

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 653 940**

51 Int. Cl.:

A61K 31/122 (2006.01)

A61K 31/202 (2006.01)

A61K 31/232 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

A61P 9/10 (2006.01)

A23D 9/00 (2006.01)

A23L 33/115 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2010** **PCT/NO2010/000002**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.07.2010** **WO10077152**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2010** **E 10700011 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.10.2017** **EP 2384192**

54 Título: **Composición de aceite biológico, formulaciones que comprenden la composición de aceite y el uso de las mismas para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares**

30 Prioridad:

05.01.2009 NO 20090033

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

09.02.2018

73 Titular/es:

CALANUS AS (100.0%)
P.O. Box 2489
9272 Tromsø, NO

72 Inventor/es:

RAA, JAN;
RØRSTAD, GUNNAR y
TANDE, KURT, STEINAR

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 653 940 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

Composición de aceite biológico, formulaciones que comprenden la composición de aceite y el uso de las mismas para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares

Campo de la invención

La presente invención se refiere a una composición de aceite biológico, formulaciones que comprenden la composición de aceite y el uso de la composición de aceite en suplementos dietético, alimentos funcionales y productos farmacéuticos para la prevención o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares.

Antecedentes de la invención

En los 70, Bang, Dyerberg y Nielsen describieron los patrones plasmáticos de lípidos y lipoproteínas de los esquimales que viven en la costa occidental de Groenlandia y los compararon con los de la población danesa (H.O. Bang, J. Dyerberg and A. B. Nielsen. Plasma lipid and lipoprotein pattern in Greenlandic West-coast Eskimos. Lancet 1971; 1: 1143-45). Más tarde, Dyerberg y sus colaboradores (J. Dyerberg, H. O. Bang y N. Hjørne. Fatty acid composition of the plasma lipids in Greenland Eskimos. American Journal of Clinical Nutrition. 1975; 28: 958-66) relacionó las diferencias que encontraron, con la notable baja mortalidad por enfermedad coronaria entre los esquimales, en comparación con los daneses. Dado que la ingesta de grasa en la dieta fue casi la misma en las dos poblaciones, sugirieron que la notable diferencia en la enfermedad coronaria podría deberse a la gran diferencia en la ingesta de grasas marinas y que la enfermedad coronaria podría asociarse con la naturaleza química de los lípidos de la dieta (J. Dyerberg, H.O. Bang, E. Storffersen, S. Moncada y J. R. Vane. Eicosapentaenoic acid and prevention of thrombosis and atherosclerosis? Lancet 1978; 2: 117-19). Después de estos estudios pioneros, se hizo evidente que la enfermedad coronaria, que sigue siendo una de las enfermedades mortales más graves en las sociedades occidentales, ya no podía considerarse simplemente como una enfermedad de almacenamiento de lípidos causada por la ingesta excesiva de grasas en la dieta.

Los científicos que fueron pioneros en esta investigación fueron los primeros en sugerir que los factores antiaterogénicos en la dieta tradicional esquimal eran los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA) marinos. Su dieta, que consiste principalmente en focas, ballenas y aves marinas, y, hasta cierto punto, peces, proporcionó varios gramos, puede ser tanto como 15 gramos, de tales ácidos grasos por día. Esto es mucho más de lo que contiene una dieta occidental "moderna" típica.

La investigación durante los últimos 30-40 años ha confirmado los estudios clásicos del grupo Dyerberg y estableció una base científica firme para un entendimiento común entre científicos y otros profesionales: los beneficios para la salud del alimento marino y los aceites marinos pueden estar asociados principalmente con dos PUFA marinos típicos, a saber, ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA). Esta declaración está en línea con las conclusiones y recomendaciones del simposio "Beyond Cholesterol: Prevention and Treatment of Coronary Heart Disease with n-3 Fatty Acids, publicado por Deckelbaum et al. (American Journal of Clinical Nutrition 2008; 87 (supl): 2010S-2S).

EPA y DHA contienen, respectivamente, 20 y 22 átomos de carbono con 5 y 6 enlaces dobles conjugados, de los cuales el primero está en la posición 3 de los átomos de carbono (n-3) contados a partir del extremo hidrófobo (metilo) de estos dos ácidos grasos. La abreviatura C20:5n-3 se usa a menudo como designación química para EPA y C22:6n-3 para DHA. El fitoplancton en el ambiente marino es el principal productor de EPA y DHA, que siguen la red alimentaria desde este primer nivel trófico a través del zooplancton hasta peces y mamíferos marinos. Los aceites vegetales y la grasa animal contienen bajos niveles, si los hay, de EPA y DHA.

Se cree que EPA y DHA son particularmente importantes en la prevención de enfermedades cardiovasculares. Incluso la ingesta moderada de alimentos marinos, que proporciona 250 mg de EPA y DHA a diario, parece suficiente para reducir el riesgo de muerte coronaria en un 36% y para reducir la mortalidad en la población general en un 17% (UJ Jung et al. American Journal of Clinical Nutrition 2008; 87 (supl): 2003S-9S).

Los mecanismos fisiológicos y moleculares propuestos para explicar los efectos cardioprotectores de EPA y DHA incluyen 1) disminuir los niveles de triacilglicerol y ácidos grasos libres en plasma, 2) aumentar los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuir los niveles de lipoproteínas de baja densidad (LDL), 3) disminución de la agregación plaquetaria, 4) disminución del aporte de colesterol y deposición del colesterol en las paredes arteriales, 5) disminución de la inflamación arterial. Estos son mecanismos interactivos que involucran mecanismos bioquímicos complejos y diversos, incluidos los efectos de EPA y DHA, así como de sus productos de transformación (prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos) en la modulación de la inmunidad y la inflamación y expresión génica en diferentes células y tejidos. Aunque los beneficios para la salud de la EPA y el DHA ya no se pueden cuestionar, los mecanismos involucrados son demasiado complejos para ser completamente comprendidos. Por ejemplo, todavía es un hecho desconcertante que "los principales mecanismos subyacentes a los efectos beneficiosos de los ácidos grasos n-3 en la prevención y tratamiento de la enfermedad arterial coronaria

parecen ser distintos de los efectos sobre la disminución de las concentraciones plasmáticas de triacilglicerol" (Deckelbaum et al., American Journal of Clinical Nutrition 2008; 87 (suppl): 2010S-2S).

