

①9



Octrooiraad
Nederland

①1

193459

①2 **C OCTROOI**

②1 Aanvraag om octrooi: **8902020**

②2 Ingediend: **07.08.89**

⑤1

Int.Cl.⁷
C11C3/04, A61K31/20, A61K31/23,
C11B3/00

③0

Vorrang:
11.08.88 GB 0008819110 gedeeltelijk erkend

④3

Ter inzage gelegd:
01.03.90 I.E. 90/05

④4

Openbaargemaakt:
01.07.99 I.E. 99/07

④7

Dagtekening:
02.11.99

④5

Uitgegeven:
03.01.2000 I.E. 2000/01

⑦3

Octrooihouder(s):
Norsk Hydro a.s. te Oslo, Noorwegen (NO).

⑦4

Gemachtigde:
Mr. Drs. S.U. Ottevangers c.s. te 2508 DH Den Haag.

⑤4

Vetzuursamenstelling met omega-3-poly-onverzadigde vetzuren, werkwijze voor de bereiding ervan en farmaceutische samenstelling op basis daarvan.

Vetzuursamenstelling met omega-3 poly-onverzadigde vetzuren, werkwijze voor de bereiding ervan en farmaceutische samenstelling op basis daarvan

De onderhavige uitvinding heeft betrekking op een vetzuursamenstelling met omega-3 poly-onverzadigde
 5 vetzuren, waaronder (cis)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur (EPA) C 20:5, (cis)-4,7,10,13,16,19-docosahexaeenzuur (DHA) C 22:6 en andere omega-3 C 20, C 21 en C 22 vetzuren, desgewenst aanwezig als farmaceutisch aanvaardbare zouten of esters, op een werkwijze voor de bereiding van een dergelijke vetzuursamenstelling, alsmede daarop gebaseerde farmaceutische samenstellingen.

In de niet voorgepubliceerde Europese octrooiaanvraag 0.409.903 is, voorzover deze aanvraag een
 10 ouder recht heeft van 27 mei 1988 (Britse octrooiaanvraag 8812655.2), een werkwijze beschreven voor het bereiden van mengsels van poly-onverzadigde vetzuren en meer in het bijzonder van mengsels die (cis)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur (EPA) C 20:5, (cis)-4,7,10,13,16,19-docosahexaeenzuur (DHA) C 22:6 en andere omega-3 C 20, C 21 en C 22 vetzuren, bevatten, door uitsluitend moleculaire destillatie van visoliën. Een dergelijke methode leidt, alhoewel is vermeld dat hogere concentraties aan EPA en DHA
 15 worden verkregen dan in de genoemde stand der techniek zoals WO 87/03899, zijn toegelicht, tot gelijke of hogere concentraties van DHA ten opzichte van EPA en bovendien tot concentraties aan EPA en DHA zoals bij nawerking is gebleken, van ten hoogste ongeveer 62 gew.%, bepaald volgens de methode die is beschreven door Einig en Ackman in J. Amer. Oil Chem. Soc. 64 (4; 1987) 499–502.

Europese octrooiaanvraag 0.255.824 (overeenkomstig met WO 87/03899) beschrijft het bereiden van een
 20 geraffineerd visolieconcentraat, waarbij de bereiding van samenstellingen met 20–35 gew.% EPA en 35–50 gew.% DHA en 15–25 gew.% andere poly-onverzadigde omega-3 vetzuren is toegelicht; vermeld is dat die samenstelling als zodanig of na concentratie kan worden toegepast.

In de oudere op 30 november 1988 gepubliceerde, EP-A-0.292.846 is de therapeutische of profylaxe werking van mengsels van ethylesters van EPA en DHA en concentreringswijze uit ruwe visolie beschreven.
 25 Vermeld is dat mengsels met een gehalte hoger dan 65% aan EPA + DHA in een verhouding van 1:1,5 worden verkregen.

Gedurende de laatste drie decennia hebben antihypertensieve geneesmiddelen bijgedragen tot de vermindering van de met cardiovasculaire ziekten verband houdende morbiditeit en sterfte. Er bestaat echter toenemende bezorgdheid vanwege neveneffecten en toxiciteit behorend bij de hedendaagse
 30 antihypertensieve therapie, in het bijzonder bij de patiënt met zwakke hypertensie. Er zijn resultaten die erop wijzen, dat hoewel de heden ten dage toegepaste antihypertensieve middelen doeltreffend zijn wat betreft het verminderen van de bloeddruk, de polsfrequentie tegelijkertijd wordt verhoogd. Aldus bestaat behoefte aan een geneesmiddel met een geringer aantal nadelige werkingen voor de behandeling van hypertensie.

