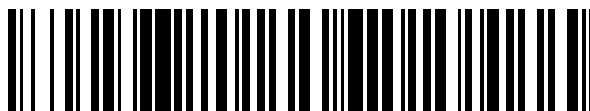


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 599**

51 Int. Cl.:

A61K 31/232 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61K 45/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.04.2006 E 06754856 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.12.2014 EP 1881824**

54 Título: **Utilización de triglicéridos docosahexaenoicos para el tratamiento de enfermedades tumorales**

30 Prioridad:

12.05.2005 ES 200501141

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

17.03.2015

73 Titular/es:

**BRUDY TECHNOLOGY, S.L. (100.0%)
RIERA DE SANT MIQUEL, 3, 2N 4A
08006 BARCELONA, ES**

72 Inventor/es:

DOMINGO PEDROL, J.C.

74 Agente/Representante:

PONTI SALES, Adelaida

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 531 599 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Utilización de triglicéridos docosahexaenoicos para el tratamiento de enfermedades tumorales

5 **CAMPO DE LA INVENCION**

[0001] La presente invención se refiere a la utilización de un aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico (DHA) para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de una enfermedad tumoral.

10 **ANTECEDENTES**

[0002] Diferentes evidencias derivadas de estudios en animales e *in vitro* indican que los ácidos grasos omega-3, especialmente los poliinsaturados de cadena larga (PUFAs), tales como el ácido eicosapentaenoico (EPA) y el ácido docosahexaenoico (DHA), presentes en los pescados y en los aceites derivados de los mismos inhiben la carcinogénesis y presentan una potencial actividad antitumoral. Estudios *in vitro* con líneas tumorales humanas han demostrado de forma convincente que los PUFAs omega-3, principalmente el DHA, reducen el crecimiento de diversos tipos de células tumorales, incluyendo mama, colon, páncreas, y en leucemia mieloide crónica y melanoma. Los datos epidemiológicos sobre la asociación entre el consumo de pescado, como marcador para la adquisición de ácidos grasos omega-3, y el riesgo del cáncer son, sin embargo, algo menos consistentes. Solo se ha podido establecer que la ingesta de DHA y EPA reduce el crecimiento de tumores en roedores, incluyendo tumores de la glándula mamaria, de colon, de la próstata, del hígado y del páncreas.

[0003] Además, diversos estudios han demostrado que los PUFAs omega-3 inhiben selectivamente la proliferación de células tumorales, siendo menos tóxicos hacia las células normales. Esta diferente sensibilidad a los PUFAs omega-3 no se puede explicar simplemente por diferencias en la captación de los ácidos grasos. Se han propuesto varios mecanismos por el que los ácidos grasos omega-3 puedan modificar el proceso carcinogénico, entre los que destacan: la supresión de la biosíntesis de eicosanoides derivados del ácido araquidónico (ARA); alteraciones en la actividad de factores de transcripción, regulación de la expresión génica y de la señalización intracelular; alteración del metabolismo de los estrógenos; alteración de la generación de radicales libres y de especies reactivas al oxígeno y modificaciones en la fluidez de la membrana.

[0004] Los eicosanoides derivados del ARA se han asociado con el desarrollo tumoral. Existen varios mecanismos por los cuales los ácidos grasos omega-3 pueden disminuir la biosíntesis de eicosanoides derivados del ARA. En primer lugar, los ácidos grasos omega-3 se incorporan en los fosfolípidos de la membrana, donde sustituyen parcialmente a los omega-6. En segundo lugar, los PUFAs omega-3 compiten con los PUFAs omega-6 como sustratos de las desaturasas y de las elongasas, teniendo los PUFAs omega-3 mayor afinidad por dichas enzimas. Finalmente, los ácidos grasos omega-3 inhiben la cicloxigenasa-2 a nivel transcripcional y compiten con los ácidos grasos omega-6 como sustratos de las cicloxigenasas en la formación de los eicosanoides.