- 5 El documento WO98/56883 divulga ésteres de cera enriquecidos en ácidos grasos insaturados o-3 preparados de una mezcla de ésteres de ácidos grasos libres enriquecidos en ácidos grasos poliinsaturados.

Los estudios clínicos preclínicos y humanos durante los últimos 30-40 años han proporcionado pruebas consistentes de que el consumo de aceites alimentarios marinos y de alimentos marinos es beneficioso para la salud, y se ha
10 aceptado generalmente entre los expertos en la técnica que estos beneficios para la salud son: en primer lugar y más importante asociado con EPA (ácido eicosapentanoico) y DHA (ácido docosahexanoico). La evidencia total relacionada con la capacidad de estos dos PUFA marinos n-3 para prevenir la enfermedad coronaria es tan abrumadora que se ha convertido en parte de una estrategia de prevención primaria de las autoridades sanitarias de las sociedades occidentales para recomendar el consumo diario de EPA y DHA. En apoyo de esta estrategia, se
15 puede remitir al simposio "Beyond Cholesterol: Prevention and Treatment of Coronary Heart Disease with n-3 Fatty Acids" resumido y discutido por R.J. Deckelbaum et al. (American Journal of Clinical Nutrition, 2008; 87 (supl): 2010S-2S). Además, los concentrados de EPA y DHA, producidos como se describe en la patente de EE.UU. Nos. 5,502,077, 5,656,667 y 5,698,594, han sido aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) como preparaciones farmacéuticas que reducen el nivel de componentes sanguíneos considerados
20 como factores de riesgo de enfermedad coronaria.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una ilustración visual representativa de la formación de placa en aortas de ratones hembra
25 alimentados con una dieta a la que se agregó la composición biológica de aceite (Dieta 1) o el concentrado EPA/DHA (Dieta 2), en comparación con la dieta de referencia (Dieta 3).

La figura 2 ilustra el crecimiento promedio de ratones hembra (n=10) en las tres dietas experimentales.

30 La figura 3 muestra el peso promedio de diferentes órganos de ratones hembra (n=10) alimentados con las tres dietas experimentales (WAT = tejido adiposo blanco).

Descripción detallada de la invención

35 En la descripción de la presente invención, a continuación, los términos composición biológica de aceite, aceite de copépodo, composición de aceite de copépodo, composición de aceite se usan intercambiables.

EPA y DHA son los ácidos grasos predominantes presentes en peces marinos, ballenas, focas y crustáceos. Además, el aceite presente en el copépodo marino *Calanus finmarchicus* es una fuente rica de EPA y DHA, pero
40 este aceite difiere de otros aceites marinos en varias otras características químicas. Comparado con otros aceites marinos, el aceite de copépodo de la presente invención es muy rico en el PUFA C18:4n-3 (ácido estearidónico, SDA). A diferencia de otros aceites alimentarios marinos comunes, los PUFA presentes en el aceite de copépodo existen predominantemente como monoésteres con alcoholes monoinsaturados de cadena larga, es decir, ésteres de cera. Comparado con otros aceites marinos dietéticos comunes, el aceite de copépodo de la presente invención
45 contiene una proporción relativamente alta de ácidos grasos libres, bajas cantidades de triglicéridos y altos niveles de astaxantina y colesterol.

Basado en el entendimiento común de que EPA y DHA son los factores clave responsables de los efectos beneficiosos de los aceites marinos en la prevención y el tratamiento de la enfermedad arterial coronaria, los efectos
50 biomédicos de estos dos ácidos grasos se han comparado con los de la composición del aceite de copépodo, como descrito en la presente invención. Los efectos del aceite de copépodo según la presente invención se compararon con los de una preparación concentrada de EPA/DHA en la formación de placa aterosclerótica y en el nivel de colesterol total en ratones, ajustados para que el aceite de copépodo proporcionara la misma cantidad total de EPA y DHA como la cantidad total de EPA y DHA en la preparación de referencia. En estos estudios, se utilizaron
55 animales de experimentación (ratones deficientes en apolipoproteína E (ApoE)) que se alimentaban con una dieta aterogénica rica en grasas (21% p/p) que contenía un 0,2% (p/p) de colesterol.

Aunque existen diferencias en la composición química entre la composición de aceite de copépodo de la presente invención y otros aceites marinos dietéticos, la notable diferencia en las actividades biológicas, como se describe en
60 la presente invención, no podría ser predicha en absoluto por cualquiera que trabaje en los efectos de los PUFA en la enfermedad coronaria. Lo más sorprendente es el hallazgo altamente inesperado de que la composición de aceite biológico de la presente invención, a diferencia del EPA/DHA concentrado, tiene una capacidad estadísticamente significativa para inhibir la formación de placas ateroscleróticas. También difiere de EPA y DHA en la forma en que afecta el patrón de deposición de lípidos en el cuerpo de los animales de experimentación. El aceite de copépodo
65 descrito en la presente invención es en sí mismo una nueva composición antiaterosclerótica.

La composición de aceite biológico de acuerdo con la presente invención también muestra un efecto significativo sobre el nivel de colesterol en la sangre. Los niveles de colesterol total en sangre son significativamente menores en animales alimentados con una dieta que comprende la composición de aceite biológico de acuerdo con la presente invención en comparación con los niveles en animales alimentados con una dieta que comprende EPA/DHA concentrada.

