98.43
	PUFA%	96.30
	总Ω-3	90.26
	总Ω-6	4.41
	剩余的 PUFA	1.63
	饱和物%	0.35
	单不饱和物%	1.35
	未知物%	0.42

6.7.2研究设计

[0332] 进行了使用两种不同治疗药物的生物利用度的开放标签、单剂量、随机分组、4路交叉研究：4克的Epanova®或4g的Lovaza®，将各药物与低脂肪餐和高脂肪餐一起向54名健康成年人给药。图4提供说明研究设计的治疗流程图：简略地，在间歇期后将受试者随机分组入两种治疗程序中的一种：

(i) Epanova®(低脂肪)→Lovaza®(低脂肪)→Epanova®(高脂肪)→Lovaza®(高脂肪)，或者

(ii) Lovaza®(低脂肪)→Epanova®(低脂肪)→Lovaza®(高脂肪)→Epanova®(高脂肪)。

[0333] 低脂肪期膳食(时段1和时段2)：无早餐(禁食)；在抽血4小时后的无脂肪午餐(0g脂肪；600kcal)；在抽血12小时后的低脂肪晚餐(9g脂肪；900kcal)。低脂肪食品是：无脂肪酸奶、水果杯、无脂肪的无花果酥、瘦身特餐。高脂肪期膳食(时段3和时段4)：抽血0.5小时后即刻的高脂肪早餐(20g脂肪；600kcal)；抽血4小时后的高脂肪午餐(30g脂肪；900kcal)；和12小时抽血后的高脂肪晚餐(30g脂肪；900kcal)。高脂肪食品是：早餐三明治和涂粉小甜甜圈；比萨干酪；马铃薯片；奶酪和火腿三明治。

[0334] 试验前的筛选间歇要求是：对于鱼油、EPA或DHA补充剂或强化食品为60天；对于鱼、亚麻籽、紫苏籽、大麻、螺旋藻、或黑加仑油、他汀类、胆汁酸螯合剂、胆固醇吸收抑制剂或贝特类药物为7天。交叉间歇期为至少7天。

[0335] 在临床访视前的晚上，受试者在各治疗期的时间0前的12小时食用低脂肪晚餐(9g

脂肪;900kcal)。在给药前抽血后的早晨(时间0),给予试验用药品(Epanova®或LOVAZA®)。在每2天治疗期中,在第一天在给药前的-1.0、-0.5和0小时和给药后的1、2、3、4、5、6、7、8、10和12小时(+/-5分钟)以及在第二天的24小时(+/-15min),进行药代动力学采血。

6.7.3药代动力学和统计分析

[0336] 通过标准非隔室(noncompartmental)方法计算以下的EPA和DHA血浆浓度的药代动力学参数,以便获得总的和单独的EPA和DHA浓度的基线调整后变化:AUC_{0-t}、AUC_{0-inf}、C_{max}、和T_{max}。

[0337] 生物利用度的主要测定:在24小时时间区间中对数变换的血浆浓度-时间曲线下面积(AUC_t)和最大测量血浆浓度(C_{max}),用于获得基线调整后总体变化及单独EPA和DHA浓度。

[0338] 在计算药代动力学参数之前,对血浆浓度进行基线调整。绘出了用于几何平均(对数转换的)的基线调整后变化的图示。

[0339] 利用方差分析(ANOVA)对经对数转换的药代动力学参数进行评估,为由于治疗、手段、给药程序和程序内的受试者所造成的差异。

[0340] 利用最小二乘平均值计算经对数转换的AUC_{0-t}、AUC_{0-inf}和C_{max}的平均值的比。

[0341] 平均值的比和它们的90%置信区间超过AUC_{0-t}、AUC_{0-inf}和C_{max}的125.00%的上限,从而表明在与膳食一起共同给药的情况下Epanova®具有相比Lovaza®优越的相对生物利用度。

6.7.4结果

[0342] 研究人群-有54名健康成年人参与了该研究:41名男性(75.9%)和13名女性(24.1%),年龄为21至77岁。51名受试者(94.4%)完成全部的治疗期,53名受试者(98.1%)完成了该研究的低脂肪部分。人群中主要是黑人或非裔关国人(66.7%)以及31.5%的白人和1.8%的亚洲人。

[0343] 生物利用度-图5中对高脂肪和低脂肪期中(禁食给药状态)在给予单剂量(4g)Lovaza®之后总EPA+DHA(基线调整后变化)的生物利用度进行了比较,从而确认在低脂肪餐情况下Lovaza®的生物利用度显著降低。总血浆EPA+DHA水平中的基线调整后变化表明与高脂肪餐期中的Lovaza®相比在低脂肪餐期中Lovaza®的AUC_t降低83.3%:分别为661.6相比3959.5nmol-h/mL($p<0.0001$)(下面的表27中的最小二乘平均值数据)。与高脂肪期($p<0.0001$)相比低脂肪期中Lovaza®的C_{max}降低80.6%,低脂肪期中的T_{max}与高脂肪期相比增加62%(T_{max}分别为10.2和6.3小时;$p=0.0001$)。

表 27

	最小二乘平均值					90%置信区间界限(%)	
生物利用度参数	低脂肪	高脂肪	平均值的比率(%)	p 值 [a]	受试者内部的协方差(C.V.)% [b]	下限	上限
基线调整后变化							
AUC_t(nmol • hr/mL)	661.63	3959.52	16.7	<0.0001	69.1	3.47	29.95
C_{max}(nmol/mL)	86.89	448.63	19.4	<0.0001	70.7	5.50	33.23
T_{max}(hr)	10.19	6.28	162.3	0.0001	54.5	138.32	186.24
基线调整后变化(经对数转换)数据(几何平均)							
Ln AUC_t (nmol • hr/mL)	652.06	3468.17	18.8	<0.0001	55.3	15.72	22.49
Ln C_{max} (nmol/mL)	60.61	398.07	15.2	<0.0001	69.2	12.35	18.78

N＝53

[a]p值是用与来自ANOVA模型的Epanova®与Lovaza®之间的最小二乘(LS)平均值差

[b]协方差%

[0344] 图6中对在给予单剂量(4g)Lovaza®之后在高脂肪期中总EPA+DHA(基线调整后变化)的生物利用度与单剂量(4g)Epanova®进行了比较，从而表明在高脂肪餐期中(其中Lovaza®的生物利用度被确认是最大的)当以游离脂肪酸形式(Epanova®)给药时生物利用度EPA+DHA显著地大于相应的乙基酯Ω-3组合物(Lovaza®)(p＜0.0007)。

[0345] 图7中对在低脂肪饮食期中在给予单剂量Epanova®之后总EPA+DHA(基线调整后变化)的生物利用度与Lovaza®进行了比较，从而表明在低脂肪餐期中就总血浆EPA+DHA水平中基线调整后变化而言Epanova®的AUC_t是Lovaza®的4.6倍：分别为3077.8和668.9nmol-h/mL(p＜0.0001)(下面表28中的LS平均值数据)。Epanova®的C_{max}是Lovaza®(p＜0.0001)的3.2倍，T_{max}比LOVAZA®短20%(T_{max}分别为8和10小时；p＝0.0138)。

表 28

生物利用度参数	最小二乘平均值		平均值的比率(%)	p 值[a]	受试者内部的协方差%[b]	受试者之间的协方差%[b]	90% 置信区间界限(%)	
	Epanova®	Lovaza®					下限	上限
基线调整后变化								
AUC_t(nmol·hr/mL)	3077.83	668.95	460.10	<0.0001	62.9	253	402.77	517.42
C_{max}(nmol/mL)	277.58	86.35	321.46	<0.0001	71.6	48.9	27236	370.56
T_{max}(hr)	8.08	10.21	79.23	0.0138	45.8	24.6	65.60	92.86
基线调整后变化(经对数转换数据(几何平均值)								
Ln AUC(nmol·hr/mL)	2651.41	658.09	402.90	<0.0001	63.9	243	329.71	492.33
Ln C_{max}(nmol/mL)	225.79	60.70	371.95	<0.0001	66.3	42.7	304.37	454.53

N=53

[a] p-值是用于来自 ANOVA 模型的 Epanova®与 Lovaza®之间的最小二乘(LS)平均值差

[b] 协方差%

[0346] 图8中对低脂肪餐期中在给予单剂量Epanova®之后EPA的生物利用度(基线调整后变化)与Lovaza®进行了比较,表明在低脂肪餐期中Epanova®的AUC_t是Lovaza®的13.5倍:分别为578.2和42.7μg·h/mL(p<0.0001)(下面的表29中给出了LS平均值数据)。Epanova®的C_{max}是Lovaza®(p<0.0001)的5.6倍,T_{max}比Lovaza®短12%(分别为8和9小时;p=0.2605)。

表 29

生物利用度参数	最小二乘平均值		平均值的比率(%)	p 值[a]	受试者内部的协方差%[b]	受试者之间的协方差%[b]	90% 置信区间界限(%)	
	Epanova®	Lovaza®					下限	上限
基线调整后变化								
AUC(μg • hr/mL)	578.22	42.67	1355.1	<0.0001	80.8	18.2	1163.8	1546.4
C_{max}(μg /mL)	52.64	9.45	557.0	<0.0001	83.9	49.8	467.32	646.68
T_{max}(hr)	8.06	9.13	88.28	02605	54.7	25.8	71.02	105.54
基线调整后变化(经对数转换)数据(几何平均值)								
Ln AUC_t(μg •hr/mL)	495.66	48.65	457.09	<0.0001	93.0	23.5	713.46	1283.9
Ln C_{max}(μg /mL)	39.02	4.66	837.53	<0.0001	102.1	52.3	630.85	1111.9
N=53								

[a] p-值是用于来自 ANOVA 模型的 Epanova®与 Lovaza® 之间的最小二乘(LS)平均值差

[b] 协方差%

[0347] 图9中对在低脂肪饮食期中在给予单剂量Epanova®后DHA的生物利用度(基线调整后变化)与Lovaza®进行了比较,表明在低脂肪餐期中Epanova®的AUC_t是Lovaza®的2.2倍:分别是383.1和173.4μg • hr/mL(p＜0.0001)(下面表30中给出的LS平均值数据)。Epanova®的C_{max}是Lovaza®的1.9倍(p＜0.0001)并且T_{max}比Lovaza®短21％(分别是8和11小时;p＝0.0148)。Epanova®的DHA生物利用度是Lovaza®的2.2倍,尽管Epanova®制剂中的DHA比

Lovaza®少42%。

表 30

生物利用度参数	最小二乘平均值			p 值[a]	受试者内部的协方差%[b]	受试者之间的协方差%[b]	90%置信区间界限(%)	
	Epanova®	Lovaza®	平均值的比率(%)				下限	上限
基线调整后变化								
AUC_t(μg • hr/mL)	383.06	173.40	220.91	<0.0001	55.2	32.1	192.10	249.72
C_{max}(μg/mL)	35.50	19.19	185.02	<0.0001	66.0	48.3	154.43	215.61
T_{max}(hr)	8.45	10.72	78.84	0.0148	47.3	24.0	64.82	92.87
基线调整后变化(绝对实转换)数据(几何平均)								
Ln AUC_t(μg •hr/mL)	337.09	162.19	207.84	<0.0001	61.3	21.4	171.98	251.17
Ln C_{max}(μg /mL)	30.17	15.00	201.14	<0.0001	52.5	42.2	170.73	236.96

N=53

[a] p-值是用于来自 ANOVA 模型的 Epanova®与 Lovaza® 之间的最小二乘(LS)平均值差

[b] 协方差%

[0348] 图10A和图10B给出了在低脂肪餐和高脂肪餐期间各个受试者的AUC_{0-t}应答，该应答是用低脂肪AUC_{0-t}与高脂肪AUC_{0-t}的比率(%)的形式来表示。未绘出负的比率。这些数据表明在低脂肪饮食期中，Epanova®(游离脂肪酸)中的54名受试者中的30名(56%)相对于Lovaza®(乙基酯类)中的52名受试者的3名(6%)维持≥各自高脂肪饮食期AUC_t的50%的

AUC_t。

[0349] 由29名受试者总共报道了51次不良事件。最常见的不良事件为头痛(10名受试者)和便溏或腹泻(9名受试者)。所有不良事件的严重程度是轻度的,均不是严重的。在实验室、生命体征或体质评估中,没有具有临床意义的变化。

6.7.5结论

[0350] 在高脂肪饮食期中使用Epanova®(采用游离酸形式的Ω-3 PUFA)的总EPA+DHA及单独EPA和DHA吸收特征(AUC)中的基线调整后变化显著大于使用Lovaza®(Ω-3-PUFA乙基酯类),并且在低脂肪饮食期中显著地更好。而且,膳食的脂肪含量对Lovaza®的生物利用度具有非常深刻的影响,然而由于仅有适度的食物效应Epanova®的生物利用度因而可预测性大得多。与Lovaza®相比Epanova®优越的与脂肪无关的生物利用度在临床上是重要的,这是因为具有严重升高的甘油三酯类的受试者要求非常低脂肪的饮食。鉴于NCEP ATP III建议使受试者在辅助治疗期间遵守低脂肪饮食,这些研究结果证实了游离脂肪酸Ω-3组合物在治疗严重高甘油三酯血症中具有显著的治疗优势。

6.8实施例8:14天对比生物利用度试验

[0351] 为了判断单剂量给药后所观察的作用是否在重复给药后得以维持,而进行了长期研究。图11是说明14天对比生物利用度试验的设计的治疗流程图,其中与低脂肪早餐一起给予研究药物(Lovaza®或Epanova®)。相反,在实施例7中所描述的初始ECLIPSE试验的低脂肪组中是在禁食状态下给药。

[0352] 在14天对比生物利用度研究的Lovaza®组中,EPA和DHA水平从基线到稳态的变化与先前的研究一致,如表31中所示,该表31中给出了在确定的先前研究中EPA和DHA的平均值变化百分率。

表31
先前的第三方研究

药物	研究	受试者编号	周数	Δ EPA(%)	Δ DHA(%)
Ω-3 乙基酯	CK85-013	17	8	276	34
	CK85-014	54	12	300	50
	CK85-017	29	12	300	50
	CK85-019	26	12	200	29
	CK85-022	30	12	233	23
	CK85-023	28	12	139	11
	CK85-95014	30	24	260	54
	CK85-95009	22	16	173	-10*
	CK85-94010	20	6	202	77**
	CK85-95011	49	12	361**	59
	CK85-95012	6	6	156*	40

EPA范围(%Δ):(156*----209----361**)

DHA范围(%Δ):(-10*------34------77**)

[0353] 图12A中绘出了用Lovaza®的治疗和Epanova®的治疗二者的平均未经调整的总EPA+DHA浓度与时间(线性刻度)的关系图。图12B是显示图12A中括号中时间点的未调整EPA+DHA(nmol/mL)中的差异的柱状图。图12A和图12B表明在14天的给药后,维持低脂肪餐的受试者中来自Epanova®的EPA+DHA的蓄积是Lovaza®的2.6倍。

[0354] 图13中绘出了在14天对比生物利用度研究中Lovaza®治疗相对于Epanova®治疗的平均基线调整的血浆总EPA+DHA浓度与时间(线性刻度)的关系图,表明在14天低脂肪餐给药后,在维持低脂肪餐的受试者中来自Epanova®的EPA+DHA水平(AUC_{0-24})是Lovaza®的5.8倍。

[0355] 图14A是绘出14天对比生物利用度研究的Lovaza®和Epanova®组中EPA+DHA的未调整血浓度从基线到稳态的增加的柱状图,图中表明与Lovaza®组群中的66%相比在Epanova®组群中EPA+DHA的血浓度从基线增加了316%到稳态。图14B是绘出在14天对比生物利用度研究的Lovaza®和Epanova®组中EPA+DHA的未调整C_{avg}从基线到稳态的增加的柱状图,图中表明与Lovaza®组群中的90%相比在Epanova®组群中EPA+DHA的平均浓度(C_{avg})水平从基线提高了448%。

[0356] 图15A是绘出在14天对比生物利用度研究的Lovaza®和Epanova®组中的DHA的总血浓度从基线到稳态的增加的柱状图,图中表明与Lovaza®组群中提高了34%相比在Epanova®组群中DHA水平从基线到稳态提高了109%。图15B中绘出了在14天对比生物利用度研究中与Lovaza®组群相比在Epanova®组群中DHA C_{avg}水平从基线到稳态的提高,并且表明与Lovaza®组群中的47%相比在Epanova®组群中DHA的平均浓度(C_{avg})水平相对于基线提高了157%。

[0357] 图16A是绘出了在14天对比生物利用度研究的Lovaza®和Epanova®组中血液的总EPA水平从基线到稳态的增加的柱状图,图中表明与Lovaza®组群中的210%相比在Epanova®组群中EPA水平从基线到稳态增加了1021%。图16B中绘出了从基线到稳态增加的平均浓度,并且表明与Lovaza®组群中的297%相比在Epanova®组群中EPA的C_{avg}水平从基线增加了1,465%。

[0358] 这些数据表明:在ECLIPSE试验中在较长的期间(2周)中在单次给药后所观察的生物利用度提高得以维持,甚至增强。另外,分散的受试者特定数据(未示出)表明对Epanova®具有最小应答的受试者仍然具有比对Lovaza®具有最佳应答的受试者更大的第14天EPA+DHA C_{max}。

[0359] 基于与Lovaza®相比较时使用Epanova®所实现的临床上相关Ω-3 PUFA种类的提高的C_{avg}和总血浓度,可预测在降低血清甘油三酯水平和降低心血管病风险方面显著改善的疗效。

实施例9:13周大鼠研究

[0360] 此研究对在用相当剂量的Epanova®或LOVAZA®治疗13周的大鼠中的Ω-3暴露及其对血清脂类水平的影响进行了比较。

[0361] 选择Sprague Dawley大鼠用于此研究,因为它是采用Lovaza®进行毒性研究方案中所使用的大鼠家族,因此允许对来自使用Epanova®的本研究的数据与Lovaza®的审批总结依据中公开可得的大鼠毒性数据进行直接比较。该研究设计通过基于公开可得Lovaza®

大鼠毒数据的剂量选择(最大耐受剂量＝2000mg/kg)而提供对Epanova®的可靠毒性评估。Sprague Dawley大鼠提供被认可用来预测Ω-3 PUFA对人受试者中甘油三酯类和总胆固醇的脂类变化影响的模型。将在第13周的结果示于下面的表32中。

表32

治疗	性别	DHA 暴露 [a]		EPA 暴露 [a]		甘油三酯类(相对于对照%的差异%)	胆固醇(相对于对照%的差异%)
		$AUC_{(0-t)}$ (μg·hr/mL)	C_{max} (μg/mL)	$AUC_{(0-t)}$ (μg·hr/mL)	C_{max} (μg/mL)		
Epanova®	男性	15.56	1.82	14.02	2.15	-32	-45
	女性	13.00	2.05	9.50	1.38	-53	-41
	两性	14.28	1.94	11.76	1.77	-43	-43
Lovaza®	男性	6.55	0.47	7.57	0.73	-14	-25
	女性	4.97	0.40	6.04	0.55	-38	-36
	两性	5.76	0.43	6.81	0.64	-26	-31

$AUC_{(0-t)}$ 直到最后采样时间的血浆浓度-时间曲线下面积。是系统暴露的衡量尺度。

C_{max} 最大血浆浓度

[a] 基于 DHA 和 EPA 的估计剂量的剂量归一化值

[0362] 如表32中所示，Epanova®不仅提供明显高于Lovaza®的DHA和EPA最大血浆浓度(C_{max})，而且提供明显较高的两种Ω-3种类的$AUC_{(0-t)}$；$AUC_{(0-t)}$是系统暴露的衡量。在使用

Epanova®的治疗中两种Ω-3PUFA种类的较大生物利用度和长期系统暴露致使脂类降低疗效中的长期差异，并且与用LOVAZA®所见相比Epanova®基本上实现更大的血浆甘油三酯类和总胆固醇的下降。因此，本文中描述的组合物在两个临床上重要的心血管参数方面提供更大的疗效。

6.10.实施例10:EVOLVE试验

6.10.1药物

[0363] 研究药物(Epanova®)-制备A型猪软明胶胶囊，各胶囊含有一克(1g)的包含采用游离酸形式(API)的Ω-3 PUFA的PUFA组合物。胶囊用Eudragit NE30-D(Evonik Industries AG)包衣。API具有表10中批次2中所给出的组成(见上面的实施例4)。

[0364] 安慰剂-制备含有橄榄油的胶囊，用作对照。

6.10.2研究设计

[0365] 在美国、丹麦、匈牙利、印度、荷兰、俄罗斯和乌克兰进行12周、双盲、橄榄油对照研究。基于在500至2,000mg/dL范围内的高甘油三酯水平来选择受试者。随机地选出受试者接受2、3或4克的Epanova®，或者4克的作为安慰剂的橄榄油。图17中示出了一般的试验设计，图18提供进一步确定研究访问的时间安排的更详细治疗流程图。主要研究终点是血浆甘油三酯水平从基线到治疗终点的变化百分率(EOT)。次要终点是血浆非高密度脂蛋白胆固醇(非HDL-C)从基线到EOT的变化百分率。

6.10.3结果

[0366] 图19示出了全部受试者的处置，其中“AE”是“不良事件”的缩写，“SAE”是“严重不良事件”的缩写。

[0367] 最初对总共1,356名受试者进行了筛选，从这些受试者中选出399名参与该项研究。在399名受试者中，99名接受橄榄油安慰剂，100名接受Epanova® 2g/日；101名接受Epanova®3g/日；99名接受Epanova®4g/日。表33示出了在随机分组(治疗前)时受试者的平均甘油三酯(TG)和胆固醇测量值，与国家心肺和血液研究所制作的“成年人中高血胆固醇的检测、评估和治疗(成年人治疗Panel III)专家组的第三报告”中所描述的理想水平相比较。

表33

参数	理想值(mg/dL)[j]	为试验而随机分组的患者			
		4 g/日	3 g/日	2 g/日	橄榄油
TG	<150	655	715	717	686
HDL-C	>40	29	28	27	29
LDL-C	<100	90	81	77	78
非-HDL-C	<130	225	215	205	215
VLDL-C	<30	126	124	123	125

[1] NCEP ATP III,2002年9月

[0368] 在接受橄榄油的患者中,共有5名患者由于以下原因从研究中退出:退出同意(1)、未随访(1)、和其他原因(3)。在接受Epanova®2g/日的患者中,共有7名患者由于以下原因而退出:不良反应(5)、退出同意(1)、和其他原因(1)。在接受Epanova®3g/日的患者中,共有14名患者由于以下原因而退出:不良反应(7)、不顺从(2)、退出同意(1)、未随访(3)、和其他原因(1)。在接受Epanova®4g/日的患者中,有9名患者由于以下原因而退出:不良反应(5)、不依从性(1)、退出同意(2)、和其他原因(1)。

[0369] 在所有剂量下Epanova®实现了甘油三酯下降的主要终点和非HDL胆固醇下降(总胆固醇水平减去HDL胆固醇水平)(非-HDL-C)的次要终点,并且实现致粥状动脉硬化性的多个确认标记中的有统计学意义下降:Apo B、Apo CIII、RLP、和LpPLA2。在同时他汀类治疗的患者中,Epanova®提供对于关键脂类参数的相加疗效:TG;非-HDL-C;HLD-c;总胆固醇(TC);和TC/HDL-C。

[0370] EPA、DHA和DPA的血浆水平-在基线和治疗终点(EOT)处对Epanova®中最富含的三种Ω-3 1c-PUFA种类进行测量,正如Ω-6 1c-PUFA、花生四烯酸(AA)的血浆水平。下面的表34分别地汇总了EPA、DHA、DPA和AA以及TG、NHDL-C、HDL-C、VLDL-C和LDL-C的平均值基线、中值基线、治疗结束时平均值(EOT)、和中值EOT血浆水平。

[0371] EPA、DHA、DPA和AA的基线血浆水平表示在治疗组中受试者的有效随机分组。在基线处的EPA:AA比为约0.10(见下面的表37)。

[0372] 图20A-图20E中绘出了在EVOLVE试验的各治疗组中EPA(图20A)、DHA(图20B)、DPA(图20C)和AA(图20D)的平均值基线和治疗结束("EOT")时血浆水平(单位是μg/mL)。图20E中对各治疗组和对照(橄榄油)组的平均值基线和EOT EPA水平与ECLIPSE的之前报道值(见实施例7)、14天生物利用度研究(见实施例8)、他汀类药物-药物相互作用研究(他汀DDI)、和由其他人完成的使用不同Ω-3 PUFA制剂(JELIS)的不相关JELIS试验进行了比较。应注意,JELLS试验中的日本受试者具有较高的基线EPA水平。图21A-图21D中绘出了EPA(图21A)、DHA(图21B)、DPA(图21C)、和AA(图21D)的中值基线和治疗结束(EOT)时的血浆水平(单位为μg/mL)。

表 34
(基线和 EOT 绝对血浆水平)

		基线 (平均值)	EOT (平均值)	基线 (中值)	EOT (中值)
EPA(μg/mL)	2 g	36.6	126.8	26.7	104
	3 g	41.4	174.7	30.7	141.9
	4g	38.9	199.7	25.7	170
DHA(μg/mL)	2 g	106.6	159.9	93.5	148.3
	3 g	113.7	183.6	97.4	156.9
	4g	104.8	188.8	91.8	169.1
DPA(μg/mL)	2 g	37.6	61.77	35.23	54.59
	3 g	38.71	69.36	34.71	58.56
	4 g	36.84	69.73	32.53	66.03
AA(μg/mL)	2 g	377.9	327.4	358.4	279.2
	3 g	394.9	344	368.8	313.8
	4 g	393.9	298.1	363.4	274.2
TG(mg/dL)	2 g	760.1	608.7	669	554
	3 g	766.9	754.5	612	560.8
	4 g	730.5	557.2	631	511
非 -HDL-C(mg/dL)	2 g	219.6	208.2	205.3	209.3
	3 g	223.4	221.5	215.3	197
	4 g	230.7	214.1	225	211
HDL-C(mg/dL)	2 g	28	30.7	27.3	29
	3 g	29.1	30.4	28	28
	4 g	29.9	32.2	28.7	29
V-LDL-C(mg/dL)	2 g	138.1	106.9	123.3	98
	3 g	143	121.5	124	93.8
	4 g	143.9	100.7	126	87
LDL-C(mg/dL)	2 g	83.1	101.3	77.3	93.3
	3 g	84.9	99.7	81	95
	4 g	90.4	113.4	90.3	109.5
ApoB(mg/dL)	2 g	115.6	121.1	114	120
	3 g	114.5	116	112	115
	4 g	119.3	126.6	118	121.5
ApoCIII(mg/dL)	2 g	26.5	24.3	22	21
	3 g	27.8	25	27	21
	4 g	27.5	22.7	27	21
RLP(mg/dL)	2 g	55.5	49.7	49.7	37
	3 g	62.7	54.4	54.4	34.5
	4 g	58.1	43.4	43.4	33
LpPLA2(ng/mL)	2 g	270.6	236.7	266	225
	3 g	271.2	241.4	244.5	223.5
	4 g	266.9	223.2	249	208

[0373] 下面的表35中汇总了EPA、DHA、DPA和AA以及TG、NHDL-C、HDL-C、VLDL-C和LDL-C的绝对血浆水平从基线到EOT的平均值变化和和中值变化。

表 35

	AA (μg/mL)	EPA (μg/mL)	DPA (μg/mL)	DHA (μg/mL)	TG (mg/dL)	非-HDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	VLDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
从基线到 EOT 的平均值变化									
2 g	-50.5	90.2	24.17	53.3	-183.6	-13.3	2.6	-31.2	18
3 g	-50.9	133.3	30.65	69.9	-69	-6.1	1.7	-21.9	15.5
4 g	-95.8	160.8	32.89	84	-220.2	-21.9	2.1	-42.5	21.7
从基线到 EOT 的中值变化									
2 g	-79.2	77.3	19.36	54.8	-172.2	-16	1.7	-31.5	14.8
3 g	-55	111.2	23.85	59.5	-150.1	-6.7	1.8	-25.3	11.9
4 g	-89.2	144.3	33.5	77.3	-178	-17	1.7	-37.7	22.3

[0374] 图22A、图22B、图26A和图26B中绘出了上面表中的数据，显示EVOLVE试验的各治疗组中AA、DHA、EPA和DPA的绝对血浆水平(单位为μg/mL)从基线到EOT的变化，并且图22A中绘出了平均值变化，图22B示出了从基线的中值变化。

[0375] 下面的表36A中分别地汇总了EVOLVE试验的各治疗组的EPA、DHA、DPA、和AA以及TG、NHDL-C、HDL-C、VLDL-C、和LDL-C的血浆水平从基线到EOT的平均值、中值、和最小二乘平均百分比变化。

[0376] 下面的表21B中分别地汇总了用于EVOLVE试验各治疗组的、从基线到EOT的变化百分率以及ApoB、ApoCIII、LpPLA2和RLP的平均值和中值血浆水平中的最小二乘平均值变化。

