

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 685 703**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/19** (2006.01)  
**A61K 31/202** (2006.01)  
**A61K 31/366** (2006.01)  
**A61K 45/06** (2006.01)  
**A61K 9/48** (2006.01)  
**A61P 9/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.01.2013 PCT/US2013/020398**

87 Fecha y número de publicación internacional: **11.07.2013 WO13103902**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.01.2013 E 13733671 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.07.2018 EP 2800563**

54 Título: **Composiciones enriquecidas en DPA de ácidos grasos omega-3 poliinsaturados en forma de ácido libre**

30 Prioridad:

**06.01.2012 US 201261583796 P**  
**25.06.2012 US 201261664047 P**  
**10.07.2012 US 201261669940 P**  
**07.08.2012 US 201261680622 P**  
**05.10.2012 US 201261710517 P**  
**12.10.2012 US 201261713388 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**10.10.2018**

73 Titular/es:

**OMTHERA PHARMACEUTICALS INC. (50.0%)**  
**1800 Concord Pike**  
**Wilmington, DE 19803, US y**  
**CHRYSALIS PHARMA AG (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MAINES, TIMOTHY, J.;**  
**MACHIELSE, BERNARDUS N M.;**  
**MEHTA, BHARAT M.;**  
**WISLER, GERALD;**  
**DAVIDSON, MICHAEL y**  
**WOOD, PETER RALPH**

74 Agente/Representante:

**CAMPELLO ESTEBARANZ, Reyes**

ES 2 685 703 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

Composiciones enriquecidas en DPA de ácidos grasos omega-3 poliinsaturados en forma de ácido libre

## 5 1. ANTECEDENTES

Las composiciones farmacéuticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 ("ω-3" o "n-3") (PUFA) se están desarrollando para tratar diversas indicaciones clínicas.

10 Estos productos, que proceden de fuentes naturales, típicamente aceites de pescado, son composiciones heterogéneas y comprenden diversas especies de PUFA omega-3, PUFA omega-6 y otros componentes minoritarios, incluyendo ácidos grasos monoinsaturados y saturados. Los efectos clínicos observados típicamente se atribuyen a la composición en su conjunto, aunque se cree que las más prevalentes de las especies de PUFA presentes en la mezcla, habitualmente EPA y DHA, contribuyen a una porción sustancial del efecto clínico observado. Dado que son composiciones heterogéneas, los productos se definen para incluir determinadas especies de ácidos grasos poliinsaturados obligados, cada una con un porcentaje de intervalo de tolerancia definido. Las composiciones se definen adicionalmente para limitar determinados componentes no deseados, tanto los que se originan en la fuente natural, tales como determinados contaminantes ambientales, como los creados potencialmente en el proceso de refinado.

20 La composición óptima es probable que difiera entre las indicaciones clínicas previstas. No obstante, incluso para la primera indicación clínica aprobada, el tratamiento de la hipertrigliceridemia grave (TG >500 mg/dl), la composición óptima todavía no se ha definido.

25 Por lo tanto, la primera composición farmacéutica aprobada para el tratamiento de la hipertrigliceridemia grave comprende la especie de PUFA omega-3 ácido eicosapentanoico ("EPA") y ácido docosahexanoico ("DHA") en forma de ésteres etílicos en porcentajes en peso de aproximadamente 46:38 (EPA:DHA), representando EPA y DHA en conjunto aproximadamente el 84 % de todas las especies de PUFA en la composición. Por el contrario, el producto más recientemente aprobado, Vascepa® (previamente conocido como AMR101), que está aprobado para la misma indicación clínica, tiene una pureza >96 % de EPA en la forma de éster etílico, sustancialmente sin DHA. El producto nutracéutico, OMAX3, vendido como complemento dietético y promocionado en parte para disminuir los niveles de triglicéridos, comprende EPA y DHA en una relación en peso de aproximadamente 4,1:1, en donde EPA y DHA están, asimismo, en forma de éster etílico, teniendo la formulación más del 84 % de EPA y DHA en peso y más del 90 % de ácidos grasos omega-3 en peso.

35 Estas amplias variaciones en la composición reflejan una continua incertidumbre en lo que respecta a la composición óptima para esta indicación clínica.

40 La incertidumbre se debe, en parte, a los competitivos objetivos clínicos. Por ejemplo, se sabe que en las especies de PUFA omega-3, DHA es más potente en la disminución de los niveles séricos de triglicéridos que EPA, pero se sabe que tiene una mayor tendencia a aumentar los niveles de LDL, Mori et al., Am. J. Clin. Nutr. 71:1085-94 (2000), Grimsgaard et al., Am. J. Clin. Nutr. 66:649 -59 (1997); se ha pensado que la elevación de LDL se ve clínicamente desfavorecida en sujetos con elevado riesgo cardiovascular. Aunque clínicamente se suele desear una disminución de la agregación plaquetaria y la trombogénesis por los PUFA omega-3, el aumento potencial del tiempo de sangrado ha hecho que algunos propongan añadir una determinada cantidad de la especie de PUFA omega-6, ácido araquidónico ("AA"), a las composiciones farmacéuticas que son ricas en PUFA omega-3. Véase la publicación previa a la concesión de Estados Unidos n.º 2010/0160435.

50 La dificultad en la definición de una composición óptima también se debe, en parte, a la interconversión enzimática entre ciertas especies de PUFA omega-3, y a la competición entre los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 para las enzimas compartidas en sus respectivas vías biosintéticas de PUFA de cadena media dietéticos (véase la Figura 1).

55 Un reto adicional en el diseño de una composición óptima es la variación en la biodisponibilidad de las composiciones PUFA administradas por vía oral. Se sabe que la absorción de los PUFA en forma de ésteres etílicos, por ejemplo, depende de la presencia de lipasa pancreática, que se libera en respuesta a grasas ingeridas. Por lo tanto, la absorción de ésteres etílicos de PUFA es ineficiente, y está sujeta a una sustancial variación, tanto entre los sujetos como en cualquier sujeto individual, en función de la ingesta dietética de grasas. Véase Lawson et al., "Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters", Biochem Biophys Res

Commun. 152:328-35 (1988); Lawson et al., Biochem Biophys Res Commun. 156:960-3 (1988). La absorción se reduce particularmente en sujetos con dietas bajas en grasas, una dieta dirigida a los sujetos con niveles séricos elevados de triglicéridos o enfermedad cardiovascular.

5 Para cualquier composición farmacéutica de PUFA específicamente deseada, el proceso de refinado está diseñado para producir un producto final que tenga componentes de ácidos grasos obligados dentro de intervalos de tolerancia en porcentaje predefinidos y para limitar determinados componentes no deseados a niveles inferiores a determinados límites de tolerancia predefinidos, con un rendimiento suficiente como para hacer que el proceso sea viable comercialmente y ambientalmente sostenible. Las diferencias en la composición final deseada indican  
10 diferencias en el proceso de refinado.

Sin embargo, diversas etapas conocidas del proceso presentan intercambios que dificultan la adaptación específica de la composición y la optimización del proceso de refinado. Por ejemplo, la formación de complejos de inclusión de urea (clatración) en presencia de etanol a menudo se usa para eliminar los ácidos grasos de cadena larga tanto  
15 saturados como monoinsaturados, lo que aumenta la proporción relativa de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga deseados en la composición resultante. Demasiada poca urea reduce el enriquecimiento de PUFA omega-3 de cadena larga. No obstante, el exceso de urea puede conducir a la concentración de componentes no deseados, y tiene el potencial de conducir, a cualquier temperatura y tiempo de reacción dados, a un aumento de la producción de carbamato de etilo, un carcinógeno que no está permitido por encima de  
20 determinados límites bajos definidos. No obstante, las alternativas existentes a la formación de complejos de urea presentan otras dificultades.

El documento US5502077 describe composiciones de ácidos grasos que comprenden al menos el 80 % en peso de ácidos grasos omega-3.  
25

Por lo tanto, existe la necesidad de mejores composiciones farmacéuticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, especialmente para el tratamiento de la hipertrigliceridemia y dislipidemias mixtas, y de procesos mejorados para refinar dichas composiciones a partir de aceite de pescado.

## 30 2. RESUMEN

En un primer aspecto, la presente descripción proporciona composiciones farmacéuticas enriquecidas en DPA de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre. El enriquecimiento en el contenido en DPA fue una consecuencia imprevista y no deseada del proceso de producción a escala comercial. Se ha demostrado que estas  
35 composiciones farmacéuticas enriquecidas en DPA tienen una eficacia farmacológica y clínica excepcional en experimentos *in vitro* y en ensayos clínicos en seres humanos.

Por consiguiente, en otro aspecto, las composiciones farmacéuticas se proporcionan para su uso en métodos de tratamiento. En una serie de realizaciones de tratamiento, las composiciones farmacéuticas se proporcionan para su  
40 uso en el tratamiento de la hipertrigliceridemia grave (TG >500 mg/dl). En otra serie de realizaciones de tratamiento, las composiciones farmacéuticas se proporcionan para su uso en el tratamiento de hipertrigliceridemia (200 mg/dl - 500 mg/dl) mediante la administración como adyuvante de una estatina y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. También se describen en el presente documento métodos para fabricar las composiciones farmacéuticas a escala comercial, incluyendo métodos que incluyen una etapa de formación de  
45 complejos de urea en la que los lotes restringidos en términos de composición de la materia prima intermedia transesterificada se someten a una etapa de formación de complejos de urea usando cantidades de urea dentro de los intervalos determinados por un algoritmo de proceso nuevo.

## 50 3. BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra las vías humanas conocidas para la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 a partir de ácidos grasos esenciales de cadena intermedia (media).

La Figura 2 es un diagrama de flujo de un proceso ejemplar para preparar una materia prima intermedia de ésteres etílicos de PUFA.

55 La Figura 3A representa la purificación media relativa de clases de ácidos grasos por una etapa de formación de complejos de urea en la que las cantidades de urea determinadas por el algoritmo se añaden a la materia prima intermedia definida por la composición de ésteres etílicos de PUFA.

La Figura 3B ilustra la purificación media diferencial de especies individuales de ésteres etílicos de PUFA omega-3 y omega-6 cuando se añaden cantidades de urea determinadas por el algoritmo a la materia prima

intermedia definida por la composición de ésteres etílicos de PUFA.

La Figura 4 es un diagrama de flujo del tratamiento que ilustra el diseño del estudio clínico ECLIPSE descrito adicionalmente en el Ejemplo 7.

5 La Figura 5 compara la biodisponibilidad del total de EPA + DHA (cambio ajustado con respecto al valor inicial) tras una única dosis (4 g) de Lovaza® durante los periodos de dieta rica en grasas y baja en grasas.

La Figura 6 compara la biodisponibilidad del total de EPA + DHA (cambio ajustado con respecto al valor inicial) tras una única dosis (4 g) de Lovaza® ("EE-FA") o Epanova®, una composición enriquecida en DPA de PUFA omega-3 en forma de ácido libre ("FFA"), durante el periodo de dieta rica en grasas.

10 La Figura 7 compara las concentraciones plasmáticas totales de EPA + DHA (cambio ajustado con respecto al valor inicial) tras una única dosis (4 g) de Lovaza® o Epanova® durante el periodo de dieta baja en grasas.

La Figura 8 compara las concentraciones plasmáticas totales de EPA (cambio ajustado con respecto al valor inicial) tras una única dosis (4 g) de Lovaza® o Epanova® durante el periodo de dieta baja en grasas.

15 La Figura 9 compara las concentraciones plasmáticas totales de DHA (cambio ajustado con respecto al valor inicial) tras una única dosis (4 g) de Lovaza® o Epanova® durante el periodo de dieta baja en grasas.

Las Figuras 10A y 10B presentan respuestas AUC<sub>0-t</sub> de sujetos individuales durante las dietas bajas en grasas y ricas en grasas expresadas como la relación (%) entre AUC<sub>0-t</sub> de bajas en grasas y AUC<sub>0-t</sub> de ricas en grasas. Las relaciones negativas no se han representado.

20 La Figura 11 es un diagrama de flujo del tratamiento que ilustra el diseño del ensayo de biodisponibilidad comparativa de 14 días que se describe adicionalmente en el Ejemplo 8 (la línea temporal no está a escala).

La Figura 12A representa las concentraciones medias totales sin ajustar de EPA+DHA frente al tiempo (escala lineal) para el tratamiento con Lovaza® frente al tratamiento con Epanova® en el ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días que se describe adicionalmente en el Ejemplo 8.

25 La Figura 12B es un histograma que muestra la diferencia en EPA + DHA sin ajustar (nmol/ml) para los puntos entre paréntesis en la Figura 12A.