Gedurende het afgelopen decennium zijn talrijke publicaties verschenen, die melden dat verscheidene
 35 diëtische visoliepreparaten, die omega-3 poly-onverzadigde vetzuren bevatten, een uitwerking op serum-cholesterol en bloedplaatjesaggregatie hebben. Het voor deze uitwerkingen voorgestelde mechanisme concentreert zich vaak om het prostanoïdesysteem. Zo is er enige informatie over hoe diëtische visoliën de excretie van sommige prostaglandinemetabolieten veranderen, maar de beschikbare gegevens spreken elkaar op verschillende punten tegen.

Een vermindering van de bloeddruk werd beschreven na het nuttigen van vis, ruwe visolie (beginnend bij
 40 7% EPA en 5% DHA) of zwak geconcentreerde visoliepreparaten (typisch bevattend 18% EPA en 12% DHA), hoewel de voor deze uitwerkingen verantwoordelijke componenten nooit werden geïdentificeerd. Voorts hebben alle tot nu toe aangeboden onderzoeken één of meer ernstige tekortkomingen, zoals wordt vermeld in besprekingen van de beschikbare onderzoeken (H.R. Knapp *et al.*, Proceedings of AOCS
 45 Short Course on polyunsaturated Fatty Acids and Eicosanoids, Ed.: W.E.M. Lands, p. 41–55, American Oil Chemists Society) en (L.B. Bønaa, Tidsskr. Nor Lægeforen Nr. 28, 1987, 2425–8).

Eicosapentaeenzuur C 20:5 omega-3 (EPA) werd beschouwd als de belangrijkste van de van zeedieren afkomstige omega-3 poly-onverzadigde vetzuren, deels vanwege zijn krachtige antiaggregatiewerking onder andere vermeld in US-A-4.097.602, Silver *et al.*, dat werd ingediend in augustus 1974. Later beschreven
 50 Dyerberg *et al.* ook hetzelfde effect in (Lancet, p. 152, 21 januari 1978) en (Lancet 1978 (15 juli; 2 (8081)), p. 117–119. De hoofdrede voor de veronderstelde belangrijkheid van EPA is waarschijnlijk, dat het behoort tot de eicosanoïden die sleutelmaterialen zijn voor het prostaglandinemetabolisme.

Volgens verscheidene recente rapporten heeft EPA alleen echter geen uitwerking van betekenis op hypertensie. In "Effects of highly purified eicosapentaenoic acid to angiotensin II and norepinephrine in the
 55 rabbit" (Prostaglandins augustus 1986, Vol. 32, No. 2, blz. 179–187) werd geen verlaging van de bloeddruk bij konijnen verkregen bij gebruikmaking van sterk gezuiverd EPA met een concentratie van 90%. Terano *et al.* (Atherosclerosis, 46, 321–331 (1983)) rapporteerden dat een 75% EPA en 6,2% DHA bevattend

preparaat geen uitwerking van betekenis had op de bloeddruk bij gezonde vrijwilligers na het innemen van 3,6 g EPA-ethylester. Evenzo rapporteerden Yoshida *et al.* (Artery, 14, 295–303, 1987) dat er geen uitwerking was op de basale bloeddruk na inname van 900 mg EPA-ethylester gedurende 14 dagen of langer. Voorts had 90%’s EPA-methylester geen uitwerking op spontaan hypertensieve ratten (K. Yin *et al.*, 5 Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 15 (1988), 275–280).

In tegenstelling hiermee beschrijft de GB-A 2.197.199 een materiaal voor de bestrijding van door zwangerschap teweeggebrachte hypertensie, waarbij de in het voorbeeld gebruikte materialen een EPA-gehalte van 28–35% hadden. De patiënten hadden geen vroegere geschiedenis van hypertensie. Tijdens zwangerschap ontwikkelde hypertensie wordt geacht andere biologische oorzaken dan normale 10 hypertensie te hebben, wat schijnt te worden benadrukt door het feit, dat deze gewoonlijk verdwijnt na afloop van de zwangerschap.

Naar ons beste weten is er niets wat erop wijst, dat DHA alleen enige uitwerking heeft op de bloeddruk.

Volgens US-A-3.082.228, op basis van een op 18 december 1959 ingediende aanvraag, verlaagt een ten minste 60% poly-onverzadigde vetzuren met 20 of meer C-atomen bevattend product het bloedcholesterolgehalte in aanmerkelijke mate. Hoewel andere oudere studies aangeven, dat visoliën totaal cholesterol en LDL-cholesterol verlagen en HDL-cholesterol verhogen, kwamen latere resultaten over het algemeen tot de tegengestelde conclusie, zoals uiteengezet door W.S. Harris in niet voorgepubliceerde J. Lipid Res., 30 (6; 1989), blz. 785–807 ((n-3)-news, 3(4), 1–7). Toen hij 45 artikelen over het onderwerp had samengevat, vond hij, dat LDL-cholesterol werd verhoogd met 2–30%, al naar gelang het type hyperlipidemie.