表 36A

	AA (μg/mL)	EPA (μg/mL)	DPA (μg/mL)	DHA (μg/mL)	TG (mg/dL)	非-HDL-C (mg/dL)	HDL-C (mg/dL)	VLDL-C (mg/dL)	LDL-C (mg/dL)
从基线到 EOT 的平均值变化百分率									
2 g	-10.5	410.8	86.08	69	-21.2	-5.4	10	-21.2	25.6
3 g	-11.2	538.1	96.59	88.4	-14.1	-3.4	5.6	-18.6	20
4 g	-18	778.3	131.66	106	-25.2	-8	7.2	-27.5	26.2
从基线到 EOT 的中值变化百分率									
2 g	-15.6	253.9	75.3	61.2	-25.8	-7.7	7	-24.7	21.4
3 g	-17.9	317	68.6	61.9	-21.7	-3.2	6.2	-21.5	15.5
4 g	-25.9	404.8	74.87	65.5	-30.7	-7.7	5	-34.7	26.2
最小二乘平均值变化百分率									
2 g	-15.14	267.04	--	56.72	-26.47	-7.77	7.46	-27.05	19.35
3 g	-15.98	331.86	--	64.07	-24.38	-6.49	3.33	-25.62	13.94
4 g	-23.2	406.32	--	71.77	-31.1	-9.76	5.71	-33.23	19.36

表 36B				
	ApoB	ApoCIII	LpPLA2	RLP
从基线到 EOT 的平均值变化百分率				
2 g	5.9	-8.3	-11.3	-0.9
3 g	4.6	-8.5	-8.8	-6.9
4 g	5.7	-9.8	-14.1	-10.3
从基线到 EOT 的中值变化百分率				
2 g	6.3	-8.7	-11.3	-20.2
3 g	5.6	-12.8	-9.5	-16.2
4 g	5.7	-15	-14.6	-28.2
最小二乘平均值变化(%)				
2 g	3.84	-10.87	-14.93	-20.67
3 g	2.28	-12.16	-11.06	-22.63
4 g	3.78	-14.39	-17.17	-27.52

[0377] 图23A中绘出了EVOLVE试验的各治疗组中AA、DHA、EPA和DPA的从基线到EOT的平均值变化，以基线值的百分率来表示，图23B中绘出了从基线到EOT的中值变化百分率。

[0378] 下面的表37中给出了EVOLVE试验的各治疗组在治疗开始和治疗结束时的EPA/AA比。

表 37 EPA/AA 比		
	基线	EOT
平均值		
2 g	0.096851	0.387294
3 g	0.104837	0.507849
4 g	0.098756	0.669909
中值		
2 g	0.074498	0.372493
3 g	0.083243	0.452199
4 g	0.070721	0.619985

[0379] 如从表35和表36A及图20-图23中可见，使用Epanova®的12周治疗导致EPA、DHA和DPA的血浆水平显著增加。例如，在2g剂量下，EPA血浆水平从基线到EOT的平均值变化百分率为411％；在4g剂量下为778％。EPA血浆水平的中值变化百分率分别为254％和405％。在2g剂量下，DHA血浆水平从基线到EOT的平均变化百分率为69％；在4g剂量下，平均变化百分率为106％。DHA血浆水平的中值变化百分率较不显著，在2gEpanova®中有61.2％的变化，在4g中有65.5％的变化。

[0380] EPA、DHA和DPA的血浆水平提高伴随血浆AA水平的显著下降，其中4g给药方案实现95.8μg/mL的平均值降低和89.2μg/mL的中值下降，这对应于18％的平均值百分率下降、25.9％的中值变化百分率、和23.2％的LS平均值变化。应当指出的是，尽管有花生四烯酸的外源性给药，但观察到血浆花生四烯酸水平的下降，花生四烯酸是以2.446％(a/a)的浓度存在于此试验所使用的Epanova®批次中。

[0381] EPA血浆水平的增加和同时的AA血浆水平下降导致EPA/AA比的显著提高，如表37中所示，在4g剂量下从基线处的大约0.10提高到在EOT处的大约0.67(平均值)和0.62(中值)。

[0382] 而且，Epanova®的治疗导致TG水平的显著降低，如图26A和图26B中所示，这两个图

中分别绘出了相对于基线的绝对变化的平均值和中值。图27示出了Epanova®2g和4g剂量的显示TG的0-10％降低、TG的10-20％降低、TG的20-30％降低、TG的30-40％降低、TG的40-50％降低、和TG的大于50％的下降受试者的百分比。

[0383] 图26A和图26B中还显示非-HDL-C和VLDL-C下降了，而HDL-C升高了。LDL-C水平也是升高了，这有可能是由于治疗时LDL粒径增加引起的测量结果(在实施例12中进一步论述)。图28A和图28B中分别显示平均值和中值变化百分率。

图24A-图24I中绘出了TG(图24A)、非-HDL-C(图24B)、HDL-C(图24C)、V-LDL-C(图24D)、LDL-C(图24E)、ApoB(图24F)、ApoCIII(图24G)、RLP(图24H)、和LpPLA2(图24I)的绝对平均值基线和EOT水平。图25A-图25I中绘出了TG(图25A)、非-HDL-C(图25B)、HDL-C(图25C)、V-LDL-C(图25D)、LDL-C(图25E)、ApoB(图25F)、ApoCIII(图25G)、RLP(图25H)、和LpPLA2(图25I)的绝对中值基线和EOT水平。

[0384] Epanova®中Ω-3 PUFA的极高生物利用度表明在各种血浆种类中的药代动力学反应的差异。图29中绘出了在2g和4g剂量的Epanova®之间EPA、DHA、DPA、AA、TG、非-HDL-C、和HDL-C(绝对值)的血浆水平相对于基线的中值变化百分率中的变化率。将结果汇总于下面的表38中：

表38
(相对于基线的中值变化百分率中的变化率)
(绝对值)

EPA	DHA	DPA	AA	TG	非-HDL-C	HDL-C
0.59432847	0.07026143	0.00571049	0.66025641	0.189922	0	0.285714

[0385] 考虑到在将Epanova®的剂量从2g加倍至4g/日时DHA和DPA的血浆水平有较小增加或没有增加，相对于基线的中值变化百分率中的变化率(斜率)接近于零，从而预测当进一步增加剂量时将看到DHA和DPA血浆水平的较小的进一步增加。在甘油三酯水平、HDL-C水平和非-HDL-C水平中看到类似的反应稳定阶段(数据未示出)。

[0386] 相反，EPA的变化率仍然较高，具有0.59的斜率；预测通过将Epanova®的剂量增加到超过4g/日可实现EPA血浆水平的进一步增加。显著地，当把Epanova®的剂量从2g加倍至4g/日时，AA水平中的变化率甚至高于EPA；预测在将Epanova®的剂量增加到超过4g/日时AA血浆水平进一步降低。因此，Epanova®在降低AA水平的能力方面显示前所未有的效能。

[0387] 将EVOLVE试验结果的总结汇总于下面的表39中。

表 39

	OO(n=98)		2 克(n=99)				3 克(n=97)				4 克(n=99)			
	基线(mg/dL)	%A	基线(mg/dL)	%A	p-值	相对于 OO 的 LSM 差	基线(mg/dL)	%A	p-值	相对于 OO 的 LSM 差	基线(mg/dL)	%A	p-值	相对于 OO 的 LSM 差
TG	686.3	-10.4	717	-25.8	0.003	-22.1	715	-21.7	0.021	-20	655	-30.7	<0.001	-26.7
非-HDL-C	214.5	-0.9	205.3	-7.7	0.018	-10.3	215.3	-3.2	0.042	-9	225	-7.7	0.002	-12.2
HDL-C	28.7	2.2	27.3	7	0.088	5.5	28	6.2	0.127	1.4	28.7	5	0.127	3.7
TC/HDL-C	8.8	-1.9	8.8	-9.5	0.024	-11.8	8.8	-7.2	0.137	-7.7	9	-14.1	0.004	-12.9
LDL-C	78.2	9.8	77.3	21.4	0.003	16.2	81	15.5	0.092	10.8	90.3	26.2	<0.001	16.3
VLDL-C	124.5	-11.3	123.3	-24.7	0.006	-18.4	124	-21.5	0.017	-17	126	-34.7	<0.001	-24.6
ApoB	110	2.3	114	6.3	0.344	3	112	5.6	0.834	1.4	118	5.7	0.449	2.9

[0388] EVOLVE试验也证明Epanova®治疗显著地降低载脂蛋白CIII(ApoCIII)。ApoCIII抑制脂蛋白脂肪酶活性和肝对富含甘油三酯的脂蛋白的摄取。已发现,升高的ApoCIII水平是心血管疾病(CHD)危险的独立的预测因素,同时通过基因方式降低的ApoCIII与心血管疾病的防护是相关的。

[0389] 已证明含有DHA的Ω-3脂肪酸制剂在患有严重高甘油三酯血症的患者中提高LDL-C(Kelley等人,2009,J.Nutrition,139(3):495-501)。对LDL-C的此作用被假设是脂蛋白粒径增大的结果(Davidson等人,2009,J.Clin.Lipidology,3(5):332-340)。临床数据表明在将甘油三酯类降低到与EPA+DHA相似程度的剂量下单独使用二十碳五烯酸(EPA)不提高LDL-C,但也不能降低ApoCIII(Homma等人,1991,Atherosclerosis,91(1):145-153)。

[0390] 图34示出了用于来自EVOLVE试验的数据的LDL中的百分率变化与ApoCIII的百分率变化之间的相互关系。当利用线性回归拟合这些数据时获得-0.28的Pearson相关系数,从而表明在用Epanova®进行治疗时LDL的提高与ApoCIII的下降相关。这些结果与DHA给药时LDL提高的之前报道是一致的,这是可归因于脂蛋白粒径增大的观察结果。在下面的实施例12中对于Epanova®对脂蛋白粒径的作用作进一步的论述。

[0391] 在表40中示出的受试者的一个亚群中,显示大于800%的EPA提高以及小于5%的甘油三酯水平的下降。这种不产生应答的情况有可能归因于1型脂蛋白脂肪酶(LPL)中的缺失或功能缺陷。LPL将存在于乳糜微粒中的甘油三酯类水解成游离脂肪酸,而且已知LPL的损害与严重的高甘油三酯血症相关(Fojo and Brewer,1992,J.of Int.Med.231:669-677)。在用Epanova®治疗后显示EPA显著提高且伴随临床参数(例如甘油三酯水平、AA水平等)的较小变化的受试者,可以被分类为无应答者。可以将这种受试者从用Epanova®的治疗中撤除。

表 40

受试者的国家	剂量	BMI	基线 TG(mg/dL)	EOT TG(mg/dL)	相对于基线的TG%变化	基线 EPA (mcg/mL)	EOT EPA (mcg/mL)	相对于基线的EPA%变化	基线 HbA1c	EOT HbA1c
匈牙利	2	32.4	778	831	6.8	18.4	171.4	832	7.3	8.1
匈牙利	2	33.4	924	937	1.4	11.4	133.6	1067	5.9	6.2
匈牙利	2	36.2	782	803	2.6	12.5	173.6	1288	6.0	5.6
俄罗斯	2	31.2	857	1723	101.1	22.1	243.7	1001	5.6	6.2
荷兰	2	27.1	511	589	15.2	15.4	257.4	1572	5.0	5.0
印度	2	25.1	460	544	18.4	4.6	79.9	1632	6.7	6.6
美国	3	34.6	1047	1077	2.8	16.7	273.7	1543	6	5.6
美国	3	36	622	687	10.3	16.4	193.8	1080	6.6	7.2
美国	3	31	838	870	3.8	14.3	151.2	961	5.6	6.1
美国	3	40.8	888	995	12	61.8	650.6	953	8	8.7
匈牙利	3	36.3	484	463	-4.3	10.1	185.3	1740	6.1	6.0
匈牙利	3	29.6	647	627	-3.1	8.6	110.3	1177	6.2	6.3
匈牙利	3	36.6	851	1016	19.3	10.4	94.4	811	8.2	8.6
匈牙利	3	28.6	707	730	3.2	8.3	408.5	4827	5.8	6
匈牙利	3	32.8	2158	2273	5.3	24.5	480.1	1863	5.6	5.1
匈牙利	3	31.7	1034	992	-4.1	10.6	280.5	2538	5.3	5.5
匈牙利	3	34.8	976	1110	13.7	22.4	224.8	905	7.3	7.9
匈牙利	3	28.8	728	1210	66.1	22.4	289	1071	7.1	7.9
乌克兰	3	36.2	1664	10317	520.1	91.9	1238.8	1248	8.1	10.8
匈牙利	4	30.1	714	702	-1.7	11.1	256.7	2214	5.1	5.4
匈牙利	4	31.7	785	1300	65.6	11.7	466	3886	8.5	10.9
匈牙利	4	27.3	513	527	2.6	16.6	198.3	1093	7.8	8
匈牙利	4	31.9	508	625	23.2	3.5	198.4	5504	6	7.3
乌克兰	4	33.6	563	589	-2.5	34.9	327.9	841	7	7.3
俄罗斯	4	29.7	664	702	5.7	38.2	795.2	1984	5.5	5.1
俄罗斯	4	41.6	483	504	4.3	10.9	231.1	2026	6.2	6.3
印度	4	32.8	839	1721	105.0	13.8	1066.6	7624	5.6	5.2

6.11实施例11:他汀类的药物-药物相互作用试验

6.11.1药物

研究药物(Epanova®):

[0392] 制备A型猪软明胶胶囊,各胶囊含有一克(1g)的包含采用游离酸形式(API)的Ω-3 PUFA的PUFA组合物。这些胶囊用Eudragit NE30-D(Evonik Industries AG)包衣。API具有表9的批次3中所给出的组成(见上面的实施例4)。

[0393] 研究药物(Zocor®):由Merck Sharp&Dohme有限公司生产的40mg辛伐他汀片,是从商业来源获得。

[0394] 研究药物(阿司匹林®):由Bayer HealthCare Pharmaceuticals生产的81mg肠溶包衣片,是从商业来源获得。

6.11.2研究设计

[0395] 一项开放标签、随机分组、2-路交叉研究被设计用于评估健康正常受试者中多剂量Epanova®对辛伐他汀多剂量药代动力学的作用。在两个研究组中每日给予低剂量的阿司匹林(81mg)。

[0396] 治疗状态"A"是:于第1天至第14的早晨,在禁食状态下,40mg辛伐他汀(1片)、81mg阿司匹林(1片)和4g(4胶囊)Epanova®的口服剂量的联合给药,每日一次(每24小时)连同240mL水,共14次给药。治疗状态"B"是:于第1天至第14天的早晨,在禁食状态下,口服剂量的40mg辛伐他汀(1片)和81mg阿司匹林(1片)的给药,每日一次(每24小时)连同240mL水,总共14次给药。在治疗之间有14天的间歇期。

[0397] 总共有52名受试者参与并考虑治疗的顺序进行随机分组。在这些受试者中,46名参与者是西班牙裔美国人。

[0398] 在进入(第1天)和使用Epanova®(治疗"A")的治疗组之后的退出(第15天)时进行抽血,用以检测血浆脂肪酸水平(EPA、DHA、AA)。在各种先前确定的SNPs处,包括FADS1基因中的SNPs(例如rs174546),包括与DGLA向AA转化相关的SNP(SNP rs174537)、FADS2基因、和Scd-1基因,进行基因型鉴定。

6.11.3.结果

[0399] 图20E示出了EPA水平的平均值基线和治疗结束(EOT)时血浆水平(以μg/mL为单位)。

[0400] 图56示出了根据在rs174546 SNP处的基因型进行分组的受试者在(A)基线(单位为μg/mL)处,和(B)用Epanova®治疗的第15天的花生四烯酸(AA)血浆水平(用相对于基线的变化百分率表示)。就各基因型而言,方框表示四分位距,在四分位方框内部的水平线表示中值,菱形框表示平均值。开放的圆圈代表离群值。触须线延伸到最小和最大非离群值。评分1标示在主要等位基因处是纯合子的受试者;评分3标示在次要等位基因处是纯合子的受试者;评分2代表杂合子。

[0401] 在治疗前,西班牙裔美国人人群具有与SNP rs174546的CC纯合子(24%)相比更高含量的TT纯合子(41%)。这与各基因型中EPA(CC=18μg/mL;CT=11μg/mL;TT=7μg/mL,p<0.0001)和花生四烯酸(AA)(CC=266μg/mL;CT=202μg/mL;TT=167μg/mL,p<0.0001)显著不同的基线水平相对应。

[0402] 在对Epanova®治疗的反应中,观察到EPA的显著增加,并且在TT基因型中有最大的增加百分率(TT:1054%,CT:573%,CC:253%)。

6.12.实施例12:ESPRIT试验

6.12.1.药物

[0403] 研究药物(Epanova®)-制备A型猪软明胶胶囊,各胶囊含有一克(1g)的包含采用游

离酸形式(“API”)的Ω-3 PUFA的PUFA组合物。这些胶囊用Eudragit NE30-D(Evonik Industries AG)包衣。API具有表9的批次3中所给出的组成(见上面的实施例4)。

[0404] 安慰剂-制备含橄榄油的胶囊,用作对照。

6.12.2.研究设计

[0405] 如图38中所示,当与2g治疗组中的不接受同时他汀类治疗的受试者相比较时,EVOLVE试验的2g治疗组中接受同时他汀类治疗的受试者亚群显示相对于对照更大幅度的TG、非-HDL-C、HDL-C、LDL-C、TC、VLDL-C、和TC/HDL-C的变化百分率(平均最小二乘差)。接受同时他汀类治疗的受试者显示对Epanova®剂量依赖性反应,如图39中用于Epanova® 2g和Epanova® 4g的比较数据中所示。

[0406] 作为所观察到的Epanova®连同他汀类治疗的增强疗效的后继,对基线他汀类治疗中的患者进行了ESPRIT临床试验研究。如图40中所示,基于在200-500mg/dL之间的TG水平和基线他汀类治疗来选择进行ESPRIT研究的患者。在660名被选择参与试验的患者中,220名患者接受橄榄油安慰剂治疗,220名患者接受Epanova® 2g剂量治疗,220名患者接受Epanova® 4g剂量治疗。除了基线他汀类治疗外,给予所有的安慰剂和Epanova®治疗药。

[0407] 下面的表41示出了ESPRIT试验中受试者的TG、HDL-C、LDL-C、非-HDL-C、和VLDL-C的基线水平,与由国家心肺和血液研究所发布的“成年人中高血胆固醇的检测、评估和治疗(成年人治疗组III)中专家组的第三报告”中描述的理想水平相比较。

表41
基线水平

	理想水平(mg/dL)	2 g/日	4 g/日	橄榄油(OO)
TG	<150	265	265	269
HDL-C	>40	38	37	38
LDL-C	<100	92	91	87
非-HDL-C	<130	139	135	132
VLDL-C	<30	42	43	42

6.12.3.结果

[0408] 图41示出了ESPRIT试验中的患者处置,显示6名患者从安慰剂组中退出,6名患者从2g治疗组中退出,12名患者从4g治疗组中退出。总体上,发生不良反应(AE)的患者数较低,在安慰剂组中有2名,在2g治疗组中有3名,在4g治疗组中有7名患者发生不良反应。

[0409] ESPRIT试验中的患者显示血浆EPA和DHA水平的显著变化百分率,分别如图42A和图42B中所示。与橄榄油安慰剂相比,这些患者也显示甘油三酯(TG)的剂量依赖性的降低,非-HDL-C的下降、和HDL-C的增加(见图43)。而且,观察到VLDL-C和总胆固醇(TC)/HDL-C的剂量依赖性下降(见图44)。合起来考虑,图42-图44的结果显示了Epanova®作为他汀类治疗的附加用药的疗效。

[0410] 图45-图52中给出了ESPRIT试验结果的进一步细节内容,表明在一系列基线患者形态下Epanova®对低效能和高效能他汀类都是有效的附加用药。图45示出了患者的由基线TG水平分隔开的三个三分位数的患者相对于基线的中值TG变化百分率的结果。图46示出了由基线非-HDL-C水平分隔开的三个三分位的患者相对于基线的中值非-HDL-C变化百分率的结果。图47示出了由基线LDL-C水平分隔开的三个三分位的患者的、相对于基线的中值

LDL-C变化百分率的结果。

[0411] 如从图48中可见，在接受同时罗苏伐他汀、阿托伐他汀和辛伐他汀治疗的患者中观察到TG水平的下降。无论是否有低效能或高效能他汀类药物的联合给药，均观察到对甘油三酯类、非-HDL-C和LDL-C水平具有统计学意义的作用，如图49-图51中所示。

[0412] 图52中对(A)具有较高TG基线水平(≥294mg/dL)的患者、(B)具有高EOT EPA水平(≥26.58μg/mL)的患者、和(C)接受同时罗苏伐他汀治疗的患者的甘油三酯类相对于基线的中值变化百分率进行了比较。这些结果表明Epanova®2g剂量的疗效与图52中所示患者人群中的4g剂量相似。

[0413] 在用Epanova®进行治疗时所观察的LDL-C水平提高与所观察到的脂蛋白粒径增加相一致。在安慰剂和ESPRIT试验的各治疗组中，对大VLDL、中VLDL、小VLDL、总VLDL和VLDL的粒径进行测量。将这些结果示于图53中，图中表明Epanova®治疗导致大VLDL颗粒的量增加和相应地小VLDL颗粒的量减小。观察到VLDL颗粒的减少连同LDL粒径的增加，如图54中所示。如图55中所示，在治疗结束时TG水平降低，LDL-P粒径的增加百分率较大。合起来考虑，图53至图55表明Epanova®治疗导致脂蛋白粒径增大，这是可以导致所观察的LDL-C增加的观察结果。

[0414] 下面的表42总结了ESPRIT试验的结果。

表 42

		橄榄油(OO)			4 g/日*				2 g/日*				
		基线	EOT	%Δ	基线	EOT	%Δ	p-值	差值	基线	EOT	%Δ	p-值	差值
非-HDL-C	中值	132	134	1	135	129	-6	<0.001	-6	139	133	-3	0.037	-3
	平均值	135	136	1	139	132	-5			140	136	-2		
TG	中值	269	260	-4	265	215	-21	<0.001	-15	265	222	-15	<0.001	-9
	平均值	280	268	-3	287	233	-18			284	244	-14		
HDL-C	中值	38	38	2	37	38	3	0.988	1	38	39	2	0.988	0
	平均值	39	40	3	39	40	4			39	40	3		
LDL-C	中值	87	91	2	91	92	1	0.647	0	92	95	3	0.025	4
	平均值	92	93	4	94	94	4			92	97	6		
VLDL-C	中值	42	41	-3	43	33	-20	<0.001	-16	42	37	-12	0.008	-8
	平均值	46	44	3	47	38	-14			47	40	-10		
TC	中值	174	174	1	170	167	-4	<0.001	-4	177	174	-1	0.049	-2
	平均值	174	176	1	178	172	-3			179	176	-1		
TC/HDL-C	中值	5	5	-2	5	4	-7	0.001	-5	5	5	-4	0.119	-3
	平均值	5	5	-1	5	5	-6			5	5	-3		

[0415] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件的全部内容以参考的方式并入本文中用于所有目的，如同各单独的出版物、专利、专利申请或其他文件被单独地指示以参考的方式并入本文中用于所有目的。

[0416] 虽然上面说明并描述了各种具体实施方式，但应当理解的是在不背离本发明精神和范围的前提下可以作出各种变化。

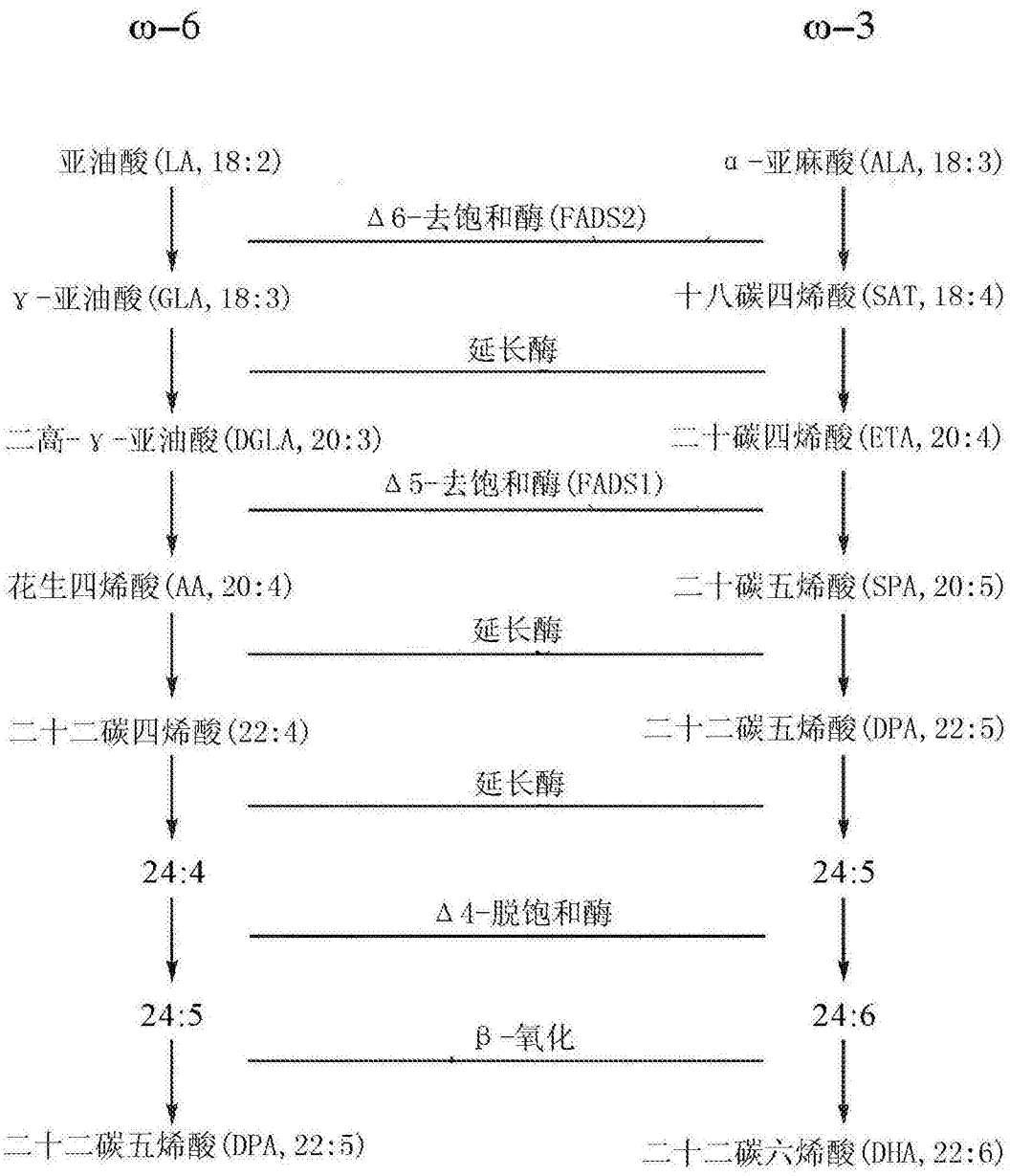

ω-6
ω-3
亚油酸(LA, 18:2)
α-亚麻酸(ALA, 18:3)
Δ6-去饱和酶(FADS2)
γ-亚油酸(GLA, 18:3)
十八碳四烯酸(SAT, 18:4)
延长酶
二高-γ-亚油酸(DGLA, 20:3)
二十碳四烯酸(ETA, 20:4)
Δ5-去饱和酶(FADS1)
花生四烯酸(AA, 20:4)
二十碳五烯酸(SPA, 20:5)
延长酶
二十二碳四烯酸(22:4)
二十二碳五烯酸(DPA, 22:5)
延长酶
24:4
24:5
Δ4-脱饱和酶
24:5
24:6
β-氧化
二十二碳五烯酸(DPA, 22:5)
二十二碳六烯酸(DHA, 22:6)

图1

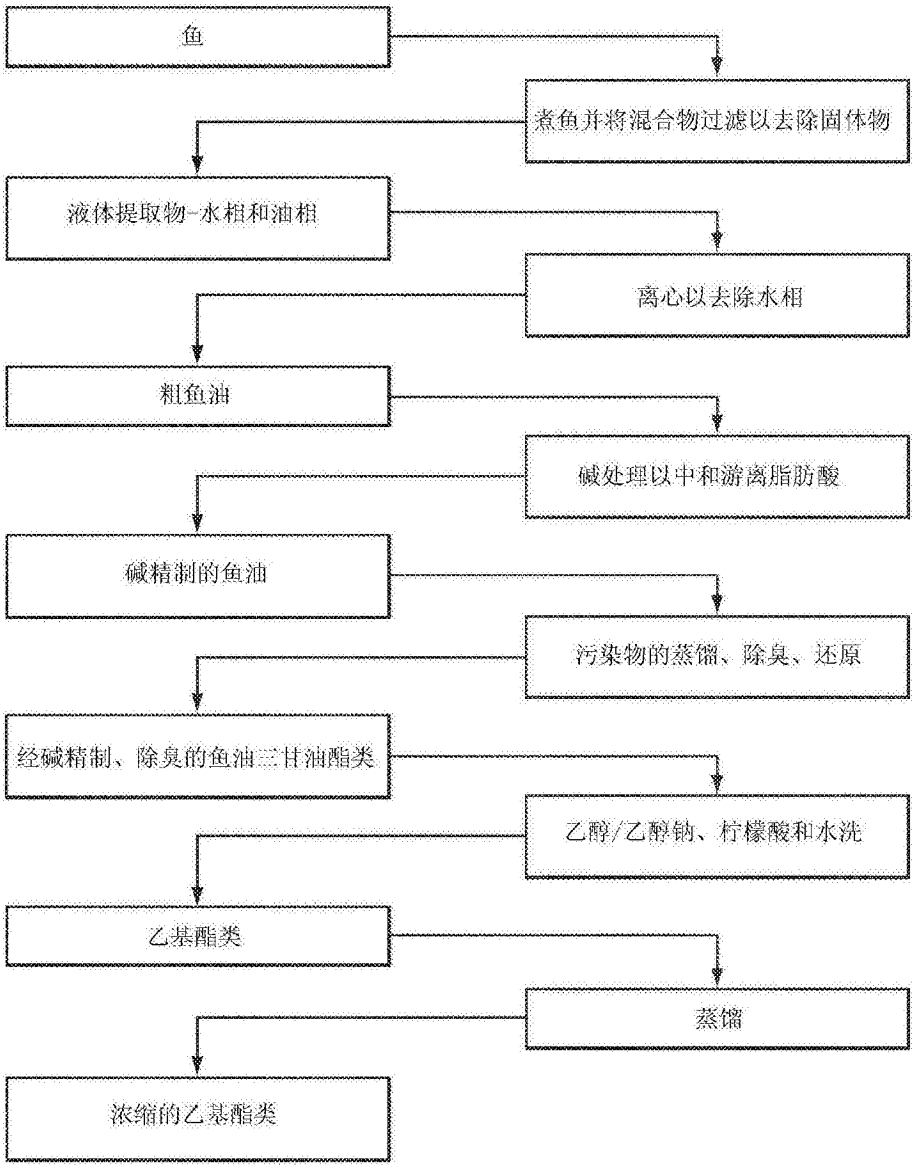

鱼
煮鱼并将混合物过滤以去除固体物
液体提取物-水相和油相
离心以去除水相
粗鱼油
碱处理以中和游离脂肪酸
碱精制的鱼油
污染物的蒸馏、除臭、还原
经碱精制、除臭的鱼油三甘油酯类
乙醇/乙醇钠、柠檬酸和水洗
乙基酯类
蒸馏
浓缩的乙基酯类