[0005] Por otra parte, los PUFAs omega-3 y sus metabolitos pueden ejercer algunos de sus efectos antitumorales al afectar la expresión de diversos genes o las actividades de las moléculas de transmisión de la señal implicadas en el control del crecimiento, diferenciación y apoptosis celular, angiogénesis y metástasis. Los más importantes son el receptor activado de proliferación peroxisomal, el del factor kB de transcripción nuclear, el oncogén ras, la proteína quinasa C, el coenzima-A-3-hidroxi-3-metilglutaril reductasa, la cicloxigenasa-2, las lipoxigenasas y la óxido nítrico sintasa. Se ha demostrado que el tratamiento de las células de carcinoma de colon con DHA altera las características de la membrana celular y reduce su capacidad metastásica.

[0006] La generación de radicales libres y de especies reactivas al oxígeno parece estar implicada en la iniciación de la apoptosis y en la defensa natural contra las células transformadas. De este modo, los efectos inhibitorios de los PUFAs omega-3 de cadena larga en el crecimiento de células tumorales pueden, por lo menos en parte, ser explicados por la formación de productos de la oxidación, que conduce a la detención del crecimiento de la célula y al inicio del proceso de apoptosis. Se ha sugerido que las células del tumor son deficitarias en sistemas de defensa antioxidantes en comparación con las células sanas, y de este modo son más susceptibles al daño oxidativo. Los PUFAs son los sustratos intracelulares principales en la peroxidación lipídica; ya sea provocando un daño en las membranas de la célula, modificando la composición celular o el ensamblaje del citoesqueleto, alterando los sistemas de transporte de la membrana o la actividad de sus enzimas, o inhibiendo las reacciones de la polimerasa. Por lo tanto, es razonable considerar que las células enriquecidas en DHA del tumor son más susceptibles al daño oxidativo.

[0007] Existe una cierta evidencia de que los ácidos grasos omega-3 tienen un efecto en el ciclo celular. El tratamiento *in vitro* con DHA provoca la parada en la fase G₁/S o G₂/M durante el ciclo celular en células tumorales de mama y de melanoma. *In vivo*, la administración de aceite de pescado, rico en omega-3, a ratas implantadas con una línea tumoral de mama puede prolongar la replicación del DNA de las células tumorales retrasando así la progresión a través de la fase de síntesis.

[0008] Sin embargo, estudios preclínicos han demostrado que los PUFAs omega-3 pueden incrementar la citotoxicidad de varios agentes antineoplásicos y los efectos anticancerígenos de la radioterapia. Estos efectos están mediados

posiblemente por la incorporación de los ácidos grasos en las membranas de células tumorales, alterando así las características físicas y funcionales.

5 **[0009]** Por otro lado, la eficacia terapéutica alcanzada depende de varios factores, tales como la biodisponibilidad del ácido graso, que a su vez está relacionada con la estructura química de la que forma parte, el tipo de PUFA omega-3 usado (ALA, EPA o DHA) y la disponibilidad de interacción entre el PUFA y la célula diana.

10 **[0010]** Los datos derivados de un estudio en el que se comparaba la biodisponibilidad de tres concentrados de PUFAs omega-3 en forma de ésteres etílicos, ácidos grasos libres y triglicéridos después de administración oral, demostró que los triglicéridos reesterificados presentaban una biodisponibilidad superior a las otras dos preparaciones.

15 **[0011]** En un modelo de carcinogénesis multiorgánico también se ha demostrado que en un tratamiento de monoterapia el DHA es el PUFA omega-3 que presenta una protección antitumoral más eficaz, superior al EPA. Este resultado también se ha confirmado en tratamientos antitumorales de combinación EPA + DHA, donde se ha observado que la presencia de EPA disminuye la eficacia del DHA.

20 **[0012]** Por último, un aspecto importante es la vía de administración que condiciona la eficacia del sistema. Por ejemplo una administración intratumoral es la preferida para el tratamiento de gliomas. En este sentido es esencial que los PUFAs se administren a los pacientes de tal manera que sean fácilmente captados por las células tumorales. Por ejemplo, para una administración parenteral, adecuada para el tratamiento de hepatomas, es necesario disponer de un sistema transportador, tal como una emulsión con el objetivo adicional de limitar la unión de los PUFAs a la albumina sérica que suprime su citotoxicidad tumoral. En el caso de administración oral, adecuada para el tratamiento de linfomas, después del procesamiento y la absorción intestinal, los PUFAs son transportados hasta el tejido diana incorporados en los quilomicrones en forma de triglicéridos.