20 Uit WO 87/02247 is een lipide-emulsie voor parenteraal gebruik bekend, bevattend een emulgator, water en een van zeedieren afkomstige olie bevattend ten minste één omega-3 vetzuur, waarbij de concentratie van het vrije vetzuur in de emulsie kleiner is dan ca. 5 meq/l, en waarbij de van zeedieren afkomstige olie ten minste 30 gew.% van een combinatie van esters van EPA en DHA bevat. Deze lipide-emulsie wordt gebruikt voor de intraveneuze behandeling van trombotische ziekte toestanden.

25 De uitvinding berust op het verrassende inzicht, dat een op economisch aantrekkelijke wijze te bereiden vetzuursamenstelling zoals hierna is omschreven, met sterk verhoogd gehalte aan EPA en DHA een verrassend verhoogde antihypertensieve werking heeft.

De uitvinding betreft derhalve een vetzuursamenstelling omvattende omega-3 poly-onverzadigde vetzuren, waaronder (cis)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur (EPA) C 20:5, (cis)-4,7,10,13,16,19-docosahexaeenzuur (DHA) C 22:6 en andere omega-3 C 20, C 21 en C 22 vetzuren, desgewenst aanwezig als farmaceutisch aanvaardbare zouten of esters, welke gekenmerkt wordt doordat de vetzuursamenstelling ten minste 80 gew.% van de genoemde omega-3 poly-onverzadigde vetzuren bevat, (cis)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur (EPA) C 20:5 en (cis)-4,7,10,13,16,19-docosahexaeenzuur (DHA) C 22:6 aanwezig zijn in relatieve hoeveelheden van 1:(0,5–1) en ten minste 75 gew.% van de vetzuursamenstelling vormen, 30 waarbij de andere omega-3 C 20, C 21 en C 22 vetzuren ten minste 4,5 gew.% van de totale hoeveelheid vetzuren uitmaken.

De vetzuursamenstelling wordt bepaald volgens J. Amer. Oil Chem. Soc. 64 (4; 1987), 499–502 en kan niet verkregen zijn onder toepassing van een werkwijze die alleen gebaseerd is op moleculaire destillatie als methode voor het concentreren.

40 Volgens de uitvinding is het essentieel dat de hoeveelheden voldoen aan de aangegeven waarden, waarbij de bereiding bij voorkeur dient te geschieden op de methode als beschreven in de werkwijze conclusie, zoals hierna nader is omschreven.

Vetzuurmengsels volgens de uitvinding hebben naast de antihypertensieve werking bovendien een verrassend gunstige uitwerking op alle bovengenoemde andere risicofactoren voor cardiovasculaire ziekten, 45 maar in het bijzonder een goede uitwerking op zwakke hypertensie, hypertriglyceridemie en op de werking van het coagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplex. Zij verlagen de spiegels van serum-LDL-cholesterol, verhogen die van serum-HDL-cholesterol, verlagen die van serum-triglyceriden, zij verminderen de systolische en diastolische bloeddruk en de polsfrequentie en verzwakken de activiteit van het bloedcoagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplex.

50 Eén voordeel van de mengsels volgens de onderhavige uitvinding is, dat zij zeer goed worden verdragen zonder aanleiding te geven tot enige ernstige neveneffecten.

Een bijzondere voorkeur genietend mengsels volgens de onderhavige aanvraag bevat ten minste 90 gew.% poly-onverzadigde omega-3 vetzuren met een lange keten, waarvan EPA en DHA ten minste 85 gew.% van de totale vetzuren vormen en aanwezig zijn in een gewichtsverhouding van EPA:DHA van in het 55 bijzonder 3:2.

Om EPA en DHA te isoleren uit een mengsel met grote concentratie volgens de onderhavige uitvinding, werd een speciale methode ontwikkeld voor de zuivering en isolering van de vetzuren met lange keten uit

natuurlijke visoliën. De samenstelling in gew.% berustte op de analyse met ethylesters, zoals beschreven in J. Amer. Oil Chem. Soc. 64 (4; 1987), 499–502 hoewel andere derivaten of zouten van de zuren zelf onderdeel van de onderhavige uitvinding vormen.