图2

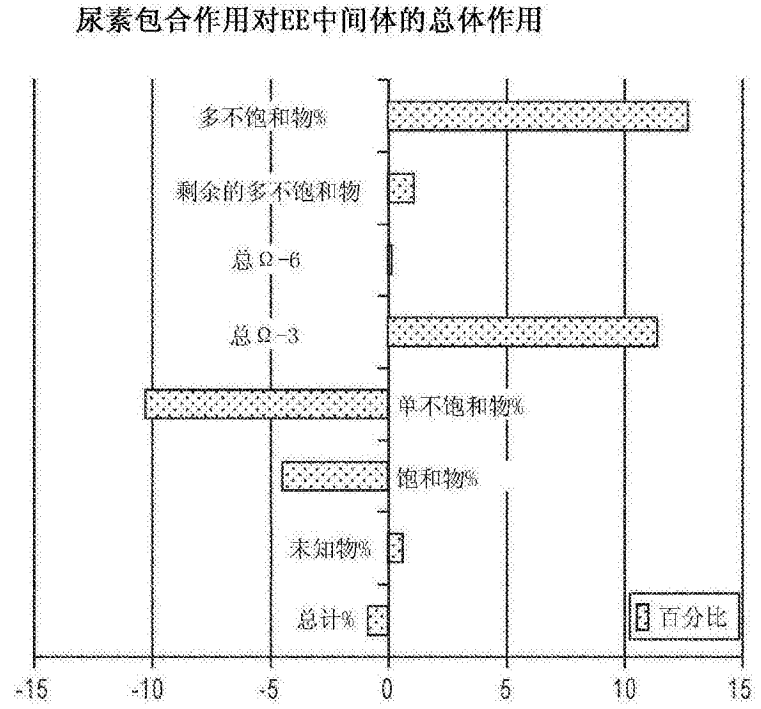

尿素包合作用对EE中间体的总体作用
多不饱和物%
剩余的多不饱和物
总Ω-6
总Ω-3
单不饱和物%
饱和物%
未知物%
总计%
百分比
-15
-10
-5
0
5
10
15

图3A

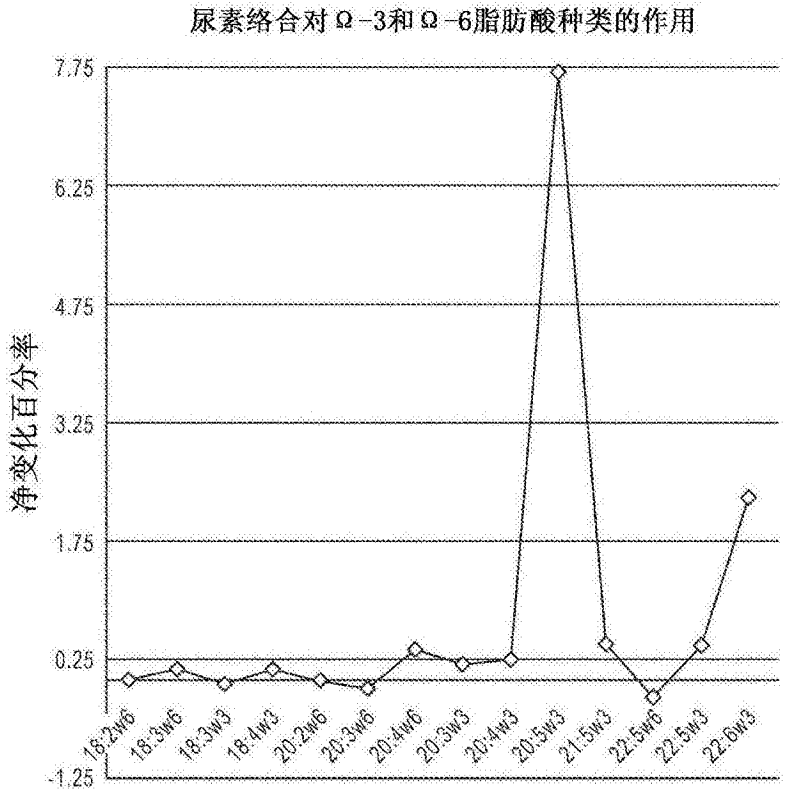
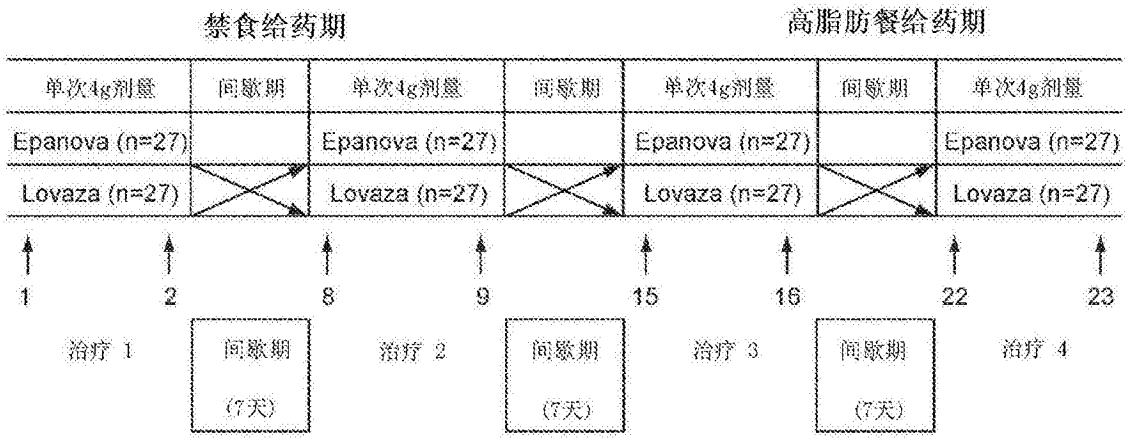

尿素络合对Ω-3和Ω-6脂肪酸种类的作用
净变化百分率
7.75
6.25
4.75
3.25
1.75
0.25
-1.25
16:2w6
18:3w6
18:3w3
18:4w3
20:2w6
20:3w6
20:4w6
20:3w3
20:4w3
20:5w3
21:5w3
22:5w6
22:5w3
22:6w3

图3B



（↑表示临床访视和研究日）

图4

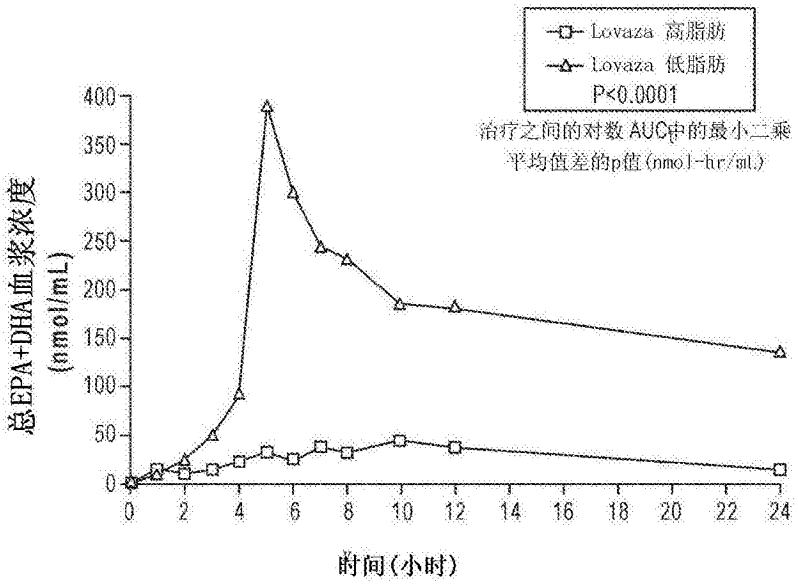


图5

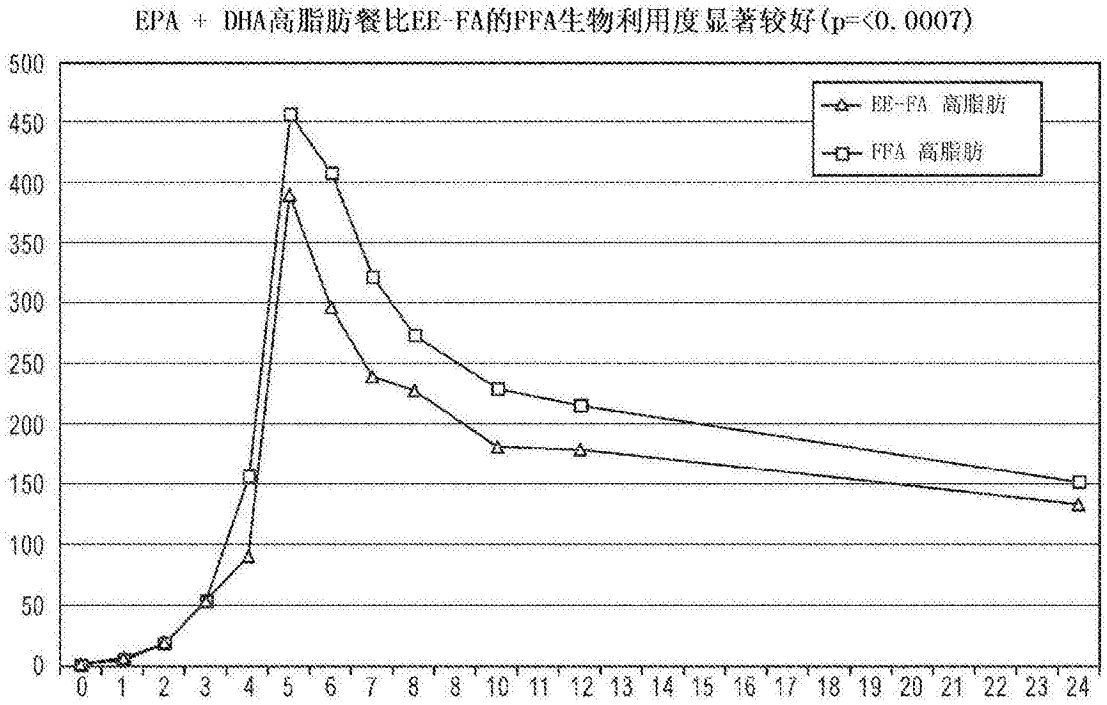

EPA + DHA高脂肪餐比EE-FA的FFA生物利用度显著较好(p=<0.0007)
EE-FA 高脂肪
FFA 高脂肪
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
0 1 2 3 4 5 6 7 8 8 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

图6

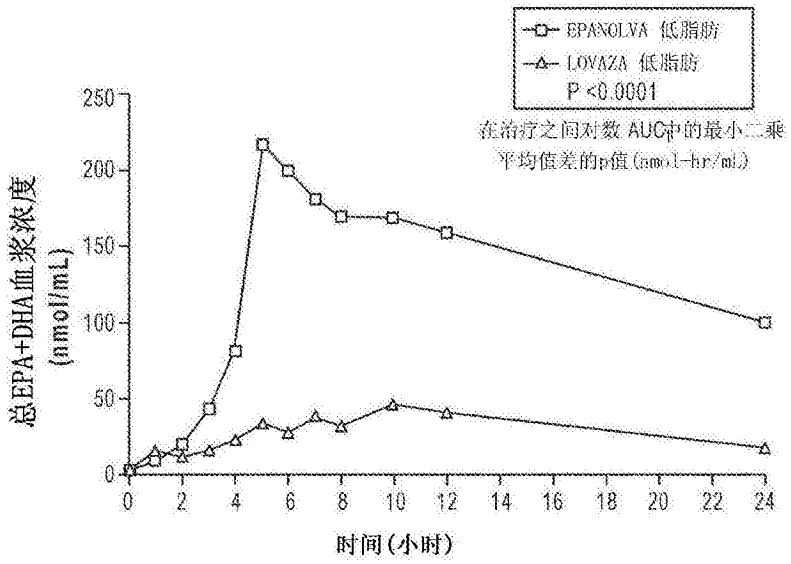

EPANOLVA 低脂肪
LOVAZA 低脂肪
P <0.0001
在治疗之间对数 AUC中的最小二乘
平均值差的p值(nmol-hr/mL)
总EPA+DHA血浆浓度
(nmol/mL)
250
200
150
100
50
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
时间(小时)

图7

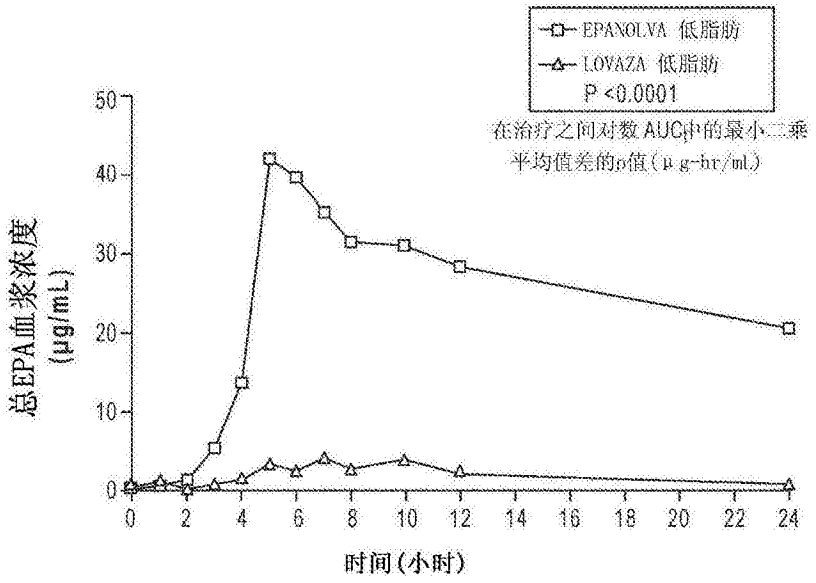

EPANOLVA 低脂肪
LOVAZA 低脂肪
P <0.0001
在治疗之间对数 AUC中的最小二乘
平均值差的p值(μg-hr/mL)
总EPA血浆浓度
(μg/mL)
50
40
30
20
10
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
时间(小时)

图8

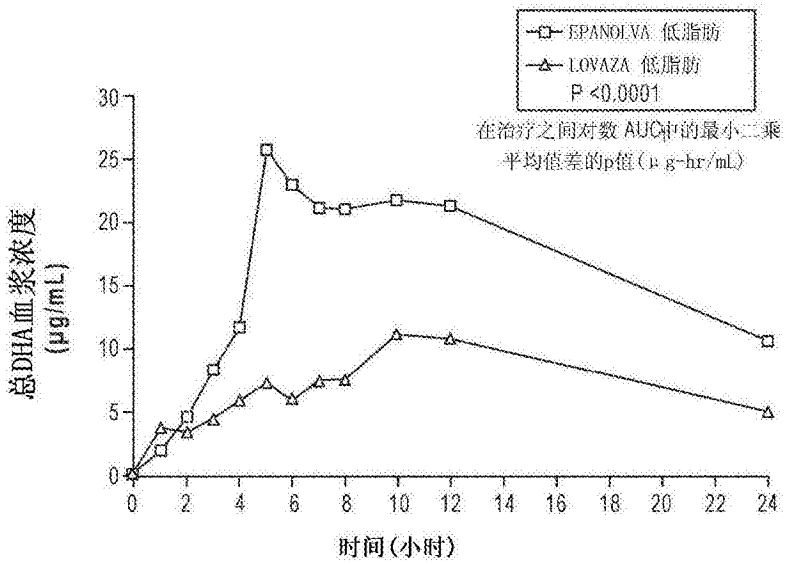

EPANOLVA 低脂肪
LOVAZA 低脂肪
P <0.0001
在治疗之间对数 AUC中的最小二乘
平均值差的p值(μg-hr/mL)
总DHA血浆浓度
(μg/mL)
30
25
20
15
10
5
0
0 2 4 6 8 10 12 14 16 18 20 22 24
时间(小时)

图9

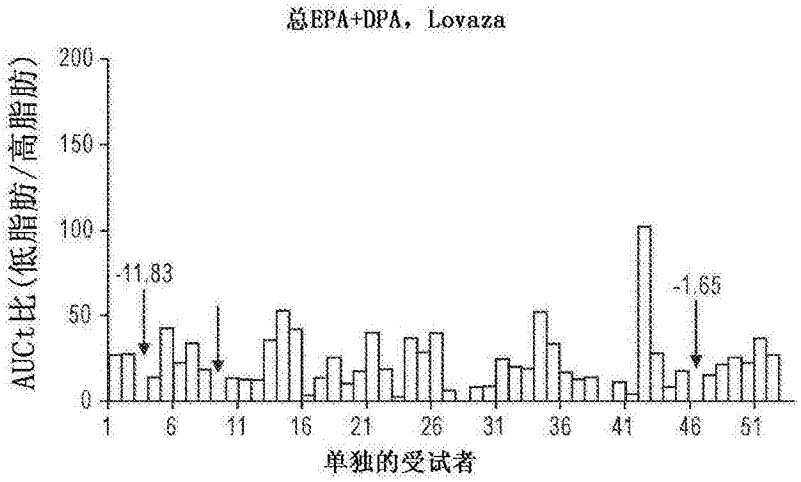


图10A

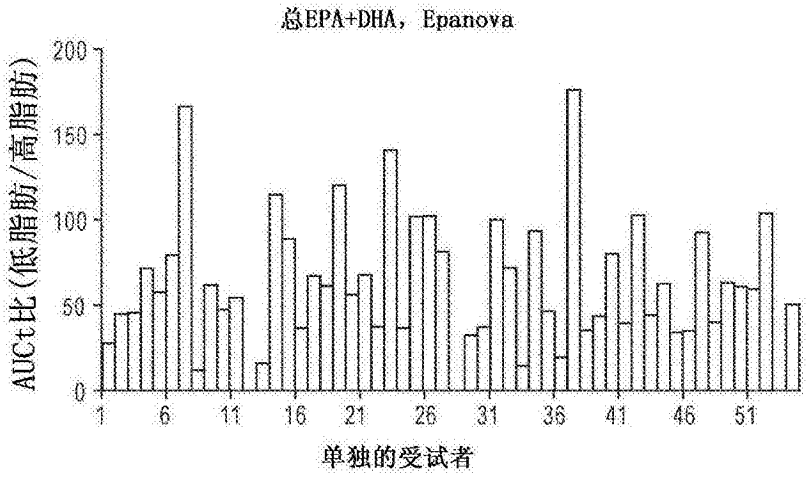


图10B

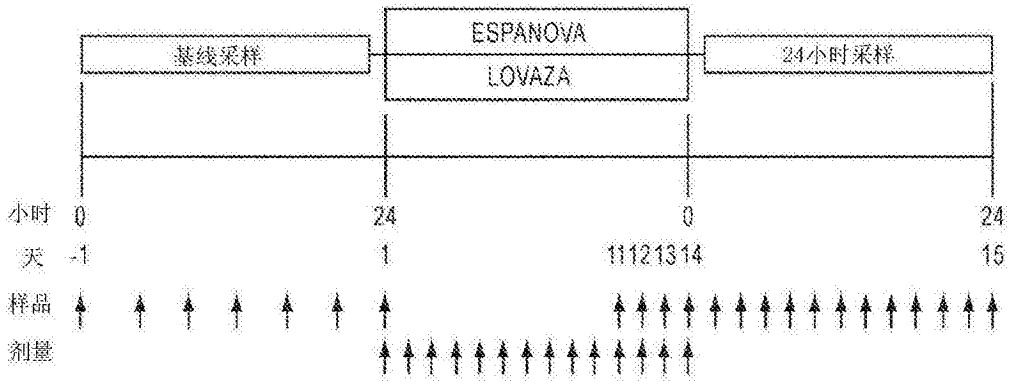


图11

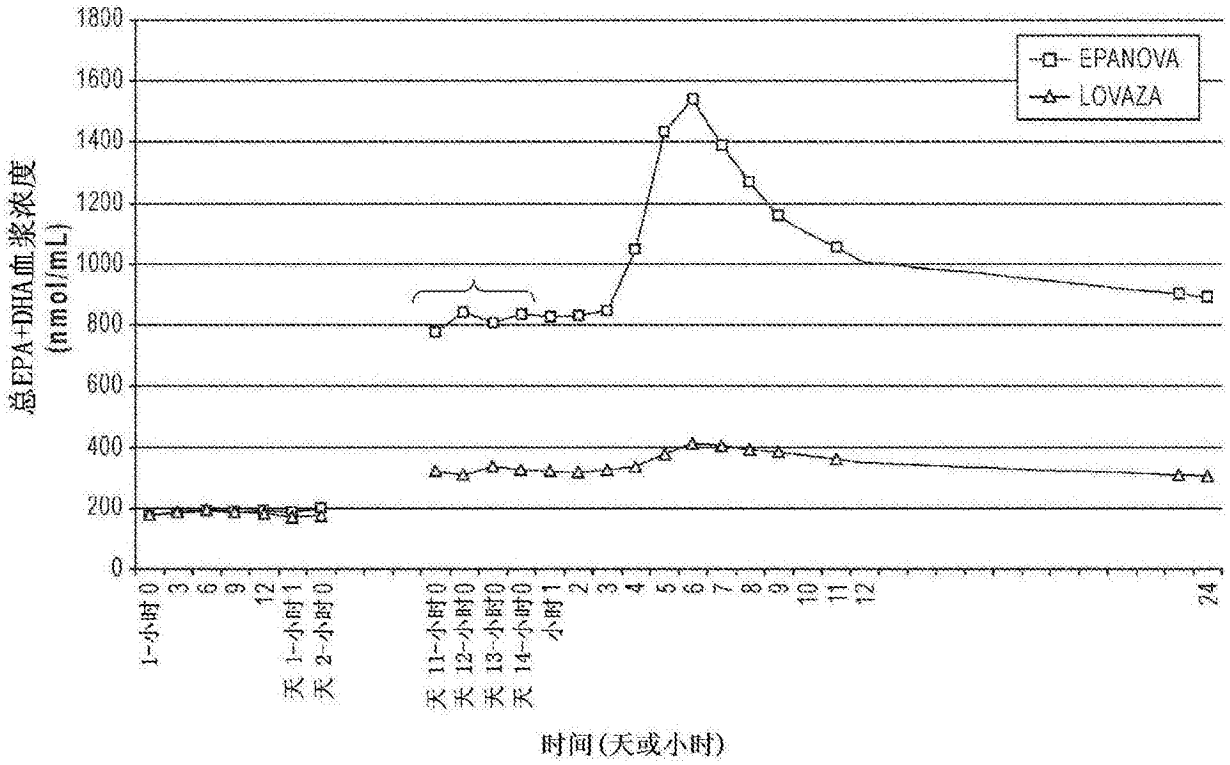

EPANOVA
LOVAZA
总EPA+DHA血浆浓度 (nmol/mL)
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
1-小时 0
3
6
9
12
天 1-小时 1
天 2-小时 0
天 11-小时 0
天 12-小时 0
天 13-小时 0
天 14-小时 0
小时 1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
24
时间(天或小时)

图12A

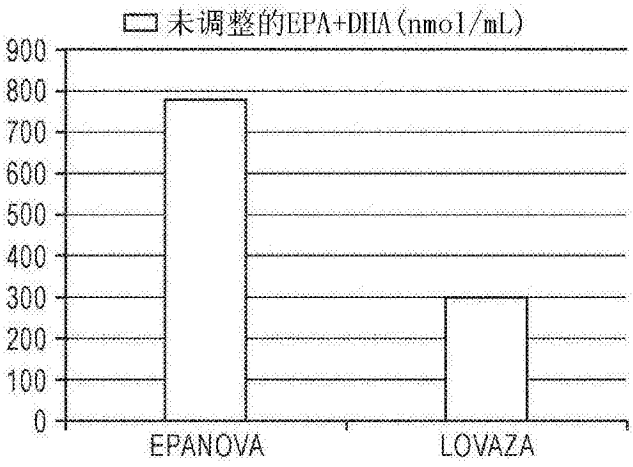

未调整的EPA+DHA(nmol/mL)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
EPANOVA
LOVAZA

图12B

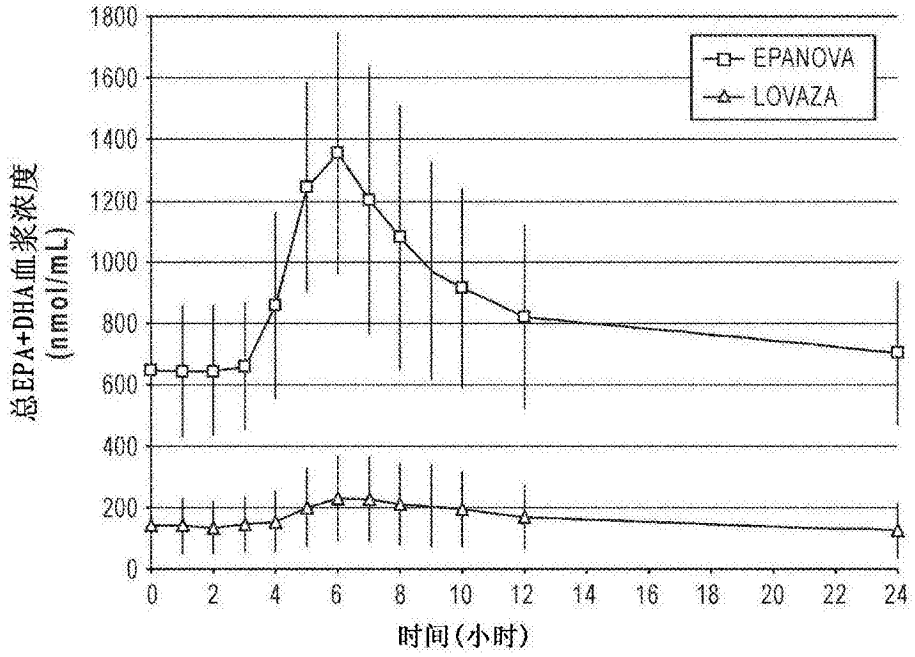

EPANOVA
LOVAZA
总EPA+DHA血浆浓度 (nmol/mL)
时间(小时)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
1800
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24

图13

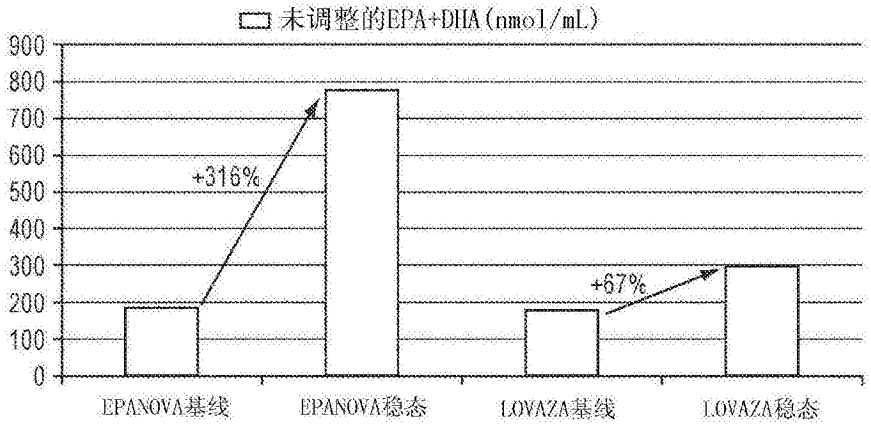

未调整的EPA+DHA(nmol/mL)
+316%
+67%
EPANOVA基线
EPANOVA稳态
LOVAZA基线
LOVAZA稳态
0
100
200
300
400
500
600
700
800
900