La composición de aceite biológico de acuerdo con la presente invención se deriva de un copépodo marino, preferiblemente un copépodo del género *Calanus*, tal como *Calanus finmarchicus*, usando materia prima recién recolectada, congelada/descongelada o deshidratada. Las composiciones oleosas de acuerdo con la invención se pueden obtener mediante cualquier procedimiento conocido por el experto en la materia, tal como, pero sin limitación, tecnología convencional de producción de aceite de pescado, procedimientos biotecnológicos, disolventes orgánicos o extracción de fluido supercrítico, o prensado en frío. Independientemente del procedimiento para obtener el aceite y el rendimiento del aceite, la composición bruta típica será la que se muestra en la Tabla 1. Para ilustrar la singularidad de la composición de aceite biológico de acuerdo con la presente invención, se muestran las composiciones correspondientes de aceite de pescado convencional (aceite de hígado de bacalao) y aceite de krill para comparación. Es evidente a partir de este análisis químico general que estos aceites son muy diferentes, en particular con respecto a sus contenidos de triglicéridos, fosfolípidos, monoésteres (ésteres de cera) y de astaxantina. Debe observarse que los ésteres de cera constituyen el componente lipídico principal en el aceite de copépodo de la presente invención, a diferencia del aceite de hígado de bacalao y el aceite de krill.

Tabla 1.

Composición química típica de tres aceites marinos diferentes: (A) Aceite de copépodo de *Calanus finmarchicus* capturado en aguas noruegas, (B) aceite de hígado de bacalao del bacalao del Atlántico *Gadus morhua*, y (C) el aceite de krill de *Euphausia superba* capturado en el océano Austral, en mg/g de aceite.

Clases de lípidos	A ¹	B ²	C ³
Triglicéridos	60	955	260
Ácidos grasos libres	80	14	13
Alcoholes grasos	62	0	0
Ácidos grasos saturados	190	160	300
Monoinsaturados	125	385	300
Poliinsaturados	270	475	387
Ácidos grasos n-3	>250	395	332
Ácidos grasos n-6	<15	50	55
Colesterol	40	12	50
Ésteres de cera (ésteres de ácidos grasos/alcohol)	650	0	0
Lípidos polares (fosfolípidos, ácidos grasos libres, alcoholes grasos libres)	200-260	18	670
Lípidos neutros (triglicéridos, ésteres de cera, colesterol)	740-800	967	310

¹ Aceite de copépodo producido por Calanus AS (www.calanus.no).

² de Falch, E., Rustad, T. y Aursand, M. Subproductos de especies de gadiformes como materia prima para la producción de lípidos marinos como ingredientes en alimentos o piensos. *Process Biochemistry* 2006; 41: 666-674.

³ De Phleger, C. F., Nelson, M. N., Mooney, B. D. and Nichols, P. D. Comparación interanual y entre especies de los lípidos, ácidos grasos y esteroides del krill antártico del área de prospección AMLR Elephant Island de los EE. UU. *Bioquímica comparada y Fisiología Parte B* 2002; 131: 733-747.

Además de la notable diferencia en la composición química bruta (Tabla 1), los tres aceites marinos utilizados aquí con fines ilustrativos, son muy diferentes también en su contenido de ácidos grasos individuales (Tabla 2).

Tabla 2. Composición de ácidos grasos de tres aceites marinos diferentes: (A) aceite de copépodo de *Calanus finmarchicus* capturado en aguas de Noruega, (B) aceite de hígado de bacalao del bacalao del Atlántico *Gadus morhua*, y (C) aceite de krill de *Euphausia superba* capturado en el Mar de Weddell, dado en mg/g de aceite.

ES 2 653 940 T3

Ácidos grasos	A ¹	B ²	C ³
14:0 FA (mirístico)	108	40	119
15:0 FA	6	0	0
16:0 FA (palmitico)	72	112	209
16:1 n-9	1.8	0	0
16:1 n-7 FA	16	61	0
16:1 n-5 FA	0	0	56
17:0 FA	1.7	0	0
16:2 n-4 FA	1.7	0	0
18:0 FA	4.5	27	15
16:3 n-3	0.8	0	0
18:1 n-9 FA (oleico)	23.4	167	170
16:4 n-3	2.2	0	0
18:1 n-7 FA	2.8	40	70
18:2 n-6 FA	10.2	19	25
18:3 n-3 FA	24.4	14	9
20:0 FA	0	0	0
18:4 n-3 FA (estearidónico, SDA)	109.7	21	51
20:1 n-11 FA	5.3	0	0
20:1 n-9 FA (gadoleico)	27	98	13
20:4 n-6 FA	2.0	8	7
20:4 n-3 FA	9.0	0	0
22:1 n-11 (+20:4 n-3 FA)	42.7	8.5	0
22:1 n-9 FA	2.7	0	0
20:5 n-3 FA (eicosapentanoico, EPA)	67.0	72	128
22:4 n-6 FA	10.5	0	0
24:1 n-9 FA	2.9	0	0
22:5 n-3 FA	3.7	20	0
22:6 n-3 FA (docosahexanoico, DHA)	54.7	188	101
<i>Suma identificada</i>	<i>612.7</i>	<i>895.5</i>	<i>973</i>

1 Aceite de Copepod producido por Calanus AS (www.calanus.no).

2 De Standal, I.B., Praël, A., McEvoy, L., Axelson, D.E., y Aursand, M. Discriminación de Aceite de Hígado de Bacalao de acuerdo con los orígenes silvestre/cultivada y geográficos por GC y 13C RMN. J. Am Oil Chem Soc 2008; 85:105-112.