Het mengsel volgens deze uitvinding wordt bij voorkeur bereid volgens de volgende methode. Om te
5 beginnen wordt de van zeedieren afkomstige olie (visolie) als grondstof veresterd en geconcentreerd via ureumfractionering, waarbij de omstandigheden voldoende mild zijn om ontleding van de producten te vermijden. De tweede trap is een moleculaire destillatie.

Bij de fractionering wordt in principe aanvankelijk het merendeel van de esters met een kleinere ketenlengte dan C 20 verwijderd. Daarna wordt een hoofdfractie verwijderd, die in hoofdzaak bestaat uit
10 esters van de C 20 en C 22 zuren. Daar de ureumfractionering de verzadigde en minder onverzadigde esters verwijderd, bevat deze fractie een grote concentratie aan EPA en DHA. De totale hoeveelheid van de omega-3 zuren met een lange keten wordt ten minste 80 gew.% met een samenstelling zoals in conclusies is omschreven. Voorkeur genietende mengsels volgens de onderhavige uitvinding bevatten ten minste 95 gew.% omega-3 vetzuren met een ketenlengte van ten minste C 20, waarbij het gehalte aan EPA + DHA
15 ten minste 90 gew.% van de totale vetzuren bedraagt.

Andere omega-3 zuren uit de C 20, C 21 en C 22 reeks zijn aanwezig in een hoeveelheid van ten minste 4,5 gew.%. Aldus is het speciale omega-3-all-Z-6,9,12,15,18-heneicosapentaeenzuur C 21:5 met een oneven aantal normaliter aanwezig in concentraties van ten minste 1,5 gew.% en omega-3-all-Z-7,10,13, 16,19-docosapentaeenzuur normaliter in concentraties van 3,0 gew.%.

20 Na het verwijderen van het ureumneerslag wordt het gebruikte oplosmiddel, normaliter ethanol, gedeeltelijk of volledig verwijderd door verdamping en de aldus geïsoleerde esters kunnen worden gezuiverd door uitwassen met water of een zwak alkalische waterige oplossing, wil men de zuivere esters zonder verontreiniging met de zuren isoleren.

De vrije zuren kunnen worden bereid volgens bekende hydrolyseprocessen.

25 De werkwijze verschaft tevens de mogelijkheid gebruik te maken van moleculaire destillatie, superkritische vloeistofextractie met CO₂ en/of chromatografie in de tweede trap.

De ureumfractionering en de daaropvolgende moleculaire destillatie worden uitgevoerd onder milde omstandigheden teneinde oxidatie en/of isomerisatie van de zeer onstabiele omega-3 zuren te vermijden. Zoals blijkt uit de onderstaande tabel 1, die de analyse van een volgens deze werkwijze verkregen product
30 vermeldt, was niet meer dan 1% aan onbekende componenten aanwezig in het gezuiverde product. Er is echter een zekere hoeveelheid aanwezig van o.a. C 16 en C 18 zuren, zoals zal blijken uit de in tabel 1 vermelde gedetailleerde analyse.

Voor het merendeel bestaan deze producten uit de gecombineerde som van de fractie van vetzuuresters die natuurlijk voorkomen in visoliën maar de concentratie van iedere afzonderlijke ester in het gerede
35 product is kleiner dan 0,2%, afgezien van het omega-3 octadecatetraeenzuur C 18:4 n-3, dat aanwezig is in ongeveer dezelfde hoeveelheid als in het uitgangsmateriaal.

Aldus zal het duidelijk zijn, dat de totale concentratie aan van het proces afkomstige bijproducten zeer klein is.

In de natuur zijn de relatieve gehalten aan EPA en DHA en ook van de andere omega-3 zuren met een
40 lange keten afhankelijk van het soort zeedier en er zijn ook seizoensvariaties binnen hetzelfde soort. De olie uit "menhaden" (de haringsoort Brevoortia tyrannus) bevat typisch 14–19% EPA en 5–8% DHA. Onze analyse van een partij levertraan gaf als resultaat een gehalte van 6,9% EPA en 8,4% DHA. Voor lodde varieerden de EPA-waarden van 8,6% tot 11,4% van januari 1973 tot augustus 1973, terwijl de DHA-waarden varieerden van 6,7% tot 11% gedurende dezelfde periode. Voor voor de Noorse kust gevangen
45 haring was het gehalte in oktober 1974 6,4% EPA en 9,8% DHA, terwijl vangsten in november 1975 een vermindering tot 1,7% resp. 1,1% te zien gaven.

Deze variaties betekenen, dat diëtische inname van visoliën of vis alleen niet zorgt voor een constante toevoer van omega-3 zuren. Zelfs al wordt de kwaliteit van de C 20, C 21 en C 22 omega-3 zuren niet of misschien slechts matig verbeterd gedurende het proces, dan blijven zij ten minste in hun oorspronkelijke
50 verhoudingen behouden.