La Figura 13 representa las concentraciones medias de EPA + DHA total en plasma ajustadas con respecto al valor inicial de EPA + DHA frente al tiempo (escala lineal) para el tratamiento con Lovaza® frente al tratamiento con Epanova® en el estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

30 La Figura 14A es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial al estado estable en los niveles en sangre sin ajustar para EPA + DHA en los brazos de Lovaza® y Epanova® del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

35 La Figura 14B es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial al estado estable en C<sub>avg</sub> sin ajustar para EPA + DHA en los brazos de Lovaza® y Epanova® del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

La Figura 15A es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial al estado estable para los niveles en sangre total de DHA en los brazos de Lovaza® y Epanova® del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

40 La Figura 15B es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial al estado estable para los niveles C<sub>avg</sub> de DHA en la cohorte de Epanova® en comparación con la cohorte de Lovaza® en el estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

La Figura 16A es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial al estado estable para los niveles de EPA totales en los brazos de Lovaza® y Epanova® del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

45 La Figura 16B representa los aumentos del valor inicial al estado estable para los niveles C<sub>avg</sub> de EPA en las cohortes de Epanova® y Lovaza® en el estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

La Figura 17 proporciona un diagrama de flujo de tratamiento que ilustra el diseño del estudio EVOLVE, descrito adicionalmente en el Ejemplo 10.

50 La Figura 18 resume el diseño del estudio EVOLVE con mayor detalle, identificando además los tiempos de las visitas del estudio.

La Figura 19 muestra la disposición de los sujetos en el ensayo EVOLVE.

Las Figuras 20A - 20D presentan los niveles plasmáticos promedio iniciales y al final del tratamiento ("EOT") (en µg/ml) para EPA (Figura 20A), DHA (Figura 20B), DPA (Figura 20C) y AA (Figura 20D), para cada uno de los brazos de tratamiento en el ensayo EVOLVE.

55 La Figura 20E compara los niveles promedio inicial y EOT de EPA para el ensayo ECLIPSE descrito en el Ejemplo 7, el estudio de biodisponibilidad de 14 días descrito en el Ejemplo 8, un estudio de interacción fármaco-fármaco de estatinas ("ESTATINA DDI") descrito en el Ejemplo 11, cada brazo de tratamiento, así como el brazo de control del ensayo EVOLVE descrito en el Ejemplo 10, y los valores indicados anteriormente en la bibliografía para el ensayo JELIS ("JELIS") no relacionado, que usó una composición de

omega-3 diferente.

Las Figuras 21A - 21D representan los niveles plasmáticos de la mediana iniciales y al final del tratamiento ("EOT") (en  $\mu\text{g/ml}$ ) para EPA (Figura 21A), DHA (Figura 21B), DPA (Figura 21C), y AA (Figura 21D) en el ensayo EVOLVE.

5 Las Figuras 22A y 22B representan el cambio del valor inicial a EOT en los niveles plasmáticos absolutos (en  $\mu\text{g/ml}$ ) de AA, DHA, EPA, y DPA, para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE. La Figura 22A representa cambios promedio; la Figura 22B representa cambios de la mediana.

La Figura 23A representa un cambio promedio del valor inicial a EOT, como porcentaje del valor inicial, para AA, DHA, EPA, y DPA en cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE. La Figura 23B  
10 representa el cambio porcentual de la mediana del valor inicial a EOT.

Las Figuras 24A - 24I representan los niveles plasmáticos promedio iniciales y EOT (en  $\text{mg/dl}$ , con la excepción de LpPLA2, mostrado en  $\text{ng/ml}$ ) en el ensayo EVOLVE para triglicéridos (Figura 24A), no HDL-C (Figura 24B), HDL-C (Figura 24C), V-LDL-C (Figura 24D), LDL-C (Figura 24E), ApoB (Figura 24F), ApoCIII (Figura 24G), RLP (Figura 24H), LpPLA2 (Figura 24I).

15 Las Figuras 25A - 25I representan los niveles plasmáticos de la mediana iniciales y EOT (en  $\text{mg/dl}$ , con la excepción de LpPLA2, mostrado en  $\text{ng/ml}$ ) en el ensayo EVOLVE para triglicéridos (Figura 25A), no HDL-C (Figura 25B), HDL-C (Figura 25C), V-LDL-C (Figura 25D), LDL-C (Figura 25E), ApoB (Figura 25F), ApoCIII (Figura 25G), RLP (Figura 25H), LpPLA2 (Figura 25I).

20 Las Figuras 26A y 26B representan el cambio del valor inicial a EOT en los niveles de plasma absolutos (en  $\text{mg/dl}$ ) en el ensayo EVOLVE de triglicéridos ("TG"), No HDL-C ("NHDL-C"), HDL-C, VLDL-C, y LDL-C para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE, representando la Figura 26A el cambio promedio, y representando la Figura 26B el cambio de la mediana.

La Figura 27 representa el porcentaje de sujetos en el ensayo EVOLVE, dado por el eje Y, para los que los niveles de triglicéridos se redujeron en el porcentaje indicado, dado por el eje X, para una dosis de 2 g y una dosis de 4 g de Epanova®.

25 La Figura 28A representa el cambio promedio del valor inicial a EOT, como porcentaje del valor inicial, para TG, no HDL-c ("NHDL-C"), HDL-C, VLDL-C, LDL-C, ApoB, ApoCIII, LpLPA2, y RLP en cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE, representando la Figura 28B el cambio porcentual de la mediana del valor inicial a EOT.

30 La Figura 29 representa la tasa de cambio (valor absoluto) del cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial en los niveles plasmáticos de EPA, DHA, DPA, AA, TG, NHDL-C, y HDL-C entre las dosis de 2 g y 4 g de Epanova® en el ensayo EVOLVE.

La Figura 30 ilustra datos comparativos para Epanova®, según se mide en el ensayo EVOLVE, y datos notificados por otros para AMR-101 (Vascepa), a las dosis indicadas, con respecto a los niveles de TG.

35 La Figura 31 ilustra datos comparativos para Epanova®, según se mide en el ensayo EVOLVE, y AMR-101 (Vascepa), con respecto a diversos parámetros de lípidos en sangre. Los datos para AMR-101 se notificaron por otros. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

40 La Figura 32 ilustra datos comparativos para dosis de 2 g y 4 g de Epanova®, según se determina en el ensayo EVOLVE, y una dosis de 4 g de Lovaza®, con respecto a diversos parámetros de lípidos en sangre. Los datos para Lovaza® se notificaron por otros. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

45 La Figura 33 ilustra datos comparativos para dosis de 2 g y 4 g de Epanova®, según se evalúa en el ensayo EVOLVE, y una dosis de 4 g de Lovaza®, como se indica por otros, con respecto a los niveles de TG. Los superíndices indican datos procedentes de (1) ensayo EVOLVE, (2) un meta-análisis de la Solicitud de Nuevo Fármaco ("NDA") para Lovaza®, (3) la ficha técnica del producto aprobada por la FDA para Lovaza®, y (4) el estudio Takeda. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

50 La Figura 34 representa la correlación entre el cambio porcentual en LDL y el cambio porcentual en ApoCIII, según se mide en el ensayo EVOLVE.

La Figura 35 representa el cambio porcentual de la media por mínimos cuadrados (LS) del valor inicial para el subconjunto de sujetos del ensayo EVOLVE que tiene niveles iniciales de TG superiores o iguales a 750  $\text{mg/dl}$ , para los brazos de tratamiento indicados del estudio EVOLVE, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

55 La Figura 36 representa el cambio porcentual de la media por mínimos cuadrados (LS) desde el valor inicial para el subconjunto de sujetos que tienen diabetes de tipo II, para los brazos de tratamiento indicados del estudio EVOLVE, como se describe en el Ejemplo 10. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

La Figura 37 representa el cambio porcentual de la media por mínimos cuadrados (LS) desde el valor inicial para el subconjunto de sujetos que están sometidos a terapia concurrente con estatinas, para los brazos de tratamiento indicados del estudio EVOLVE, como se describe en el Ejemplo 10. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

5 La Figura 38 representa la diferencia porcentual de la media por mínimos cuadrados (LS) respecto al control para triglicéridos ("TG"), colesterol no HDL ("NHDL-C"), HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C y TC/HDL-C, comparando sujetos del estudio EVOLVE descrito en el ejemplo 10 que recibieron terapia con estatinas (ESTATINA) o no la recibieron (SIN ESTATINAS) concurrente con el tratamiento con la dosis de 2 g de Epanova®. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

10 La Figura 39 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para TG, NHDL-C, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C, y TC/HDL-C para el subconjunto de sujetos que están en tratamiento concurrente con estatinas, en los brazos de tratamiento indicados del estudio EVOLVE, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

15 La Figura 40 proporciona un diagrama de flujo de tratamiento que ilustra el diseño del estudio ESPRIT, descrito adicionalmente en el Ejemplo 12.

La Figura 41 muestra la disposición de los sujetos en el ensayo ESPRIT.

20 Las Figuras 42A y 42B representan el cambio porcentual de la mediana LS desde el valor inicial para EPA (Figura 42A) y DHA (Figura 42B) del estudio ESPRIT, descrito adicionalmente en el Ejemplo 12. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

25 La Figura 43 representa el cambio porcentual de la media LS desde el valor inicial para TG, No HDL-C, y HDL-C. Los datos mostrados son del estudio ESPRIT, descrito adicionalmente en el Ejemplo 12. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

30 La Figura 44 representa el cambio porcentual de la media LS desde el valor inicial para ApoB, LDL-C, VLDL-C, y TC/HDL-C. Los datos mostrados son del estudio ESPRIT, descrito adicionalmente en el Ejemplo 12. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

La Figura 45 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para TG, con sujetos agrupados en terciles por los niveles de TG iniciales, para sujetos en el ensayo ESPRIT.

La Figura 46 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para No HDL-C, con sujetos agrupados en terciles por los niveles de No HDL-C iniciales, para sujetos en el ensayo ESPRIT.

35 La Figura 47 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para LDL-C, con sujetos agrupados en terciles por los niveles de LDL-C iniciales, para sujetos en el ensayo ESPRIT.

La Figura 48 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para TG para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo ESPRIT, con sujetos agrupados de acuerdo con la identidad de la estatina tomada en terapia concurrente.

40 La Figura 49 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para TG para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo ESPRIT, con sujetos agrupados en dos grupos de acuerdo con la terapia con estatinas concurrente de baja o alta potencia.

45 La Figura 50 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para No HDL-C para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo ESPRIT, con sujetos agrupados de acuerdo con la terapia con estatinas concurrente de baja o alta potencia.

La Figura 51 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para LDL-C para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo ESPRIT, con sujetos agrupados en dos grupos de acuerdo con la terapia con estatinas concurrente de baja o alta potencia.

50 La Figura 52 representa el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial para TG, con sujetos en cada brazo de tratamiento del ensayo ESPRIT agrupados en tres grupos de acuerdo con TG altos iniciales, EPA altos iniciales, o terapia de rosuvastatina concurrente.

La Figura 53 representa un cambio porcentual de la media LS en la distribución del tamaño de partícula desde el valor inicial para partículas de V-LDL agrupadas por tamaño, según se determina en el ensayo ESPRIT. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

55 La Figura 54 representa un cambio porcentual de la media LS en la distribución del tamaño de partículas desde el valor inicial para partículas de LDL agrupadas por tamaño para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo ESPRIT. (\*) indica un valor p de menos de 0,05, (\*\*) indica un valor p de menos de 0,01, y (\*\*\*) indica un valor p de menos de 0,001.

La Figura 55 representa el cambio porcentual de la mediana LS en el tamaño de partícula de LDL, con sujetos agrupados en tres grupos de acuerdo con los niveles de triglicéridos EOT de ESPRIT.

La Figura 56A representa los niveles plasmáticos iniciales de ácido araquidónico (AA) (en  $\mu\text{g/ml}$ ) para los sujetos en el ensayo clínico que se describe adicionalmente en el Ejemplo 11, agrupados de acuerdo con el genotipo en el SNP rs174546. La Figura 56B represente el cambio porcentual desde el valor inicial en los niveles plasmáticos de AA el día 15 de tratamiento con Epanova®, agrupados de acuerdo con el genotipo en el SNP rs174546. Para cada genotipo, el intervalo intercuartil se indica con un recuadro, la mediana está indicada por una línea horizontal en el interior del recuadro intercuartil, y la media se representa con un rombo. Los valores atípicos se representan con círculos de color blanco. Los trazos se extienden al valor no atípico mínimo y máximo. La Puntuación 1 identifica los sujetos que son homocigotos en el alelo principal; la Puntuación 3 identifica los sujetos homocigotos en el alelo secundario; y la Puntuación 2 representa heterocigotos.

#### 4. DESCRIPCIÓN DETALLADA

##### 4.1 Descripción general: Composiciones farmacéuticas de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre que están enriquecidas inesperadamente en DPA y tienen una eficacia clínica excepcional

La formación de complejos de inclusión de urea (clatración) es una etapa convencional usada a menudo en el refinado de aceites de pescado para eliminar los ácidos grasos de cadena larga saturados y monoinsaturados, enriqueciendo de este modo con los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga deseados en la composición resultante. Sin embargo, a pesar del uso prolongado, y de los estudios diseñados para caracterizar los efectos de diversos parámetros fisicoquímicos en el proceso, el grado hasta el cual la formación de complejos de urea enriquece las especies individuales de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga sigue sin ser predecible. Esta impredecibilidad residual en el procedimiento de formación de complejos de urea, junto con el potencial para generar niveles inadmisiblemente altos de carbamato de etilo, lo que obligaría a un procesamiento adicional, militó inicialmente a favor de omitir la formación de complejos de urea del proceso de refinado a escala comercial a usar para la producción de composiciones de calidad farmacéutica de PUFA omega-3 en forma de ácido libre, cumpliendo determinadas especificaciones de composición deseadas.