3 De Hagen, W., Kattner, G., Terbrüggen, A., y Van Vleet, E.S. metabolism de lípido del krill Antártico Euphausiasuperba y sus implicaciones ecológicas. Marine Biology 2001;139:95-104.

La diferencia más notable en la composición de ácidos grasos entre los tres aceites es el contenido muy alto de ácido estearidónico (SDA) en el aceite de copépodo.

5 En la composición de aceite de la presente invención, SDA, EPA y DHA existen en gran medida como ésteres con alcoholes de cadena larga. En la Tabla 3 se muestra una composición típica de ésteres de cera y alcoholes de cadena larga en el aceite de copépodo de la presente invención.

Tabla 3. Composición típica de ésteres de cera y combinaciones de alcohol/ácido graso (% (p/p)) en aceite de copépodo derivado de *Calanus finmarchicus*.¹

10

Éster de cera	Alcohol principal/ácido graso	Alcohol menor/ácido graso	% (P/P)
30:1	14:0/16:1	16:1/14:0	0.8
32:1	16:0/16:1	14:0/18:1	1.9
32:2	16:1/16:1	14:0/18:2	0.6
32:4	14:0/18:4	16:0/16:4	0.9
34:1	16:0/18:1	14:0/20:1	-
	20:1/14:0		17.6
34:2	16:0/18:2	16:1/18:1	0.9
34:3	16:0/18:3	16:1/18:2	-
34:4	16:0/18:4	16:1/18:3	2.7
34:5	14:0/20:5	16:1/18:4	0.4
36:1	20:1/16:0	16:0/20:1	-
	22:1/14:0		21.9
36:2	20:1/16:1	16:1/20:1	2.3
36:5	16:0/20:5	20:1/16:4	1.1
36:6	16:1/20:5	14:/22:6	0.3
38:1	22:1/16:0	16:0/22:1	2.8
38:2	22:1/16:1	20:1/18:1	3.9
38:3	20:1/18:2	22:1/16:2	0.4
38:4	20:1/18:3	22:1/16:3	0.9
38:5	20:1/18:4	22:1/16:4	5.4
38:6	16:0/22:6	16:1/22:5	-
40:2	20:1/20:1	22:1/18:1	5.9
40:3	22:1/18:2		0.7
40:5	22:1/18:4	20:1/20:4	4.7
40:6	20:1/20:5		1.5
42:2	22:1/20:1	20:1/22:1	12.7
42.6	22:1/20:5	20:1/22:5	1.5

Éster de cera	Alcohol principal/ácido graso	Alcohol menor/ácido graso	% (P/P)
42:7	20:1/22:6		2.0
44:2	22:1/22:1		4.9
44:7	22:1/22:6		0.6
1 Compilado de Graeve, M. y Kattner, G. Diferencias específicas de especie en ésteres de cera intactos de <i>Calanus hyperboreus</i> y <i>C. finmarchicus</i> del Estrecho de Fram - Mar de Groenlandia. Marine Chemistry 1992; 39:269-281.			

En conclusión, el aceite de copépodo de la presente invención difiere notablemente del aceite de pescado y el aceite de krill típicos tanto en la composición química bruta como en el contenido de ácidos grasos. Sin embargo, al igual que otros aceites marinos, comprende EPA y DHA.

A pesar de su alto contenido de éster de cera, la composición de aceite de la presente invención es un líquido de baja viscosidad y de flujo completamente libre a temperatura ambiente. Una de las razones para esto es que los alcoholes de los ésteres de cera están dominados por alcoholes monoinsaturados de longitud media, típicamente 80% o más (principalmente C20:1 y C22:1).

Dependiendo de los procedimientos analíticos usados, el contenido típico de éster de cera de la composición de aceite de la presente invención es 70-90%, mientras contiene 10-20% de otros componentes tales como ácidos grasos libres, triacilglicerol, esteroides y pigmentos. En ciertas aplicaciones, puede ser ventajoso o incluso deseable eliminar ácidos grasos libres y otros componentes mediante procedimientos adecuados conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, en una realización de la invención preestablecida, la composición de aceite puede contener hasta 100% de éster de cera.

Se ha encontrado que el aceite de copépodo, según la presente invención, tiene efectos biológicos marcadamente diferentes que una preparación concentrada de EPA y DHA usada en la misma concentración que en el aceite de copépodo. Particularmente, la composición según la presente invención evita la formación de placa aterosclerótica y, por lo tanto, es útil en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. La composición según la presente invención también tiene un efecto sobre el nivel total de colesterol en la sangre y es útil en la prevención y el tratamiento de hipercolesterolemia y niveles elevados de colesterol en la sangre.

La composición de aceite biológico de acuerdo con la presente invención comprende desde 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, en peso hasta 75%, 80%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 100% en peso de ésteres de cera. Preferiblemente la composición de aceite biológico comprende desde 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89% en peso hasta 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, 99.5%, 100% en peso de ésteres de cera.

Además, la composición de aceite biológico de la presente invención comprende desde 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10% en peso hasta 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19%, 20% en peso de SDA.

El contenido de EPA en la composición biológica de aceite puede ser del 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, en peso hasta 8%, 9%, 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15% en peso. La composición puede comprender 2%, 3%, 4%, 5% en peso hasta 6%, 7%, 8%, 9%, 10% en peso de DHA.

En una realización, la presente invención proporciona una composición de aceite biológico en la que la composición comprende 20-100% en peso de ésteres de cera, preferiblemente 70-100% en peso de ésteres de cera, y en donde la composición comprende 5-20% en peso de ácido estearidónico (SDA) para uso como un medicamento para la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares. La composición de aceite puede aislarse de un copépodo marino, preferiblemente uno del género *Calanus*, y más preferiblemente dicho copépodo es de la especie *Calanus finmarchicus*.