In tabel 1 illustreert de linkerkolom de typische variaties in de gehalten van individuele zuren met een lange keten in de mengsels volgens deze uitvinding, terwijl de rechterkolom de exacte analyse van het bij de bestudering van de biologische uitwerkingen, waarvan de resultaten worden vermeld in de onderstaande tabellen 2–6, gebruikte proefmonsters weergeeft.

TABEL 1

	Typische product- variatie	Proefmonster
5		
C 20:4	1–2 gew.%	1,4 gew.%
C 20:5	40–60 gew.%	54 gew.%
C 21:5	1–4 gew.%	1,5 gew.%
C 22:5	1–3 gew.%	2 gew.%
10 C 22:6	25–45 gew.%	32,6 gew.%
lagere zuren	3–8,5 gew.%	7,5 gew.%
onbekend	1 gew.%	1 gew.%
som omega-3 poly-onverzadigde FA	≥ 80 gew.%	90,1 gew.%
som EPA + DHA	≥ 75 gew.%	86,6 gew.%
15 EPA : DHA gew.dln	1 : (0,5–1)	3,3 : 2

Biologische uitwerking

20 Ter beoordeling van de uitwerking van een mengsel volgens de onderhavige uitvinding op bloeddruk, polsfrequentie, triglyceridespiegels, serumcholesterol en serum-HDL-cholesterol, bloedplaatjesaggregatie en activiteit van het coagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplex werd de gehele bevolking in de leeftijd van 34 tot 60 jaar van een kleine Noorse stad uitgenodigd voor een gezondheidscontrole en van deze werden 22.000 personen onderzocht, waarbij de volgende criteria werden gehanteerd:

- onbehandelde matige hypertensie met een diastolische bloeddruk (DBP) van 89–111 mm Hg en een
- 25 systolische bloeddruk (SBP) van 110–180 mm Hg,
- geen eerdere hartaandoening en geen gebruik van hartgeneesmiddelen,
- geen ernstige ziekten,
- geen extreme zwaarlijvigheid,
- geen alcoholisme,
- 30 – een serumcholesterolspiegel van ten minste 6,9 mmol/l.

De volgens deze criteria gekozen groep vrijwilligers telde 172 personen. De vrijwilligers werden onderzocht gedurende een aanloopperiode van 6 maanden om te zorgen voor stabilisering van de bloeddruk voordat het proefmateriaal werd toegediend.

35 Alle bloeddrukmetingen werden uitgevoerd met een automatisch instrument (Dinamap) en bij iedere gelegenheid werden drie metingen (met tussenpozen van 2 minuten) uitgevoerd, waarbij de proefpersoon zat en stond onder beheerste omstandigheden. Het gemiddelde van de laatste twee metingen bij zitten en staan werd gebruikt.

40 Het onderzoek was een beheerst dubbel-blind onderzoek. De 172 vrijwilligers werden willekeurig verdeeld in twee groepen van gelijke grootte. De ene groep werd behandeld met placebo-capsules van maïsolie, ieder met 1 g maïsolie waaraan 0,3% vitamine E was toegevoegd. De andere groep ontving capsules die 1 g van het proefmateriaal bevatten, waarvan de samenstelling wordt vermeld in tabel 1. In beide gevallen waren de capsules vervaardigd van gekleurde zachte gelatine om te zorgen voor het blind-effect. De vrijwilligers werd gevraagd tweemaal daags 3 capsules te nemen ofwel van het proefmateriaal ofwel van het vergelijkingsmateriaal gedurende 11–12 weken. 171 vrijwilligers voltooiden het

45 onderzoek en gemiddeld werd ca. 90% van de capsules ingenomen.

50 Zoals moge blijken uit de navolgende tabellen 2 en 3 had maïsolie geen uitwerking van statistische betekenis op de bloeddruk. De uitwerking van het proefmateriaal op de bloeddruk werd eerst bepaald bij de gehele groep die het proefmateriaal gebruikte en vervolgens bij die individuen met hogere bloeddrukken. De gemiddelde bloeddrukken van de patiënten met hogere bloeddruk bij het begin en het eind van de behandeling met het actieve proefmateriaal volgens deze uitvinding, worden vermeld in tabel 2 (diastolische bloeddruk) en tabel 3 (systolische bloeddruk).

TABEL 2
Uitwerking van het proefmateriaal en maïsolie op de diastolische bloeddruk (DBP)

5	DBP-gebied	Aantal patiënten	Gemiddelde DBP vóór behandeling (mm Hg)	Gemiddelde DBP na behandeling (mm Hg)	Gemiddelde vermindering van de DBP (mm Hg)	Significantie
10	Proefmateriaal:					
	85–109	62	95,8	93,4	2,4	p<0,05
	98–109	22	102	96,2	5,8	p<0,01
	Maïsolie:					
	85–109	57	95,7	96,0	0	n.s.
15	98–109	26	101,8	100,7	1,1	n.s.

n.s. betekent "niet significant".

