(12) **PATENT**

(19) NO (11) **320284** (13) **B1**

NORGE (51) Int Cl[7] A 23 L 1/30 , A 23 D 9/00 , A 61 K 35/12, 35/78

Patentstyret

(21)	Søknadsnr	20041197	(86)	Int.inng.dag og søknadsnr	
(22)	Inng.dag	2004.03.22	(85)	Videreføringsdag	
(24)	Løpedag	2004.03.22	(30)	Prioritet	Ingen
(41)	Alm.tilgj	2005.09.23			
(45)	Meddelt	2005.11.21			

(73)	Innehaver	OliVita AS , Grønlandsveien 26, 9013 TROMSØ, NO
(72)	Oppfinner	Edel O Elvevoll, Grimsbsbybeien 44A, 9011 TROMSØ, NO Bjarne Østerud, Grønlandsveien 26, 9013 TROMSØ, NO
(74)	Fullmektig	Zacco Norway AS , Postboks 2003 Vika, 0125 OSLO, NO

(54) Benevnelse **Kombinasjon av oljer, samt anvendelse derav.**

(56) Anførte publikasjoner

NO A 20022581
Clinical Nutrition, 1999, vol. 18, nr. 3, s. 167-174, Ramirez-Tortosa, M. C. et al.
European Food Research Technology, 2003, 217 (4), s. 301-307, Medina, I. Et al.
Lipids, 1998, 33 (4), s. 427-436, Vognhild, E. Et al.

(57) Sammendrag

Kombinasjon av oljer som supplement til eller komponent i regulær diett, hvori den innbefatter marin olje, fortrinnsvis selolje, og jomfrulig kaldpresset olivenolje.

Foreliggende oppfinnelse angår en kombinasjon av oljer som et supplement til, eller komponent i, en regulær diett for å motvirke utviklingen av hjerte-karsykdom (CHD), blodpropp og andre betennelsesbetingede sykdommer som psoriasis og revmatisme. Kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen innbefatter selolje og jomfruelig olivenolje.

Aterosklerotiske lesjoner dannes når tre cellulære sirkulasjonskomponenter, monocytter, blodplater og T-lymfocytter, reagerer med LDL-kolesterol og to celletyper i arterieveggen, endotelceller (EC) og de glatte muskelcellene (SMC).

Forløperen for aterogenesen er rekruttering av monocytter og lymfocytter fra det perifere blod til intima i karveggen, en hendelse som synes å avhenge av det lokale nærvær av store mengder LDL. Når LDL akkumulerer blir bundet lipid og protein oksidert og glykosylert. Celler i karveggen synes å tolke denne endringen som et farlig signal og ber om forsterkninger fra kroppens forsvarssystem. Disse prosessene synes å fremme en oppregulering av adhesjonsmolekyler på endotelceller, særlig det vaskulære celleadhesjonsmolekyl-1 (VCAM-1) og det intracellulære adhesjonsmolekyl-1 (ICAM-1). Slik blir rekrutteringen av monocytter og lymfocytter initiert. Dette fører til økt transmigrering av monocytter, oppregulert eksponering av adhesjonsmolekyler på endotelet, samt produksjon og frigjøring av kjemiske tiltreknings substanser. Dette er avgjørende hendelser for overføring av monocytter til initima, og den parallelle differensiering av monocytter til makrofager. Tilgjengelig modifisert LDL er også nødvendig for den videre utviklingen av makrofager til skumceller (fettrike makrofager), som er hovedårsaken til dannelse av fettstriper under karveggens endotel. Modifiserte former av LDL (oksiderte, glykosylerte, m.fl) er av spesiell interesse, fordi modifiseringen av LDL er assosiert med betennelsesreaksjoner som har sin bakgrunn i prosesser som er initiert på grunn av adhesjon og transmigrering av monocytter og lymfocytter inn i intima.

Som nevnt ovenfor er det velkjent at monocytter spiller en sentral rolle i den tidlige fase av aterogenesen. En av de første hendelser i den aterosklerotiske prosessen er mobiliseringen av monocytter inn i intima. Fordi rekrutteringen av monocytter og deres penetrering gjennom endotelium er forbundet med sekresjon av aktiveringsprodukter som cytokiner og vekstfaktorer, kan man anta at den funksjonelle reaktiviteten til sirkulerende monocytter er meget viktig. Det blir hevdet at kroniske, infektiøse sykdommer kan påvirke den funksjonelle reaktiviteten ved å aktivere monocyttene og gjøre dem mer tilbøyelige til å produsere og frigjøre skadelige produkter som cytokiner og kjemokiner som respons på stress.