25 **[0013]** El documento JP H0860181 A se refiere a composiciones que contienen grasas y aceites que contienen ácidos grasos altamente insaturados, que incluyen más de un 60% de DHA que está contenido en monoglicéridos y diglicéridos, para prevenir y tratar enfermedades geriátricas.

30 **[0014]** El documento JP H1057086 A describe monoglicéridos con DHA presente en el glicérido en un porcentaje de al menos el 60% que muestra efectos beneficiosos del DHA en el control del cáncer.

35 **[0015]** El documento DE 3721137 describe el uso intravenoso de emulsiones grasas que contienen ácido eicosapentaenoico y/o ácido docosahexaenoico en forma libre, así como ácidos grasos omega-3, en los que el DHA se encuentra en un bajo contenido.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

40 **[0016]** La presente invención se refiere a la utilización de un aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico (DHA) para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de una enfermedad tumoral tal como se define en las reivindicaciones.

45 **[0017]** La presente invención concierne al hallazgo inesperado de que aceites con un contenido elevado en DHA incorporado en un glicérido, en particular con un contenido superior al 50% en peso, presentan una eficacia antitumoral superior a la misma concentración de DHA en cualquier otra forma química.

50 **[0018]** Por tanto, se describe en el presente documento la utilización de un aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico (de aquí en adelante también referido como "DHA") que está incorporado en un glicérido, para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de una enfermedad tumoral, estando dicho aceite enriquecido en una concentración de hasta el 70% en peso respecto al peso total de dicha composición farmacéutica y estando dicho ácido docosahexaenoico incorporado en un glicérido en un porcentaje de al menos el 50% en peso respecto al total de ácidos grasos de dicho aceite.

55 **[0019]** Tal como se describe en el presente documento, la expresión "aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico" significa derivados del glicerol naturales o sintéticos que contienen el grupo docosahexaenoílo entre 50-100% en peso basado en el contenido total de ácidos grasos.

60 **[0020]** Tal como se describe en el presente documento por "ácido docosahexaenoico incorporado en un glicérido" se entiende un glicerol con las tres posiciones esterificadas con ácido docosahexaenoico.

[0021] Tal como se describe en el presente documento, la expresión "hasta el 70% en peso de dicho aceite enriquecido" significa el 70% del peso total de la composición farmacéutica corresponde al aceite enriquecido en DHA.

65 **[0022]** Tal como se describe en el presente documento, la expresión "al menos del 50% respecto al total de ácidos grasos" significa que el DHA representa al menos el 50% en peso del total de ácidos grasos de dicho aceite enriquecido.

[0023] Sorprendentemente, los inventores de la presente invención han encontrado que utilizando una cantidad de DHA de al menos el 50% se duplica y hasta quintuplica, el efecto antitumoral de dicho DHA, consiguiendo, de esta manera, una elevada actividad citotóxica tumoral específica, sin la existencia de efectos secundarios.

5 [0024] En una realización preferida, dicha composición farmacéutica se encuentra en forma de emulsión.

[0025] En la práctica se ha comprobado que cuando se administra a un paciente una composición farmacéutica que contiene un aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico incorporado en un glicérido, tal y como se ha descrito más arriba, en forma de emulsión, se consigue aumentar la actividad citotóxica tumoral del orden de diez veces más (tal y como se deriva de los ejemplos incluidos posteriormente).

10

[0026] Las emulsiones se pueden preparar en condiciones apirogénicas y estériles con la suficiente estabilidad física y química para su administración, incluida la administración parenteral, mediante procedimientos bien conocidos para el experto en la materia.

15

[0027] En otra realización preferida, el diámetro promedio de la microemulsión es inferior a 200 nm.

[0028] Ventajosamente, dicho diámetro promedio permite la aplicación parenteral, administrándose, de esta manera, una dosis efectiva de DHA superior a la obtenida mediante una administración oral y, en consecuencia, aumentando la biodisponibilidad de dicho ácido. Esto se debe a que se evita la pérdida inherente de la absorción intestinal. Además, por vía parenteral se pueden administrar concentraciones elevadas de DHA.