TABEL 3
Uitwerking van het proefmateriaal en maïsolie op de systolische bloeddruk (SBP)

20	SBP van patiënten (mm Hg)	Aantal patiënten	Gemiddelde SBP vóór behandeling (mm Hg)	Gemiddelde SBP na behandeling (mm Hg)	Gemiddelde vermindering van de SBP (mm Hg)	Significantie
25	Proefmateriaal:					
	>135	71	148,1	144,5	3,6	p<0,05
30	>150	24	158,4	150,3	8,1	p<0,001
	>155	15	162,2	152,4	9,8	p<0,001
	Maïsolie:					
	>135	62	148,5	149,6	0	n.s.
	>150	23	159,1	158,0	1,1	n.s.
35	>155	17	161,8	159,6	2,2	n.s.

40 Zoals blijkt uit de bovenstaande tabellen had het proefmateriaal een zeer aanmerkelijke hypotensieve uitwerking zowel op de systolische als de diastolische bloeddruk. Het is ook duidelijk, dat de uitwerking het sterkst is bij die patiënten die de hoogste bloeddruk hadden. Een significant effect werd niet verkregen bij de maïsoliegroep.

TABEL 4
Uitwerking van het proefmateriaal en maïsolie op de systolische en diastolische bloeddruk bij een diëtische consumptie van vis (3–5 maaltijden per week)

45	Maaltijden per week	Aantal patiënten	Gemiddelde BP vóór behandeling (mm Hg)	Gemiddelde BP na behandeling (mm Hg)	Gemiddelde vermindering van de BP (mm Hg)	Significantie
50	Proefmateriaal:					
	0–2	44	SBP 145,3	139,3	–6,9	p=0,005
			DBP 99,8	94,0	–5,7	p=0,0001
	3–5	34	SBP 143,6	141,2	–2,4	p=0,2
55			DPB 97,7	96,3	–1,4	p=0,2
	Maïsolie:					

TABEL 4

Uitwerking van het proefmateriaal en maïsolie op de systolische en diastolische bloeddruk bij een diëtische consumptie van vis (3–5 maaltijden per week) (vervolg)

5	Maaltijden per week	Aantal patiënten	Gemiddelde BP vóór behandeling (mm Hg)	Gemiddelde BP na behandeling (mm Hg)	Gemiddelde vermindering van de BP (mm Hg)	Significantie
10	0–2	34	SBP 145,2 DBP 98,3	146,8 100,2	+1,6 +1,9	p=0,4 p=0,1
	3–5	44	SBP 142,3 DPB 97,4	143,4 97,9	+1,1 +0,5	p=0,5 p=0,7

15 Zoals blijkt uit tabel 4 wordt een goede hypotensieve uitwerking bereikt met het mengsel volgens de onderhavige uitvinding, verrassenderwijs zelfs bij de groep met een grote diëtische visconsumptie van 3–5 maaltijden per week. In vergelijking hiermee werd geen gunstige uitwerking bereikt met maïsolie.

20 De bovenstaande vermelde resultaten geven aan, dat een mengsel volgens de onderhavige uitvinding een verrassend veel betere werking heeft dan de diëtische consumptie van vis (of zwak geconcentreerde, van zeedieren afkomstige olie) zou doen verwachten.

In vergelijking met de in de eerder uitgevoerde onderzoeken met een diëtische consumptie van visolie bij de testresultaten, laten de met een mengsel volgens de onderhavige uitvinding bereikte resultaten een verrassende verbetering zien wat betreft de uitwerking op de diastolische en systolische bloeddruk van iets 25 hypertensieve patiënten respectievelijk de sterker hypertensieve patiënt, en wel van ca. 30% en 45%.

TABEL 5

Uitwerking van proefmateriaal en maïsolie op de polsfrequentie (per minuut)

30	Groep	Vóór	Na	Verandering	Significantie
	Proefmateriaal:				
	zittend	75,4	73,2	–2,2	p<0,02
	staand	82,9	80,2	–2,7	p<0,005
35	Maïsolie:				
	zittend	74,3	75,1	+0,8	p=0,3
	staand	80,9	82,2	+1,3	p=0,2

40 Het onderzoek van de polsfrequentie omvatte 78 personen in de het proefmateriaal ontvangende groep en 77 personen in de andere groep.