Nøyaktig hvordan de funksjonelle egenskaper til sirkulerende monocytter henger sammen med aterogenesen er så langt lite kjent, men at hyperaktive monocytter er avgjørende for patofysiologien ved revmatisme, psoriasis og andre betennelses-betingede sykdommer er imidlertid etablert kunnskap. Vi vet også at aterogenese er en proinflammatorisk sykdom. Det kan derfor antas at den proinflammatoriske funksjon hos sirkulerende monocytter kan assosieres med økt risiko for hjerte-karsykdom (CHD), og at høye kolesterolnivåer kan forsterke produksjonen av proinflammatoriske produkter som oksygenradikaler, cytokiner etc.

Oppfinner har gjennom mange år observert at reaktiviteten hos monocytter, bedømt ved produksjonen av tromboplastin (Tissue Factor = TF) og cytokiner som TNFa og IL-6 i lipopolysakkarid (LPS) stimulert blod, varierer mellom individer fra lav aktivitet til meget høy aktivitet (høyrespondere). Denne egenskap hos monocyttene synes å være arvelig (Østerud et al, "Blood Coagulation and Fibrinolysis" 2002; 13:399-405). Oppfinner har bl.a. undersøkt *in vitro* hvordan LPS-indusert reaktivitet hos monocytter i fullblod relaterer til lipidprofilen i serum hos friske individer med en hjerteinfarkt (MI)- eller cancerhistorie i den nære familie. Av totalt 54 individer i hjerteinfarkt (MI) familiene hadde 20 moderat høyt kolesterol (7,1 – 10,2 mmol/l), mens 34 hadde normalt kolesterol. Av individene med normalt kolesterol hadde 19 hyperaktive monocytter (høyrespondere), mens 15 hadde normalt responderende monocytter. LPS-indusert tromboplastin (TF), TNFa og IL-6 var i gjennomsnitt 3-4 ganger høyere i gruppen med normalt kolesterol sammenlignet med gruppen med moderat høyt kolesterol. Således ble det ikke funnet noen positiv korrelasjon mellom hyperaktive monocytter og kolesterol-nivå. Alle de 42 individene i familiene med krefthistorie hadde normalt kolesterol, og LPS-indusert tromboplastin (TF), TNFa og IL-6 var ikke signifikant forskjellig fra verdiene til gruppen med moderat høyt kolesterol blant hjerteinfarkt (MI) familiene. Dette støtter konklusjonen om at moderat høyt kolesterol ikke er assosiert med økt monocyttaktivering i fullblod, mens hyperaktive perifere blodmonocytter er en signifikant risikofaktor for utvikling av hjerte- karsykdom.

Å redusere reaktiviteten til monocytter, og derved produksjon av proinflammatoriske produkter som cytokiner, oksidative metabolitter og vekstfaktorer, er trolig minst like viktig som å redusere kolesterolnivået. Nye studier viser også at statiners betennelses-dempende effekt kan være viktigere enn den kolesterolreduserende effekten (Balk et al. "Effects of statins on nonlipid serum markers associated with cardiovascular disease: a systematic review" Ann Intern Med. 2003;139:670-82. Review).

Kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen inneholder omega-3 fettsyrer. Disse er kjente for å redusere risikoen for arytmier som kan føre til plutselig død. Omega-3 fettsyrer er også kjente for å redusere risikoen for trombose som kan føre til hjerteinfarkt og slag. De reduserer veksthastigheten for aterosklerotisk plakk, og har derved betennelsesdempende egenskaper, ettersom lesjonsdannelse i den aterogene prosess medieres av proinflammatoriske reaksjoner. Videre forbedrer omega-3 fettsyrer den endoteliale funksjon, reduserer nivået av triglycerider i blod og gir et noe lavere blodtrykk (for en kort oversikt henvises det til PM Kris-Etherton, WS Harris, LJ. Appell "Arterioscler Thromb Vasc Biol." 2003; 23:151-2).