20

[0029] Por todo lo anterior, en una realización preferida, dicha composición farmacéutica en forma de emulsión se administra por vía parenteral. Las dosis a administrar dependen del tipo y de la gravedad de la patología a tratar, sin presentar restricciones dietéticas (interacciones con los alimentos).

25

[0030] Las emulsiones descritas en el presente documento se pueden administrar también por vía oral, sublingual, intravenosa, intramuscular, tópica, subcutánea, rectal o incluso por simple puesta en contacto con los órganos olfativos situados en la entrada de las vías respiratorias del principio activo de la emulsión de la invención en forma líquida o de vapor. De este modo, la administración puede realizarse por pulverización, nebulización o atomización de las emulsiones o por inhalación.

30

[0031] En otra realización preferida, dicha composición farmacéutica se administra mediante inyección intramuscular.

[0032] En otra realización preferida, dicho aceite enriquecido en DHA incluye también ácido eicosapentaenoico (también referido como EPA) en un porcentaje en peso respecto al total de ácidos grasos en dicho aceite de hasta el 30%.

35

[0033] En una realización preferida, la concentración de aceite enriquecido en DHA se encuentra en el intervalo del 10-70%, preferiblemente en el intervalo del 10-30% respecto al peso total de la composición farmacéutica.

40

[0034] En otra realización preferida, el porcentaje en peso de DHA respecto al peso total de ácidos grasos de dicho aceite enriquecido oscila entre el 50-100%, preferiblemente oscila entre 70 y 90% y, más preferiblemente, dicho porcentaje en peso de DHA es del 70%.

[0035] Los inventores de la presente invención han encontrado además que cuando se administra una composición farmacéutica, de acuerdo con la presente invención, no existen interacciones con los componentes del régimen antineoplásico que esté siendo administrado al paciente, ya que dicha composición no se metaboliza en vías comunes a las de metabolización de los fármacos antineoplásicos.

45

[0036] Por tanto, en otra realización preferida de la invención, dicha composición se administra de manera concomitante con al menos un fármaco antineoplásico.

50

[0037] Tal como se describe en el presente documento, por "fármaco antineoplásico" se entiende un principio activo o fármaco diseñado para el tratamiento de una patología de origen tumoral o canceroso.

55

[0038] Ventajosamente, se ha observado que la administración conjunta de un aceite enriquecido en DHA, según la invención, junto con un fármaco antineoplásico, potencia la actividad antitumoral de dicho tratamiento y, a su vez, inhibe los efectos secundarios del tratamiento antitumoral.

[0039] A continuación, se exponen los siguientes ejemplos a modo ilustrativo y no limitativo de la presente invención.

60

EJEMPLOS

EJEMPLO 1: Formulación de una composición farmacéutica tal como se describe en el presente documento

65

[0040] Se describe en el presente documento una composición no detergente, estable, en forma de microemulsión, para la administración a seres humanos, que comprende:

- entre el 1 y el 70% en peso de un glicérido que contiene DHA como principio activo al menos en un 50% de sus ácidos grasos (Proyecto Empresarial Brudy);
- entre el 1 y el 1,5% en peso de fosfolípidos de soja (Lipoid E80, Lipoid);
- el 2,25% en peso de glicerol (Sigma & Aldrich); y
- hasta el 100% de agua USP (ADESCO).

[0041] La emulsión inicial se homogeneiza repetidamente a alta presión hasta el tamaño adecuado y el pH se ajusta a un valor fisiológico (entre 6,5-7) con hidróxido sódico (Sigma & Aldrich). Una vez ajustado al volumen final, la microemulsión se esteriliza por filtración (0,22 µm, Millipore) en su recipiente definitivo de vidrio.