Zoals blijkt uit de bovenstaande tabel werd een significante verlaging van de polsfrequentie verkregen met het proefmateriaal volgens de onderhavige uitvinding en een zwakke, niet significante verhoging van de polsfrequentie met maïsolie.

45

TABEL 6

Uitwerking van proefmateriaal en maïsolie op serumcholesterol (mmol/l)

50	Groep	Vóór	Na	
		Totaal cholesterol	HDL-cholesterol	Totaal cholesterol HDL-cholesterol
	Alle patiënten:			
55	Proefmateriaal (n=78):	6,58	1,35	6,57 1,41**
	Maïsolie (n=78):	6,68	1,33	6,64 1,41**

TABEL 6
Uitwerking van proefmateriaal en maïsolie op serumcholesterol (mmol/l) (vervolg)

5	Groep	Vóór		Na	
		Totaal cholesterol	HDL-cholesterol	Totaal cholesterol	HDL-cholesterol
10	Alle patiënten:				
	Totaal cholesterol 7:				
	Proefmateriaal (n=26):	7,74	1,53	7,31**	1,58*
	Maïsolie (n=20):	7,66	1,26	7,45*	1,32*

* p < 0,1

15 ** p < 0,01

20 Zoals blijkt uit tabel 6 verlaagt het proefmateriaal volgens de onderhavige uitvinding de totale serumcholesterol in aanmerkelijke mate bij patiënten met een totale cholesterolspiegel groter dan 7,0 mmol/l en verhoogt de HDL-cholesterolspiegel in aanmerkelijke mate bij de gehele populatie. Soortgelijke, maar zwakkere uitwerkingen worden verkregen bij de maïsoliegroep.

Verder verlagen de mengsels volgens de onderhavige uitvinding LDL-cholesterol met 5–10% bij patiënten met een totaal aan cholesterol groter dan 7 mmol/l, maar zij hebben geen significant effect bij patiënten met een totaal aan cholesterol van < 6,5 mmol/l.

TABEL 7
Uitwerking van proefmateriaal en maïsolie op serumtriglyceride

Triglyceride (mmol/l)					
30	Groep	n	Vóór	Na	p-waarde
35	Proefmateriaal:	87	1,51	1,20	0,31
	Maïsolie:	85	1,57	1,47	0,03
					n.s.
Patiënten met triglyceriden groter dan 2,00 mmol/l					
40	Groep	n	Vóór	Na	p-waarde
40	Proefmateriaal:	14	3,28	2,03	1,25
	Maïsolie:	17	3,22	2,66	0,56

45 Zoals blijkt uit tabel 7 heeft het proefmateriaal een verlaging van de serumtriglyceridenspiegel als uitwerking, in het bijzonder bij patiënten met hoge spiegel (> 2,0 mmol/l) vóór behandeling. Een significante werking wordt niet verkregen met maïsolie bij de gehele groep van vrijwilligers, terwijl een zeer zwakke uitwerking wordt verkregen bij personen met hoge triglyceridenspiegels.

TABEL 8
Uitwerking van proefmateriaal en maïsolie op bloedplaatjesaggregatie

50	Groep	Collageen 0,2 µg/ml				Collageen 0,1 µg/ml			
		n	Vóór	Na		Vóór	Na		
55	Proefmateriaal	21	X SEM	X SEM		X SEM<	X SEM		
			63,4±4,40	38,8±5,19		38,0±5,91	13,7±3,77		

TABEL 8
Uitwerking van proefmateriaal en maïsolie op bloedplaatjesaggregatie (vervolg)

	Collageen 0,2 µg/ml			Collageen 0,1 µg/ml	
5					
	Maïsolie:	21	73,5±4,40	57,4±6,37	43,4±45,5 15,2±3,32

Zoals blijkt uit tabel 8 heeft de toediening van mengsels volgens de onderhavige uitvinding een

10 antiaggregatie-uitwerking op bloedplaatjes.

Het coagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplex wordt aangetroffen in het plasma van personen behorende tot een groep met een hoog risico van cardiovasculaire ziekten, zoals beschreven door P. Leren *et al.*, (The Oslo Study, Cardiovascular disease in middle aged and young Oslo men. *Acta Med. Scand.* suppl. 588, 1–38 (1987)) en Dalaker *et al.*, (A novel form of factor VII in plasma from men at risk for cardiovascular disease, *Br J. Haematol.*, 61, 315–322, (1985)), en dit wordt beschouwd als een andere risicofactor voor

15 cardiovasculaire ziekten.

TABEL 9
Uitwerking van proefmateriaal en maïsolie op de activiteit wat betreft het coagulatiefactor-VII-fosfolipidecomplex (%)

	Groep	n	Vóór	Na	Vershil
	Proefmateriaal:	69	9,7	6,6	3,1**
25	Maïsolie:	72	8,5	8,8	0,3 n.s.