Sin embargo, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 1, los primeros esfuerzos para desarrollar un proceso a escala comercial sin urea pusieron de manifiesto que tales procesos no podían producir de forma fiable lotes con una composición que cumpliera las especificaciones requeridas. Por consiguiente, se buscó un proceso que usara formación de complejos de urea y se descubrió que un estricto control de la composición en las especies de PUFA presentes en la materia prima de éster etílico intermedia, junto con uso de una cantidad de urea determinada mediante algoritmo podría producir de forma fiable lotes que cumplieran las especificaciones requeridas y sin exceder los límites de carbamato de etilo aceptables.

Como se describe en el Ejemplo 2, se prepararon cuatro lotes de producción ejemplares de ácidos grasos poliinsaturados en forma de ácido libre usando una etapa de formación de complejos de urea. Se aplicaron estrictos controles de la composición a la materia prima intermedia de éster de etilo usando solo lotes en los que las especies especificadas de ácidos grasos poliinsaturados estaban dentro de límites de intervalos definidos, y se usaron cantidades de urea que estaban dentro del intervalo requerido por el algoritmo calculador de urea. Se determinó que los cuatro lotes de producción de la composición farmacéutica cumplían las especificaciones de composición deseadas.

Como cabía esperar, la etapa de formación de complejos de urea disminuyó sustancialmente el porcentaje de ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados en la composición resultante, enriqueciendo sustancialmente de este modo con ácidos grasos poliinsaturados. Véase la Figura 3A. No obstante, inesperadamente, la formación de complejos de urea usando cantidades de urea que están dentro del intervalo determinado por algoritmo tuvo efectos diferenciales sobre el enriquecimiento de especies concretas de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y ácidos grasos poliinsaturados omega-6.

Como se describe a continuación en el Ejemplo 3, se encontró que las especies de ácido docosapentaenoico omega-3, DPA (C22:5 n-3), estaban enriquecidas, mientras que la especie de omega-6 correspondiente, con longitud de cadena y grado de insaturación idénticos, ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), se redujo en prevalencia. El efecto divergente de la formación de complejos de urea en el enriquecimiento de estos dos isómeros, junto con diferencias en sus concentraciones relativas en la materia prima intermedia de éster etílico, dio como resultado una diferencia de orden log en sus concentraciones en la composición farmacéutica final de ácido libre

("API").

Se prepararon lotes de producción adicionales y, como se describe en el Ejemplo 4, el análisis de la composición de 10 lotes de API demostró niveles elevados de forma reproducible de DPA en la composición final. Como se describe en el Ejemplo 5, el análisis de la composición de 21 lotes preparados usando formación de complejos de urea demostró una diferencia reproducible de 10 veces en la concentración de la especie de omega-3, DPA, en comparación con su isómero omega-6, ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6).

A una concentración media de 4,44 % (a/a) en 21 lotes de producción, el DPA es la tercera especie más prevalente de ácido graso poliinsaturado en el API, superada solo por EPA y DHA. A este nivel, la concentración de DPA también es aproximadamente 10 veces mayor que la indicada para una composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre, denominada Purepa, en la que se indicó que DPA estaba presente a un nivel del 0,5 %. Véase Belluzzi et al., Dig. Dis. Sci. 39(12): 2589-2594 (1994).

Aunque el DPA es un intermedio en la ruta biosintética de EPA en DHA (véase la Figura 1), sorprendentemente se conoce poco sobre los efectos biológicos específicos de DPA. Para aclarar la potencial contribución de DPA a la eficacia clínica de la composición farmacéutica se realizaron experimentos de perfil de la expresión génica usando células de hepatocarcinoma HepG2.

Como se describe adicionalmente en el Ejemplo 6, los efectos de DPA sobre la expresión génica de células hepáticas predicen una mayor eficacia clínica de las composiciones enriquecidas en DPA.

Los experimentos de perfil de expresión génica demostraron que DPA tiene una actividad biológica significativa a concentraciones *in vitro* relevantes. Estos efectos son notablemente diferentes de los observados con EPA y con DHA.

A una concentración relevante, se observó que DPA afectaba a la expresión de los genes en múltiples vías metabólicas, incluyendo los genes en categorías que se conoce que son relevantes para los efectos clínicos de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3: los genes implicados en el metabolismo de los lípidos, los genes implicados en la fisiología cardiovascular, y los genes implicados en la inflamación. También se predicen efectos significativos de segundo orden, dados los cambios observados en la expresión de los genes que codifican proteínas que por sí mismas afectan a la expresión génica, y en genes que codifican proteínas que afectan a la modificación postranscripcional.

Efectos específicos sobre la expresión de varios genes implicados en el metabolismo de los lípidos sugieren que DPA, a una concentración *in vivo* análoga, debería contribuir a la mejora de diversos parámetros lipídicos clínicamente relevantes. En particular, la regulación ascendente dirigida por DPA observada de **ACADSB**, la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta/ramificada, predice niveles séricos de triglicéridos más bajos; la regulación descendente dirigida por DPA de **HMGCR**, análoga a la inhibición de la enzima HMG-CoA-reductasa codificada por estatinas, se predecirá que conduce a disminuciones favorables de la relación colesterol total:HDL; y la regulación descendente de DPA de **SQLE**, una etapa limitante de la velocidad en la síntesis de esteroles, predice de forma análoga reducciones de los niveles de colesterol total.

Los experimentos de perfil de expresión también demostraron un umbral de dosis para los efectos del DPA. La concentración más baja ensayada, seleccionada para imitar la concentración 10 veces menor de DPA en la formulación temprana de omega-3 en ácido libre, Purepa, afectó a la expresión de genes 10 veces inferiores que la concentración superior de DPA, seleccionada para imitar la exposición esperada de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, lo que demuestra que la concentración de DPA inferior proporciona exposición subumbral, y cabría esperar que proporcionará una dosis subterapéutica *in vivo*.

Los ensayos clínicos en seres humanos confirmaron la excepcional eficacia clínica de la composición farmacéutica enriquecida en DPA de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre.

El Ejemplo 7 presenta los resultados del ensayo clínico ECLIPSE, un estudio de dosis única, aleatorizado, de 4 vías y de grupos cruzados que compara la biodisponibilidad de una dosis de 4 g de Lovaza® con la biodisponibilidad de una dosis de 4 g de la composición farmacéutica enriquecida en DPA de PUFA omega-3 en forma de ácido libre descrita en el presente documento (en lo sucesivo en el presente documento "Epanova®"), en condiciones dietéticas ricas en grasas y bajas en grasas. De acuerdo con la ficha técnica del producto aprobada por la FDA, cada cápsula de 1 gramo de Lovaza® contiene al menos 900 mg de los ésteres etílicos de los ácidos grasos omega-3

procedentes de aceites de pescado, predominantemente una combinación de ésteres etílicos de ácido eicosapentaenoico (EPA, aproximadamente 465 mg) y ácido docosahexaenoico (DHA, aproximadamente 375 mg). El lote de Epanova usado en el ensayo comprendía el 57,3 % (a/a) de EPA, 19,6 % (a/a) de DHA y el 6,2 % (a/a) de DPA, cada uno sustancialmente en forma de ácido libre.

5

El cambio ajustado por el valor inicial en los perfiles de absorción (AUC) de EPA+DHA total y EPA y DHA individual con Epanova® (PUFA omega-3 en forma de ácido libre) fue significativamente mayor que con Lovaza® (ésteres etílicos de PUFA omega-3) durante el periodo de dieta rica en grasas y espectacularmente mejor durante el periodo de dieta baja en grasas. Adicionalmente, hubo un profundo impacto del contenido en grasas de las comidas sobre la biodisponibilidad de Lovaza®, mientras que la biodisponibilidad de Epanova® fue mucho más predecible, debido a un efecto del alimento únicamente modesto.

La biodisponibilidad superior independiente de grasa de Epanova® sobre Lovaza® es clínicamente importante, en vista de la recomendación de la NCEP ATP III de que los sujetos con hipertrigliceridemia y dislipidemias cumplan una dieta baja en grasas durante la terapia adyuvante.

15

El Ejemplo 8 presenta resultados de un estudio de biodisponibilidad de 14 días, que demostró que el aumento de la biodisponibilidad observado en el ensayo de dosis única ECLIPSE se mantenía, incluso mejoró, en 2 semanas de dosificación. Además, los datos específicos de sujetos desagregados demostraron que el sujeto con menor respuesta a Epanova® todavía tenía una  $C_{\text{máx}}$  de EPA+DHA de 14 días mayor que el sujeto con mejor respuesta a Lovaza®.

20

El Ejemplo 10 presenta los resultados del ensayo EVOLVE, un estudio de 12 semanas, de doble ciego y controlado con aceite de oliva de pacientes seleccionados en base a los niveles altos de triglicéridos, en el intervalo 500-2.000 mg/dl (hipertrigliceridemia grave). El criterio de valoración principal del estudio fue el cambio porcentual de los niveles plasmáticos de triglicéridos desde el valor inicial al final del tratamiento ("EOT"). El criterio de valoración secundario fue el cambio porcentual de los niveles plasmáticos de colesterol no HDL ("no HDL-C") desde el valor inicial al EOT.

25

Como se puede ver a partir de las Figuras 20 - 23, el tratamiento de 12 semanas con Epanova® produjo aumentos drásticos en los niveles plasmáticos de EPA, DHA y DPA.

30

Los aumentos en los niveles plasmáticos de EPA, DHA, y DPA se acompañaron de reducciones significativas en los niveles plasmáticos de AA, realizando el régimen de dosificación de 4 g una reducción promedio del 18 %, una reducción de la mediana del 25,9 %, y una reducción de la media por mínimos cuadrados ("LS") del 23,2 %. Estas disminuciones de los niveles plasmáticos de ácido araquidónico se observaron a pesar de la administración de ácido araquidónico exógeno, que estaba presente al 2,446 % (a/a) en el lote de Epanova® usado en este ensayo.

35

El aumento en los niveles plasmáticos de EPA con una reducción concomitante en los niveles plasmáticos de AA produjo una mejora significativa en la relación EPA/AA, de aproximadamente 0,10 en el valor inicial a aproximadamente 0,67 (promedio) y 0,62 (mediana) al final del tratamiento ("EOT") a la dosis de 4 g. Se ha notificado que la relación EPA/AA constituye un factor de riesgo independiente para la aterosclerosis coronaria, Nakamura & Maegawa, Endocrine Abstracts (2012) 29 OC19.1, con relaciones inferiores asociadas con la progresión en la aterosclerosis coronaria en pacientes con aterosclerosis coronaria tratados con estatinas, Nozue et al., Am J Cardiol. 2013 Jan 1;111(1):6-1 (publicación electrónica previa a la impresión).

45

Adicionalmente, el tratamiento con Epanova® dio como resultado reducciones sustanciales de los niveles de triglicéridos (véanse las Figuras 26A y 26B), reducciones en no HDL-C y VLDL-C, y aumentos en HDL-C. Los niveles de LDL-C eran elevados, una observación que se puede atribuir a un aumento del tamaño de partícula de LDL tras el tratamiento (analizado adicionalmente en el Ejemplo 12).

50

El ensayo EVOLVE también demostró que la Apolipoproteína CIII (ApoCIII) se había reducido significativamente mediante el tratamiento con Epanova®. Se ha descubierto que los niveles elevados de ApoCIII son un predictor independiente de riesgo cardiopatía cardiovascular (CHD), mientras que niveles reducidos genéticamente de ApoCIII se han asociado con protección frente a la CHD, y también se han correlacionado con un aumento de la longevidad.

55

La extremadamente elevada biodisponibilidad de los PUFA omega-3 en Epanova® reveló diferencias previamente desconocidas, e inesperadas, en la respuesta farmacocinética entre las diversas especies de PUFA.

La Figura 29 representa la tasa de cambio en el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial en los niveles plasmáticos de EPA, DHA, DPA, AA, TG, no HDL-C, y HDL-C (valor absoluto) entre las dosis de 2 g y 4 g de Epanova®. Con poco o ningún aumento en los niveles plasmáticos de DHA y DPA después de la duplicación de la dosis de Epanova® de 2 g a 4 g al día, la tasa de cambio (pendiente) en el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial es casi nulo, lo que predice que se conseguirá poco aumento adicional de los niveles plasmáticos de DHA y DPA si la dosis se aumenta adicionalmente. Se observó un estancamiento similar de la respuesta en los niveles de triglicéridos, niveles de HDL-C y niveles de no HDL-C (datos no mostrados).

Por el contrario, la tasa de cambio para EPA sigue siendo alta, con una pendiente de 0,59; se espera obtener un aumento adicional de los niveles plasmáticos de EPA aumentando la dosis de Epanova® por encima de 4 g al día. Significativamente, la tasa de cambio (disminución) en los niveles de AA tras la duplicación de la dosis de Epanova® de 2 g a 4 g al día es todavía mayor que la observada para EPA; cabe esperar que se produzcan reducciones adicionales en los niveles plasmáticos de AA a medida que se aumenta la dosis de Epanova® por encima de 4 g/día. Por lo tanto, Epanova® presenta una potencia sin precedentes en cuanto a la capacidad para elevar los niveles de EPA, reducir los niveles de AA y mejorar la relación EPA:AA.