图14A

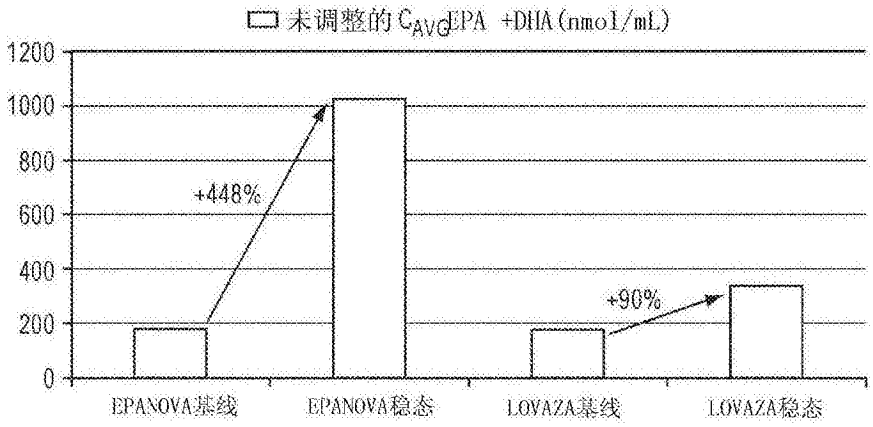


图14B

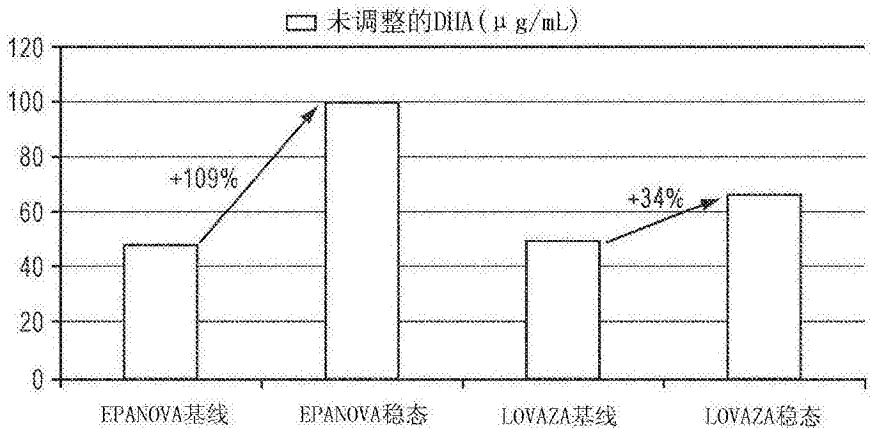


图15A

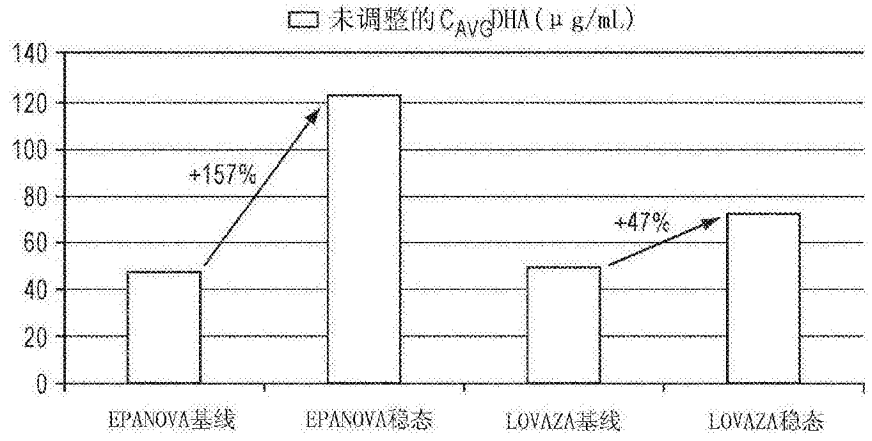


图15B

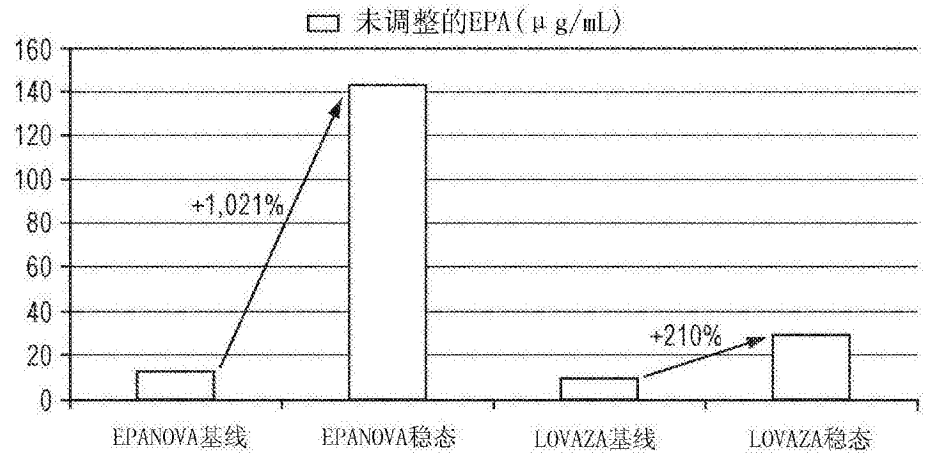

未调整的EPA(μg/mL)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
+1,021%
+210%
EPANOVA基线
EPANOVA稳态
LOVAZA基线
LOVAZA稳态

图16A

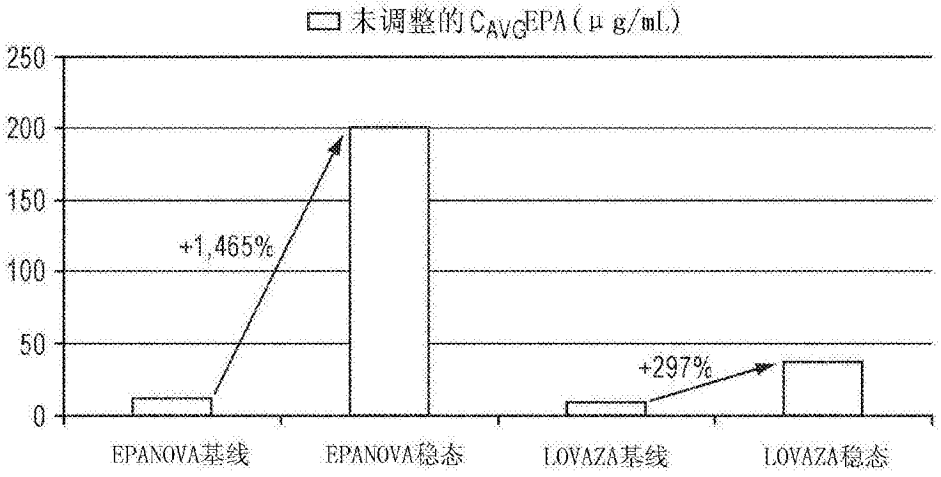

未调整的C_{AVG}EPA(μg/mL)
250
200
150
100
50
0
+1,465%
+297%
EPANOVA基线
EPANOVA稳态
LOVAZA基线
LOVAZA稳态

图16B

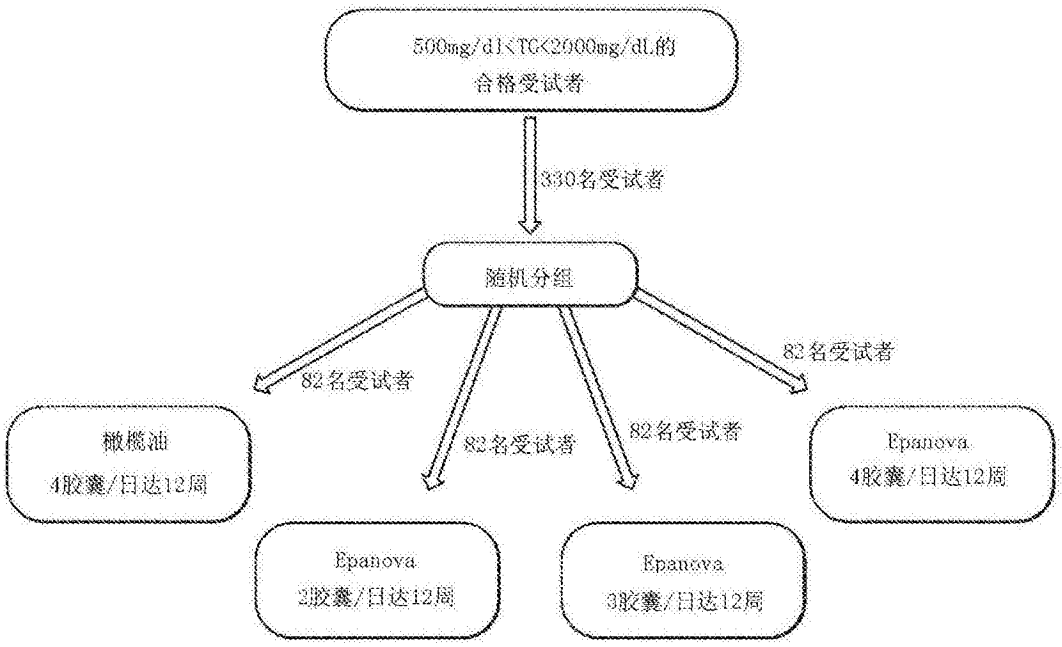

500mg/dl<TG<2000mg/dL的
合格受试者
330名受试者
随机分组
82名受试者
82名受试者
82名受试者
82名受试者
橄榄油
4胶囊/日达12周
Epanova
3胶囊/日达12周
Epanova
3胶囊/日达12周
Epanova
4胶囊/日达12周

图17

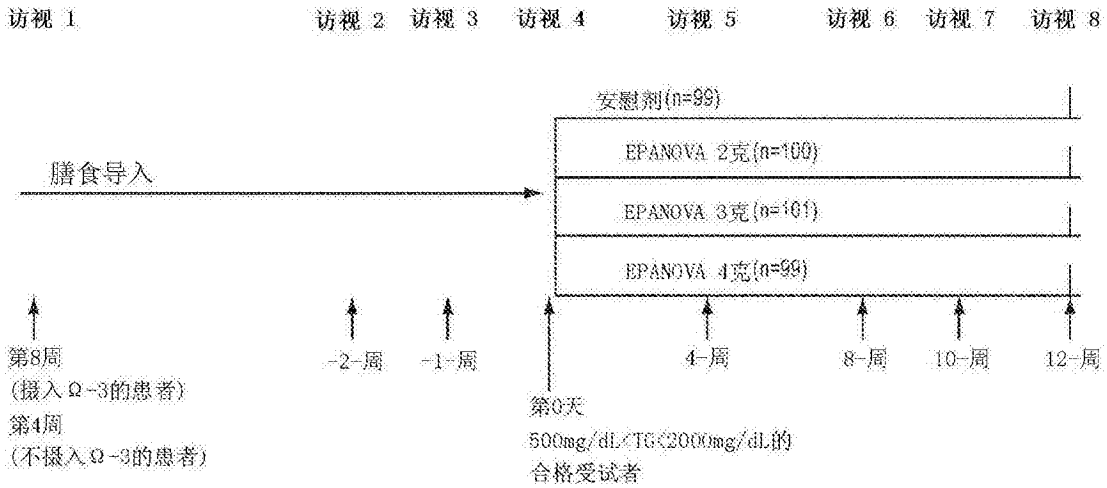

访视 1
访视 2
访视 3
访视 4
访视 5
访视 6
访视 7
访视 8
安慰剂(n=99)
EPANOVA 2克(n=100)
EPANOVA 3克(n=101)
EPANOVA 4克(n=99)
膳食导入
第8周
(摄入Ω-3的患者)
第4周
(不摄入Ω-3的患者)
-2-周
-1-周
第0天
500mg/dL<TG<2000mg/dL的
合格受试者
4-周
8-周
10-周
12-周

图18

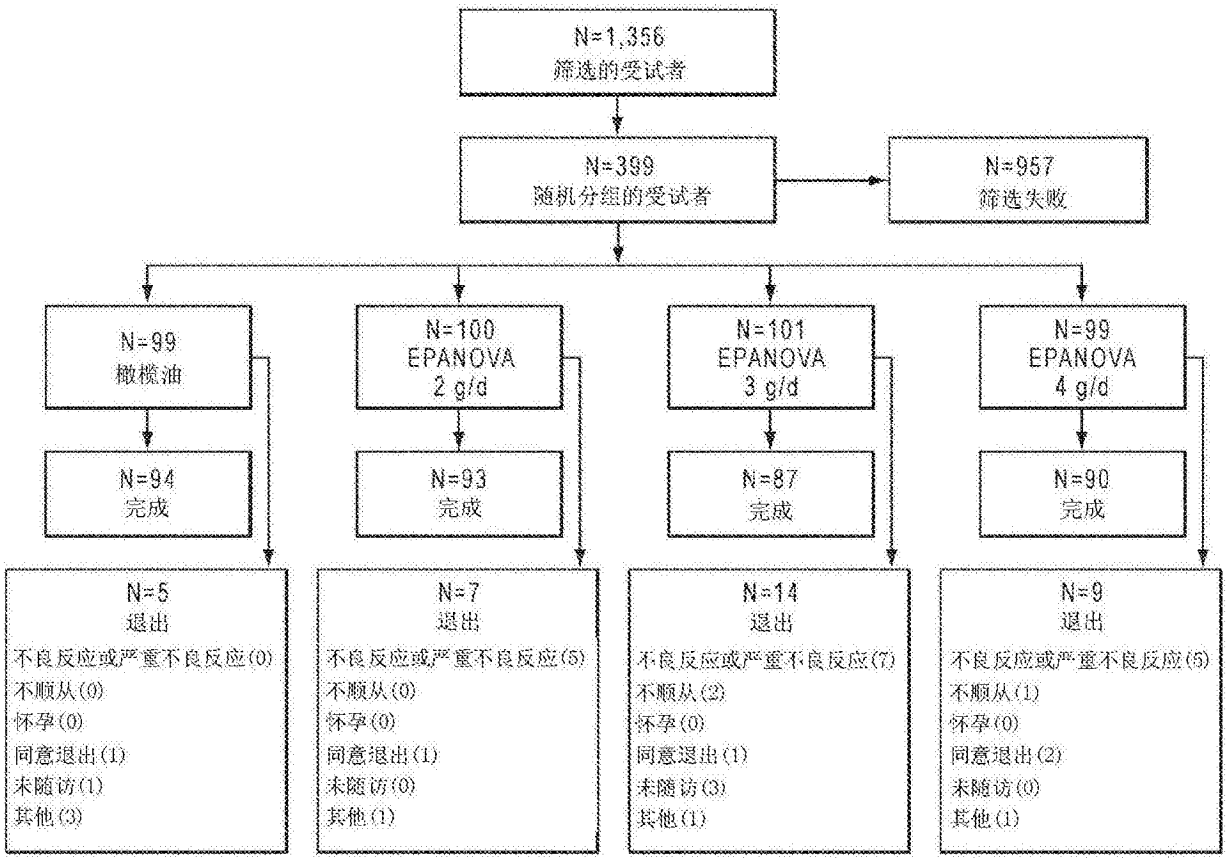

N=1,356
筛选的受试者
N=399
随机分组的受试者
N=957
筛选失败
N=99
橄榄油
N=100
EPANOVA
2 g/d
N=101
EPANOVA
3 g/d
N=99
EPANOVA
4 g/d
N=94
完成
N=93
完成
N=87
完成
N=90
完成
N=5
退出
不良反应或严重不良反应(0)
不顺从(0)
怀孕(0)
同意退出(1)
未随访(1)
其他(3)
N=7
退出
不良反应或严重不良反应(5)
不顺从(0)
怀孕(0)
同意退出(1)
未随访(0)
其他(1)
N=14
退出
不良反应或严重不良反应(7)
不顺从(2)
怀孕(0)
同意退出(1)
未随访(3)
其他(1)
N=9
退出
不良反应或严重不良反应(5)
不顺从(1)
怀孕(0)
同意退出(2)
未随访(0)
其他(1)

图19

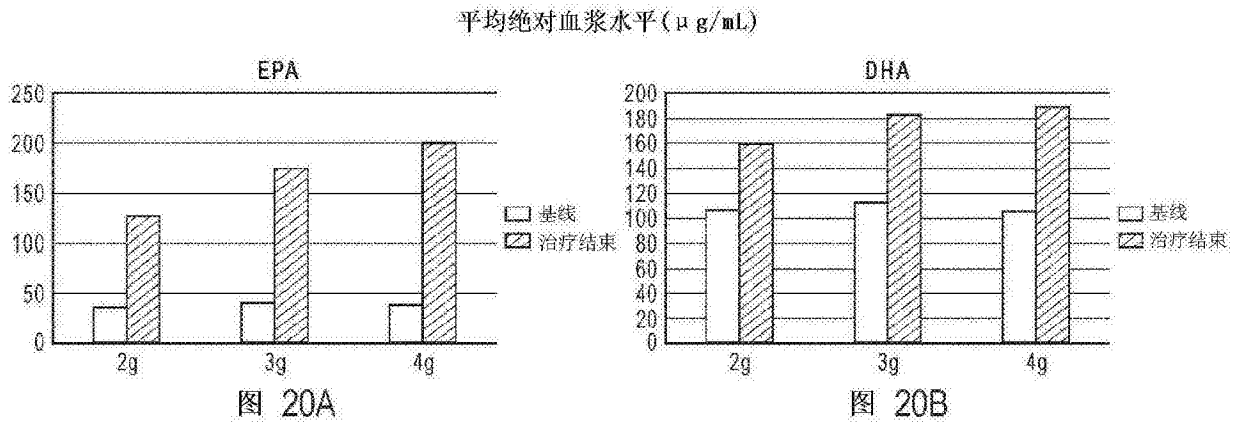


图 20A

图 20B

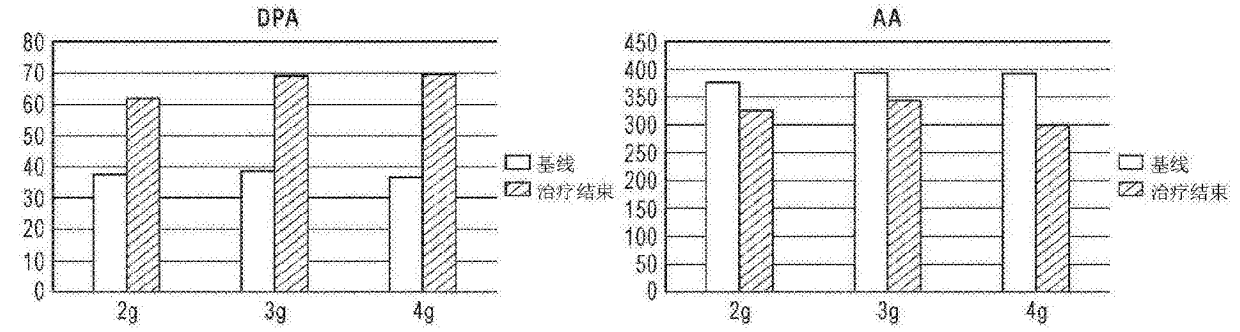


图 20C

图 20D

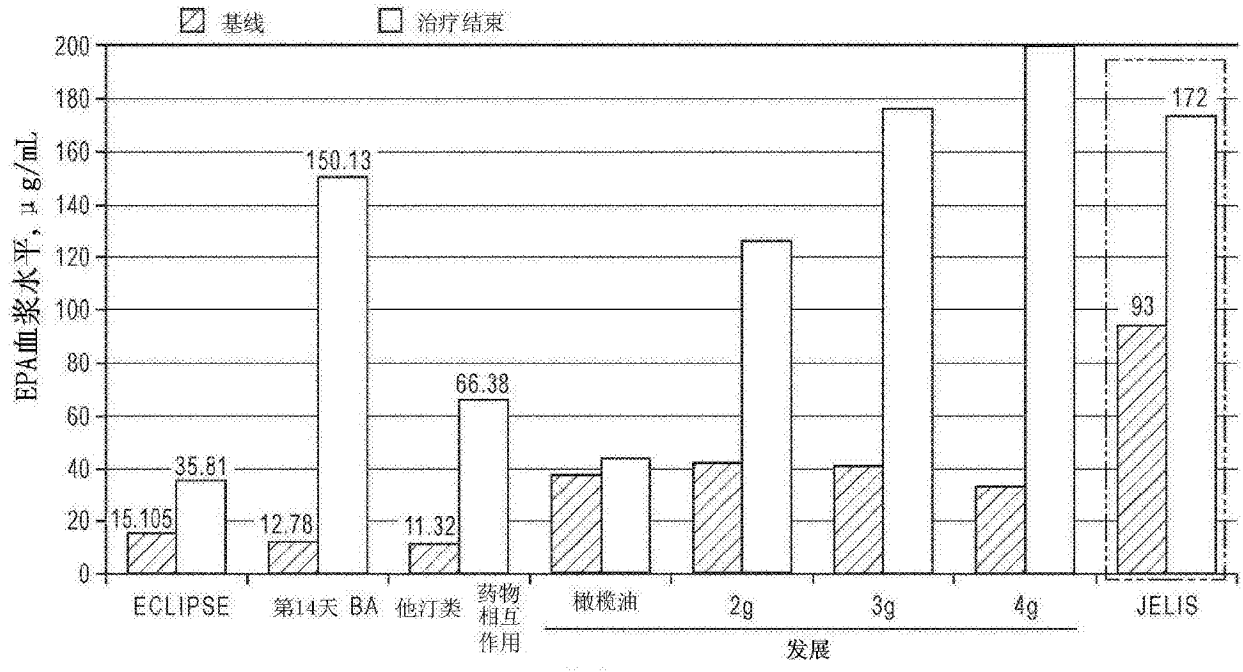


图 20E

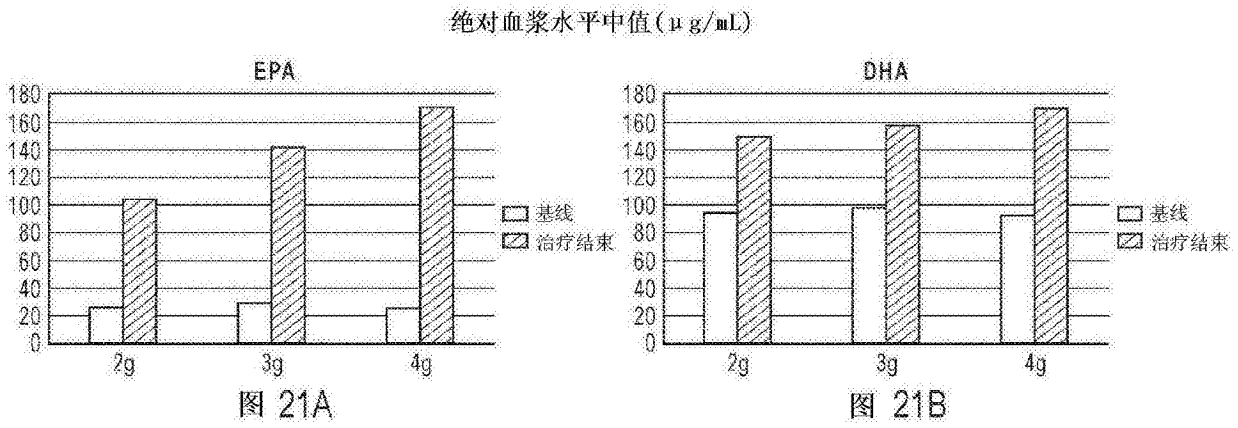


图 21A

图 21B

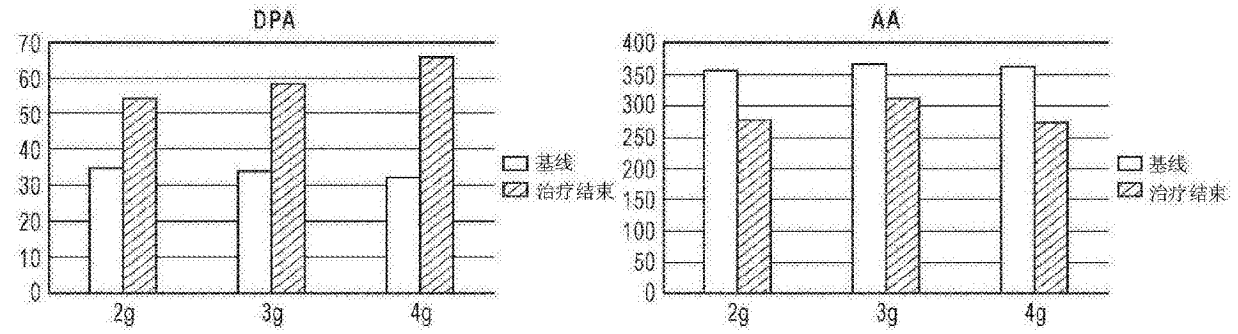


图 21C

图 21D

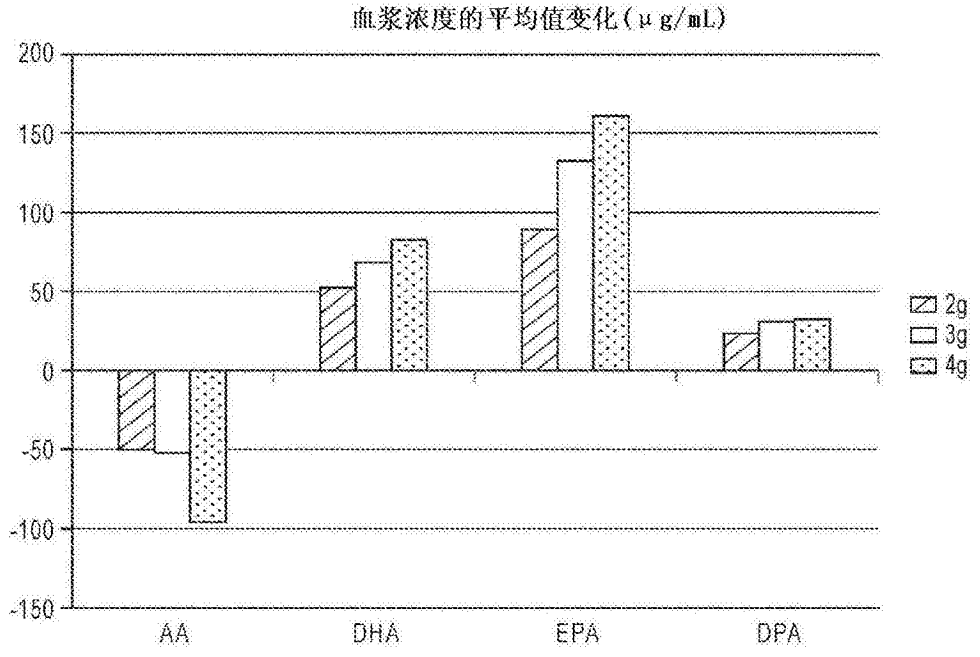


图22A

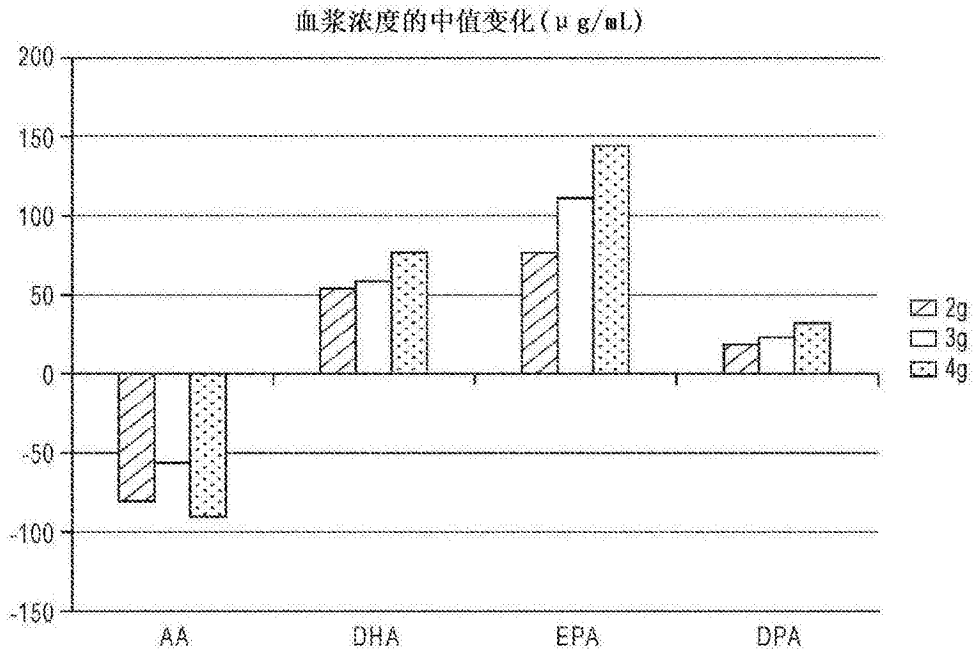

血浆浓度的中值变化(μg/mL)
200
150
100
50
0
-50
-100
-150
AA
DHA
EPA
DPA
2g
3g
4g

图22B

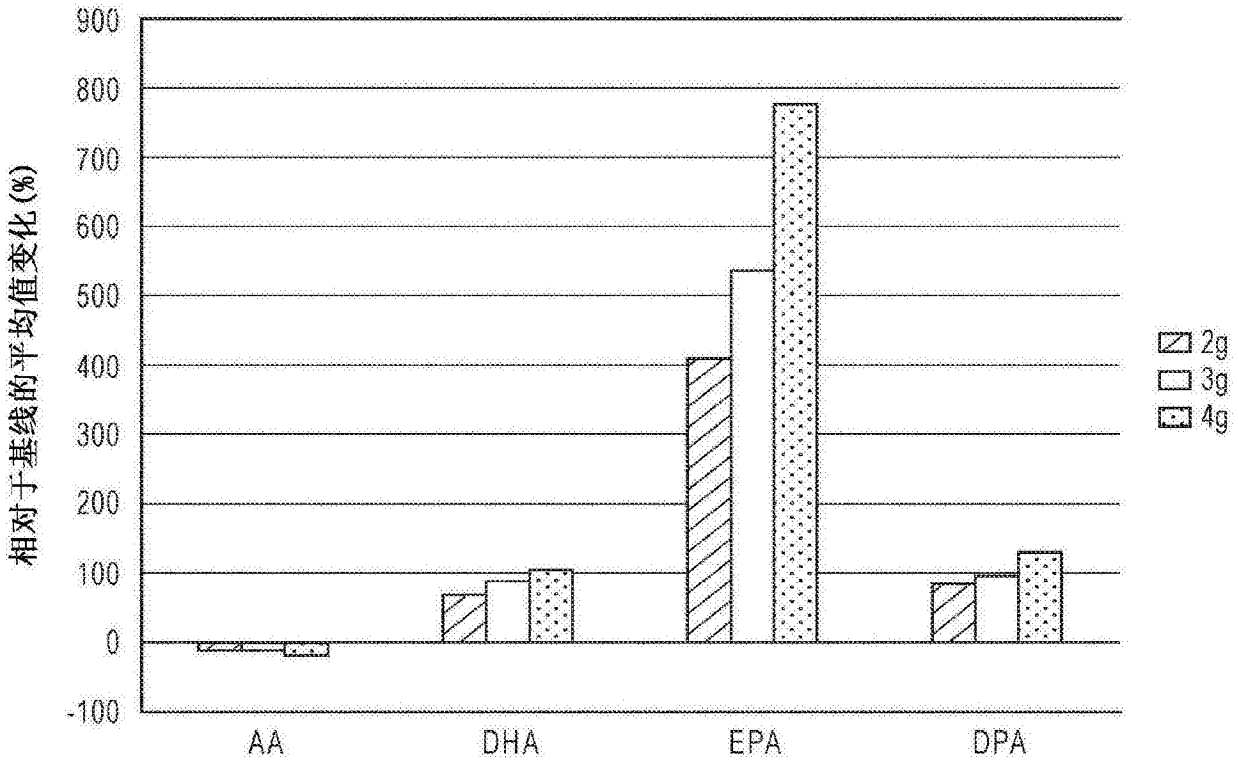

相对于基线的平均值变化(%)
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
AA
DHA
EPA
DPA
2g
3g
4g