Basert på egenskapene til omega-3 fettsyrer skulle man forvente at tilskudd av omega-3 fettsyrer skulle være tilstrekkelig til å forhindre kardiovaskulære sykdommer. Kliniske studier gjennomført i Norge har imidlertid påvist negative effekter av omega-3 fettsyrer (I Seljeflot, O Johansen, H Arnesen, JB Eggesbo, AB Westvik, P. Kierulf, "Thromb Haemost" 1999; 81:566-70; O Johansen, I Seljeflot, AT Hostmark, H Arnesen "Arterioscler Thromb Vasc Biol." 1999;19:1681-6). Kardiovaskulære pasienter som fikk tilskudd av omega-3 fettsyrer i 6 måneder opplevde en fordobling av både angina og okklusjoner sammenlignet med kontroller. Det ble også observert en økning i cytokinproduksjon, noe som antyder en økning i proinflammatoriske peroksydasjon av flerumettede fettsyrer *in vivo* (for en oversikt vises det til H. Arnesen "Lipids" 2001; 36 Suppl:S103-6).

Det ovenfor anførte er i overensstemmelse med oppfinners egne resultater når det gjelder dietter med tilskudd av omega-3 fettsyrer. Således var den betennelsesdempende effekt av å supplere dietten til friske individer med et omega-3 fettsyrekonsentrat ikke signifikant sammenlignet med en tilsvarende mengde omega-3 fettsyrer i form av torskeleverolje (CLO). Kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen ga derimot en signifikant reduksjon av LPS-indusert cytokin- og eicosanoidproduksjon etter 10 ukers inntak av 15 ml olje per dag.

Moderne raffineringsprosesser for fremstilling av olje fra fisk og maritime pattedyr har som mål å gjøre oljen sunnere, sikrere, mer smakfull og mer lagringsstabil. Fjerning av molekyler som gir uønsket smak eller lukt, for å forbedre de sensoriske egenskaper, kan imidlertid ødelegge potente antioksidanter. Næringskvaliteten påvirkes også av det kvantitative innholdet av biologisk aktive molekyler. Disse næringsstoffene påvirkes av flere faktorer som miljø, tilgjengelighet, kjemiske stabilitet, graden av prosessering og

den form i hvilken næringen avgis. Fiskeoljer ekstraheres fra hel fisk, fiskelever (hovedsakelig torskelever) eller biprodukter (hovedsakelig laks). Oljer fra marine pattedyr fremstilles fra spekk og eksternt adiposevev.

Prosessering av marine oljer slik at de blir egnet for menneskelig føde kan være problematisk. Tradisjonelle ekstraheringsteknikker involverer oppvarming eller dampstripping av råmateriale for å frigjøre lipidene. Marine oljer har høyt innhold av umettede fettsyrer. Anvendelse av høye temperaturer under ekstraheringen vil forårsake uønskede effekter som initiering av oksidasjonsreaksjoner, destruering av antioksidanter og dannelse av molekyler som gir oljen lukt og smak. Detekterbare endringer inntrer i lipidkomponenter ved varmeekstrahering over 40 ^{0}C, sammenlignet med deres "jomfruelige" tilstand i cellene. For å oppnå et stabilt, sensorisk akseptabelt og sikkert produkt, er fjerning av et antall komponenter (proteiner, peptider, aminosyrer, frie fettsyrer, fosfolipider, pigmenter, steroler, transformasjonsprodukter, metaller og eventuelle toksiske stoffer) vanligvis nødvendig. Den konvensjonelle raffinerings-prosessen består av fire hovedtrinn, polering, syrevasking, bleking og luktfjerning. I tillegg benyttes ofte trinn som rensing (filter, sedimentering), blanding av forskjellige batcher, vinterisering og poleringsfiltrering. Under raffineringstrinnene vil et antall kjemiske reaksjoner (hydrolyse, autooksydering, isomerisering, konjugering, polymerisering, pyrolyse og dehydratisering) inntre avhengig av prosessbetingelsene. Raffineringsprosessen må ta høyde for å fjerne eventuelle uønskede biprodukter som måtte dannes. Antall rensetrinn påvirkes også av kvaliteten på råoljen, inkludert medfølgende substanser, mengde og art av urenheter, tidligere oksidativ- og hydrolytisk skade. Avgjørende for valg av raffineringsprosess vil være kvalitetskriterier for næringsoljen, miljøforhold, økonomi og redusert materialtapet.