En otras realizaciones de la invención, la presente invención proporciona una composición de aceite biológico para el uso como medicamento en la prevención y el tratamiento de aterosclerosis, hipercolesterolemia y niveles elevados de colesterol en la sangre.

En otra realización más, la presente invención proporciona una composición de aceite que comprende 3-15% en peso de EPA y 2-10% en peso de DHA.

La composición de la presente invención puede comprender 20-100% en peso de ésteres de cera, preferiblemente 70-100% en peso de ésteres de cera, 5-20% en peso de SDA, 3-15% en peso de EPA y se proporciona 2-10% en peso de DHA.

En otra realización de la presente invención, se proporciona una composición de aceite que comprende alcoholes grasos y SDA, DHA y EPA como monoéster con alcoholes grasos.

5 En una realización adicional, la presente invención proporciona una composición de aceite que comprende 1000-4000 ppm de astaxantina, principalmente en forma esterificada.

En aún otra realización de la presente invención, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende una composición de aceite como se describió anteriormente.

10 La formulación según la invención que comprende una composición de aceite como se describió anteriormente puede proporcionarse en cápsulas, tabletas, emulsiones o tónicos y puede comprender uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en adyuvantes, antioxidantes, emulsionantes, tensioactivos y vehículos.

15 La presente invención proporciona además el uso de una composición de aceite como se describió anteriormente para la fabricación de un producto para la prevención o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular, particularmente aterosclerosis, hipercolesterolemia y niveles elevados de colesterol en la sangre.

20 La presente composición se puede utilizar en un procedimiento para la profilaxis o el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, particularmente aterosclerosis, hipercolesterolemia y niveles elevados de colesterol en sangre en el que el individuo que necesita dicho tratamiento profiláctico o curativo se administra por vía oral con una composición farmacéutica que comprende una composición de aceite biológico en donde la composición comprende 20-100% en peso de ésteres de cera, preferiblemente 50-100% en peso de ésteres de cera, más preferiblemente 70-100% en peso de ésteres de cera, y en donde un nivel de dosificación diario en el rango de 4-100 mg/kg de peso corporal. .

la presente invención se utiliza en un procedimiento en el que la composición farmacéutica administrada comprende 5-20% en peso de SDA. La presente composición se puede utilizar en un procedimiento en el que la composición farmacéutica comprende 3-15% en peso de EPA y 2-10% en peso de DHA.

30 La presente composición se puede utilizar en un procedimiento en el que la composición farmacéutica administrada comprende 20-100% en peso de ésteres de cera, preferiblemente se proporciona 70-100% en peso de ésteres de cera, 5-20% en peso de SDA, 3-15% en peso de EPA y 2-10% en peso de DHA.

35 La presente composición se puede utilizar en un procedimiento en el que se proporciona la composición farmacéutica administrada que comprende alcoholes grasos y SDA, DHA y EPA como monoéster con alcoholes grasos.

40 La presente composición se puede utilizar en un procedimiento en donde se proporciona la composición farmacéutica administrada que comprende alcoholes grasos, SDA, DHA y EPA como monoéster con alcoholes grasos.

La presente composición se puede utilizar en un procedimiento en donde la composición farmacéutica administrada comprende 1000-4000 ppm de astaxantina, principalmente en forma esterificada. La siguiente parte experimental y ejemplos no limitativos ilustran y documentan la presente invención.

Ejemplos

Experimental

50 Cuando se estudia la eficacia preventiva de cualquier fármaco candidato o ingrediente dietético en la enfermedad cardíaca coronaria, los análisis de punto final más confiables son las manifestaciones reales de la enfermedad, como, por ejemplo, la formación de placas ateroscleróticas. Los efectos sobre los parámetros sanguíneos considerados como indicativos del riesgo de desarrollo de la enfermedad son por supuesto importantes para evaluar el modo de acción de los nuevos candidatos a fármacos antiaterogénicos, pero es preferible relacionar dichos análisis sanguíneos con los datos de eficacia sobre la manifestación de la enfermedad. Esta ha sido la filosofía en los estudios que constituyen la base de la presente invención.

60 Los efectos biológicos del aceite de copépodo de esta invención se registraron en ratones deficientes en apolipoproteína E (*ApoE*). Los ratones de esta cepa se usan rutinariamente para determinar los efectos de los componentes dietéticos sobre el desarrollo de inflamación vascular y placas ateroscleróticas, ya que desarrollan lesiones ateroscleróticas de acuerdo con un patrón muy similar al de los humanos, y son animales modelo útiles para estudios bioquímicos y celulares procesos implicados en la iniciación, progresión y regresión de la enfermedad aterotrombótica. Los estudios se llevaron a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad de Tromsø (Noruega). Se instalaron tres grupos de diez ratones hembra a la edad de 7 semanas y se alimentaron con 3 tratamientos diferentes de dieta (ver a continuación) durante 13 semanas.

Los ratones fueron alimentados *ad libitum* con una dieta experimental alta en grasas (21% p/p) y colesterol (0.2% p/p), ricos en carbohidratos biodisponibles (azúcar/dextrina) y con una alta proporción de grasa saturada (sniff Spezialdiäten GmbH, oler EF Clinton/Cybulsky (II) mod.). La composición de esta dieta promueve el desarrollo de la obesidad y de las lesiones ateroscleróticas. A la dieta se añadió ya sea 1% (p/p) del aceite de copépodo de la presente invención (Dieta 1) o 0.1223% (p/p) de un concentrado de EPA/DHA (Dieta 2), produciendo dos alimentos experimentales con igual contenido de EPA y DHA. El contenido de colesterol de estas dos dietas y de la dieta control (Dieta 3) sin aceite agregado se ajustó a 0.20% al agregar colesterol, teniendo en cuenta el colesterol presente en los ingredientes del alimento y en el propio aceite del copépodo. La composición de las dietas experimentales se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4. Dieta experimental para ratas y ratones con alto contenido de grasa/colesterol (tipo sniff® EF Clinton/Cybulsky (II) mod.)¹ con perfil de ingrediente y nutricional para los tres grupos de prueba