图23A

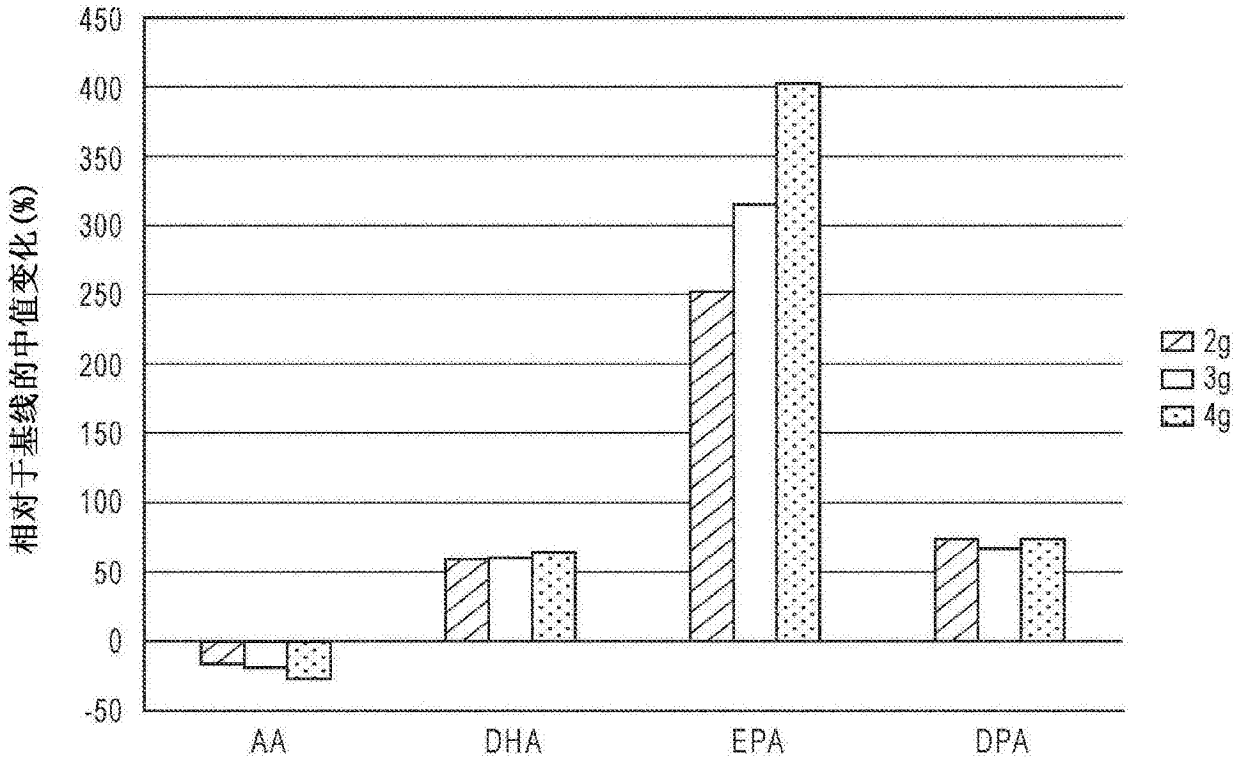

450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
-50
相对于基线的中值变化(%)
AA
DHA
EPA
DPA
2g
3g
4g

图23B

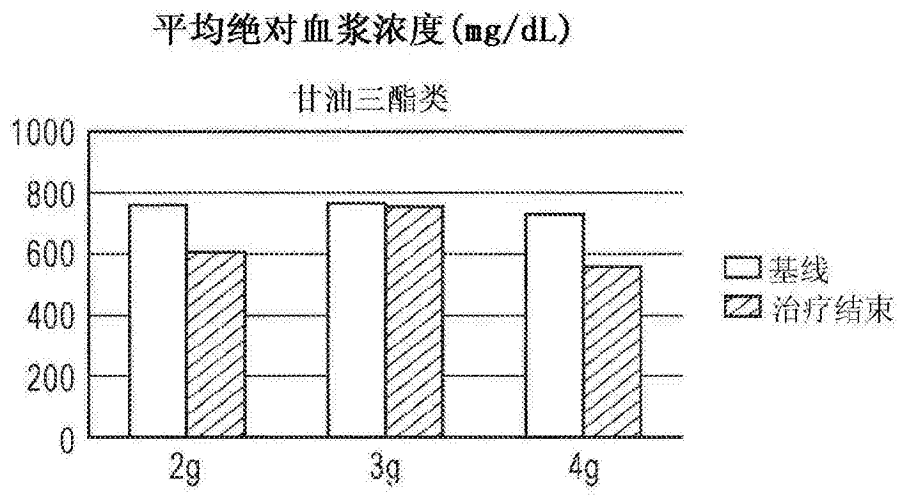


图 24A

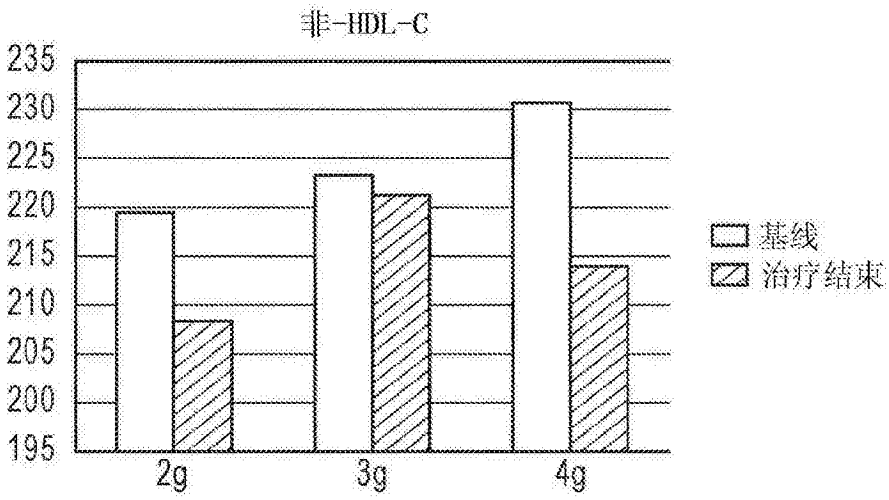


图 24B

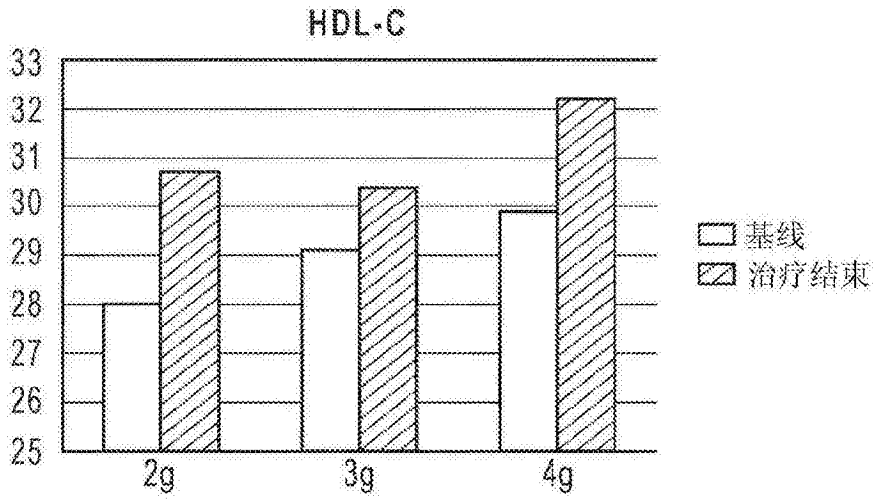


图 24C

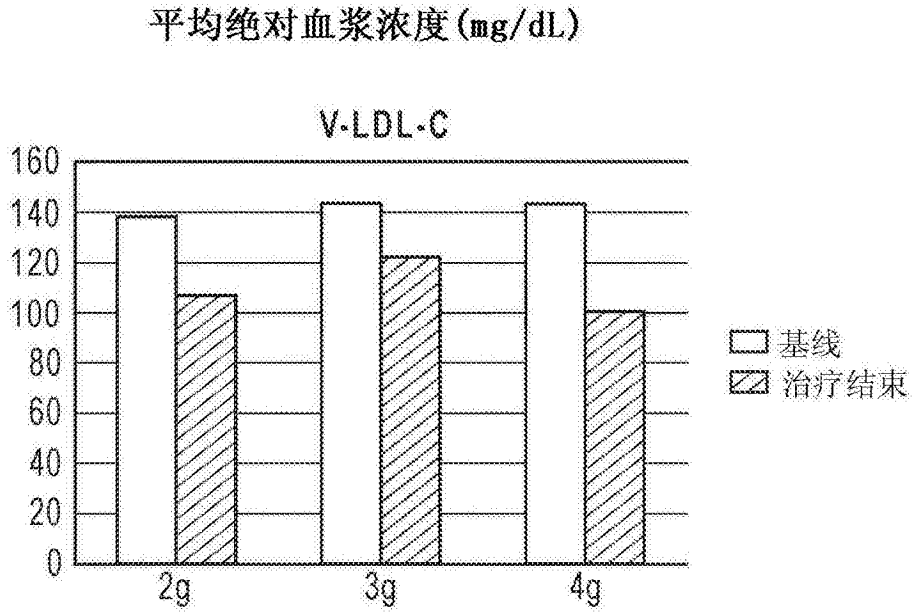

平均绝对血浆浓度(mg/dL)
V-LDL-C
160
140
120
100
80
60
40
20
0
2g
3g
4g
基线
治疗结束

图 24D

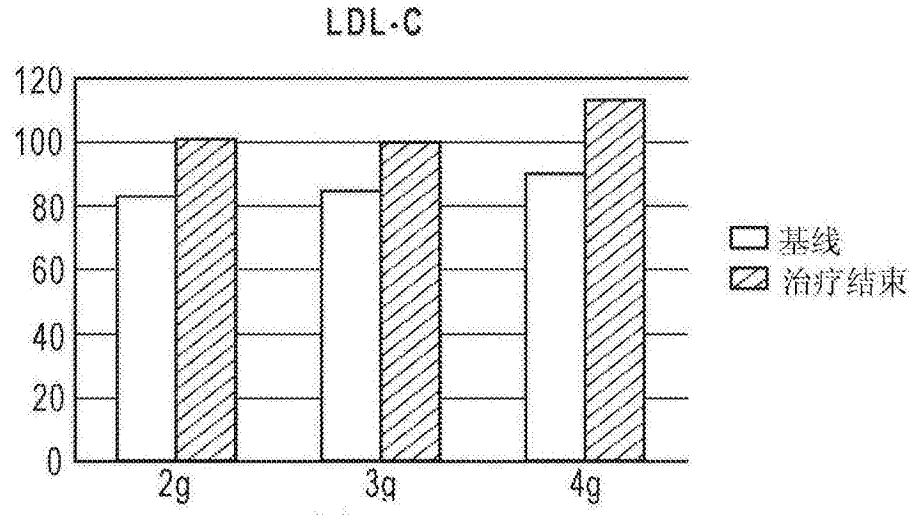

LDL-C
120
100
80
60
40
20
0
2g
3g
4g
基线
治疗结束

图 24E

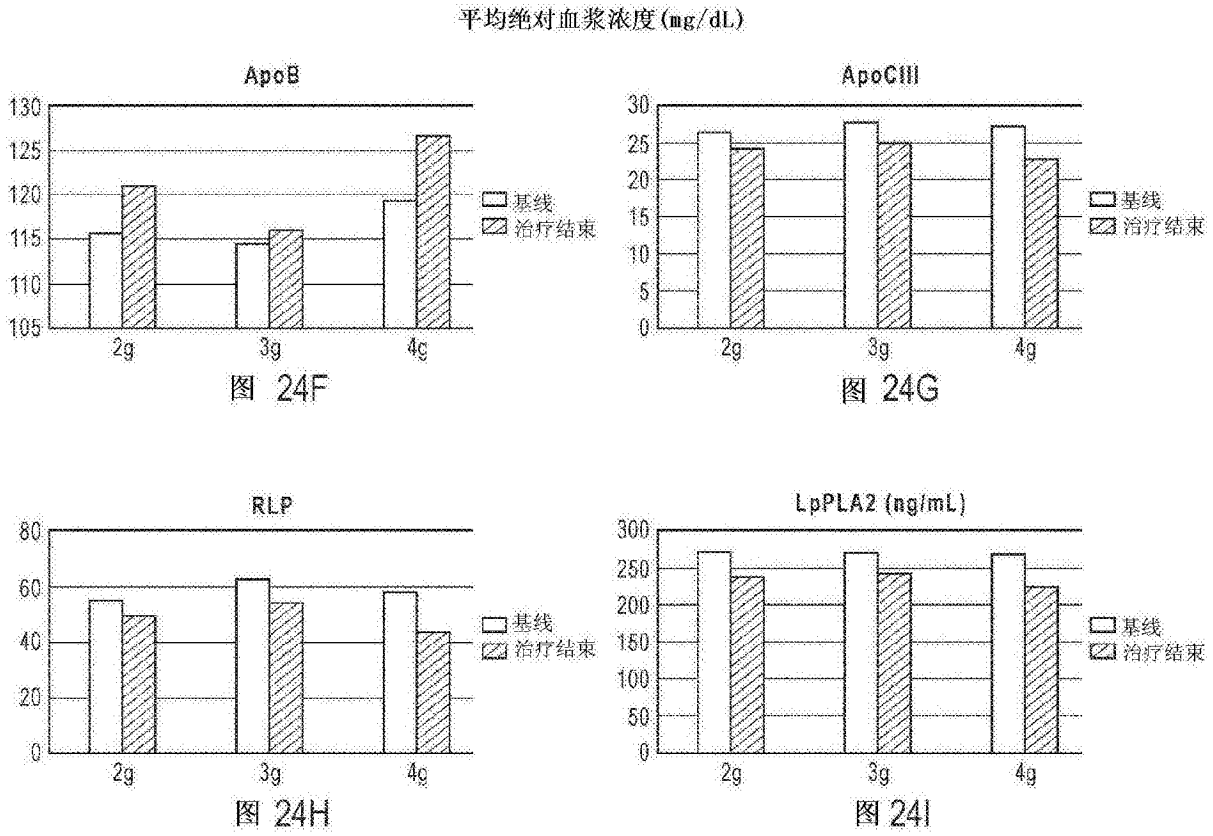


图 24F 图 24G

图 24H 图 24I

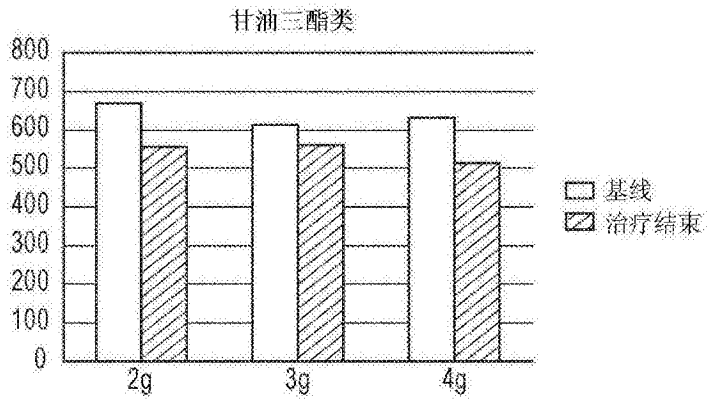

绝对血浆水平中值(mg/dL)
甘油三酯类
800
700
600
500
400
300
200
100
0
2g
3g
4g
基线
治疗结束

图 25A

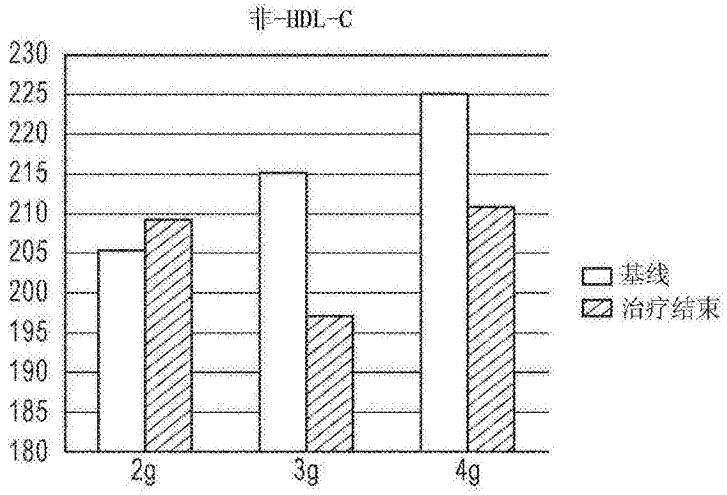

非-HDL-C
230
225
220
215
210
205
200
195
190
185
180
2g
3g
4g
基线
治疗结束

图 25B

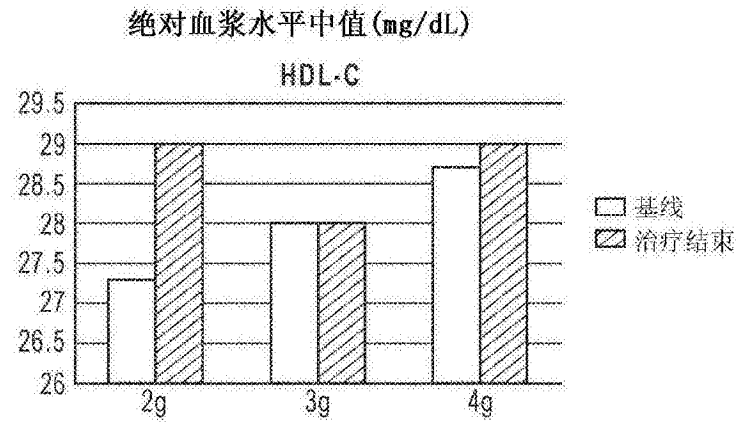


图 25C

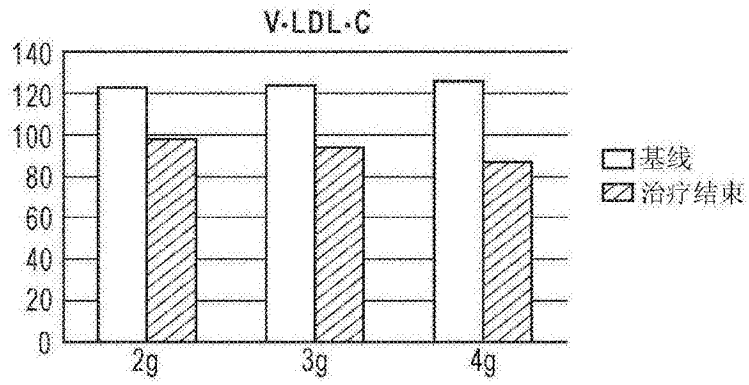


图 25D

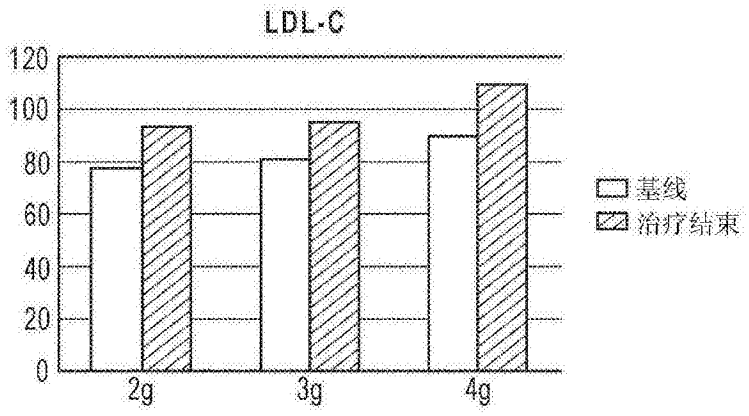


图 25E

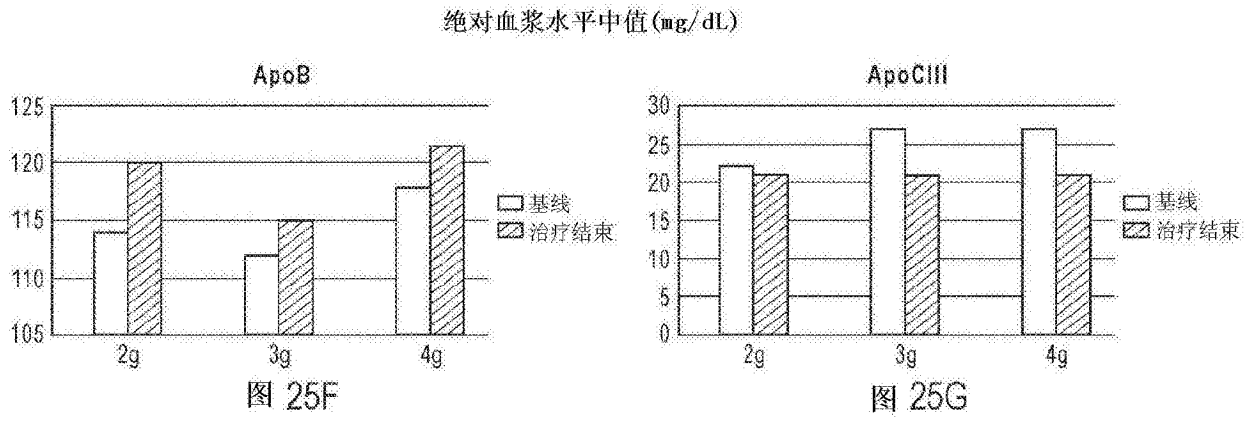


图 25F 图 25G

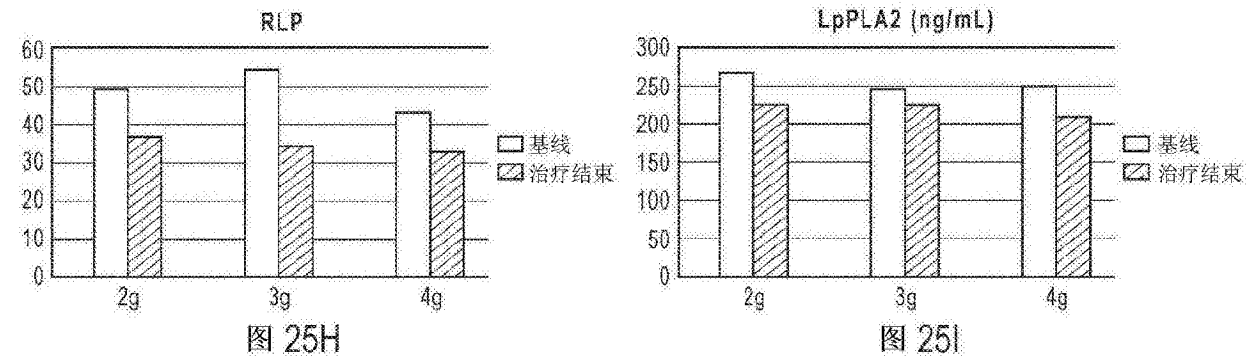


图 25H 图 25I

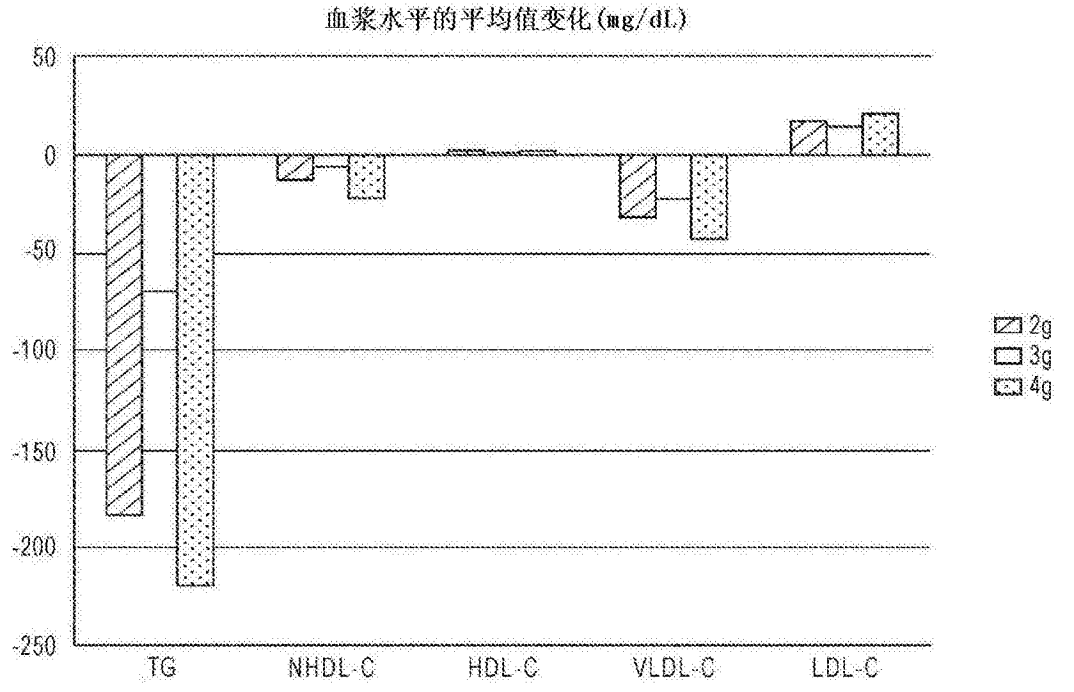


图26A

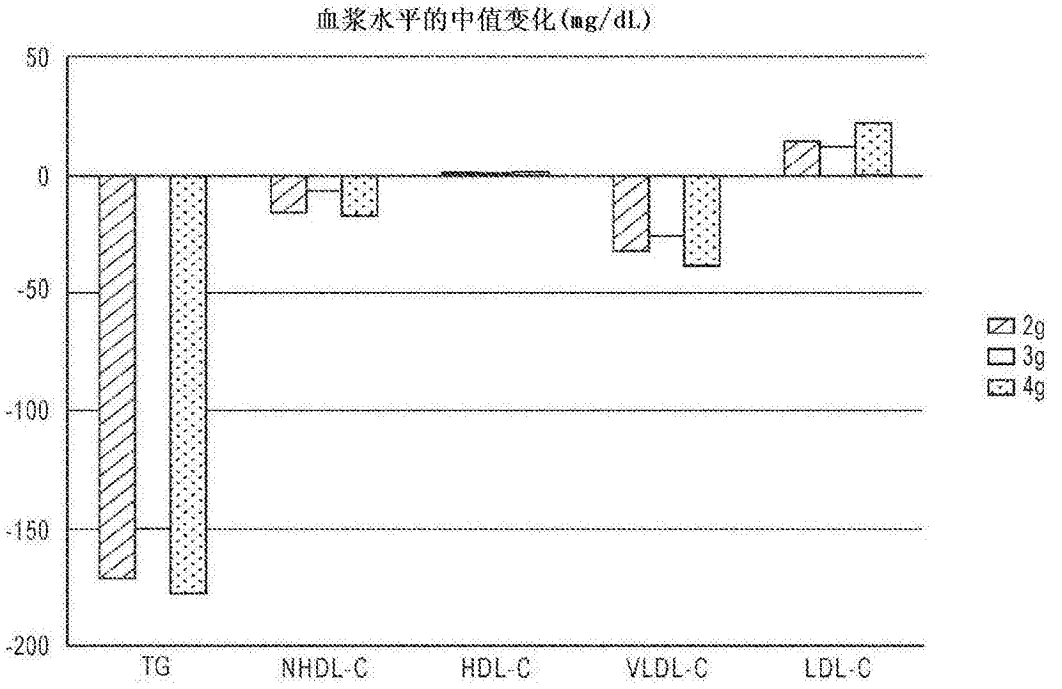

血浆水平的中值变化(mg/dL)
50
0
-50
-100
-150
-200
TG
NHDL-C
HDL-C
VLDL-C
LDL-C
2g
3g
4g

图26B

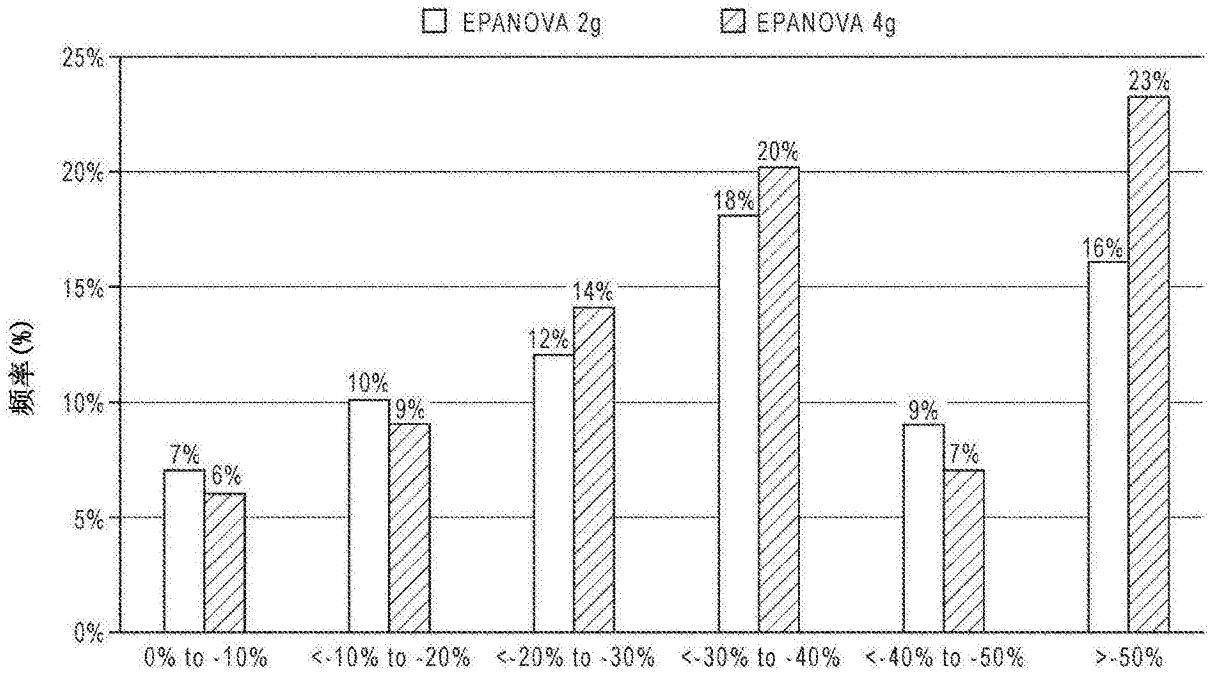

EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
频率(%)
25%
20%
15%
10%
5%
0%
7%
6%
10%
9%
12%
14%
18%
20%
9%
7%
16%
23%
0% to -10%
<-10% to -20%
<-20% to -30%
<-30% to -40%
<-40% to -50%
>-50%