Raffinering av marine oljer for å forbedre de sensoriske egenskaper og stabilitet kan altså ødelegge potente antioksidanter og komponenter med potensielt fordelaktige funksjonelle egenskaper.

Flerumettede fettsyrer, bl.a. omega-3 fettsyrer, kan inkorporeres i LDL-partikler og gjøre disse mer utsatt for oksidasjon. Ettersom oksidasjon av LDL-partikler er en av hovedreaksjonene i den tidlige fase av aterogenese, vil en hindring av oksidasjonen hindre dannelse av skumceller i intima (for et overblikk vises det til B Østerud, E Bjørklid, "Physiological Reviews", 2003; 83: 1069-112. Review). Således er antioksidanter påvist å redusere lesjonsdannelse i dyremodeller (M. Aviram, B. Fuhrman "Ann N Y Acad Sci." 2002; 957: 146-61. Review). Videre er antioksidanter

også viktige ved nedregulering av eicosanoidmetabolismen. Lipoksygenaseveien, som fører til dannelse av bl.a. leukotrien B4, inhiberes av antioksidanter med påfølgende reduksjon i LTB4-produksjonen. I den senere tid er det blant annet påvist at inhibering av LTB4 reseptor i transgene mus som var predisponert for aterosklerose reduserte lesjonsdannelsen med rundt 70 % (RJ Aiello, PA Bourassa, S Lindsey, W Weng, A Freeman, HJ Showell, "Arterioscler Thromb Vasc Biol." 2002;22:443-9).

En forsøksperson (oppfinner) som har benyttet næringsoljen ifølge oppfinnelsen i en 10 års periode har meget lav LTB4-generering i LPS-indusert fullblod. Ved å sette kommersiell LTB4 til forsøkspersonens blod stiger den LPS-induserte TF (Tissue factor) med mer enn 70 % og blodresponsen på LPS blir nok en gang blant de høyeste som er målt (Østerud, upubliserte data).

Kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen kombinerer effekten av omega-3 fettsyrer og en synergistisk komponent som gir antioksidasjonseffekt både *in vivo* og *in vitro*. Denne kombinasjonen har ifølge oppfinnelsen gitt overraskende fordelaktige egenskaper i form av svært gode kliniske effekter, bedre bruksegenskaper og lengre holdbarhet. Oppfinnerne har vist at det oppnås en særlig fordelaktig virkning ved anvendelse av et produkt som inneholder olje fra sel og kaldpresset jomfrulig olivenolje, hvor begge disse komponentene fremstilles på en i og for seg kjent måte. Den oppnådde effekten kan synes mer uttalt enn det som ville være å forvente om hver komponent var anvendt alene.

Oppfinnelsen angår således en kombinasjon av oljer som supplement til regulær diett, kjennetegnet ved at den innbefatter en kombinasjon av selolje og jomfrulig kaldpresset olivenolje.

Oppfinnelsen angår også anvendelse av kombinasjonen ifølge oppfinnelsen som en komponent i en olje-i-vann eller vann-i-olje emulsjon i matvarer.

Videre angår oppfinnelsen anvendelse av kombinasjonen ifølge oppfinnelsen, eventuelt sammen med hjelpestoffer, for eksempel fremstilling av et preparat for å motvirke utviklingen av hjerte-karsykdom og tromboser og å undertrykke psoriasis, revmatisme og andre proinflammatoriske sykdommer.

To kliniske studier er gjennomført på effekten av å anvende kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen som et daglig supplement til friske individer. I den første studie var

det 28 deltakere i henholdsvis kontrollgruppen og gruppen som mottok kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen, mens det var 37 deltakere i en torskeleverolje (CLO)-gruppe. Hver person konsumerte 15 ml olje per dag eller ingen ting (kontrollgruppen) i 12 uker. Selv om det var en høyere stigning i omega-3 fettsyrene i serum hos individene i CLO-gruppen sammenlignet med gruppen som mottok kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen, var reduksjonen i LPS-indusert TNF i fullblod 24,0 % i gruppen som mottok kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen sammenlignet med 5,0 % i CLO gruppen. Dette viser, som i den tidligere omtalte studie, at reduksjonen i mengde inflammatoriske produkter hos stimulerte blodceller ikke direkte er relatert til innholdet av omega-3 fettsyrer (Østerud et al 1995).

I en annen studie oppnådde man resultatene som angitt i tabell 1.