EJEMPLO 2: Evaluación de una preparación de DHA en diferentes modelos tumorales

[0042] En el presente estudio se han utilizado como modelo tumoral experimental células KG-1a (derivadas de una leucemia mielode aguda que son además MDR+, ATCC CCL-246.1), células Jurkat (derivadas de un linfoma tipo T agudo, TIB-152), células HeLa y KB3.1 (derivadas de un carcinoma epitelial humano, CCL-2), células HT-29 (derivadas de un tumor de colon humano, HTB-38), células 435 (derivadas de un tumor de mama humano, MDA-MB-435), células SH-SY5Y (derivadas de un neuroblastoma humano, CRL-2266) y NP-18 (derivadas de un tumor de páncreas humano). Como modelo no tumoral se han utilizado células Foreskin (fibroblastos de epidermis no diferenciados, CRL-1635) y células REPTC (células renales del túbulo proximal, DPK-KTEC-H). Todas las líneas celulares se han obtenido de la American Type Culture Collection, excepto las células NP-18 que han sido cedidas por el Laboratorio de Bioinvestigación de Merck Farma y Química y las REPTC que se han adquirido de Dominion Pharmakine. Los cultivos celulares se han mantenido en las condiciones adecuadas de crecimiento: temperatura (37°C), concentración de CO₂ (5%) y humedad (95%) en un incubador especial para esta finalidad. Las células se mantuvieron en crecimiento en frascos de cultivo, pero fueron traspasadas a placas de 96 pocillos para poder realizar el experimento. Se ha trabajado en todo momento con un DHA procedente de aceite de pescado con un porcentaje variable de DHA en la composición en ácidos grasos (20, 50 o 70%) e incorporado en glicéridos (TG), ésteres etílicos (EE) o como ácido graso libre (FA).

[0043] Para evaluar el efecto citotóxico de las diferentes muestras se han realizado estudios de viabilidad celular. Este método consiste en la adición del reactivo MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio), Sigma & Aldrich) soluble en medio acuoso, al medio de incubación. Las células viables metabolizan este compuesto y es convertido en sal de formazán. Esta sal es un compuesto colorimétrico insoluble en medio acuoso, soluble en DMSO y que se puede usar como una medida de la viabilidad celular. El método consiste en la adición de 20 µl por pocillo de una disolución de MTT de 7,5 mg/ml (en exceso). Se incuba durante una hora a 37°C de forma que las células viables metabolizan el compuesto y producen la sal de formazán, mientras que las no viables no lo metabolizarán. Tras una hora de incubación, se precipitan las células y se añaden 100 µl de DMSO (Sigma & Aldrich), el cual disolverá la sal de formazán. Por último, se mide la absorbancia a 550 nm en un lector de placas. Los resultados de viabilidad se expresan como porcentaje de densidad óptica con respecto a los controles considerando que estos últimos poseen un 100% de viabilidad. Se han realizado curvas de viabilidad celular en placas de 96 pocillos sembrando aproximadamente 20.000 células por pocillo (tras un análisis del número de células idóneo en función de su ratio de crecimiento) con un volumen aproximado de 200 µl de medio por pocillo. El estudio de la eficacia del producto se realizó después de la exposición de las células al producto durante 72 h en un intervalo de concentraciones lo suficientemente amplio para determinar el valor de la IC₅₀, definido como la concentración necesaria de principio activo para reducir el crecimiento/viabilidad celular al 50% con respecto al control.

[0044] Los resultados experimentales se han ajustado a la ecuación de Hill mediante el software SigmaPlot 8.0 para determinar la IC₅₀, definida como la concentración de DHA necesaria para disminuir la viabilidad del cultivo al 50% con respecto al control.

Resultados

[0045] El primer aspecto a estudiar para determinar la acción del DHA como agente antitumoral es la especificidad de su actividad citotóxica. En este sentido hemos estudiado el efecto del DHA sobre la proliferación/viabilidad celular de células no inmortalizadas con un metabolismo similar al de una célula normal. Como modelo se han utilizado células Foreskin poco diferenciadas y células renales humanas del túbulo proximal (RPTEC) y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 1.

[0046] Como se puede observar de las diferentes variantes estructurales del DHA estudiadas (triglicérido (TG), ácido graso libre (FA) y éster etílico (EE)), el triglicérido es el que presenta una citotoxicidad menor en ambos modelos de célula normal. En estas mismas condiciones, pero en un modelo tumoral (células HeLa), las diferentes variantes del DHA muestran una toxicidad muy significativa con una IC₅₀ inferior en todos los casos a 100 µM. La potencia citotóxica sigue el orden de: TG > FA = EE con el mismo contenido de DHA (70%).