图27

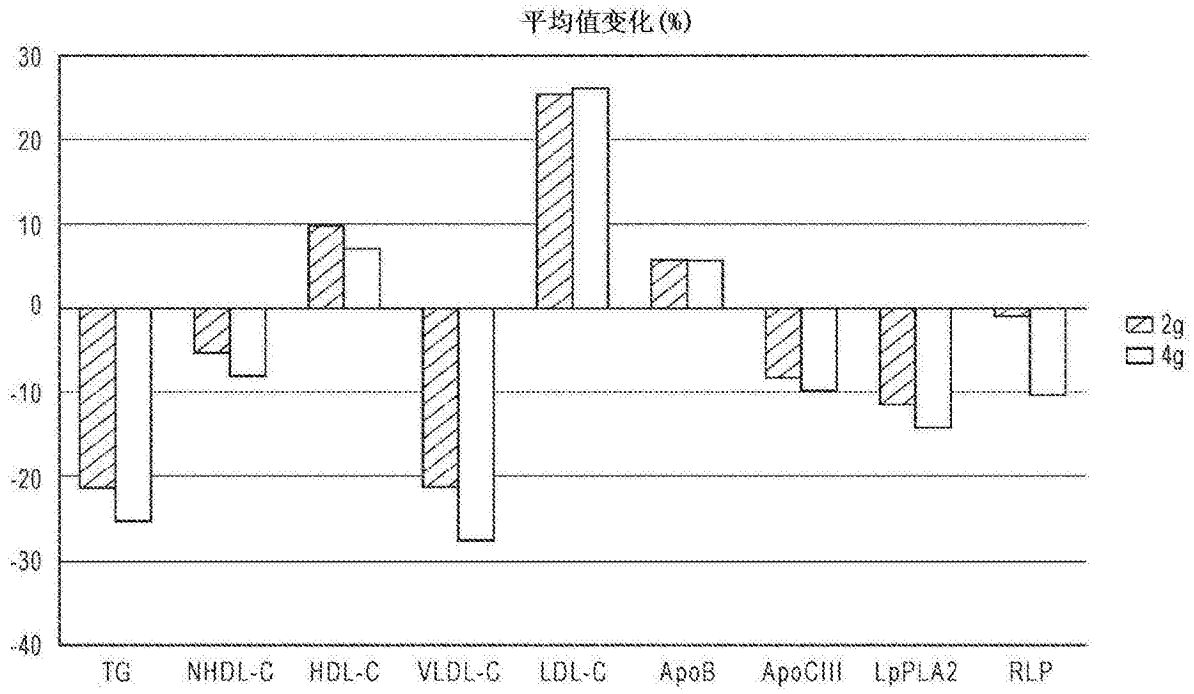

平均值变化(%)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
TG
NHDL-C
HDL-C
VLDL-C
LDL-C
ApoB
ApoCIII
LpPLA2
RLP
2g
4g

图28A

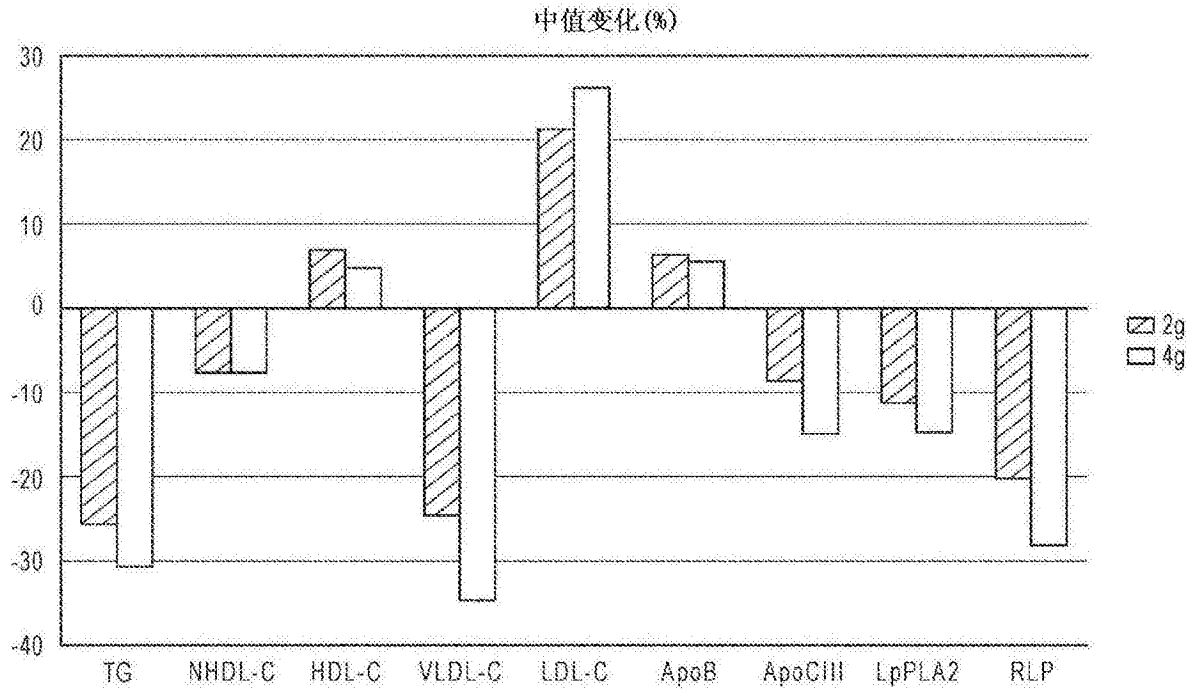

中值变化(%)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
TG
NHDL-C
HDL-C
VLDL-C
LDL-C
ApoB
ApoCIII
LpPLA2
RLP
2g
4g

图28B

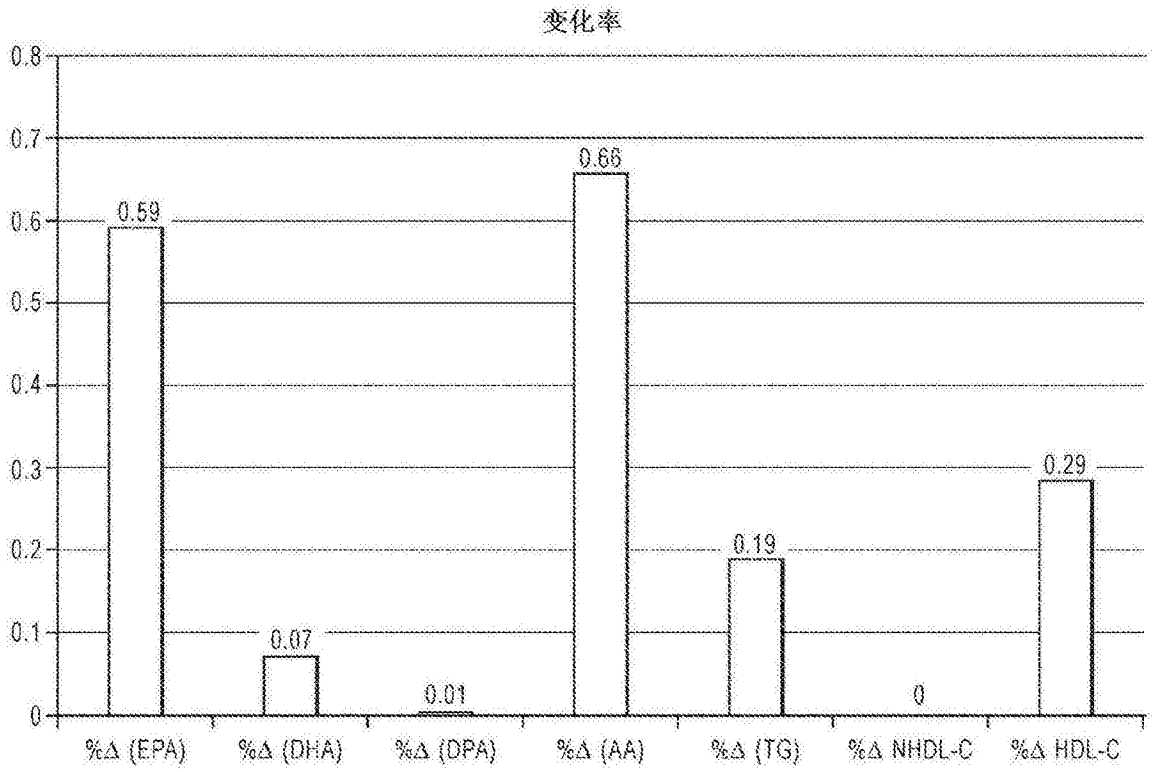

变化率
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
0.59
0.07
0.01
0.66
0.19
0
0.29
%Δ (EPA)
%Δ (DHA)
%Δ (DPA)
%Δ (AA)
%Δ (TG)
%Δ NHDL-C
%Δ HDL-C

图29

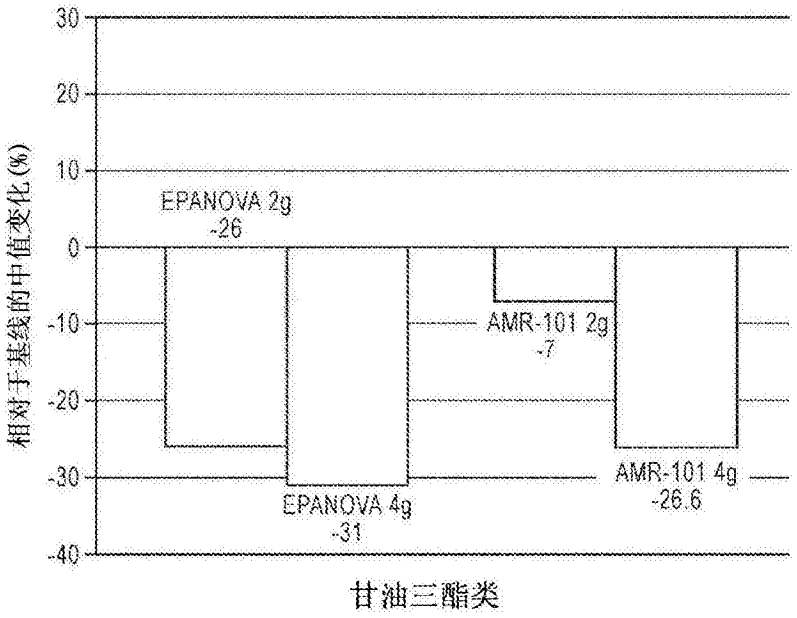

30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
相对于基线的中值变化 (%)
EPANOVA 2g
-26
EPANOVA 4g
-31
AMR-101 2g
-7
AMR-101 4g
-26.6
甘油三酯类

图30

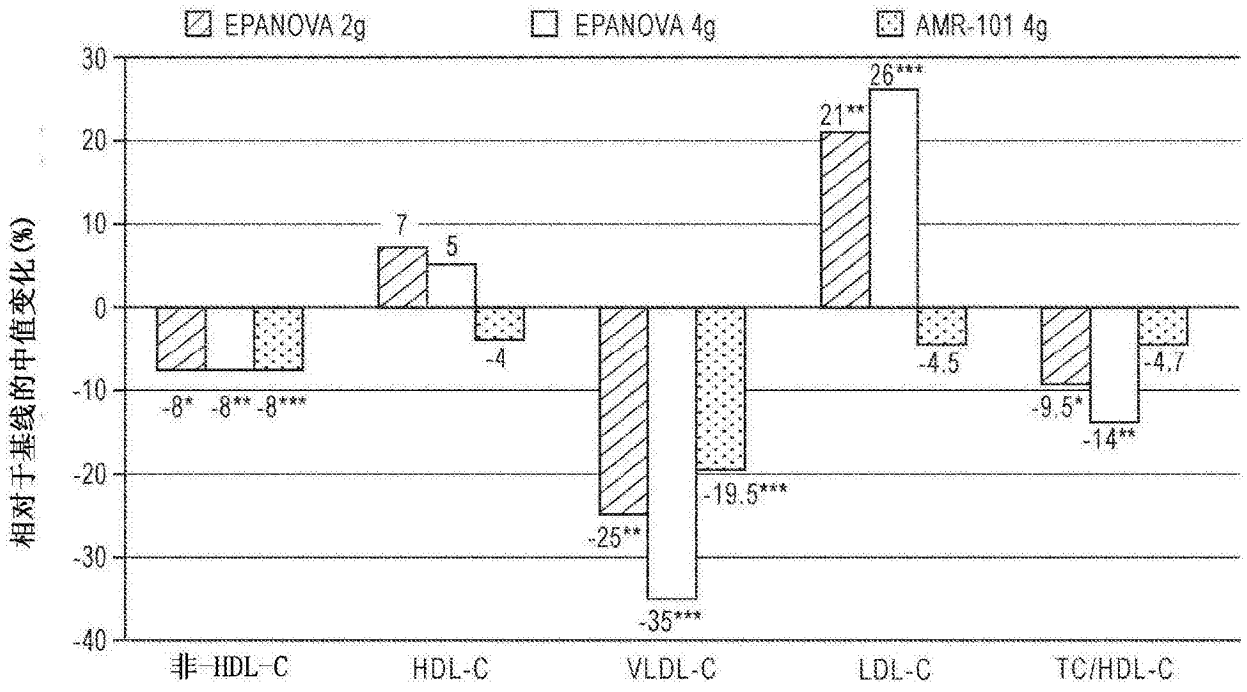

EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
AMR-101 4g
相对于基线的中值变化(%)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-8*
-8**
-8***
7
5
-4
-25**
-35***
-19.5***
21**
26***
-4.5
-9.5*
-14**
-4.7
非-HDL-C
HDL-C
VLDL-C
LDL-C
TC/HDL-C

图31

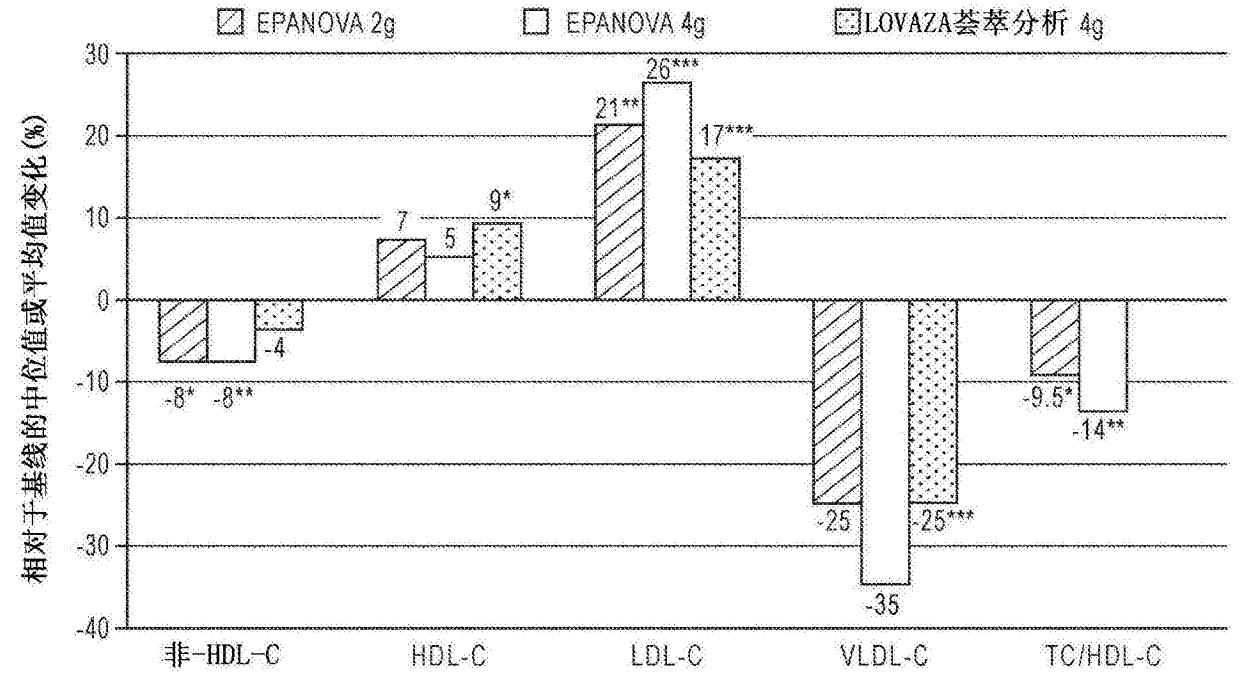

EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
LOVAZA荟萃分析 4g
相对于基线的中位值或平均值变化(%)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-8*
-8**
-4
7
5
9*
21**
26***
17***
-25
-35
-25***
-9.5*
-14**
非-HDL-C
HDL-C
LDL-C
VLDL-C
TC/HDL-C

图32

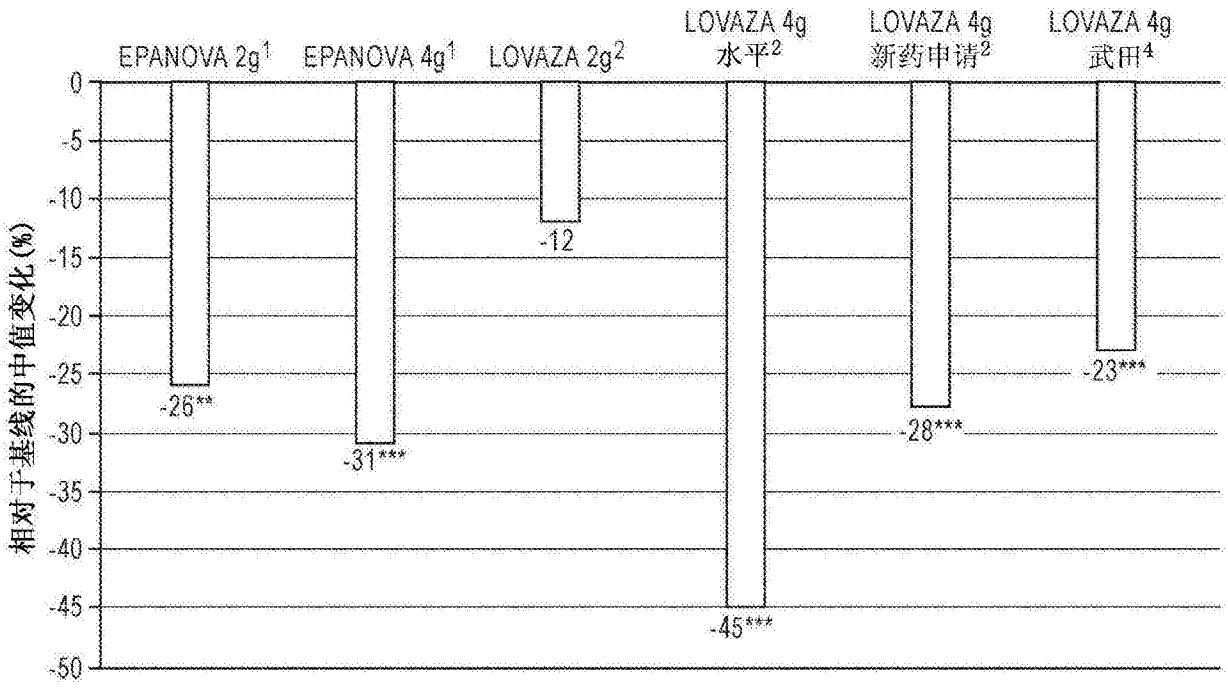

EPANOVA 2g[1]
EPANOVA 4g[1]
LOVAZA 2g[2]
LOVAZA 4g 水平[2]
LOVAZA 4g 新药申请[2]
LOVAZA 4g 武田[4]
相对于基线的中值变化(%)
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-35
-40
-45
-50
-26**
-31***
-12
-45***
-28***
-23***

图33

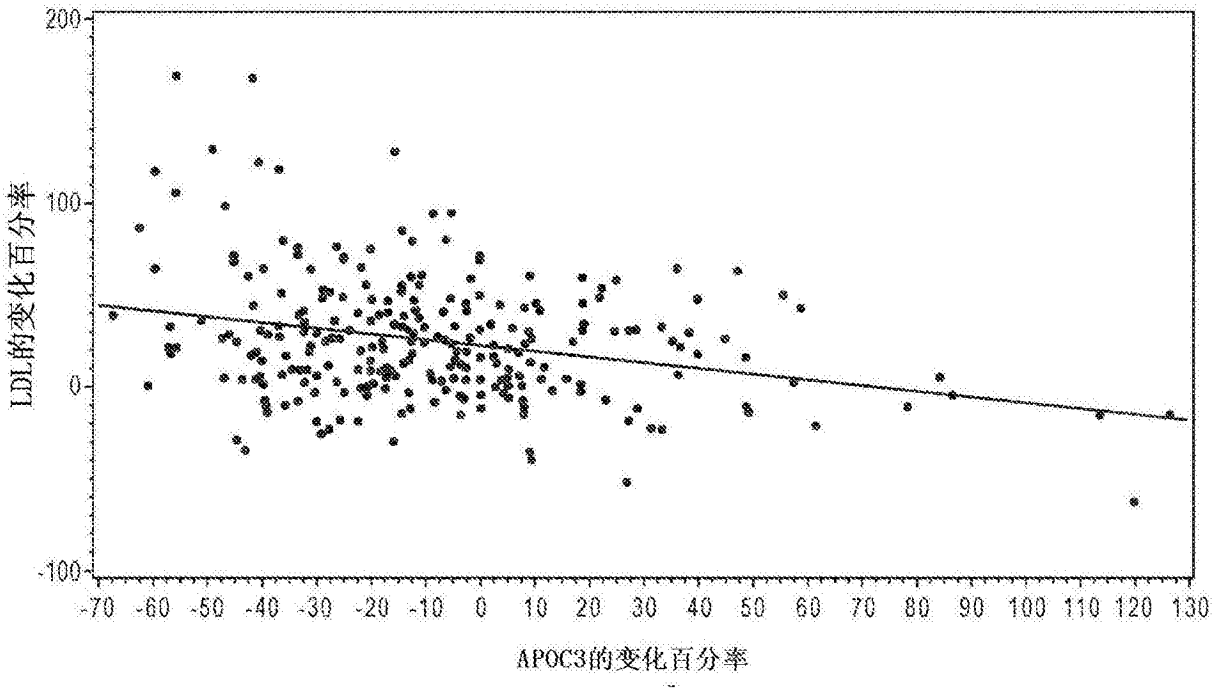

LDL的变化百分率
200
100
0
-100
-70 -60 -50 -40 -30 -20 -10 0 10 20 30 40 50 60 70 80 90 100 110 120 130
APOC3的变化百分率

图34

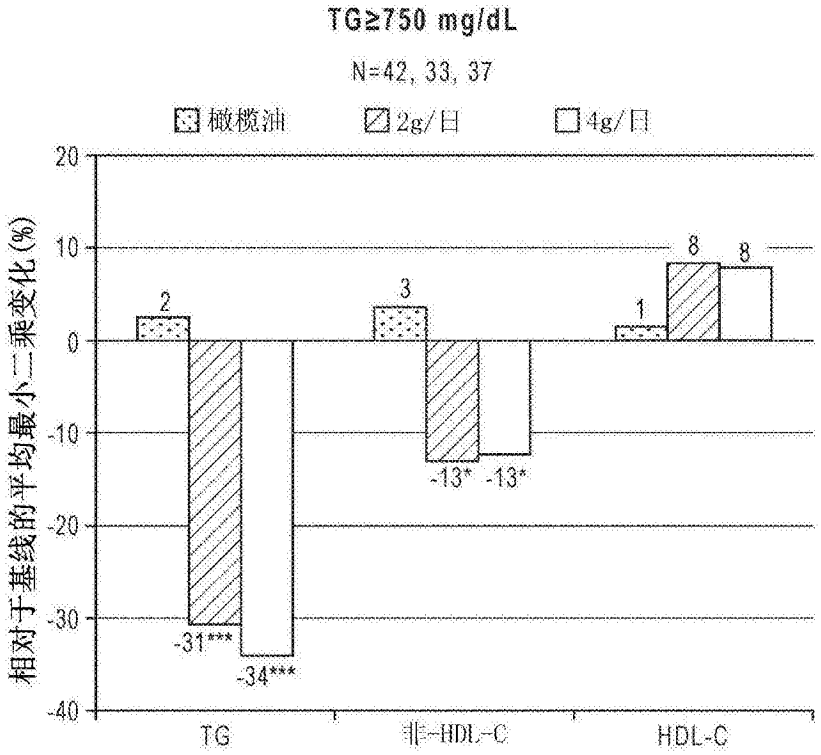

TG≥750 mg/dL
N=42, 33, 37
橄榄油
2g/日
4g/日
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
20
10
0
-10
-20
-30
-40
2
-31***
-34***
3
-13*
-13*
1
8
8
TG
非-HDL-C
HDL-C