Ingredientes	Dieta 1 Preparación de aceite de Copépodo	Dieta 2 concentrado EPA/DHA	Dieta 3 Control
Sacarosa , %	33.0876	33.0476	32.5867
Grasa láctea, %	19.9692	19.9692	19.9692
Caseína (sin vitaminas), %	19.4700	19.4700	19.4700
Maltodextrina, %	9.9846	9.9846	9.9846
Almidón de maíz, %	4.9923	4.9923	4.9923
Celulosa en polvo, %	4.9923	4.9923	4.9923
AIN-76 Mezcla Mineral, %	3.4946	3.4946	3.4946
Aceite de Calanus-841, %	1.0000	-	-
Omacor Oil-842, %	-	0.1223	-
AIN-76A Mezcla de Vitaminas, %	0.9985	0.9985	0.9985
Aceite de Maíz, %	0.9985	0.9985	1.9985
Carbonato de calcio, %	0.3994	0.3994	0.3994
DL- Metionina, %	0.2995	0.2995	0.2995
bitartrato de colina , %	0.1997	0.1997	0.1997
Colesterol, %	0.1498	0.1498	0.1498
Etoxiquina, %	0.0040	0.0040	0.0040
Perfil Nutricional			
Proteína, %	17.4	17.4	17.4
Grasa, %	21.0	21.0	21.0
Colesterol, ppm	2027	2027	2027
Carbohidratos, %	48.9	48.9	48.4
Fibra (max), %	5.0	5.0	5.0
Energía, kcal/g	4.48	4.56	4.55
De			
Proteína, %	15.3	15.3	15.4
De			

Ingredientes	Dieta 1 Preparación de aceite de Copépodo	Dieta 2 concentrado EPA/DHA	Dieta 3 Control
grasa (extracto de éter), %	41.6	41.7	41.8
Carbohidratos, %	43.0	43.0	42.8
¹ Producido por ssniff Spezialdiäten GmbH (www.ssniff.de).			

La preparación de aceite de copépodo fue un producto experimental proporcionado por Calanus AS, Tromsø, Noruega (www.calanus.no). El concentrado de EPA/DHA utilizado como sustancia de prueba de referencia fue el fármaco reductor de lípidos Omacor (Pronova Biopharma ASA, P.O. Box 420, NO-1327 Lysaker, Noruega). Según el fabricante (www.pronova.com), este producto contiene 90% de ésteres etílicos de omega-3 de EPA (460 mg/g) y DHA (380 mg/g) y se fabrica utilizando aceite de pescado como material de partida.

Los ratones experimentales se monitorizaron diariamente y se pesaron a intervalos regulares. Se tomaron muestras de suero sanguíneo en diferentes puntos para el posterior análisis de diversos parámetros sanguíneos, incluidos lípidos y ácidos grasos. Los ratones se sacrificaron al final del experimento, y todos los órganos relevantes se disecaron siguiendo procedimientos estándar. Después de la disección de los ratones sacrificados, las aortas se aislaron, se limpiaron y se abrieron longitudinalmente, se fijaron a un cartón blanco y se fijaron en formalina al 10% durante al menos 24 horas. Las aortas se tiñeron con Oil Red O (Sigma) antes del análisis. Después del enjuague, las aortas se montaron en portaobjetos microscópicos, y se adquirieron imágenes (2.700 ppp) utilizando un escáner SprintScan 35 (Polaroid, Cambridge, Massachusetts, EE. UU.) Equipado con GeoScan Enabler (Meyer Instruments, Houston, Texas, EE. UU.). Las imágenes se analizaron para áreas positivas, adoptando la metodología de análisis de imagen y calibración de última generación. El área total de la lesión se cuantificó en cada grupo mediante morfometría cuantitativa asistida por ordenador como se describe por N. V. Guevara et al. (La ausencia de p53 acelera la aterosclerosis al aumentar la proliferación celular in vivo. *Nature Medicine* 1999; 5: 335-339).

Efectos biológicos

i) Aterosclerosis

Se ha encontrado que el aceite de copépodo de la presente invención tiene efectos biológicos marcadamente diferentes que una preparación concentrada de EPA y DHA usada en la misma concentración que en el aceite de copépodo. Este fue un hallazgo altamente inesperado, considerando el consenso abrumador entre los expertos en la materia, de que los efectos positivos en la salud de los aceites marinos están asociados con su contenido de EPA y DHA, exclusivamente.

Los resultados se muestran en la Tabla 5 y en las Figs. 1-3.

El efecto del aceite de copépodo de la presente invención y del concentrado de EPA/DHA sobre la formación de placa aterosclerótica en las aortas de ratones hembra se muestra en la Tabla 5. La preparación de aceite de copépodo tuvo un efecto sorprendente y estadísticamente muy significativo sobre la reducción de la formación de placa tanto en el arco aórtico ($p=0.002$) como en la aorta total ($p=0.001$) en comparación con el control. Además, el concentrado de EPA/DHA redujo la formación de placa en comparación con el control, pero el efecto no cumplió los requisitos de significación estadística.