Como se muestra en la Figura 38, un subconjunto de sujetos en el brazo de tratamiento de 2 g del ensayo EVOLVE que estaban recibiendo terapia concurrente con estatinas mostró cambios porcentuales de mayor magnitud (diferencia de la media LS), con respecto al control, para TG, no HDL-C, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C y TC/HDL-C, en comparación con los sujetos en el brazo de tratamiento de 2 g que no recibieron terapia concurrente con estatinas. Los sujetos que recibían terapia concurrente con estatinas mostraron una respuesta a Epanova® dependiente de la dosis, como se muestra en los datos comparativos para 2 g de Epanova® y 4 g de Epanova® que se muestra en la Figura 39.

El Ejemplo 12 describe el ensayo clínico ESPRIT, que se realizó para estudiar pacientes en terapia inicial con estatinas con niveles de triglicéridos entre 200-500 mg/dl, menores que en los pacientes con hipertrigliceridemia grave participantes en el estudio EVOLVE descrito en el Ejemplo 10.

Se observaron reducciones de triglicéridos dependientes de la dosis, reducciones en no HDL-C, y aumentos en HDL-C en comparación con el placebo de aceite de oliva (véase la Figura 43). Además, se observaron reducciones dependientes de la dosis en VLDL-C y TC/HDL-C (véase la Figura 44). En conjunto, los resultados (resumidos en las Figuras 42 - 44) demuestran la eficacia de Epanova® como auxiliar a la terapia de estatinas en pacientes con niveles de triglicéridos entre 200-500 mg/dl.

Las Figuras 45 - 52 ilustran que Epanova® es eficaz como auxiliar a las estatinas tanto de baja potencia como de alta potencia, en una serie de condiciones iniciales para los pacientes. Como se observa a partir de la Figura 48, se observaron reducciones en los niveles de TG para pacientes que recibieron terapia concurrente con rosuvastatina, atorvastatina y simvastatina. Se observaron efectos estadísticamente significativos sobre los niveles de triglicéridos, no HDL-C y LDL-C, con independencia de si las estatinas de baja potencia o de alta potencia se habían coadministrado, como se muestra en las Figuras 49 - 51.

#### 4.2 Composiciones de omega-3 enriquecidas en DPA en forma de ácido libre

Por consiguiente, en un primer aspecto se proporcionan composiciones mejoradas de ácidos grasos poliinsaturados ("PUFA") en forma de ácido libre. En diversas realizaciones, la composición es una composición farmacéutica adecuada para administración oral.

##### 4.2.1 Realizaciones típicas

La composición comprende una pluralidad de especies de PUFA omega-3, cada una presente sustancialmente en forma de ácido libre.

La composición comprende ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) ("EPA", también conocido como ácido timnodónico), ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3) ("DHA", también conocido como ácido cervónico), y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3) ("DPA", también conocido como ácido clupanodónico), cada uno sustancialmente en forma de ácido libre.

La composición comprende EPA en una cantidad, calculada como porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, de al menos el 45 % ("45 % (a/a)"). En diversas realizaciones, la

composición comprende EPA en una cantidad de al menos el 46 % (a/a) 47 % (a/a), 48 % (a/a), 49 % (a/a), o al menos el 50 % (a/a). En ciertas realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad de al menos el 51 % (a/a), al menos el 52 % (a/a), al menos el 53 % (a/a), al menos el 54 % (a/a), al menos el 55 % (a/a), al menos el 56 % (a/a), al menos el 57 % (a/a), al menos el 58 % (a/a), incluso al menos el 59 % (a/a), al menos el 60 % (a/a), al menos el 61 % (a/a), 62 % (a/a), 63 % (a/a), 64 % (a/a), o el 65 % (a/a).

En ciertas realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad del 45 al 65 % (a/a). En realizaciones particulares, EPA está presente en una cantidad del 50 al 60 % (a/a). En diversas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 52 al 58,0 % (a/a). En algunas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 55 % (a/a) al 56 % (a/a). En algunas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 55 % (a/a).

En diversas realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad, calculada como porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición ("% (m/m)"), del 50 % (m/m) al 60 % (m/m). En ciertas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 55 % (m/m).

La composición comprende DHA en una cantidad de al menos el 17 % (a/a). En diversas realizaciones, la composición comprende DHA en una cantidad de al menos el 18 % (a/a), al menos el 19 % (a/a), o al menos el 20 % (a/a). En realizaciones seleccionadas, la composición comprende DHA en una cantidad de al menos el 21 % (a/a), al menos el 22 % (a/a), al menos el 23 % (a/a).

En varias realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 17 % (a/a) al 23 % (a/a). En ciertas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 19 % (a/a) al 20 % (a/a).

En diversas realizaciones, las composiciones comprenden DHA en una cantidad del 17 % (m/m) al 23 % (m/m). En ciertas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 20 % (m/m).

La composición comprende DPA en una cantidad de al menos el 1 % (a/a). En diversas realizaciones, la composición comprende DPA en una cantidad de al menos el 1,5 % (a/a), 2 % (a/a), 2,5 % (a/a), 3 % (a/a), 3,5 % (a/a), 4 % (a/a), 4,5 % (a/a), incluso al menos el 5 % (a/a). En realizaciones seleccionadas, la composición comprende DPA en una cantidad de al menos el 6 % (a/a), al menos el 7 % (a/a), al menos el 8 % (a/a), o al menos el 9 % (a/a).

En una diversidad de composiciones, la composición comprende DPA en una cantidad del 1 % (a/a) al 8 % (a/a). En ciertas realizaciones, la composición comprende DPA en una cantidad del 2 % (a/a) al 7 % (a/a). En realizaciones seleccionadas, la composición comprende DPA en una cantidad del 3 % (a/a) al 6 % (a/a). En realizaciones particulares, la composición comprende DPA en una cantidad del 4 % (a/a) al 5 % (a/a).

En diversas realizaciones, la composición comprende DPA, calculado como porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición, en una cantidad de no menos del 1 % (m/m). En diversas realizaciones, la composición comprende DPA en una cantidad del 1 % (m/m) al 8 % (m/m). En realizaciones particulares, la composición comprende DPA en una cantidad de no más del 10 % (m/m).

La composición comprende EPA y DHA en una cantidad total de al menos el 60 % (a/a). En diversas realizaciones, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad total de al menos el 61 % (a/a), 62 % (a/a), 63 % (a/a), 64 % (a/a), 65 % (a/a), 66 % (a/a), 67 % (a/a), 68 % (a/a), 69 % (a/a), o al menos el 70 % (a/a). En realizaciones particulares, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad total de al menos el 71 % (a/a), 72 % (a/a), 73 % (a/a), 74 % (a/a), 75 % (a/a), 76 % (a/a), 77 % (a/a), 78 % (a/a), 79 % (a/a), incluso al menos el 80 % (a/a). En ciertas realizaciones, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad total de al menos el 81 % (a/a), 82 % (a/a), al menos el 83 % (a/a), 84 % (a/a), incluso al menos el 85 % (a/a).

En diversas realizaciones, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad del 70,0 % (m/m) al 80,0 % (m/m). En ciertas realizaciones, la composición comprende el 75 % (m/m) de EPA más DHA.

La composición comprende EPA, DHA, y DPA en una cantidad total de al menos el 61 % (a/a). En realizaciones típicas, la composición comprende EPA, DHA, y DPA en una cantidad total de al menos el 62 % (a/a), 63 % (a/a), 64 % (a/a), 65 % (a/a), 66 % (a/a), al menos el 67 % (a/a), al menos el 68 % (a/a), al menos el 69 % (a/a), o al menos el 70 % (a/a). En ciertas realizaciones, la composición comprende EPA, DHA, y DPA en una cantidad total de al menos el 71 % (a/a), 72 % (a/a), 73 % (a/a), 74 % (a/a), 75 % (a/a), 76 % (a/a), 77 % (a/a), 78 % (a/a), 79 % (a/a), 80 % (a/a), incluso al menos el 81 % (a/a), 82 % (a/a), 83 % (a/a), 84 % (a/a), 85 % (a/a), 86 % (a/a), 87 % (a/a), incluso al

menos el 88 % (a/a).

En diversas realizaciones, la composición comprende EPA, DHA, y DPA en una cantidad total de entre el 70 % (a/a) al 90 % (a/a).

- 5 En una serie particular de realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 55 % (a/a) al 56 % (a/a); DHA está presente en una cantidad del 19 % (a/a) al 20 % (a/a); y DPA está presente en una cantidad del 4 % (a/a) al 5 % (a/a).
- 10 En ciertas realizaciones, la composición comprende además una o más especies de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 seleccionadas del grupo que consiste en: ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3), ácido moróctico (C18:4 n-3, también conocido como ácido estearidónico), ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), y ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3).
- 15 En realizaciones particulares, la composición comprende EPA, DHA, DPA, y ácido moróctico, cada uno sustancialmente en forma de ácido libre. En una diversidad de realizaciones, la composición comprende EPA, DHA, DPA, ácido moróctico, y ácido heneicosapentaenoico, cada uno sustancialmente en forma de ácido libre. En realizaciones específicas, la composición comprende EPA, DHA, DPA, ácido moróctico, ácido heneicosapentaenoico, y ácido eicosatetraenoico, cada uno sustancialmente en forma de ácido libre.
- 20 En realizaciones seleccionadas, la composición comprende EPA, DHA, DPA, ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3), ácido moróctico (C18:4 n-3), ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), y ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3).
- En diversas realizaciones, los ácidos grasos omega-3 totales, definidos como la suma de ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3), ácido moróctico (C18:4 n-3), ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5 n-3), ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3), ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA) (C22:6 n-3), constituyen del 80 % (a/a) al 95 % (a/a) de todos los ácidos grasos en la composición. En una diversidad de realizaciones, los ácidos grasos omega-3 totales constituyen del 80 al 95 % (m/m) de todos los ácidos grasos en la composición.
- 30 En diversas realizaciones, la composición comprende además una o más especies de PUFA omega-6, cada una presente sustancialmente en forma de ácido libre.
- En ciertas realizaciones, la composición comprende una o más especies de PUFA omega-6 seleccionadas del grupo que consiste en ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n-6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6) ("DGLA"), ácido araquidónico (C20:4 n-6) ("AA"), y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6, también conocido como ácido osbond).
- 35 En realizaciones particulares, la composición comprende ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n-6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6) ("DGLA"), ácido araquidónico (C20:4 n-6) ("AA"), y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), cada uno presente sustancialmente en la forma de ácido libre.
- 40 En diversas realizaciones, AA está presente en una cantidad de no más del 5 % (a/a) de los ácidos grasos en la composición. En ciertas realizaciones, AA comprende no más del 4,5 % (a/a) de los ácidos grasos en la composición. En realizaciones particulares, AA está presente en una cantidad de no más del 4 % (a/a) de los ácidos grasos en la composición.
- 45 En ciertas realizaciones, AA está presente en una cantidad de no más del 5 % (m/m) de los ácidos grasos en la composición. En ciertas realizaciones, AA comprende no más del 4,5 % (m/m) de los ácidos grasos en la composición. En realizaciones particulares, AA está presente en una cantidad de no más del 4 % (m/m) de los ácidos grasos en la composición.
- 50 En ciertas realizaciones, los ácidos grasos poliinsaturados omega-6 totales, definidos como la suma de ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n-6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6), ácido araquidónico (C20:4 n-6) y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), comprenden no más del 10 % (a/a) de los ácidos grasos en la composición. En ciertas realizaciones, los ácidos grasos poliinsaturados omega-6 totales, definidos como la suma de ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n-6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6), ácido araquidónico (C20:4 n-6) y ácido
- 55

docosapentaenoico (C22:5 n-6), comprenden no más del 10 % (m/m) de los ácidos grasos en la composición.

En realizaciones específicas, la composición se da por la Tabla 11, con cada especie de PUFA identificada dentro del intervalo de -3DE a +3 DE del promedio recitado respectivamente. En ciertas realizaciones, cada especie de PUFA identificada en las mismas está dentro del intervalo de -2DE a +2 DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, cada especie está dentro del intervalo de -1DE a +1DE del promedio citado respectivamente.

En realizaciones seleccionadas, la composición se da por la Tabla 13, estando cada especie de PUFA identificada en las mismas dentro del intervalo de -3DE a +3 DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, cada especie está dentro del intervalo de -2DE a +2 DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, cada especie de PUFA está dentro del intervalo de -1DE a +1DE del promedio citado respectivamente.

En ciertas realizaciones, los ácidos grasos poliinsaturados distintos de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 están presentes en una cantidad de no más del 5 % (a/a). En diversas realizaciones, los ácidos grasos poliinsaturados distintos de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 están presentes en una cantidad de no más del 5 % (m/m).

En una diversidad de realizaciones, al menos el 90 % de cada una de la pluralidad de especies de PUFA omega-3 en la composición está en la forma de ácido libre. En ciertas realizaciones, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, incluso al menos el 99 % de cada especie de PUFA omega-3 en la composición está presente en la forma de ácido libre. En realizaciones ejemplares, al menos el 90 % del contenido de ácido graso poliinsaturado omega-3 total en la composición está presente en la forma de ácido libre. En ciertas realizaciones, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, incluso al menos el 99 % del contenido de ácido graso poliinsaturado omega-3 total en la composición está presente en la forma de ácido libre.