图35

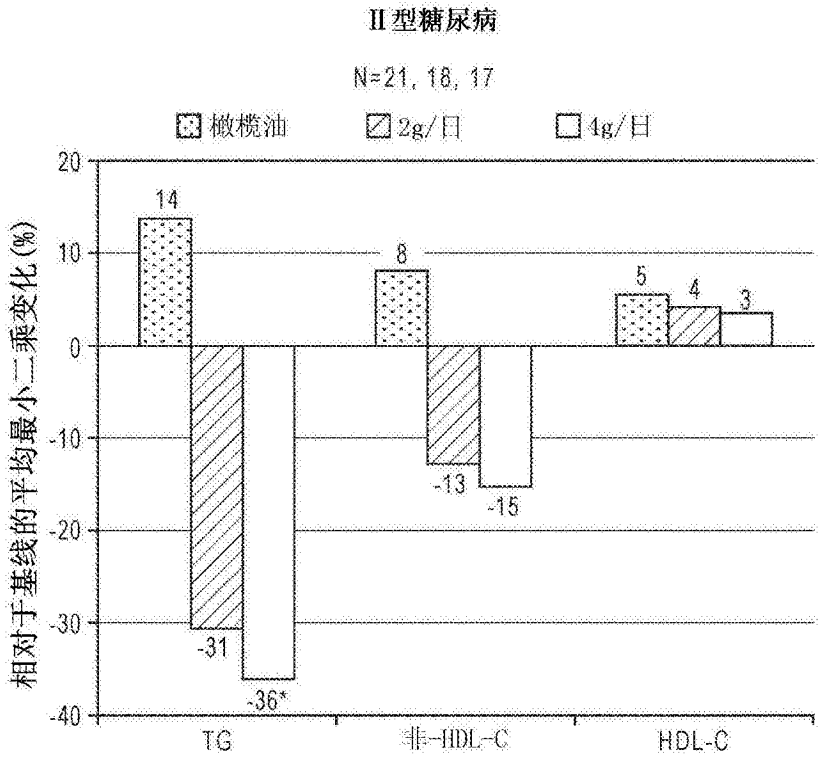

II型糖尿病
N=21, 18, 17
橄榄油
2g/日
4g/日
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
20
10
0
-10
-20
-30
-40
14
-31
-36*
8
-13
-15
5
4
3
TG
非-HDL-C
HDL-C

图36

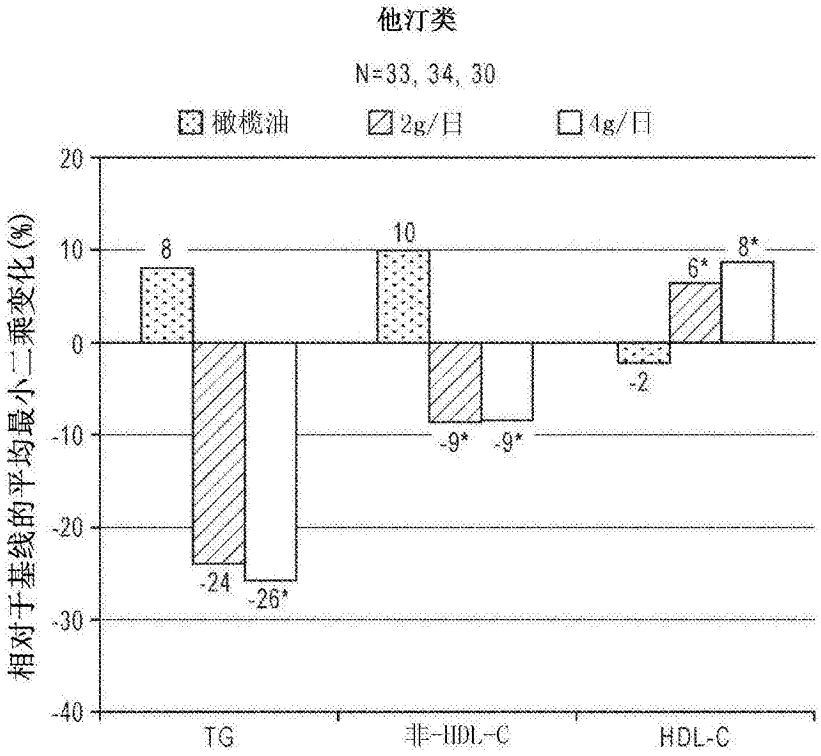

他汀类
N=33, 34, 30
橄榄油
2g/日
4g/日
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
20
10
0
-10
-20
-30
-40
8
-24
-26*
10
-9*
-9*
-2
6*
8*
TG
非-HDL-C
HDL-C

图37

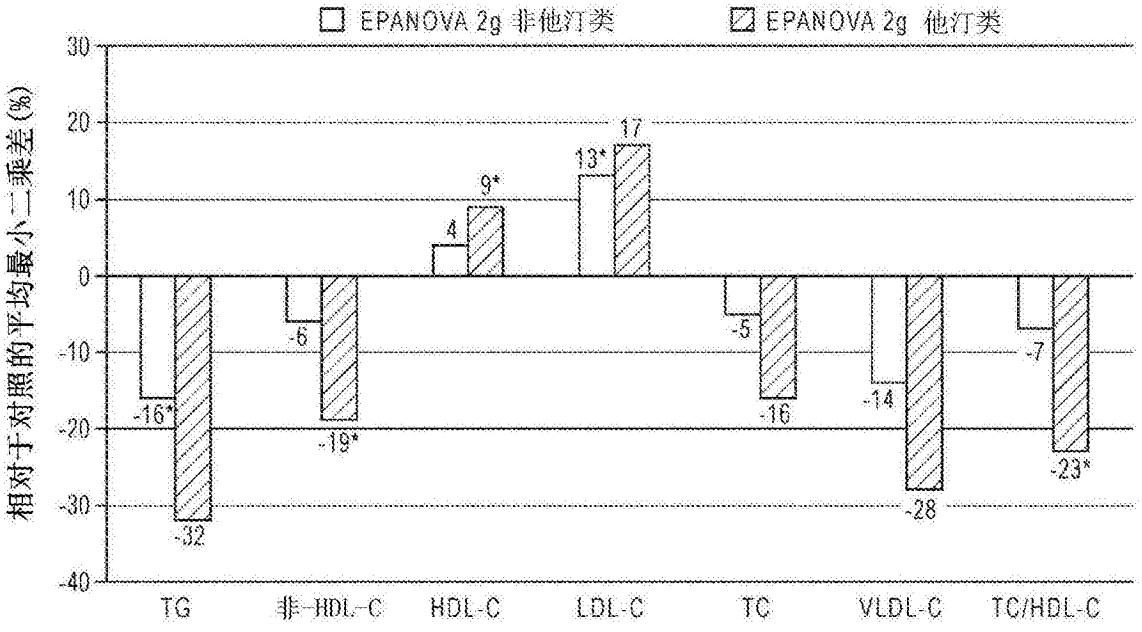

EPANOVA 2g 非他汀类
EPANOVA 2g 他汀类
相对于对照的平均最小二乘差(%)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-16*
-32
-6
-19*
4
9*
13*
17
-5
-16
-14
-28
-7
-23*
TG
非-HDL-C
HDL-C
LDL-C
TC
VLDL-C
TC/HDL-C

图38

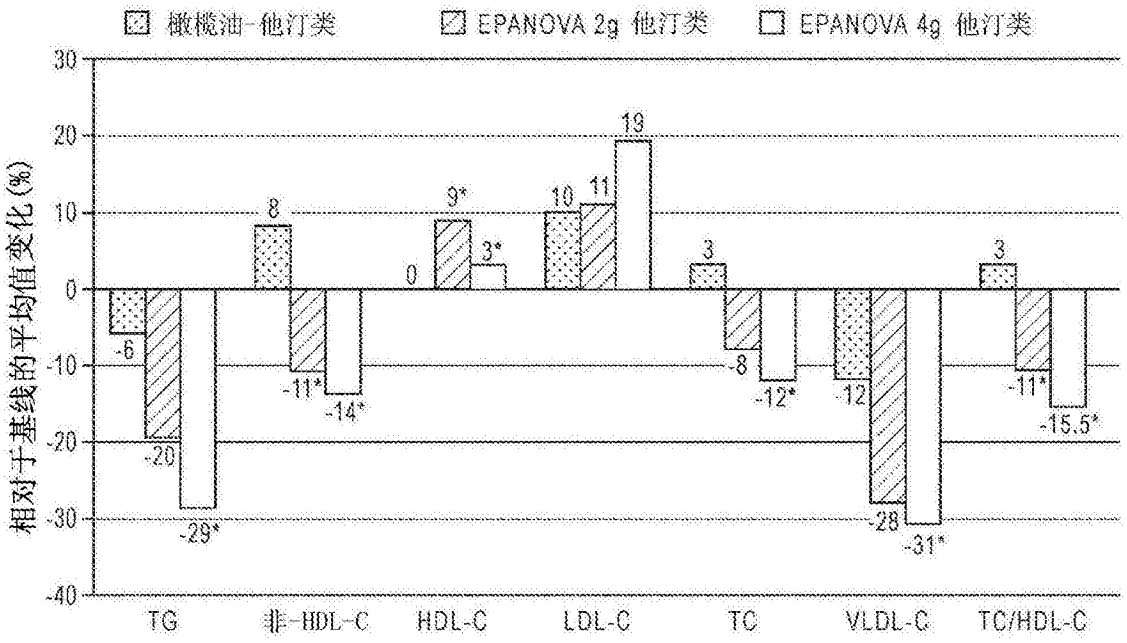

橄榄油-他汀类
EPANOVA 2g 他汀类
EPANOVA 4g 他汀类
相对于基线的平均值变化(%)
30
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-6
-20
-29*
8
-11*
-14*
0
9*
3*
10
11
19
3
-8
-12*
-12
-28
-31*
3
-11*
-15.5*
TG
非-HDL-C
HDL-C
LDL-C
TC
VLDL-C
TC/HDL-C

图39

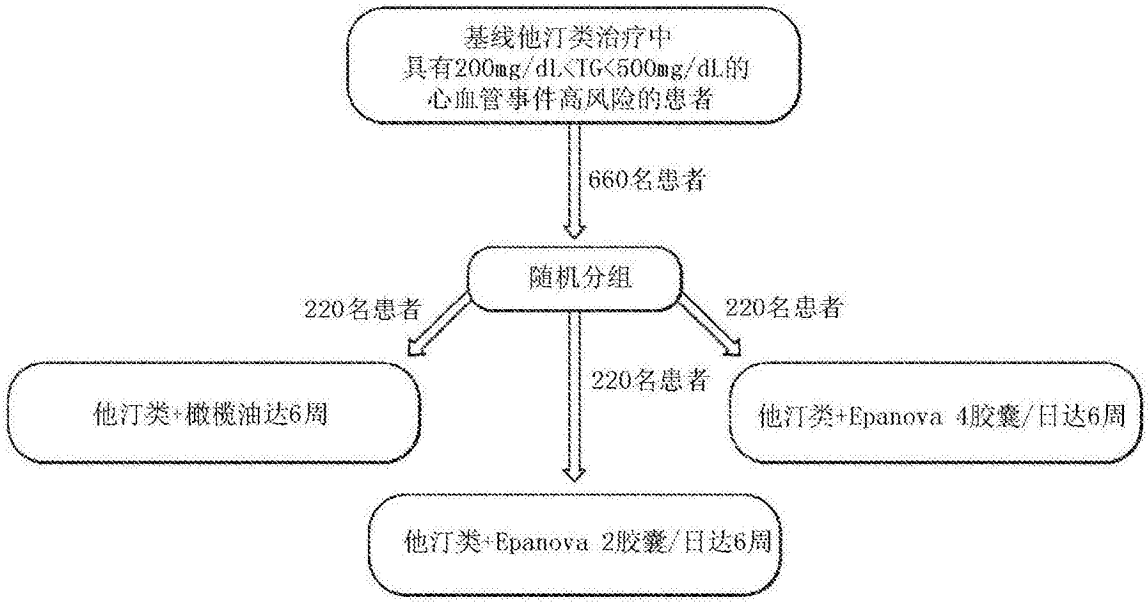

基线他汀类治疗中
具有200mg/dL<TG<500mg/dL的
心血管事件高风险的患者
660名患者
随机分组
220名患者
220名患者
220名患者
他汀类+橄榄油达6周
他汀类+Epanova 4胶囊/日达6周
他汀类+Epanova 2胶囊/日达6周

图40

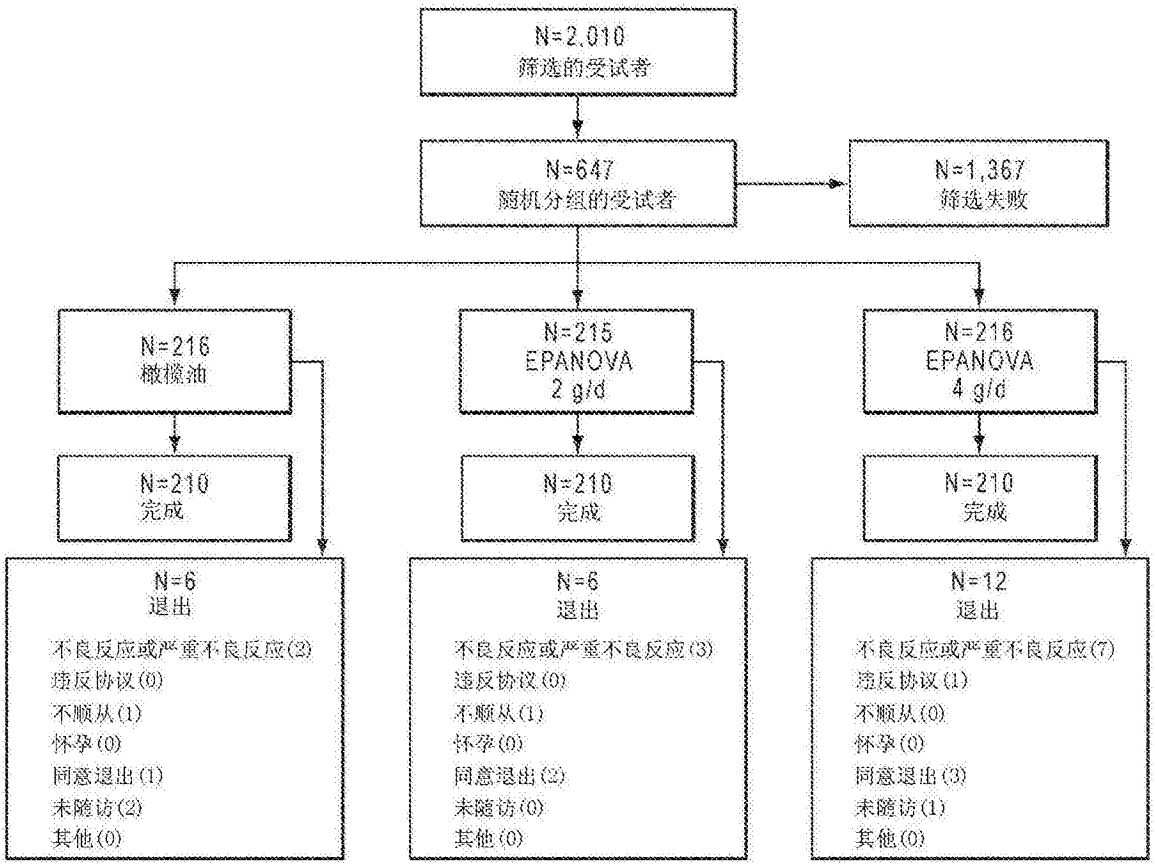

N=2,010
筛选的受试者
N=647
随机分组的受试者
N=1,367
筛选失败
N=216
橄榄油
N=215
EPANOVA
2 g/d
N=216
EPANOVA
4 g/d
N=210
完成
N=210
完成
N=210
完成
N=6
退出
不良反应或严重不良反应(2)
违反协议(0)
不顺从(1)
怀孕(0)
同意退出(1)
未随访(2)
其他(0)
N=6
退出
不良反应或严重不良反应(3)
违反协议(0)
不顺从(1)
怀孕(0)
同意退出(2)
未随访(0)
其他(0)
N=12
退出
不良反应或严重不良反应(7)
违反协议(1)
不顺从(0)
怀孕(0)
同意退出(3)
未随访(1)
其他(0)

图41

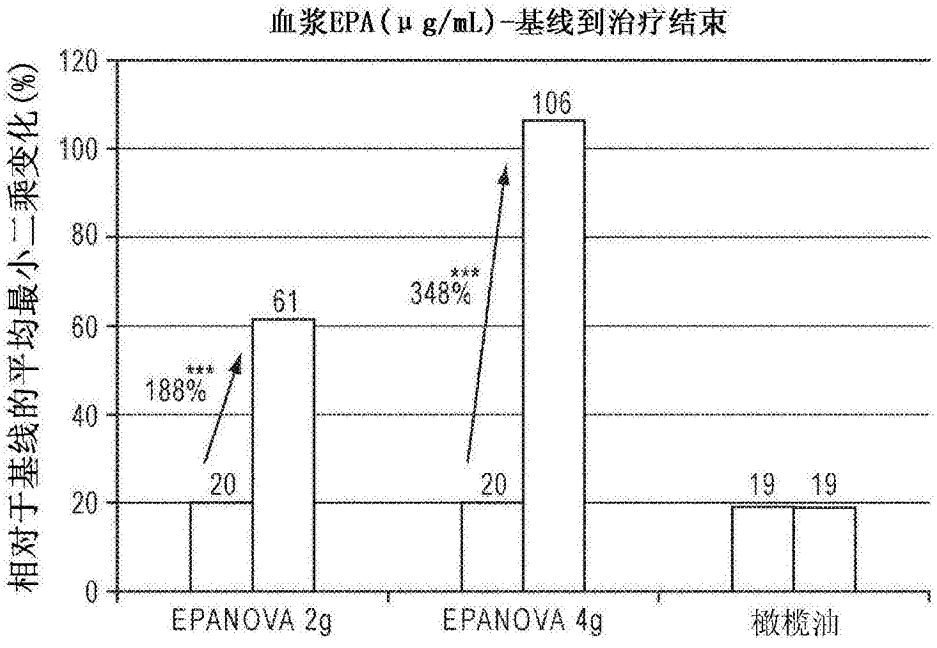

血浆EPA(μg/mL)-基线到治疗结束
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
120
100
80
60
40
20
0
188%
***
348%
***
20
61
20
106
19
19
EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
橄榄油

图42A

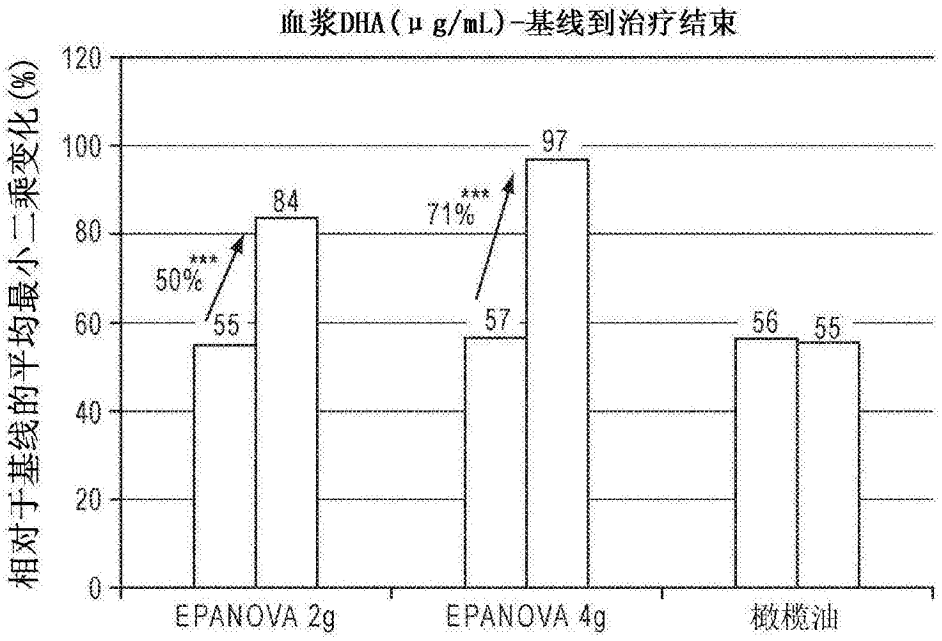

血浆DHA(μg/mL)-基线到治疗结束
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
120
100
80
60
40
20
0
50%***
71%***
55
84
57
97
56
55
EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
橄榄油

图42B

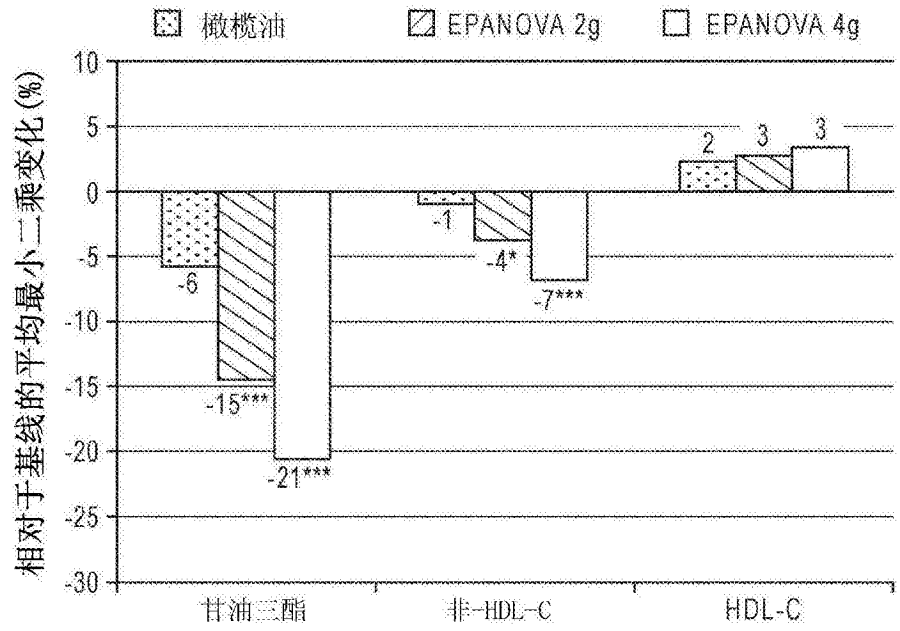

橄榄油
EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-6
-15***
-21***
-1
-4*
-7***
2
3
3
甘油三酯
非-HDL-C
HDL-C

图43

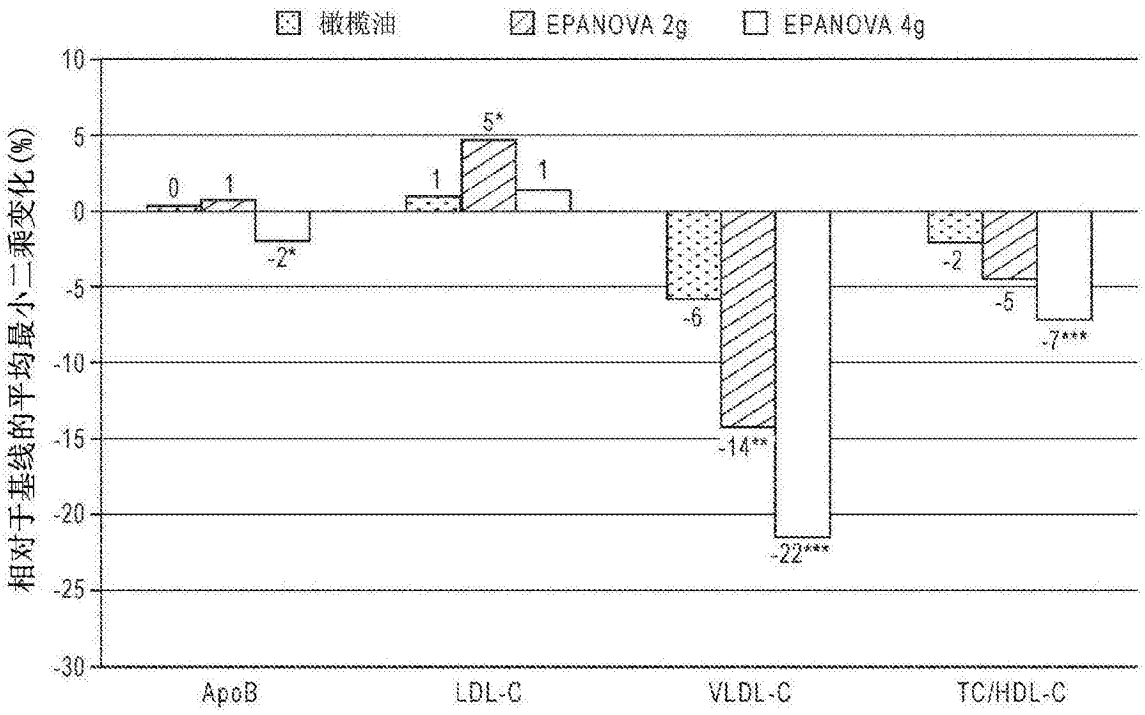

橄榄油
EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
0
1
-2*
1
5*
1
-6
-14**
-22***
-2
-5
-7***
ApoB
LDL-C
VLDL-C
TC/HDL-C

图44

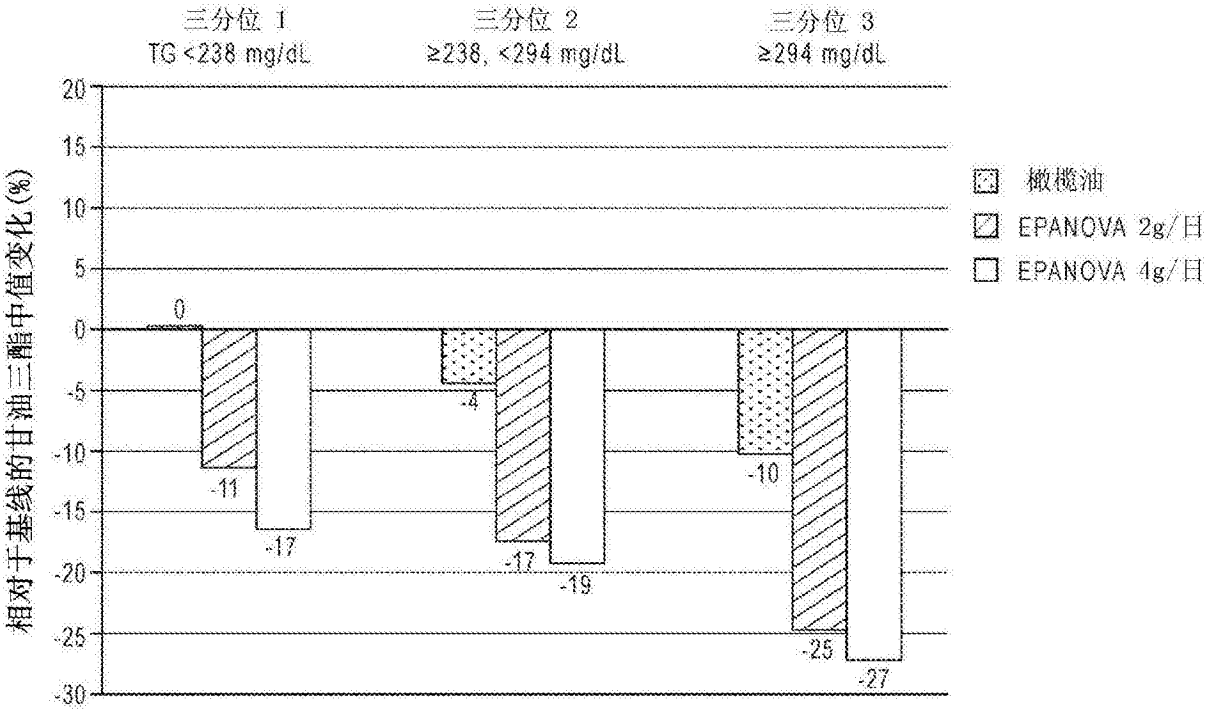

三分位 1
TG <238 mg/dL
三分位 2
≥238, <294 mg/dL
三分位 3
≥294 mg/dL
相对于基线的甘油三酯中值变化(%)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
0
-11
-17
-4
-17
-19
-10
-25
-27
橄榄油
EPANOVA 2g/日
EPANOVA 4g/日

图45

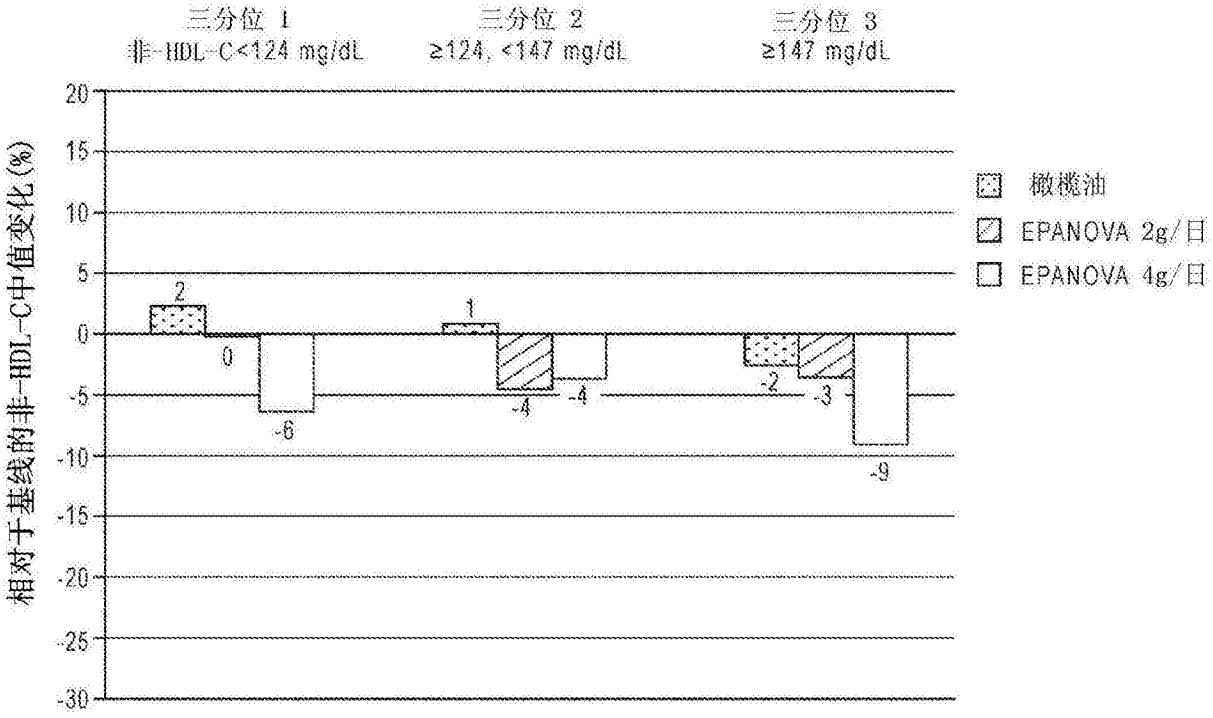

三分位 1
非-HDL-C<124 mg/dL
三分位 2
≥124, <147 mg/dL
三分位 3
≥147 mg/dL
相对于基线的非-HDL-C中值变化(%)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
2
0
-6
1
-4
-4
-2
-3
-9
橄榄油
EPANOVA 2g/日
EPANOVA 4g/日