** p < 0,02

Zoals blijkt uit de tabel wordt de activiteit significant verminderd door het mengsel volgens de onderhavige

30 aanvraag, terwijl geen significant effect wordt bereikt met maïsolie.

De doses van de mengsels volgens deze uitvinding, die nodig zijn voor therapeutische of profylactische uitwerking, variëren al naar gelang het type van toediening. Bij onze grootschalige tests werd 6 g van het proefmengsel per persoon per dag toegediend. Over het algemeen kunnen doses voor de gemiddelde

35 volwassenen variëren van 1,0–10 g als functie van de lichaamsomvang en de ernst van de te behandelen toestand.

Bij voorkeur dienen de actieve verbindingen oraal te worden toegediend in de vorm van pillen of zachte capsules. De toediening zou echter ook kunnen plaatsvinden langs iedere andere weg, waarlangs de actieve bestanddelen efficiënt kunnen worden geabsorbeerd en benut, bijvoorbeeld intraveneus, subcutaan, rectaal, vaginaal of eventueel plaatselijk.

40 De farmaceutisch gevormde preparaten kunnen, naast EPA en DHA als actieve bestanddelen zoals gedefinieerd, eventueel een of meer tot de stand der techniek behorende farmaceutisch aanvaardbare dragers bevatten. Van de preparaten kunnen tevens vulmiddelen, stabilisatoren, verdunningsmiddelen, bindmiddelen, bevochtigmiddelen, oppervlak-actieve middelen en glijmiddelen deel uitmaken, zoals bekend in de techniek van de vervaardiging van farmaceutische preparaten.

45 Bovendien kunnen antioxidantia, bijvoorbeeld hydroxytolueenbutyraat, chinon, tocoferol en ascorbinezuur, conserveringsmiddelen, kleurgevende middelen, parfums, smaakstoffen en andere farmaceutische middelen worden gebruikt.

50 Conclusies

1, Vetzuursamenstelling met omega-3- poly-onverzadigde vetzuren, waaronder (cis)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur (EPA) C 20:5, (cis)-4,7,10,13,16,19-docosahexaeenzuur (DHA) C 22:6 en andere omega-3 C 20, C 21 en C 22 vetzuren, desgewenst aanwezig als farmaceutisch aanvaardbare zouten of esters, met

55 het kenmerk, dat de vetzuursamenstelling ten minste 80 gew.% van de genoemde omega-3 poly-onverzadigde vetzuren bevat, (cis)-5,8,11,14,17-eicosapentaeenzuur (EPA) C 20:5 en (cis)-4,7,10,13,16,19-docosahexaeenzuur (DHA) C 22:6 aanwezig zijn in relatieve gewichtshoeveelheden van 1:(0,5–1) en ten

minste 75 gew.% van de vetzuursamenstelling vormen, waarbij de andere omega-3 C 20, C 21 en C 22 vetzuren ten minste 4,5 gew.% van de totale hoeveelheid vetzuren uitmaken.

2. Samenstelling volgens conclusie 1, met het kenmerk, dat de concentratie van omega-3 vetzuren met een ketenlengte van ten minste C 20 ten minste 95 gew.% bedraagt, waarbij EPA en DHA ten minste 90 gew.% van de totale vetzurenhoeveelheid uitmaken.

3. Werkwijze voor de bereiding van een vetzuursamenstelling volgens een der conclusies 1–2, met het kenmerk, dat uit zeedieren afkomstige grondstof achtereenvolgens wordt onderworpen aan omestering, concentratie door ureum fractionatie en moleculaire destillatie, waarbij een hoofdfractie in hoofdzaak bestaande uit esters van de omega-3 C 20:5 en C 22:6 zuren wordt geïsoleerd, met een totale hoeveelheid van omega-3 poly-onverzadigde vetzuuresters met een ketenlengte van ten minste C 20 van ten minste 80 gew.% met een samenstelling volgens conclusie 1 of 2, waarbij de concentratie en de moleculaire destillatie worden uitgevoerd onder milde omstandigheden om oxidatie en isomerisatie van de omega-3 zuren te vermijden, indien gewenst gevolgd door hydrolyse van de omega-3 vetzure esters om de vrije vetzuren te verkrijgen, indien gewenst gevolgd door de omzetting van de vrije vetzuren in de farmaceutisch aanvaardbare zouten.

4. Gevormde farmaceutische samenstelling voor de profylaxe of de behandeling van cardiovasculaire aandoeningen, gekenmerkt door de aanwezigheid van een samenstelling volgens conclusies 1–4.