En diversas realizaciones, al menos el 90 % de cada una de la pluralidad de especies de PUFA omega-6 en la composición está en la forma de ácido libre. En ciertas realizaciones, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, incluso al menos el 99 % de cada especie de PUFA omega-6 en la composición está presente en la forma de ácido libre. En realizaciones ejemplares, al menos el 90 % del contenido de ácido graso poliinsaturado omega-6 total en la composición está presente en la forma de ácido libre.

En diversas realizaciones, al menos el 90 % del ácido grasos poliinsaturado total en la composición está presente en la forma de ácido libre. En ciertas realizaciones, al menos el 91 %, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, incluso al menos el 99 % del ácido grasos poliinsaturado total en la composición está presente en la forma de ácido libre.

La composición comprende, en realizaciones típicas, no más del 3,0 % (a/a) de ácidos grasos saturados y no más del 5,0 % (a/a) de ácidos grasos mono-insaturados. En diversas realizaciones, la composición comprende o más del 3,0 % (m/m) de ácidos grasos saturados y no más del 5,0 % (m/m) de ácidos grasos mono-insaturados.

En realizaciones típicas, la composición comprende además de forma útil un antioxidante. En ciertas realizaciones, el antioxidante es hidroxianilo butilado (BHA). En algunas realizaciones, el antioxidante es alfa-tocoferol. En algunas realizaciones, alfa-tocoferol está presente en una cantidad del 0,20 -0,40 % (m/m). En diversas realizaciones, alfa-tocoferol está presente en una cantidad del 0,25 -0,35 % (m/m). En realizaciones particulares, alfa-tocoferol está presente en una cantidad del 0,27 -0,33 % (m/m).

En algunas realizaciones, la composición comprende no más de 0,1 ppm de carbamato de etilo. En diversas realizaciones, la composición comprende menos de 0,1 ppm de carbamato de etilo.

#### 4.2.1 Realizaciones adicionales

En ciertas realizaciones adicionales, la composición comprende EPA en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, del 50,0 -60,0 % (a/a). En diversas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 52,0 -58,0 % (a/a). En algunas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 55,0 % (a/a).

En ciertas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 55,0 -58,4 % (a/a). En diversas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 55,6 -57,9 % (a/a). En algunas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 56,7 % (a/a).

5

En diversas realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad, calculada como porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición, del 50,0 - 60,0 % (m/m). En ciertas realizaciones, EPA está presente en una cantidad del 55 % (m/m).

10 En ciertas realizaciones adicionales, la composición comprende DHA en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, del 13,0 -25,0 % (a/a). En ciertas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 15,0 -23,0 % (a/a). En diversas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 17,0 -21,0 % (a/a). En ciertas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 19,0 -20,0 % (a/a).

15

En ciertas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 17,7 -22,2 % (a/a). En diversas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 18,4 -21,4 % (a/a). En ciertas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 19,9 % (a/a).

20 En diversas realizaciones, las composiciones comprenden DHA, calculado como porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición, en una cantidad del 15,0 - 25,0 % (m/m). En ciertas realizaciones, DHA está presente en una cantidad del 20,0 % (m/m).

En diversas realizaciones adicionales, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad total, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, del 67,0 - 81,0 % (a/a). En ciertas realizaciones, la composición comprende una cantidad total de EPA y DHA del 69,0 -79,0 % (a/a). En diversas realizaciones, la composición comprende una cantidad total de EPA más DHA del 71,0 -77,0 % (a/a). En ciertas realizaciones, la composición comprende una cantidad total de EPA+DHA del 74,0 -75,0 % (a/a).

30 En diversas realizaciones, la composición comprende EPA+DHA en una cantidad total, calculada como porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición, del 70,0-80,0 % (m/m). En ciertas realizaciones, la composición comprende el 75,0 % (m/m) de EPA más DHA.

En estas realizaciones adicionales que comprenden además ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3), ácido  $\alpha$ -linolénico está presente en una cantidad del 0,07 -1,10 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido  $\alpha$ -linolénico está presente en una cantidad del 0,24 -0,91 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido  $\alpha$ -linolénico está presente en una cantidad del 0,40 -0,80 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido  $\alpha$ -linolénico está presente en una cantidad del 0,50 al 0,600 % (a/a).

40 En estas realizaciones adicionales que comprenden además ácido moróctico (C18:4 n-3), ácido moróctico está presente en una cantidad del 0,01 -7,90 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido moróctico está presente en una cantidad del 0,25 -6,40 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido moróctico está presente en una cantidad del 1,70 % - 4,90 % (a/a). En realizaciones particulares, ácido moróctico está presente en una cantidad del 3,25 % (a/a).

45 En estas realizaciones adicionales que comprenden además ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad del 0,75 -3,50 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad del 1,20 -3,00 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad del 1,60 -2,60 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad del 2,10 % (a/a).

50

En estas realizaciones adicionales que comprenden además ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), el ácido eicosatetraenoico está presente en una cantidad del 0,01 -0,40 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico está presente en una cantidad del 0,01 -0,30 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico está presente en una cantidad del 0,03 -0,22 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido

55 eicosatetraenoico está presente en una cantidad del 0,12 % (a/a).

En estas realizaciones adicionales que comprenden además ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3), el ácido heneicosapentaenoico está presente en una cantidad del 0,01 - 4,10 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico está presente en una cantidad del 0,01 -3,20 % (a/a). En realizaciones particulares, el ácido

heneicosapentaenoico está presente en una cantidad del 0,60 -2,35 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico está presente en una cantidad del 1,50 % (a/a).

En diversas realizaciones adicionales, DPA está presente en una cantidad del 0,90 -7,60 % (a/a). En una diversidad de realizaciones, DPA está presente en una cantidad del 2,00 -6,50 % (a/a). En ciertas realizaciones, DPA está presente en una cantidad del 3,10 -5,40 % (a/a). En diversas realizaciones, DPA está presente en una cantidad del 4,25 % (a/a).

En diversas realizaciones adicionales, DPA está presente en una cantidad del 2,13 -8,48 % (a/a). En ciertas realizaciones, DPA está presente en una cantidad del 3,19 -7,42 % (a/a). En algunas realizaciones, DPA está presente en una cantidad del 4,25 -6,37 % (a/a). En diversas realizaciones, DPA está presente en una cantidad del 5,31 % (a/a).

En diversas realizaciones, los ácidos grasos omega-3 totales comprenden del 80,0-95 % (m/m) de todos los ácidos grasos en la composición farmacéutica.

En realizaciones adicionales que comprenden DGLA, DGLA está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, del 0,01 -4,40 % (a/a). En algunas realizaciones, DGLA está presente en una cantidad del 0,01 -3,30 % (a/a). En ciertas realizaciones, DGLA está presente en una cantidad del 0,01 -2,20 % (a/a). En algunas realizaciones, DGLA está presente en una cantidad del 1,10 % (a/a).

En algunas realizaciones, DGLA está presente en una cantidad del 0,28 -0,61 % (a/a). En ciertas realizaciones, DGLA está presente en una cantidad del 0,33 -0,56 % (a/a). En algunas realizaciones, DGLA está presente en una cantidad del 0,44 % (a/a).

En realizaciones adicionales que comprenden AA, AA está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, del 0,01 - 6,90 % (a/a). En diversas realizaciones, AA está presente en una cantidad del 0,01 -5,40 % (a/a). En ciertas realizaciones, AA está presente en una cantidad del 0,70 -3,80 % (a/a). En varias realizaciones, AA está presente en una cantidad del 2,25 % (a/a).

En diversas realizaciones, AA está presente en una cantidad del 1,41 -4,87 % (a/a). En ciertas realizaciones, AA está presente en una cantidad del 1,99 -4,30 % (a/a). En varias realizaciones, AA está presente en una cantidad del 2,57 -3,72 % (a/a).

En diversas realizaciones, la composición comprende AA en una cantidad de no más del 4,5 % (a/a). En algunas realizaciones, la composición comprende AA en una cantidad de no más del 3,14 % (a/a).

En algunas de las realizaciones adicionales que comprenden además ácido linoleico (C18:2 n-6), el ácido linoleico está presente en una cantidad del 0,25 % - 1,30 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido linoleico está presente en una cantidad del 0,40 % -1,20 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido linoleico está presente en una cantidad del 0,60 % - 0,95 % (a/a). En realizaciones particulares, ácido linoleico está presente en una cantidad del 0,80 % (a/a).

En estas realizaciones adicionales que comprenden además ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), el ácido gamma-linolénico está presente en una cantidad del 0,01 -0,65 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido gamma-linolénico está presente en una cantidad del 0,03 -0,51 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido gamma-linolénico está presente en una cantidad del 0,15 -0,40 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido gamma-linolénico está presente en una cantidad del 0,27 % (a/a).

En estas realizaciones adicionales que comprenden además ácido eicosadienoico (C20:2 n-6), el ácido eicosadienoico está presente en una cantidad del 0,01-0,30 (a/a). En diversas realizaciones, el ácido eicosadienoico está presente en una cantidad del 0,04 -0,24 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido eicosadienoico está presente en una cantidad del 0,09 -0,20 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosadienoico está presente en una cantidad del 0,14 % (a/a).

En estas realizaciones adicionales que comprenden además ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), el ácido docosapentaenoico está presente en una cantidad del 0,01 - 0,95 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad del 0,01 -1,05 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad del 0,05 -0,71 % (a/a). En ciertas realizaciones,

el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad del 0,01 -0,48 % (a/a). En realizaciones particulares, ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad del 0,24 % (a/a).

5 En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad del 0,01 -1,19 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad del 0,16 -0,98 % (a/a). En realizaciones particulares, ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad del 0,57 % (a/a).

En ciertas realizaciones, la composición comprende no más del 10,0 % (a/a) de ácidos grasos omega-6 totales.

10

La composición comprende, en realizaciones típicas entre estas realizaciones adicionales, no más del 3,0 % (a/a) de ácidos grasos saturados, no más del 5,0 % (a/a) de ácidos grasos mono-insaturados, y no más de 0,1 ppm de carbamato de etilo. En algunas realizaciones, la composición comprende no más de 0,1 ppm de carbamato de etilo. En diversas realizaciones, la composición comprende menos de 0,1 ppm de carbamato de etilo.

15

### 4.3 Formas de dosificación unitaria

En otro aspecto, la composición farmacéutica de PUFA omega-3 enriquecidos en DPA en forma de ácido libre descrita en la Sección 4.2 anterior se envasa de forma útil en formas de dosificación unitaria para administración oral.

20

En realizaciones particulares, la forma de dosificación es una cápsula. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación es una cápsula de gelatina. En realizaciones particulares, la cápsula de gelatina es una cápsula de gelatina dura. En otras realizaciones, la forma de dosificación es una cápsula de gelatina blanda.

25

En diversas realizaciones, la cápsula comprende gelatina de tipo A. En algunas realizaciones, la cápsula comprende gelatina tanto de tipo A como de tipo B. Las fuentes de colágeno para la producción de gelatina de tipo A o de tipo B incluyen, pero sin limitación, vacas, cerdos y peces.

30 En diversas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de tal forma que la cápsula se desintegra en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37 °C después del almacenamiento durante al menos 3 meses a 40 °C. En ciertas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de tal forma que la cápsula se desintegra en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37 °C después del almacenamiento durante 6 meses a 40 °C. En ciertas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de tal forma que la cápsula se desintegra en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37 °C después del almacenamiento durante 12 meses a 40 °C.

35

40 En diversas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de tal forma que la cápsula se desintegra en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37 °C después del almacenamiento durante al menos 3 meses a 30 °C. En ciertas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de tal forma que la cápsula se desintegra en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37 °C después del almacenamiento durante 6 meses a 30 °C. En algunas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de tal forma que la cápsula se desintegra en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37 °C después del almacenamiento durante 12 meses a 30 °C.

45

50 En ciertas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende una mezcla de gelatina de tipo A porcina y una gelatina de tipo B. En diversas de estas realizaciones, al menos el 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % incluso al menos el 50 % (p/p) de la gelatina es gelatina porcina de tipo A. En realizaciones seleccionadas, al menos el 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % (p/p) de la gelatina es gelatina porcina de tipo A. En realizaciones particulares, al menos el 80 %, 85 %, 90 %, incluso el 95 % (p/p) de la gelatina es gelatina porcina de tipo A.

55

En diversas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda en la que la gelatina consiste esencialmente en gelatina porcina de tipo A.

En algunas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina reticulada reducida, tales como las descritas en la Pat. de Estados Unidos N.º 7.485.323.

En ciertas realizaciones, la cápsula comprende gelatina succinilada.

5

En una diversidad de realizaciones, las cápsulas están formadas por sustancias que no son subproductos animales, tales como agar-agar, carragenina, pectina, konjak, goma guar, almidón alimentario, almidón de maíz modificado, almidón de patata y tapioca. Las fuentes no animales de materiales que se pueden usar para preparar cápsulas útiles en las formas de dosificación unitaria orales descritas en el presente documento se describen en la

10 Publicación de Patente de Estados Unidos N.º 2011/0117180. En algunas realizaciones se usan cápsulas Vegicaps® (Catalent).