图46

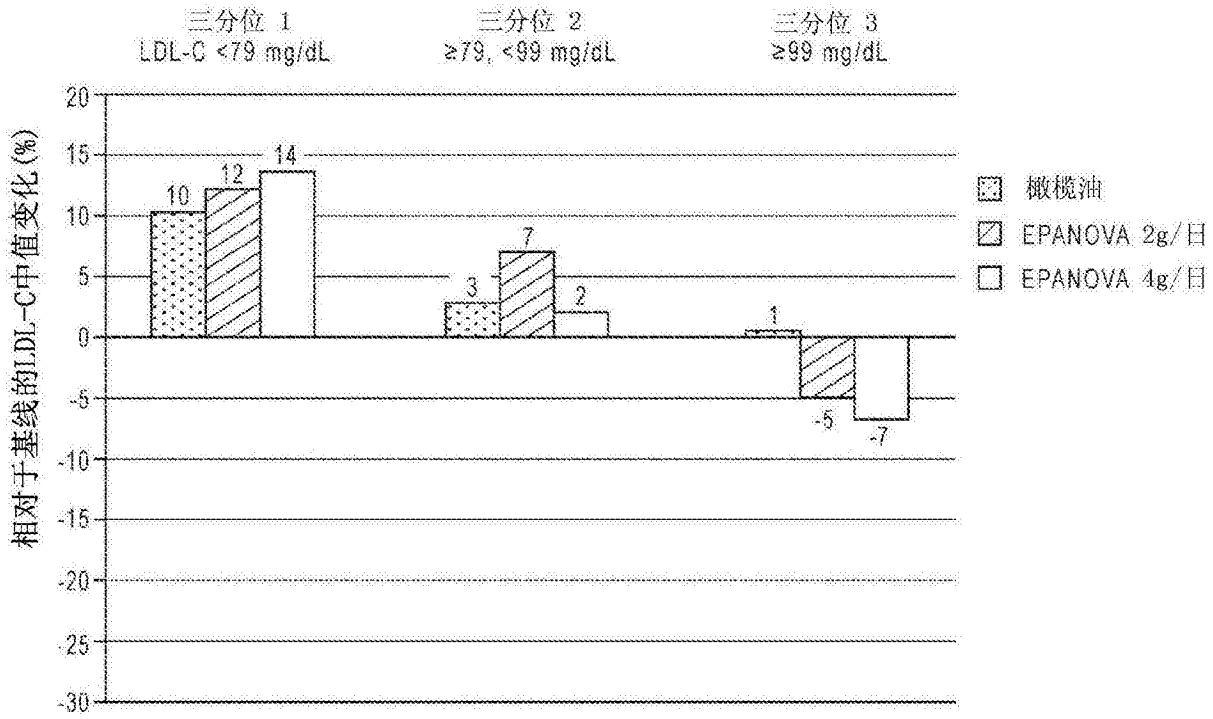

三分位 1
LDL-C <79 mg/dL
三分位 2
≥79, <99 mg/dL
三分位 3
≥99 mg/dL
相对于基线的LDL-C中值变化(%)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
10
12
14
3
7
2
1
-5
-7
橄榄油
EPANOVA 2g/日
EPANOVA 4g/日

图47

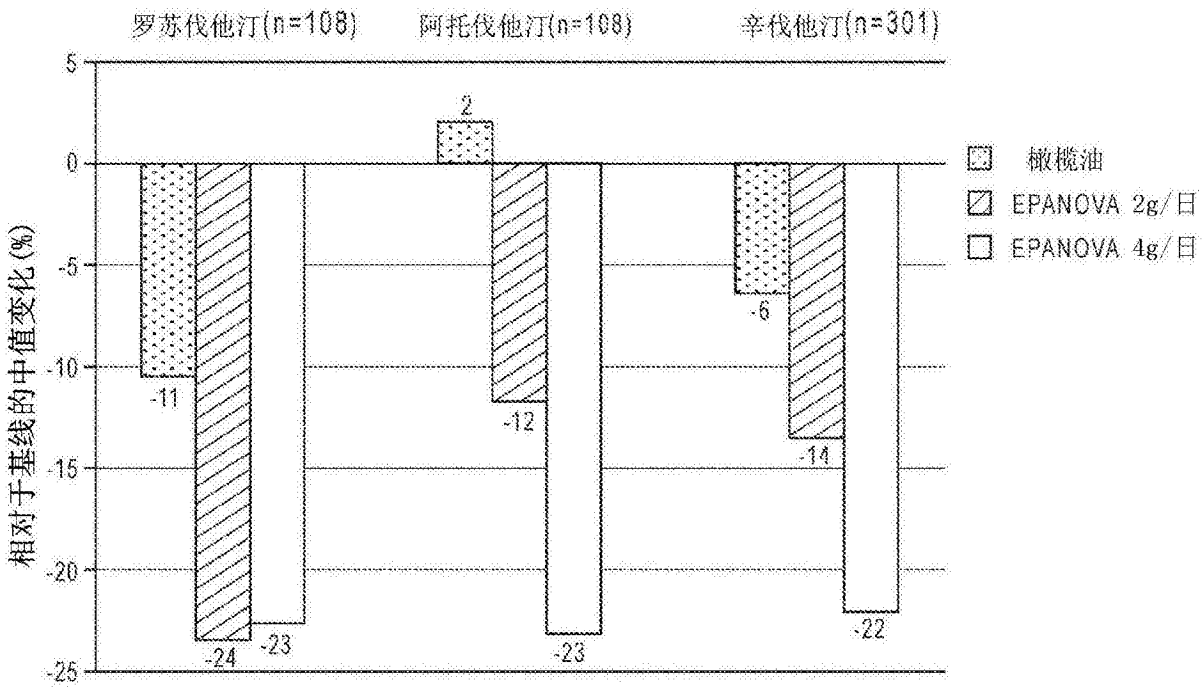

罗苏伐他汀(n=108)
阿托伐他汀(n=108)
辛伐他汀(n=301)
相对于基线的中值变化(%)
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
2
-11
-24
-23
-12
-23
-6
-14
-22
橄榄油
EPANOVA 2g/日
EPANOVA 4g/日

图48

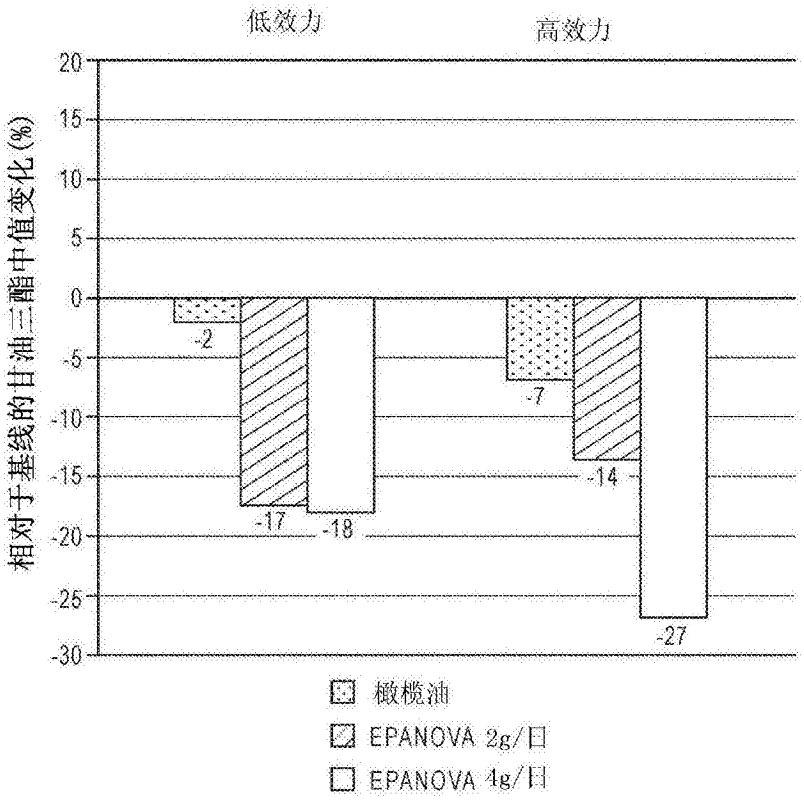

低效力
高效力
相对于基线的甘油三酯中值变化(%)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-2
-17
-18
-7
-14
-27
橄榄油
EPANOVA 2g/日
EPANOVA 4g/日

图49

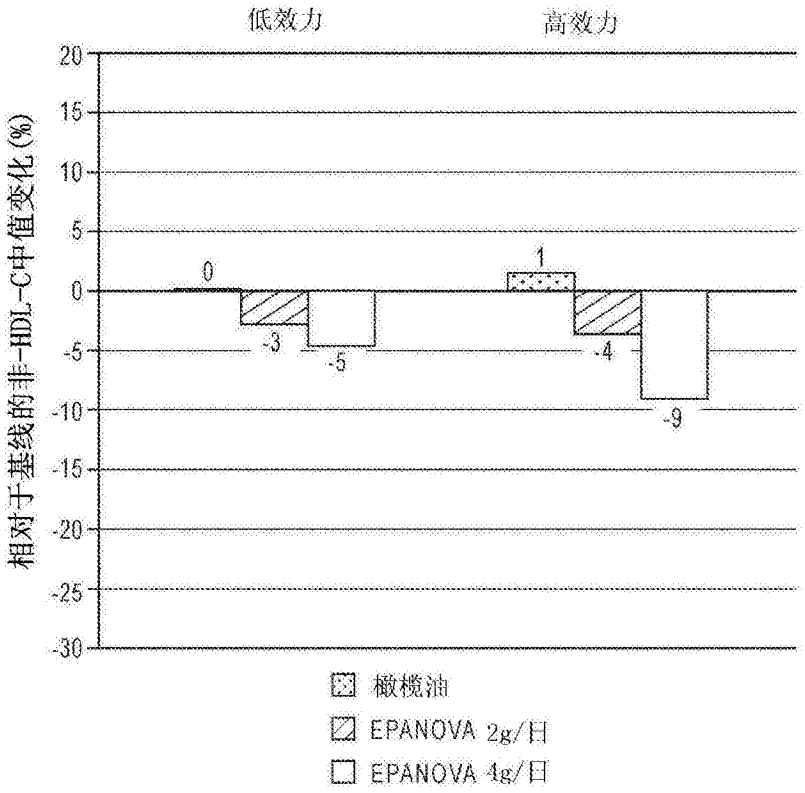

低效力
高效力
相对于基线的非-HDL-C中值变化(%)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
0
-3
-5
1
-4
-9
橄榄油
EPANOVA 2g/日
EPANOVA 4g/日

图50

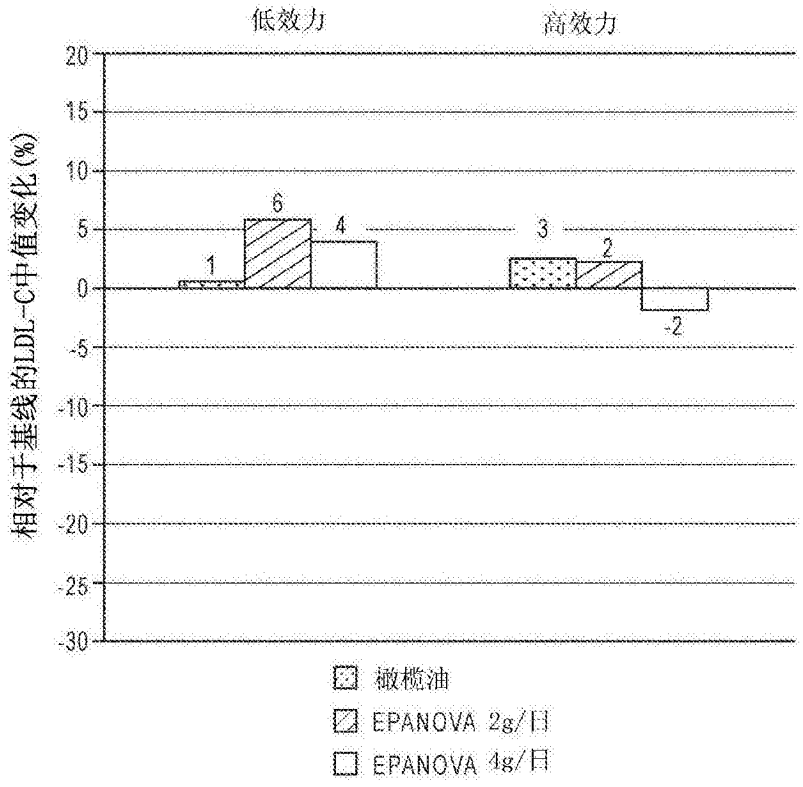

低效力
高效力
相对于基线的LDL-C中值变化(%)
20
15
10
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
1
6
4
3
2
-2
橄榄油
EPANOVA 2g/日
EPANOVA 4g/日

图51

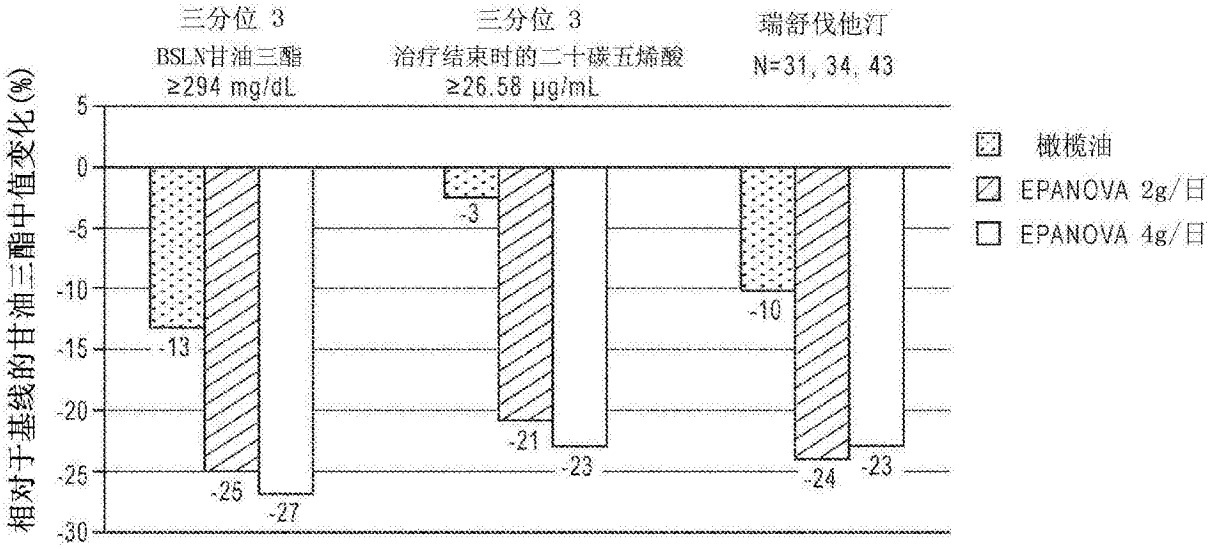

三分位 3
BSLN甘油三酯
≥294 mg/dL
三分位 3
治疗结束时的二十碳五烯酸
≥26.58 μg/mL
瑞舒伐他汀
N=31, 34, 43
相对于基线的甘油三酯中值变化(%)
5
0
-5
-10
-15
-20
-25
-30
-13
-25
-27
-3
-21
-23
-10
-24
-23
橄榄油
EPANOVA 2g/日
EPANOVA 4g/日

图52

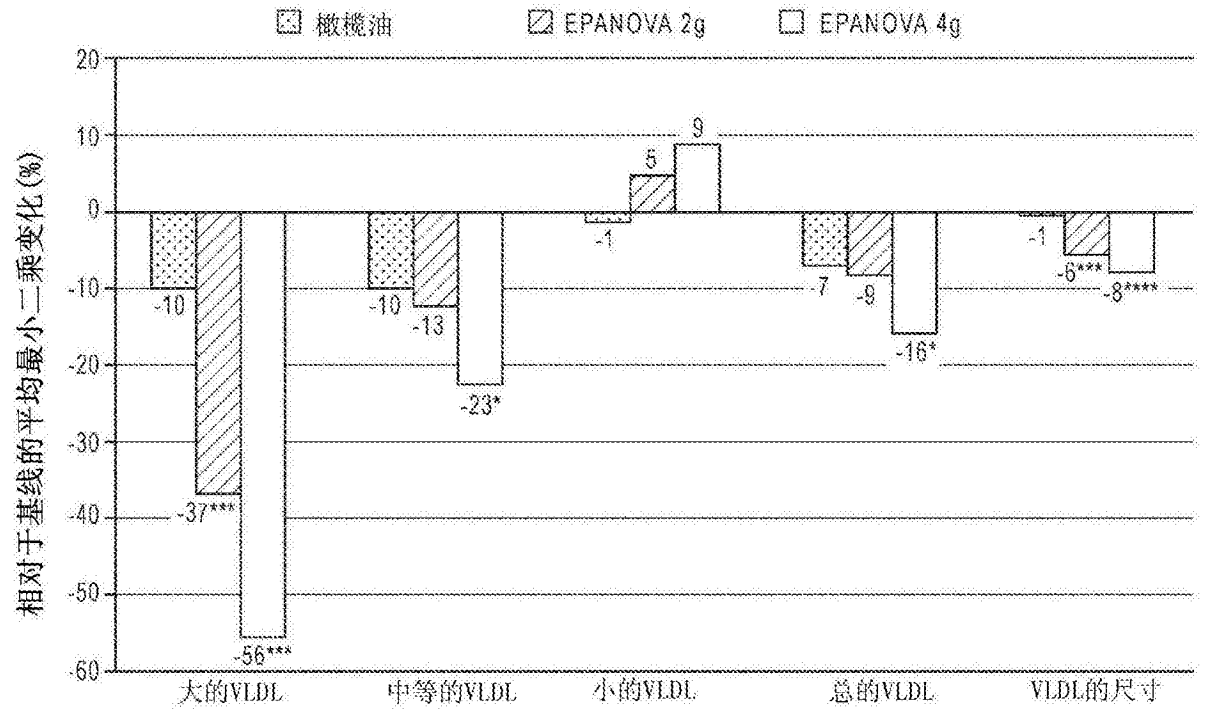

橄榄油
EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
20
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-10
-37***
-56***
-10
-13
-23*
-1
5
9
-7
-9
-16*
-1
-6***
-8****
大的VLDL
中等的VLDL
小的VLDL
总的VLDL
VLDL的尺寸

图53

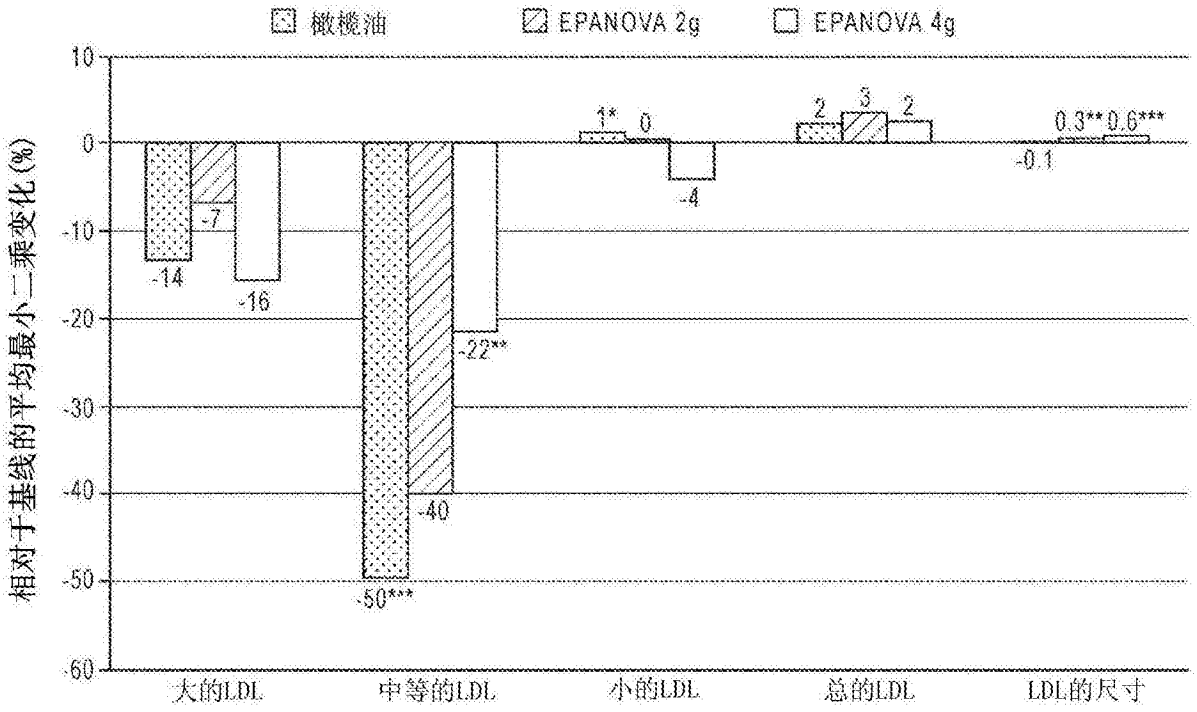

橄榄油
EPANOVA 2g
EPANOVA 4g
相对于基线的平均最小二乘变化(%)
10
0
-10
-20
-30
-40
-50
-60
-14
-7
-16
-50***
-40
-22**
1*
0
-4
2
3
2
-0.1
0.3**
0.6***
大的LDL
中等的LDL
小的LDL
总的LDL
LDL的尺寸

图54

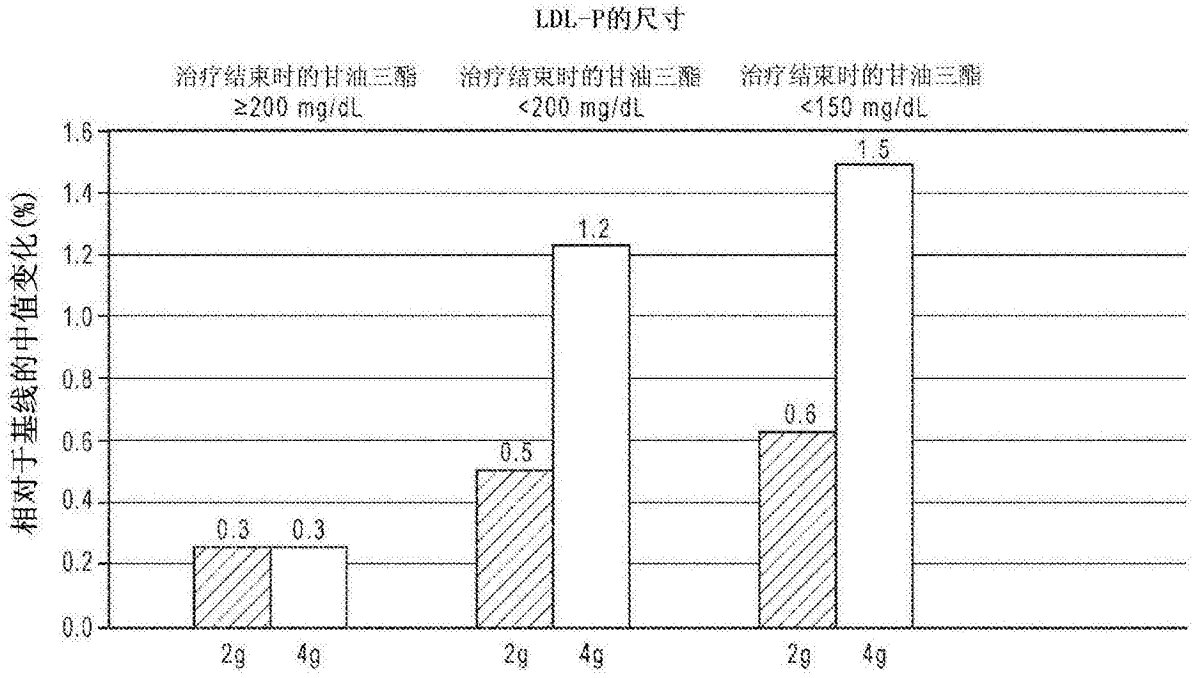
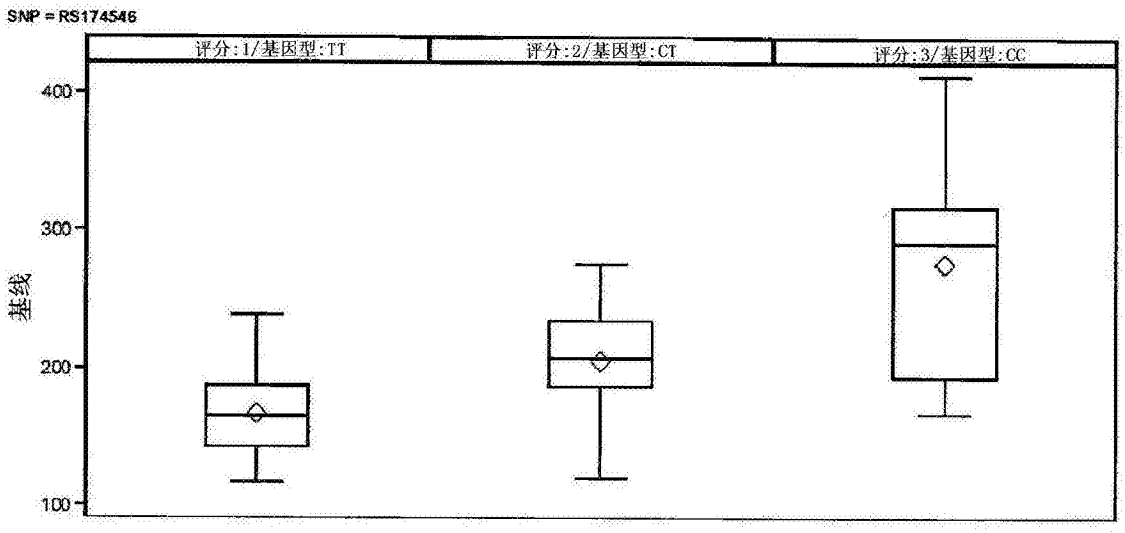

LDL-P的尺寸
治疗结束时的甘油三酯
≥200 mg/dL
治疗结束时的甘油三酯
<200 mg/dL
治疗结束时的甘油三酯
<150 mg/dL
相对于基线的中值变化(%)
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.3
0.3
0.5
1.2
0.6
1.5
2g
4g
2g
4g
2g
4g

图55

A


SNP = RS174546
评分:1/基因型:TT
评分:2/基因型:CT
评分:3/基因型:CC
400
300
200
100
基线

B

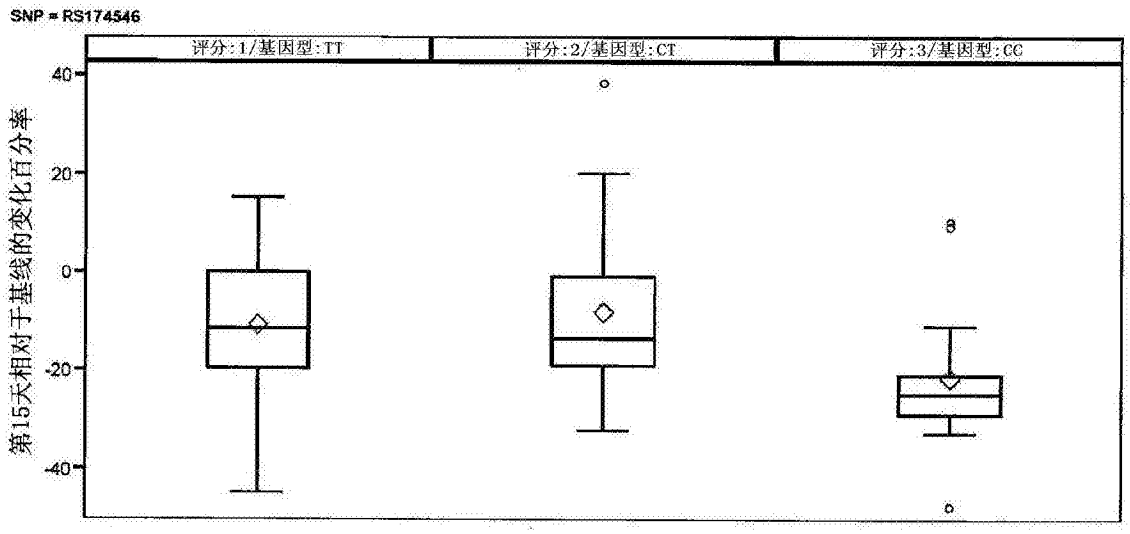

SNP = RS174546
评分:1/基因型:TT
评分:2/基因型:CT
评分:3/基因型:CC
40
20
0
-20
-40
第15天相对于基线的变化百分率

图56