Tabla 5. El efecto de una preparación de aceite de copépodo y de EPA/DHA concentrado en la formación de placa aterosclerótica¹ en los segmentos arco aórtico ascendente, torácico, abdominal y perirrenal de la aorta en ratones

Región objetivo	Dieta 1 preparación de aceite de Copépodo (n=10)	Dieta 2 concentrado de EPA/DHA (n=10)	Dieta 3 Control (n=10)
Arco Aortico (A)	15.1	18.0	22.0
Torácico (B)	7.93	9.51	12.16
Abdominal (C)	1.93	2.52	3.94
Perirenal (D)	1.36	2.27	1.94

Región objetivo	Dieta 1 preparación de aceite de Copépodo (n=10)	Dieta 2 concentrado de EPA/DHA (n=10)	Dieta 3 Control (n=10)
Aorta total (B-D)	4.59	5.87	7.22
¹ Las figuras representan el área de lesión promedio en porcentaje del área total de cada región objetivo en el momento del sacrificio. Ver FIG. 1 para la subdivisión de regiones objetivo (A-D) de la aorta.			

El crecimiento de los ratones se muestra en la FIG. 2. Aunque los ratones crecieron más rápido con alimento enriquecido con aceite de copépodo, y prosperaron bien con esa dieta, esta aparente diferencia no cumple con los requisitos de significación estadística. No hubo diferencia entre los grupos en la ingesta de alimento y no se observaron efectos negativos en animales alimentados con dietas experimentales.

El peso de diferentes órganos se muestra en la FIG. 3. Aunque hubo un mayor nivel de grasa depositada en el tejido adiposo blanco (WAT) en ratones alimentados con aceite de copépodo, la diferencia no fue estadísticamente significativa. Sin embargo, es una observación digna de mención que el aceite de copépodo de la presente invención reduce la formación de placa mientras que se depositan más lípidos en los tejidos de almacenamiento de lípidos.

ii) Nivel de colesterol en la sangre

El aceite de copépodo tiene un efecto antiaterosclerótico notablemente más pronunciado que el EPA y el DHA purificados a la misma concentración que en este aceite. Los mecanismos implicados en este efecto del aceite de copépodo pueden, en consecuencia, ser aditivos a los efectos de EPA y DHA o ser completamente diferentes.

Los resultados que se muestran en la Tabla 6 ilustran que el Aceite de Calanus difiere de EPA y DHA también con respecto al efecto sobre el nivel de colesterol en la sangre en los animales de experimentación. Mientras que el nivel de colesterol en la sangre de los animales alimentados con la dieta EPA/DHA fue el mismo que en los animales control después de 13 semanas de alimentación, el nivel de colesterol en la sangre del grupo de Aceite de Calanus fue notablemente inferior. Ambos grupos de tratamiento parecen tener un ligero, y similar, efecto de disminución de triglicéridos en comparación con el control.

Tabla 6. Efectos de los suplementos dietéticos sobre el peso corporal, la ingesta de alimentos y los lípidos plasmáticos en ratones hembra con deficiencia de apoE después de 13 semanas de tratamiento, como valores medios +/-SEM.

Ratones hembra deficientes en apoE	Dieta 1 Composición de aceite de Copépodo (n=10)	Dieta 2 concentrado de EPA/DHA (n=10)	Dieta 3 Control (n=10)
Peso del cuerpo (g)			
Inicial	18.4 +/- 0.3	18.7 +/- 0.3	18.6 +/- 0.4
Final	38.9 +/- 1.2	37.7 +/- 1.6	34.6 +/- 1.2
Ingesta de alimento (g/día)	2.72 +/- 0.05	2.72 +/- 0.07	2.77 +/- 0.04
Colesterol total (mmol/L)	12.3 +/- 1.25	15.9 +/- 1.28	16.1 +/- 1.25
Triacilglicerol (mmol/L)	0.82 +/- 0.05	0.84 +/- 0.07	0.96 +/- 0.05

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición de aceite biológico que comprende 20-100% en peso de ésteres de cera, preferiblemente 70-100% en peso de ésteres de cera y en donde la composición comprende 5-20% en peso de ácido estearidónico (SDA) para uso como un medicamento para la prevención o el tratamiento de una enfermedad cardiovascular.
2. La composición de aceite biológico de acuerdo con la reivindicación 1 para uso como un medicamento para la prevención o tratamiento de aterosclerosis.
- 10 3. La composición biológica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso como un medicamento para la prevención o tratamiento de hipercolesterolemia.
4. La composición biológica de acuerdo con la reivindicación 1 para uso como un medicamento para la prevención o tratamiento de niveles de colesterol sanguíneos elevados.
- 15 5. La composición de aceite biológico para uso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la composición comprende 3-15 % en peso de ácido eicosapentanoico (EPA) y 2-10% en peso de ácido docosahexanoico (DHA).
- 20 6. La composición de aceite biológico para uso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 5 en donde la composición comprende alcoholes grasos y SDA, DHA y EPA como monoésteres con alcoholes grasos.
7. La composición de aceite biológico para uso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 6 en donde la composición contiene 1000-4000 ppm de astaxantina.
- 25 8. La composición de aceite biológico para uso de acuerdo con alguna de las reivindicaciones 1 a 7 en donde dicha composición se aísla de un copépodo.
9. La composición de aceite biológico para uso de acuerdo con la reivindicación 8 en donde dicho copépodo es del género *Calanus*.
- 30 10. La composición de aceite biológico para uso de acuerdo con la reivindicación 9 en donde dicho copépodo es de las especies *Calanus finmarchicus*.
- 35 11. Una formulación farmacéutica que comprende una composición de aceite biológico de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para uso en terapia.
12. Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 11 suministrada en cápsulas, tabletas, emulsiones o tónicos.
- 40 13. Una formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 12 que comprende uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste de adyuvantes, antioxidantes, emulsificantes, tensioactivos y portadores.