Tabell 1. Effekt av diettilskudd med CLO eller kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen sammenlignet med kontroll (% forandring sammenlignet med verdier oppnådd før diettinntak)

Gruppe	*HDL-kol*	*hsCRP*	*MCP-1*	*TxB2*	*LTB4*
Kontroll	0	+5,1	+8,5	0	+36,6
CLO	+1,4 (i.s.)	+12,5 (n.s.)	-5,2 (0,005)	-14,3 (0,05)	+8,6 (0,001)
Oljen ifølge oppfinnelsen	**+8,3 (0,05)**	**-24,0 (0,001)**	**-14,3 (0,05)**	**-17,6 (0,05)**	**+8,8 (0,001)**

Tabell 1 viser forandring i noen av de viktigste parametrene relatert til hjerte- kar-sykdom (CHD). HDL-kol er det fordelaktige kolesterolet og enhver positiv forandring av dette er av det gode. Hypersensitivt C-reaktivt protein (hs-CRP) reflekterer kroniske inflammasjons reaksjoner i kroppen. Det er vist at økte verdier på mellom 0 til 5 mmol/l er en god risiko indikator for hjerte-karsykdom, og særlig når andelen total kolesterol over HDL-kolesterol relatert til hs-CRP øker (Rifai N, Ridker PM. "Inflammatory markers and coronary heart disease" Curr Opin Lipidol. 2002;13:383-9. Review.). Monocytt kjemotaktisk protein-1 (MCP-1) er et svært viktig kjemisk tiltrekningsprotein, som spiller en viktig rolle i utvikling av aterosklerose ved at det mobiliserer proin-flammatoriske stoffer på steder hvor det produseres. Således kan et hvilket som helst diettilskudd som gir en reduksjon i MCP-1 være svært fordelaktig. LTB4 og TxB2 (et stabilt produkt av TxA2) er proinflammasjons produkter avledet fra metabolismen av arakidonsyre.

Studien ovenfor ble utført på henholdsvis 23, 18 and 19 friske mennesker i kontrollgruppen, CLO og gruppen som mottok kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen. Prøvene ble tatt fra fastende frivillige mellom 08.00 og 10.00 like før starten av studien og ved slutten etter 12 uker med supplementerende inntak av 15 gram olje (eller ingenting = kontroll). Fettsyresammensetningen før og etter ble bestemt i serumprøver.

Konklusjonen på studien ovenfor er at kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen har potensiale til å øke det fordelaktige HDL-kolesterolet, redusere signifikant den viktige markøren og risikofaktoren for hjerte-karsykdom (hs-CRP) og videre redusere MCP-1 mer effektivt enn CLO. I tillegg er den fordelaktige effekten med å redusere proinflamasjonsproduktene TxA2 and LTB4 på samme nivå som for CLO. Samlet sett har kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen som diettsupplement betydelig flere antiinflammasjonseffekter enn CLO, og er overlegen olivenolje som også er blitt brukt alene som kontroll i flere studier av omega-3 fettsyrer og fiskeoljer. Effekten av kombinasjonen av oljer ifølge oppfinnelsen oppstår trolig gjennom en synergistisk kombinasjon av omega-3 fettsyrer fra den maritime oljen og sterke antioksidanter tilstede i den jomfruelige olivenoljen.

P a t e n t k r a v

1.
Kombinasjon av oljer som supplement til eller komponent i regulær diett, k a r a k t e r i s e r t v e d at den innbefatter selolje og jomfrulig kaldpresset olivenolje.

2.
Kombinasjon ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at kombinasjonen er i form av en blanding.

3.
Kombinasjon ifølge krav 1, k a r a k t e r i s e r t v e d at forholdet mellom seloljen og den jomfrulige olivenoljen er fra 1:9 til 9:1, foretrukket 2:8 til 8:2, mer foretrukket 3:7 til 7:3, enda mer foretrukket 4:6 til 6:4, og mest foretrukket 1:1.

4.
Anvendelse av kombinasjonen ifølge krav 1 som næringsmiddelolje eller som komponent i en olje-i-vann eller vann-i-olje emulsjon i matvarer.

5.
Anvendelse av kombinasjonen ifølge krav 1, eventuelt sammen med hjelpestoffer, for fremstilling av et preparat for å motvirke utviklingen av hjerte- karsykdom og tromboser og å undertrykke psoriasis, revmatisme og andre proinflammatoriske sykdommer.