[0047] También se pone de manifiesto que la citotoxicidad del producto radica en la presencia de DHA, ya que una disminución de la proporción de dicho ácido disminuye la potencia citotóxica (compárense los resultados de TG-70, TG-50 y TG-20), estimándose el umbral de concentración necesaria para obtener un desarrollo terapéutico al menos del 50% de contenido de DHA, si bien con una concentración de DHA del 70% se consigue un efecto terapéutico óptimo.

5

TABLA 1. Efecto de la estructura química y la concentración sobre la toxicidad del DHA en líneas celulares normales y tumorales

COMPOSICIÓN		IC ₅₀ (μM)		
ESTRUCTURA	% DHA	Foreskin	LÍNEA CELULAR	
			RPTEC	HeLa
FA	70	123,1 ± 9,0	n.d.	72,2 ± 5,8
	70	566,3 ± 53,9	72,6 ± 8,3	71,0 ± 9,7
TG	70	716,7 ± 41,9	392,7 ± 37,5	58,6 ± 8,8
	50	1956,0 ± 27,8	413,6 ± 25,6	564,0 ± 69,6
	20	2267,6 ± 27,9	3116,0 ± 158,2	1379,4 ± 286,4

10

[0048] El segundo aspecto estudiado ha sido el espectro de aplicabilidad del DHA como fármaco antitumoral, considerando como variables su estructura química y la naturaleza del proceso patológico al cual va dirigido, manteniendo el contenido de DHA en el 70%. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 2.

15

TABLA 2. Efecto de la estructura química en la toxicidad celular del DHA sobre líneas celulares de diferente origen patológico

	CELLULAR LINE		IC ₅₀ (μM)	
	FA	TG	EE	
KG-1a	88,4 ± 8,0	27,1 ± 3,2	120,8 ± 15,1	
Jurkat	61,8 ± 4,5	22,1 ± 1,2	104,6 ± 12,6	
HT-29	158,2 ± 19,6	115,8 ± 17,3	n.d.	
435P	193,1 ± 20,9	129,7 ± 14,9	n.d.	
NP18	n.d.	18,8 ± 3,0	n.d.	
KB3.1	n.d.	116,2 ± 15,7	n.d.	
HeLa	72,2 ± 5,8	58,6 ± 8,8	71,0 ± 9,7	
SH-SY5Y	n.d.	86,8 ± 6,8	n.d.	

20

[0049] La característica más destacable es el mantenimiento de la potencia citotóxica que sigue el orden: TG > FA > EE, en todos los modelos utilizados independientemente de su origen. De los resultados obtenidos cabe destacar, en primer lugar, la mayor sensibilidad al DHA (entre 5-8 veces mayor) hacia procesos tumorales de carácter hematológico (Jurkat y KG-1a) con respecto a los tumores sólidos (el resto). Como excepción que confirma la regla, se observa una gran sensibilidad en las células derivadas de un tumor pancreático (NP18).

25

[0050] En base a estos resultados se ha decidido utilizar como principio activo un triglicérido con una proporción de DHA igual o superior al 70% del total de ácidos grasos, ya que es el que mantiene una relación óptima entre citotoxicidad tumoral e inocuidad frente a la célula normal.

30

[0051] Teniendo en cuenta estas consideraciones se ha preparado una emulsión como se ha descrito en el apartado anterior con una proporción en peso de aceite del 10% y que contiene diferentes proporciones de DHA y se ha realizado un estudio comparativo de su especificidad citotóxica con respecto al triglicérido de DHA libre. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 3 usando como control una microemulsión de ácido oleico preparada en las mismas condiciones que la microemulsión de DHA.

5 [0052] Se observó un comportamiento análogo al descrito para el triglicérido libre. La citotoxicidad de las microemulsiones es muy superior en una línea tumoral (células HeLa) con respecto a una normal (células Foreskin) y depende de manera directa de la concentración de DHA en el glicérido. Además, la toxicidad observada es atribuible exclusivamente al DHA y no al sistema transportador (emulsión), ya que una emulsión de las mismas características preparada con un triglicérido de ácido oleico es totalmente inocua.

10 [0053] También se ha analizado la eficacia citotóxica de las microemulsiones de DHA frente a diferentes líneas tumorales y los resultados obtenidos se muestran en la tabla 4 usando otra vez como control una microemulsión de ácido oleico preparada en las mismas condiciones que la microemulsión de DHA.