En ciertas realizaciones de la forma de dosificación unitaria oral capsular, la cápsula está sin recubrir.

15 En otras realizaciones de la forma de dosificación unitaria oral capsular, la cápsula está recubierta.

En ciertas realizaciones de cápsulas recubiertas, la composición de ácido graso se libera de un modo dependiente del tiempo. En diversas realizaciones, no hay una liberación sustancial de la composición de PUFA durante al menos 30 minutos después de la ingesta. En ciertas realizaciones, no hay una liberación sustancial de la composición de PUFA durante al menos 30 minutos cuando la liberación se ensaya *in vitro*. En ciertas realizaciones, no más del 20 % de la composición de PUFA se libera en los primeros 30 minutos cuando se ensaya *in vitro*. En realizaciones seleccionadas, no más de aproximadamente el 25 %, 30 %, incluso no más del 35 % de la composición de PUFA se libera en los primeros 30 minutos, cuando se ensaya *in vitro*. En realizaciones particulares, las propiedades de liberación *in vitro* se evalúan de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente provisional n.º

20 61/749.124, presentada el 4 de enero de 2013, titulada "Method of release testing for omega-3 polyunsaturated fatty acids", de Bharat Mehta.

En realizaciones particulares, cantidades sustanciales de la composición de PUFA se liberan en aproximadamente 60 minutos después de la ingesta. En ciertas realizaciones, cantidades sustanciales de la composición de PUFA se liberan en aproximadamente 60 minutos cuando se ensaya *in vitro*. En realizaciones seleccionadas, se libera al menos el 40 % de la composición de PUFA en 60 minutos, cuando se ensaya *in vitro*. En diversas realizaciones, al menos el 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, incluso al menos el 65 % de la composición de PUFA se libera en aproximadamente 60 minutos, cuando se ensaya *in vitro*. En realizaciones particulares, las propiedades de liberación *in vitro* se evalúan de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente provisional n.º

30 61/749.124, presentada el 4 de enero de 2013, titulada "Method of release testing for omega-3 polyunsaturated fatty acids", de Mehta.

En ciertas realizaciones, las cápsulas están recubiertas como se describe en las Pat. de Estados Unidos N.º 5.792.795 y 5.948.818. En diversas realizaciones recubiertas, el recubrimiento es un copolímero de poli(etilacrilato-metilacrilato). En algunas realizaciones, el recubrimiento es Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG), que tiene un peso molecular promedio de aproximadamente 800.000.

40 En otras realizaciones de cápsulas recubiertas, la cápsula se recubre con un recubrimiento entérico que protege la cápsula de la disolución o desintegración en el estómago, pero se disuelve a valores de pH encontrados en el

45 intestino delgado.

En diversas realizaciones, la forma de dosificación unitaria oral contiene de 100 mg a 2000 mg de la composición de PUFA. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral contiene 250 mg de la composición de PUFA. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral contiene 500 mg de la composición de PUFA. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación oral contiene 750 mg de la composición de PUFA. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral contiene 1000 mg de la composición de PUFA. En otras realizaciones, la forma de dosificación oral contiene 1500 mg de la composición de PUFA. En ciertas realizaciones, la forma de dosificación unitaria contiene cantidades en peso no integrales de la composición de PUFA entre 100 mg y 2000 mg.

#### 55 4.4 Kits de dosificación

En otro aspecto, una pluralidad de formas de dosificación unitaria como se ha descrito anteriormente se pueden envasar juntas en un kit de dosificación para aumentar la facilidad de uso y el cumplimiento del paciente.

En ciertas realizaciones, el kit de dosificación es un frasco. En otras realizaciones, la pluralidad de las formas de dosificación se envasa en envases de tipo blíster, una pluralidad de los cuales puede envasarse opcionalmente juntos en una caja u otro acondicionamiento. Típicamente, estén en un frasco o en uno o más envases de tipo blíster, la pluralidad de formas de dosificación unitaria es suficiente durante 30, 60 o 90 días de dosificación. Por lo tanto, en realizaciones seleccionadas, la forma de dosificación unitaria es una cápsula que contiene aproximadamente un gramo de la composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, y el kit de dosificación comprende 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 270 o 300 de dichas cápsulas.

En diversas realizaciones, la pluralidad de formas de dosificación unitaria se envasa en un gas inerte, tal como nitrógeno o un gas noble, o se envasa al vacío.

#### 4.5 Uso médico

En otro aspecto, la composición farmacéutica se proporciona para su uso en tratamientos médicos.

##### 4.5.1 Tratamiento de hipertrigliceridemia grave (>500 mg/dl)

En una primera serie de realizaciones de tratamiento, las composiciones farmacéuticas se proporcionan para su uso en el tratamiento de la hipertrigliceridemia grave.

Los tratamientos comprenden administrar por vía oral la composición farmacéutica descrita en la Sección 4.2 anterior a un paciente que tiene niveles de triglicéridos en suero o plasma previos al tratamiento >500 mg/dl, en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos por debajo de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones típicas, cada dosis de la composición farmacéutica se administra como una o como una pluralidad de las formas de dosificación unitaria descritas en la Sección 4.3 anterior.

En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz es al menos 2 g al día. En diversas realizaciones, la cantidad eficaz es al menos 3 g al día. En realizaciones particulares, la cantidad eficaz es al menos 4 g al día. En realizaciones típicas, la cantidad eficaz es 2 g al día. En ciertas realizaciones, la cantidad eficaz es 4 g al día.

En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se administra durante al menos 30 días. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se administra durante al menos 60 días. En realizaciones particulares, la composición farmacéutica se administra durante al menos 90 días, 120 días, 180 días, 240 días, o al menos 360 días. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se administra indefinidamente.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra diariamente. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra en días alternos.

En realizaciones particulares, la dosis diaria de la composición farmacéutica se administra en una única dosis diaria. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra en dosis divididas, con la dosis diaria dividida en dos administraciones, tres administraciones o incluso cuatro administraciones durante el transcurso del día.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se administra con alimentos. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se administra con una comida baja en grasas. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra sin alimentos. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en ayunas.

Los métodos, en determinadas realizaciones, además comprenden administrar una estatina. En realizaciones particulares, la estatina se selecciona del grupo que consiste en: pravastatina, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina, tenivastatina y pitavastatina.

##### 4.5.2 Tratamiento de hipertrigliceridemia (200 - 500 mg/dl)

En otra serie de realizaciones de tratamiento, las composiciones farmacéuticas se proporcionan para su uso en el tratamiento de pacientes que tienen niveles en suero o plasma de triglicéridos previos al tratamiento de 200 mg/dl a 500 mg/dl. En ciertas realizaciones, los pacientes ya están en tratamiento con estatinas; en estos pacientes, los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos previos al tratamiento son los medidos durante el tratamiento con estatinas, antes de la administración de las composiciones farmacéuticas descritas en la Sección 4.2 anterior.

El tratamiento comprende administrar por vía oral una cantidad eficaz de una estatina, y administrar adicionalmente la composición farmacéutica descrita en la Sección 4.2 en el presente documento, por vía oral, en una cantidad y durante un periodo suficiente para disminuir los niveles séricos y plasmáticos de triglicéridos por debajo de los niveles medidos antes del tratamiento con la composición farmacéutica descrita en el presente documento. La 5 composición farmacéutica descrita en la Sección 4.2 y la estatina no se tienen que administrar al mismo tiempo, con el mismo régimen de dosificación, ni siquiera los mismos días. Basta con que las dos se administren con una proximidad temporal suficiente para que el paciente reciba el beneficio terapéutico de ambas de forma concurrente.

En diversas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en la Sección 4.2 se administra en formas de 10 dosificación unitaria como se ha descrito en la Sección 4.3 anterior.

En diversas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos 1 g al día. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos 2 g/día. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos 3 g/día. En realizaciones 15 particulares, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos 4 g/día. En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de 2 g/día. En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de 3 g/día o 4 g al día.

#### 4.6 Proceso

20 En otro aspecto se presenta un proceso mejorado para refinar aceite de pescado en composiciones farmacéuticas que comprenden PUFA en forma de ácido libre y, en particular, para refinar aceite de pescado en las composiciones farmacéuticas descritas en la Sección 4.2 en el presente documento.

##### 25 4.6.1 Preparación de materia prima intermedia

La materia prima intermedia se prepara mediante transesterificación del aceite corporal obtenido de peces, por ejemplo, peces de las familias Engraulidae, Clupeidae y Scombridae, mediante técnicas estándar bien conocidas en la técnica, con los parámetros del proceso ajustados para alcanzar una composición que esté dentro de las 30 tolerancias descritas en la sección 4.6.2 indicada inmediatamente a continuación.

Se describen etapas de proceso estándar adecuadas, por ejemplo, en las Pat. de Estados Unidos N.º 5.656.667; 5.719.302; 5.945.318; 6.204.401; 6.518.049; 6.528.669; 7.491.522; 7.550.613; 7.678.930; 7.718.698; 7.732.488 y en las Pat. de Estados Unidos N.º 5.472.705; 5.750.572; 5.776.978; 5.869.714; 7.541.480; 7.553.870; y 7.619.002.

35 En un proceso ejemplar, se extrae un aceite de triglicéridos en bruto de un pez, tales como anchoas, sardinas, caballa y sábalo. El aceite de triglicéridos en bruto se refina entonces con álcali, por ejemplo, usando hidróxido de sodio, y se desodoriza, se pule y se seca. Después, los PUFA se convierten en ésteres, tales como ésteres metílicos o ésteres etílicos, mediante transesterificación. La transesterificación se puede realizar mediante, por ejemplo, 40 etanólisis en presencia de etanol y etóxido de sodio para producir ésteres etílicos. A la transesterificación le sigue al menos una ronda, típicamente una pluralidad de rondas, de destilación.

En otro proceso ejemplar, el aceite de triglicéridos se refina con álcali y se desodoriza, se transesterifica con etanol, tal como, por ejemplo, mediante etanólisis, en presencia de etanol y epóxido de sodio, y después se somete a una o 45 más rondas de destilación fraccional.

La Figura 2 presenta un diagrama de flujo de un proceso ejemplar para producir la materia prima intermedia. En este proceso, los peces se cocinan en agua y la mezcla resultante de líquidos y sólidos se filtra y la porción líquida se centrifuga para eliminar la fase acuosa. La fracción oleosa restante de la etapa anterior se trata con álcali para 50 neutralizar cualquier ácido graso libre presente, seguido de lavado con agua. Después, el aceite de pescado refinado con álcali en forma de triglicérido se desodoriza y los contaminantes ambientales se reducen mediante, por ejemplo, destilación. El aceite de pescado desodorizado seco se convierte en la forma de éster etílico usando reacción con etanol, se cataliza mediante el uso de etóxido de sodio. Después de finalizar la reacción, el exceso de etanol se elimina mediante destilación y los ésteres etílicos se lavan con una solución de ácido cítrico y después con 55 agua. En este proceso ejemplar, los ésteres etílicos se destilan para conseguir la concentración requerida de éster etílico de EPA (EPA-EE) y éster etílico de DHA (DHA-EE) para su uso como materia prima intermedia. En algunas realizaciones se realizan múltiples rondas de destilación. Las condiciones exactas usadas se ajustan dependiendo de la composición de la composición de éster etílico de entrada con el fin de alcanzar la concentración requerida de EPA-EE y DHA-EE para la materia prima intermedia, como se detalla en la sección 4.6.2 inmediatamente a

continuación.

Se conocen bien alternativas a estas etapas de proceso, y se pueden usar según sea adecuado siempre que la composición de la materia prima intermedia resultante esté dentro de las tolerancias definidas en la sección 4.6.2  
5 inmediatamente a continuación.

#### 4.6.2 Composición de materia prima intermedia

##### 4.6.2.1 Realizaciones típicas

10

La composición de la materia prima intermedia comprende una pluralidad de especies de PUFA omega-3, cada una presente sustancialmente en forma de un éster etílico.

15 La composición de la materia prima intermedia comprende EPA, DHA y DPA, cada una presente sustancialmente en forma de un éster etílico.

20 En diversas realizaciones, la composición de materia prima intermedia comprende éster etílico de EPA (EPA-EE), DHA-EE, y DPA-EE, en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ésteres etílicos de ácido graso en la composición, que está dentro del intervalo de -3DE a +3 DE de los promedios citados respectivamente en la Tabla 9. En ciertas realizaciones, cada uno de EPA-EE, DHA-EE, y DPA-EE está dentro de -2DE a +2 DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, cada uno de EPA-EE, DHA-EE, y DPA-EE está dentro de -1DE a +1DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, la composición de materia prima intermedia comprende EPA-EE, DHA-EE, y DPA-EE dentro del intervalo ajustado por sus porcentajes en área mínimos y máximos respectivos entre los lotes descritos en la Tabla 8.