Figura 1

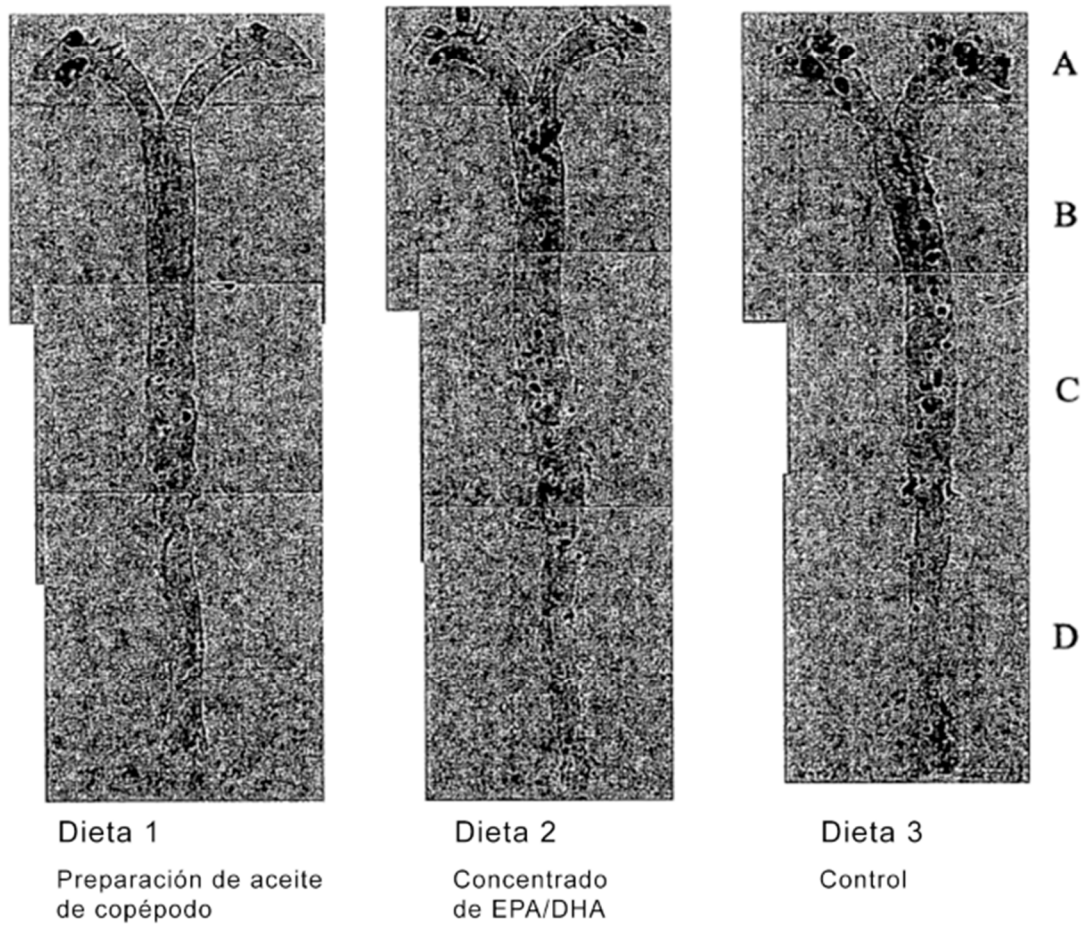


Figura 2

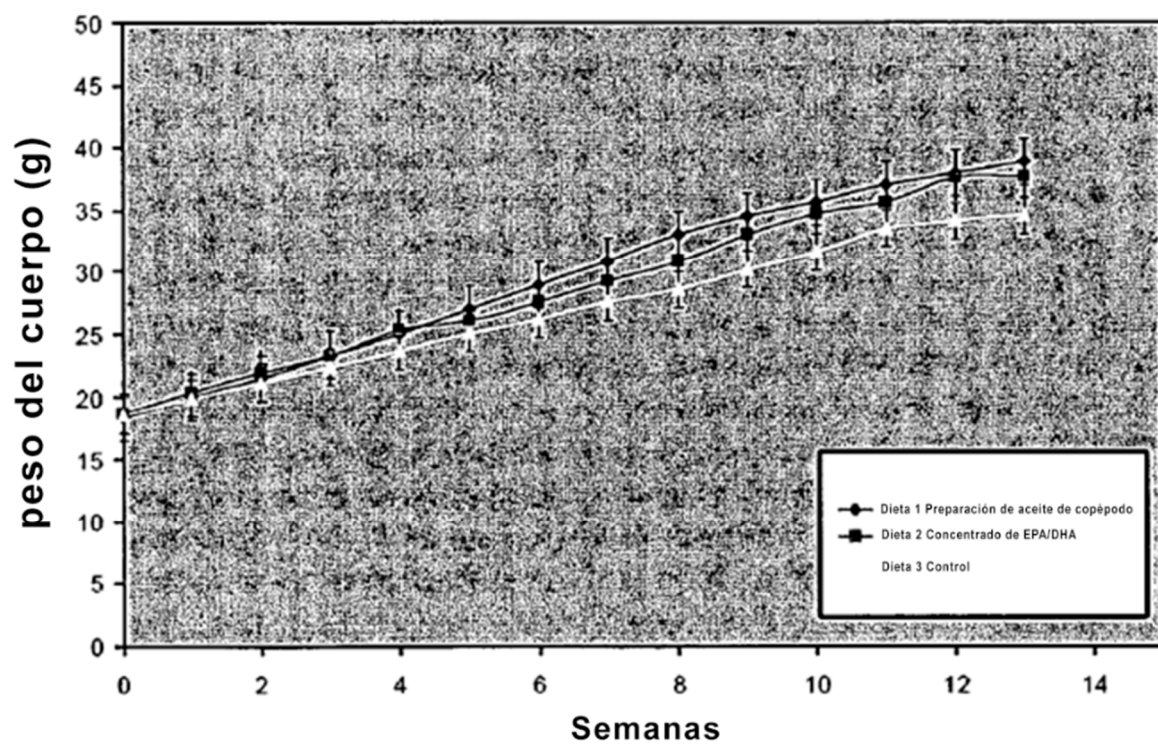


Figura 3