15 [0054] Los resultados obtenidos confirman que las emulsiones de DHA son como mínimo tan efectivas en su actividad antitumoral como el DHA incorporado en un glicérido libre. Para células derivadas de tumores sólidos o células de origen epitelial, la eficacia es entre 1,5-3 veces superior. Igualmente, se confirma la no toxicidad del sistema transportador (emulsión), ya que una emulsión de las mismas características preparada con un triglicérido de ácido oleico es totalmente inocua.

20 TABLA 3. Efecto del contenido de DHA sobre la citotoxicidad comparativa de un glicérido en forma libre o incorporado en una microemulsión en líneas celulares normales y tumorales

COMPOSICIÓN		IC ₅₀ (µM)	
		LÍNEA CELULAR	
%DHA	ESTRUCTURA	FORESKIN	HELA
70	TG	716,7 ± 41,9	58,6 ± 8,8
	µEMULSIÓN	639,3 ± 27,2	19,5 ± 2,0
50	TG	1956,0 ± 27,8	564,0 ± 69,6
	µEMULSIÓN	>5000	545,8 ± 68,5
20	TG	2267,6 ± 27,9	1379,4 ± 286,4
	µEMULSIÓN	>5000	2135,6 ± 189,3
0 (ÁCIDO OLEICO)	µEMULSIÓN	>5000	>5000

25 TABLA 4. Estudio de la citotoxicidad celular comparativa del DHA incorporado en un glicérido en forma libre o en microemulsiones sobre líneas celulares de diferente origen patológico

LÍNEA CELULAR	TG LIBRE	IC ₅₀ (µM)	
		DHA	10% microemulsión ÁCIDO OLEICO
KG-1a	27,1 ± 3,2	49,5 ± 2,7	>5000
Jurkat	22,1 ± 1,2	37,2 ± 1,3	>5000
HT29	115,8 ± 17,3	86,9 ± 3,5	>5000
435P	129,7 ± 14,9	61,2 ± 2,5	>5000
HeLa	58,6 ± 8,8	19,5 ± 2,0	>5000
NP18	18,8 ± 3,0	10,8 ± 1,9	>5000

REIVINDICACIONES

- 5 1. Utilización de un aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico (DHA) para la fabricación de una composición farmacéutica destinada al tratamiento de una enfermedad tumoral, estando dicho ácido docosahexaenoico en un porcentaje de al menos el 50% en peso con respecto al total de ácidos grasos en dicho aceite;
en la que
dicho "aceite enriquecido en ácido docosahexaenoico" significa derivados de glicerol naturales o sintéticos que contienen 50-100% en peso del grupo docosahexaenoílo en base al contenido total de ácidos grasos,
10 estando dichos derivados de glicerol en forma de triglicérido.
2. Utilización, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha composición farmacéutica está en forma de emulsión.
- 15 3. Utilización, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicho aceite enriquecido comprende ácido eicosapentaenoico en un porcentaje en peso de hasta el 30% con respecto al total de ácidos grasos de dicho aceite.
4. Utilización, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicho aceite enriquecido está presente en la composición en el intervalo del 10-70% en peso.
- 20 5. Utilización, según la reivindicación 4, **caracterizada porque** dicho aceite enriquecido está presente en la composición en el intervalo del 10-30% en peso.
6. Utilización, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** la concentración de ácido docosahexaenoico está en un porcentaje del 70%-90% en peso con respecto al total de ácidos grasos en dicho aceite.
- 25 7. Utilización, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicho ácido docosahexaenoico está en un porcentaje del 70% en peso con respecto al total de ácidos grasos en dicho aceite.
8. Utilización, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha composición farmacéutica se administra por vía parenteral.
- 30 9. Utilización, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha composición farmacéutica se administra mediante inyección intratumoral.
- 35 10. Utilización, según la reivindicación 1, **caracterizada porque** dicha composición farmacéutica se administra a un paciente que recibe de manera concomitante al menos un fármaco antineoplásico.
- 40 11. Utilización, según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, **caracterizada porque** la enfermedad tumoral a tratar es una del grupo que consiste en: cáncer de pulmón, próstata, intestino, mama, páncreas, cerebro, sistema nervioso central y periférico, melanoma.