25

30 En ciertas realizaciones, la composición comprende además uno o más ácidos grasos poliinsaturados omega-3, cada uno sustancialmente en forma del éster etílico, seleccionados del grupo que consiste en: ácido  $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3), ácido moróctico (C18:4 n-3), ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), y ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3). En diversas realizaciones, la una o más especies de omega-3-EE, si está presente, está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ésteres etílicos de ácido graso en la composición, que está dentro del intervalo de -3DE a +3 DE de los promedios citados respectivamente en la Tabla 9. En ciertas realizaciones, cada especie está dentro de -2DE a +2 DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, cada especie está dentro de -1DE a +1DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, la una o más especies de omega-3-EE, si está presente,  
35 está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ésteres etílicos de ácido graso en la composición, que está dentro del intervalo ajustado por sus porcentajes en área mínimos y máximos respectivos entre los lotes descritos en la Tabla 8.

40 En ciertas realizaciones, la composición de materia prima intermedia también comprende al menos una especie de PUFA omega-6. En diversas realizaciones, la composición comprende ésteres etílicos de uno o más ácidos grasos poliinsaturados omega-6 seleccionados del grupo que consiste en: ácido linoleico (C18:2 n-6), ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:3 n-6), ácido dihomo-gamma-linolénico ("DGLA") (C20:3 n-6), ácido araquidónico (C20:4 n-6) ("AA"), y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6). Cada especie de PUFA omega-6 está presente sustancialmente en forma de éster etílico.

45

50 En diversas realizaciones, la una o más especies de omega-6-EE, si está presente, está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ésteres etílicos de ácido graso en la composición, que está dentro del intervalo de -3DE a +3 DE de los promedios citados respectivamente en la Tabla 9. En ciertas realizaciones, cada especie está dentro de -2DE a +2 DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, cada especie está dentro de -1DE a +1DE del promedio citado respectivamente. En ciertas realizaciones, la una o más especies de omega-3-EE, si está presente, está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ésteres etílicos de ácido graso en la composición, que está dentro del intervalo ajustado por sus porcentajes en área mínimos y máximos respectivos entre los lotes descritos en la Tabla 8.

55

##### 4.6.2.2 Realizaciones adicionales

En diversas realizaciones adicionales, la composición de materia prima intermedia comprende éster etílico de EPA (EPA-EE) en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ésteres

etílicos de ácido graso en la composición, del 45,0 -53,0 % (a/a). En ciertas realizaciones, EPA-EE está presente en una cantidad del 48,40 -50,04 % (a/a). En diversas realizaciones, EPA-EE está presente en una cantidad del 48,67 -49,77 % (a/a). En algunas realizaciones, la composición de materia prima intermedia comprende EPA-EE en una cantidad del 48,95 -49,49 % (a/a). En ciertas realizaciones, la composición de materia prima intermedia comprende  
5 EPA-EE en una cantidad del 49,22 % (a/a).

En diversas realizaciones, EPA-EE está presente en una cantidad del 44,20 % (a/a) -46,92 % (a/a). En algunas realizaciones, EPA-EE está presente en una cantidad del 45,56 % (a/a).

10 En diversas realizaciones, EPA-EE está presente en una cantidad del 425 - 460 mg/g.

En diversas realizaciones adicionales, la composición de materia prima intermedia comprende éster etílico de DHA (DHA-EE) en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ésteres etílicos de ácido graso en la composición, del 13,0 -20,0 % (a/a). En diversas realizaciones, DHA-EE está presente  
15 en una cantidad del 16,43 - 18,28 % (a/a). En diversas realizaciones, la materia prima comprende DHA-EE en una cantidad del 16,74 -17,98 % (a/a). En algunas realizaciones, la composición de materia prima intermedia comprende DHA-EE en una cantidad del 17,05 % - 17,67 % (a/a). En ciertas realizaciones, la materia prima intermedia comprende DHA-EE en el 17,4 % (a/a).

20 En algunas realizaciones, la materia prima intermedia comprende DHA en una cantidad del 14,77 % (a/a) -17,87 % (a/a). En algunas realizaciones, la materia prima intermedia comprende DHA en una cantidad del 16,32 % (a/a).

En algunas realizaciones, la materia prima intermedia comprende DHA en una cantidad del 150 - 170 mg/g.

25 En diversas realizaciones adicionales, DPA-EE está presente en una cantidad del 4,10 a 6,74 % (a/a). En algunas realizaciones, DPA-EE está presente en una cantidad del 4,54 al 6,30 % (a/a). En diversas realizaciones, DPA-EE está presente en una cantidad del 4,98 al 5,86 % (a/a). En ciertas realizaciones, DPA-EE está presente en una cantidad del 5,42 % (a/a).

30 En diversas realizaciones, DPA-EE está presente en una cantidad del 0,41 al 0,70 % (a/a). En ciertas realizaciones, DPA-EE está presente en una cantidad del 0,56 % (a/a).

En diversas realizaciones, la composición de materia prima intermedia comprende además el éster etílico de ácido araquidónico (C20:4 n-6). En diversas realizaciones, AA-EE está presente en una cantidad del 1,72 al 2,81 % (a/a).  
35 En algunas realizaciones, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad del 1,9 al 2,63 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad del 2,09 al 2,45 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad del 2,27 % (a/a).

En ciertas realizaciones, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad de no más del 3,0 % (a/a). En  
40 algunas realizaciones, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad de no más del 4,0 % (a/a).

En aquellas realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además éster etílico del ácido  $\alpha$ -linolénico, el ácido  $\alpha$ -linolénico-EE está presente, en ciertas realizaciones, en una cantidad del 0,3 - 0,45 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido  $\alpha$ -linolénico-EE está presente en una cantidad del 0,4 % (a/a).

45 En algunas realizaciones, el ácido  $\alpha$ -linolénico-EE está presente en una cantidad del 0,24 % (a/a) - 0,62 % (a/a).

En algunas realizaciones, el ácido  $\alpha$ -linolénico-EE está presente en una cantidad del 0,43 % (a/a).

50 En algunas de aquellas realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además éster etílico del ácido moróctico (C18:4 n-3), el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje en área en cromatograma de GC de todos los ésteres etílicos de ácido graso en la composición, del 0,60 -2,03 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad del 0,84 al 1,80 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad del 1,10 al 1,60 % (a/a). En realizaciones  
55 particulares, ácido moróctico-EE está presente en una cantidad del 1,32 % (a/a).

En diversas realizaciones, el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad del 0,64 % al 1,93 % (a/a). En realizaciones particulares, ácido moróctico-EE está presente en una cantidad del 1,28 % (a/a).

En una diversidad de aquellas realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además éster etílico del ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), el ácido eicosatrienoico-EE está presente en una cantidad de menos del 0,1 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatrienoico-EE está presente en una cantidad de menos del 0,4 % (a/a).

5 En realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además éster etílico del ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), el ácido eicosatetraenoico-EE está presente, en ciertas realizaciones, en una cantidad del 1,57 al 2,10 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad del 1,66 al 2,02 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad del 1,75 al 1,93 % (a/a). En realizaciones específicas, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad del 1,84 % (a/a).

10 En ciertas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad del 1,42 al 2,49 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad del 1,95 % (a/a).

15 En una diversidad de realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además éster etílico del ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3), el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 2,25 al 2,36 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 2,27 - 2,34 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 2,29 al 2,32 % (a/a). En realizaciones particulares, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 2,31 % (a/a).

20 En algunas realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 1,42 al 2,76 % (a/a). En realizaciones particulares, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 2,09 % (a/a).

25 En una serie de realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además el éster etílico del PUFA omega-6, ácido linoleico (C18:2 n-6), el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad del 0,53 al 0,56 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad del 0,53 al 0,55 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad del 0,54 al 0,55 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad del 0,54 % (a/a).

30 En algunas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad del 0,38 al 0,83 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad del 0,60 % (a/a).

35 En realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además el éster etílico del ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), el ácido gamma-linolénico-EE está presente, en realizaciones ejemplares, en una cantidad menor del 0,1 % (a/a). En realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además el éster etílico del ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), el ácido gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad menor del 0,4 % (a/a).

40 En realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además éster etílico del ácido eicosadienoico (C20:2 n-6), el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad del 0,00 al 0,63 % (a/a) en diversas realizaciones ejemplares. En algunas realizaciones, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad del 0,00 al 0,45 % (a/a). En ciertas realizaciones, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad del 0,00 al 0,27 % (a/a). En realizaciones particulares, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad del 0,09 % (a/a).

45 En ciertas realizaciones, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad del 0,00 al 0,54 % (a/a). En realizaciones particulares, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad del 0,25 % (a/a).

50 En una pluralidad de realizaciones de la materia prima intermedia que comprenden además el éster etílico del ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6), DGLA-EE está presente en una cantidad del 0,35 al 0,68 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido dihomo-gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad del 0,41 al 0,63 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido dihomo-gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad del 0,46 al 0,57 % (a/a).

55 En algunas realizaciones, el ácido dihomo-gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad del 0,26 al 0,55 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido dihomo-gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad del 0,40 % (a/a).

Ciertas realizaciones adicionales de la materia prima intermedia comprenden además ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), en forma de éster etílico. En una diversidad de estas realizaciones, el ácido docosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 0,54 al 0,80 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico-EE está

presente en una cantidad del 0,59 % al 0,76 % (a/a). En diversas realizaciones, el ácido docosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 0,63 % al 0,72 % (a/a). En realizaciones particulares, el ácido docosapentaenoico-EE está presente en una cantidad del 0,67 % (a/a).

- 5 En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6)-EE está presente en una cantidad del 1,45 % al 7,21 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6)-EE está presente en una cantidad del 4,33 % (a/a).

#### 4.6.3 Formación de complejos de urea

10

La materia prima intermedia transesterificada que tiene una composición como se ha definido anteriormente se somete a formación de complejos de inclusión de urea. En realizaciones típicas, la cantidad de urea usada para la formación de complejos está dentro de un intervalo determinado por medio de un algoritmo.

- 15 Por lo tanto, en otro aspecto, se presenta un proceso mejorado para refinar aceite de pescado en composiciones farmacéuticas que comprenden PUFA en forma de ácido libre, particularmente, para refinar aceite de pescado en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. La mejora comprende someter una materia prima intermedia del aceite de pescado transesterificado que comprende los ésteres etílicos de varias especies de PUFA omega-3 y omega-6 en intervalos porcentuales definidos a una etapa de formación de complejos de inclusión de urea, en donde la cantidad de urea usada para la formación de complejos está dentro del intervalo calculado de acuerdo con (i) la fórmula I(a), o (ii) de acuerdo con la fórmula I(b), o (iii) de acuerdo tanto con la fórmula I(a) como la fórmula I(b) con la cantidad de urea fijada en un valor dentro del intervalo fijado por, e inclusive de, los resultados de las fórmulas I(a) e I(b), tal como un promedio del mismo, en donde las fórmulas son como se indican a continuación:

25 
$$[\text{Urea}] = F_{\text{enriquecimiento-DHA}} * ((\text{DHA}_{\text{diana}} - \text{DHA-EE}_{\text{introducido}}) / \text{DHA-EE}_{\text{introducido}}) \quad (\text{Ia})$$

$$[\text{Urea}] = F_{\text{enriquecimiento-EPA}} * ((\text{EPA}_{\text{diana}} - \text{EPA-EE}_{\text{introducido}}) / \text{EPA-EE}_{\text{introducido}}) \quad (\text{Ib})$$

- Los valores diana de DHA y EPA se seleccionan en base a la composición final deseada. Los factores de enriquecimiento,  $F_{\text{enriquecimiento-DHA}}$  y  $F_{\text{enriquecimiento-EPA}}$ , pueden ser iguales o diferentes. En una realización típica,  $F_{\text{enriquecimiento-DHA}}$  y  $F_{\text{enriquecimiento-EPA}}$  son iguales, con un valor de aproximadamente 100/0,34, o aproximadamente 300.

- Usando la cantidad de urea determinada algorítmicamente, la formación de complejos se realiza de acuerdo con técnicas estándar. Véanse, por ejemplo, las Pat. de Estados Unidos N.º 4.377.526; 5.106.542; 5.243.046; 5.679.809; 5.945.318; 6.528.669; 6.664.405; 7.541.480; 7.709.668; y 8.003.813.

- En una realización ejemplar, la materia prima intermedia se mezcla con una solución de urea en etanol. La formación de complejos se realiza a 60 °C - 80 °C, después la mezcla se enfría y, posteriormente, la mezcla se filtra o se centrifuga para eliminar los complejos de urea. El etanol se elimina mediante destilación y el aceite se lava varias veces con agua.

#### 4.6.4 Acabado tras la formación de complejos

- Tras la eliminación de los complejos de urea, los ésteres de PUFA que no están en forma de complejos se hidrolizan en ácidos grasos libres mediante técnicas estándar. La composición se purifica adicionalmente mediante destilación, antes o después de la hidrólisis, y se termina además usando una o más de las siguientes técnicas estándar: tratamiento con carbono activo, purificación cromatográfica, eliminación del solvente, blanqueamiento, por ejemplo, con tierra de blanqueo, y extracción supercrítica. Se añaden antioxidantes, tales como BHA o  $\alpha$ -tocoferol.

### 50 5. Ejemplos

#### 5.1 Ejemplo 1: Se requiere la formación de complejos de urea para una producción fiable de composiciones de PUFA omega-3 en forma de ácido libre que cumplan los requisitos de las especificaciones

- 55 La formación de complejos de inclusión de urea (clatración) es una etapa convencional usada a menudo en el refinado de aceites de pescado para eliminar los ácidos grasos de cadena larga saturados y monoinsaturados, enriqueciendo de este modo con los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga deseados en la composición resultante. Sin embargo, a pesar del uso prolongado (véase, por ejemplo, la Pat. de Estados Unidos N.º 4.377.526), y los estudios diseñados para caracterizar los efectos de diversos parámetros fisicoquímicos en el

proceso (véase, por ejemplo, Hayes et al., "Triangular Phase Diagrams To Predict The Fractionation Of Free Fatty Acid Mixtures Via Urea Complex Formation", Separation Sci. Technol. 36(1):45-58 (2001) y Hayes, "Purification of Free Fatty Acids via Urea Inclusion Compounds", en Handbook of Functional Lipids (Taylor y Francis Group) (2005)), el grado al que la formación de complejos de urea enriquece las especies individuales de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, incluyendo especies tanto de PUFA omega-3 como de PUFA omega-6, sigue siendo impredecible. Esta impredecibilidad residual en el procedimiento de formación de complejos de urea, y el potencial de la formación de complejos de urea para generar niveles altos no permisibles de carbamato de etilo, que obligaría a un procesamiento adicional, se mantuvo inicialmente a favor de omitir la formación de complejos de urea del proceso de refinado a escala comercial a usar para la producción de composiciones de calidad farmacéutica de PUFA omega-3 en forma de ácido libre que cumplan las especificaciones expuestas en la Tabla 1 a continuación.

<b>Parámetro</b> (todas las especies estarán presentes como ácido libre)	<b>Límite de especificación</b>
EPA	50,0-60,0 % (m/m)
DHA	15,0-25,0 % (m/m)
EPA + DHA	70,0-80,0 % (m/m)
Ácidos grasos omega-3 totales	80,0-90,0 % (m/m)
Ácido araquidónico	nm <sup>t</sup> 4,5 % (a/a)
Ácidos grasos saturados	nm <sup>t</sup> 3,0 % (a/a)
Ácidos grasos mono-insaturados	nm <sup>t</sup> 5,0 % (a/a)
Ácidos grasos omega-6	nm <sup>t</sup> 10,0 % (a/a)
Otros ácidos grasos insaturados	nm <sup>t</sup> 5,0 % (a/a)
Sin identificar total por encima del 0,1 %	nm <sup>t</sup> 2,0 % (a/a)
"(m/m)" -- porcentaje, en peso, de todos los ácidos grasos en la composición "(a/a)" -- porcentaje en área en cromatografía de gas de todos los ácidos grasos en la composición "nm <sup>t</sup> " -- "no más de".	

Sin embargo, los primeros esfuerzos para desarrollar un proceso sin urea demostraron que dichos procesos no podían producir de forma fiable composiciones farmacéuticas a escala comercial que cumplieran la especificación composicional diana requerida. La Tabla 2, a continuación, presenta datos de estos dos lotes. Los valores que están fuera del intervalo de la especificación deseado están subrayados.

<b>Parámetro</b> (todas las especies estarán presentes como ácido libre)	<b>Límite de especificación</b>	<b>Lote 1 (no adaptado para el invierno)</b>		<b>Lote 2 (adaptado para el invierno)</b>	
		<b>(m/m)</b>	<b>(a/a)</b>	<b>(m/m)</b>	<b>(a/a)</b>
EPA	50,0-60,0 % (m/m)	<u>49,0</u>	51,5	<u>49,8</u>	53,0
DHA	15,0-25,0 % (m/m)	19,6	20,3	19,6	20,9
EPA + DHA	70,0-80,0 % (m/m)	<u>68,3</u>	71,8	<u>69,4</u>	73,9
Ácidos grasos omega-3 totales	80,0-90,0 % (m/m)	<u>78,0</u>	81,2	<u>79,3</u>	83,7
Ácido araquidónico	nm <sup>t</sup> 4,5 % (a/a)	2,8	2,8	2,9	2,8
Ácidos grasos saturados	nm <sup>t</sup> 3,0 % (a/a)	1,9	2,6	0,6	0,5
Ácidos grasos mono-insaturados	nm <sup>t</sup> 5,0 % (a/a)	<u>6,6</u>	5,1	<u>6,7</u>	5,1
Ácidos grasos omega-6	nm <sup>t</sup> 10,0 % (a/a)	4,2	5,3	4,3	5,2
Otros ácidos grasos insaturados	nm <sup>t</sup> 5,0 % (a/a)	2,7	0,3	2,1	0,4
Sin identificar total por encima del 0,1 %	nm <sup>t</sup> 2,0 % (a/a)	<u>5,4</u>	<u>5,5</u>	<u>6,3</u>	<u>5,4</u>

Por consiguiente, se buscó un proceso que usara formación de complejos de urea, y se descubrió que un estricto control composicional en las especies de PUFA presentes en la materia prima de éster etílico intermedia, junto con uso de cantidades de urea dentro de intervalos ajustados algorítmicamente, podría producir de forma fiable composiciones farmacéuticas que cumplieran las especificaciones expuestas en la Tabla 1 sin exceder los límites de carbamato de etilo aceptables.

Los requisitos composicionales para la materia prima de éster etílico intermedia se presentan en la Sección 4.6.2 y

los Ejemplos 2 y 4. Véanse las Tablas 3 - 6, 8 - 9.

La cantidad óptima de urea requerida a usar se encontró que estaba determinada por (i) la fórmula I(a) o (ii) de acuerdo con la fórmula I(b), o (iii) de acuerdo tanto con la fórmula I(a) como la fórmula I(b), con la cantidad de urea fijada a un valor dentro del intervalo fijado por, e inclusive de, los resultados de las fórmulas I(a) e I(b), tal como el promedio de los dos resultados, en donde las fórmulas son como se indica a continuación:

$$[\text{Urea}] = F_{\text{enriquecimiento-DHA}} * ((\text{DHA}_{\text{diana}} - \text{DHA-EE}_{\text{introducido}}) / \text{DHA-EE}_{\text{introducido}}) \quad (\text{Ia})$$

$$[\text{Urea}] = F_{\text{enriquecimiento-EPA}} * ((\text{EPA}_{\text{diana}} - \text{EPA-EE}_{\text{introducido}}) / \text{EPA-EE}_{\text{introducido}}) \quad (\text{Ib})$$

Los factores de enriquecimiento,  $F_{\text{enriquecimiento-DHA}}$  y  $F_{\text{enriquecimiento-EPA}}$ , pueden ser iguales o diferentes. Se ha encontrado que un valor típico, usando los lotes de materia prima intermedia descritos en los Ejemplos 2 y 4, es de aproximadamente 100/0,34 (es decir, aproximadamente 300) para ambos.

**5.2 Ejemplo 2: El análisis composicional de cuatro lotes de producción ejemplares producidos usando formación de complejos de urea confirma que los requisitos de las especificaciones se cumplieron**

Se prepararon cuatro lotes de producción ejemplares de ácidos grasos poliinsaturados en forma de ácido libre. Se aplicaron estrictos controles composicionales a la materia prima intermedia de éster etílico usando solamente lotes en los que las especies especificadas de ácidos grasos poliinsaturados estaban dentro de límites de intervalos definidos. Las cantidades de urea a usar para la formación de complejos a escala de producción se determinaron primero empíricamente a escala de laboratorio, usando lotes de ensayo pequeños de la materia prima intermedia de éster etílico y variando la concentración de urea, variando de este modo la relación aceite:urea:etanol. La concentración óptica sugerida por las determinaciones a escala de ensayo se confirmó que estaba dentro del intervalo requerido por el algoritmo descrito en el Ejemplo 1, y se usó para la fabricación a escala de producción.

La composición de la materia prima transesterificada intermedia y la composición farmacéutica final ("principio farmacéutico activo" o "API") se determinaron mediante cromatografía de gases. Los resultados se recopilan en las Tablas 3-6 a continuación.

Tabla 3			
Especies de PUFA		Materia prima intermedia	API
(nombre común)	(identidad)	(ésteres etílicos transesterificados) (% de a/a)	(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,54	0,55
ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,00	0,15
ácido α-linolénico	18:3 n-3	0,45	0,39
ácido moróctico	18:4 n-3	1,52	1,70
ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,00	0,10
ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 n-6	0,47	0,35
ácido araquidónico (AA)	20:4 n-6	2,11	2,43
ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,00	0,15
ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	1,78	2,18
ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	49,42	57,25
ácido heneicosapentaenoico	21:5 n-3	2,32	2,79
ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,71	0,83
ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	5,80	6,23
ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 n-3	17,09	19,58
<b>Métrica de agregados</b>			
	% total	99,41	98,43
	% de PUFA	82,77	96,30

	Omega 3 total	78,37	90,26
<b>Tabla 3</b>			
<b>Especies de PUFA</b>		<b>Materia prima intermedia</b>	<b>API</b>
(nombre común)	(identidad)	(ésteres etílicos transesterificados) (% de a/a)	(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
	Omega 6 total	3,83	4,41
	PUFA restantes	0,57	1,63
	% de saturados	4,34	0,35
	% de mono-insaturados	12,30	1,34
	% de desconocidos	0,60	0,42
<b>Tabla 4</b>			
<b>Especies de PUFA</b>		<b>Materia prima intermedia</b>	<b>API</b>
(nombre común)	(identidad)	(ésteres etílicos transesterificados) (% de a/a)	(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,54	0,49
ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,00	0,14
ácido α-linolénico	18:3 n-3	0,45	0,34
ácido moróctico	18:4 n-3	1,52	1,67
ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,00	0,13
ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 n-6	0,47	0,39
ácido araquidónico (AA)	20:4 n-6	2,11	2,45
ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,00	0,25
ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	1,78	2,02
ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	49,42	57,64
ácido heneicosapentaenoico	21:5 n-3	2,32	2,75
ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,71	0,79
ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	5,80	6,22
ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 n-3	17,09	19,65
<b>Métrica de agregados</b>			
	% total	99,41	98,60
	% de PUFA	82,77	96,35
<b>Tabla 4</b>			
<b>Especies de PUFA</b>		<b>Materia prima intermedia</b>	<b>API</b>
(nombre común)	(identidad)	(ésteres etílicos transesterificados) (% de a/a)	(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
	Omega 3 total	78,37	90,54
	Omega 6 total	3,83	4,38
	PUFA restantes	0,57	1,43
	% de saturados	4,34	0,31
	% de mono-insaturados	12,30	1,25
	% de desconocidos	0,60	0,69
<b>Tabla 5</b>			
<b>Especies de PUFA</b>		<b>Materia prima intermedia</b>	<b>API</b>
(nombre común)	(identidad)	(ésteres etílicos transesterificados) (% de a/a)	(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,54	0,59
ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,00	0,12

ácido $\alpha$ -linolénico	18:3 n-3	0,38	0,38
ácido moróctico	18:4 n-3	1,09	1,16
ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,00	0,12
ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 n-6	0,57	0,45
ácido araquidónico	20:4 n-6	2,42	2,84
ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,00	0,22
ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	1,97	2,11
ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	49,20	55,81
ácido heneicosapentaenoico	21:5 n-3	2,30	2,72
ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,64	0,13
ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	5,06	5,46
ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 n-3	17,64	19,45
<b>Métrica de agregados</b>			
	% total	99,60	98,76
<b>Tabla 5</b>			
<b>Especies de PUFA</b>		<b>Materia prima intermedia</b>	<b>API</b>
(nombre común)	(identidad)	(ésteres etílicos transesterificados) (% de a/a)	(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
	% de PUFA	82,48	93,77
	Omega 3 total	77,64	87,31
	Omega 6 total	4,36	4,24
	PUFA restantes	0,48	2,22
	% de saturados	5,15	0,24
	% de mono-insaturados	11,98	2,97
	% de desconocidos	0,40	1,79
<b>Tabla 6</b>			
<b>Especies de PUFA</b>		<b>Materia prima intermedia</b>	<b>API</b>
(nombre común)	(identidad)	(ésteres etílicos transesterificados) (% de a/a)	(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,55	0,55
ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,00	0,12
ácido $\alpha$ -linolénico	18:3 n-3	0,38	0,37
ácido moróctico	18:4 n-3	1,13	1,26
ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,36	0,00
ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 n-6	0,56	0,42
ácido araquidónico (AA)	20:4 n-6	2,43	2,86
ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,00	0,16
ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	1,82	2,09
ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	48,84	57,08
ácido heneicosapentaenoico	21:5 n-3	2,28	2,78
ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,63	0,10
ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	5,02	5,49
ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 n-3	17,61	20,00
<b>Métrica de agregados</b>			

		% total	99,49	98,74
<b>Tabla 6</b>				
<b>Especies de PUFA</b>		<b>Materia prima intermedia</b>		<b>API</b>
(nombre común)	(identidad)	(ésteres etílicos transesterificados) (% de a/a)		(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
	% de PUFA	82,11		94,94
	Omega 3 total	77,09		89,22
	Omega 6 total	4,53		4,05
	PUFA restantes	0,49		1,67
	% de saturados	5,42		0,40
	% de mono-insaturados	11,96		1,57
	% de desconocidos	0,51		1,84

Se determinó que los cuatro lotes de producción de API cumplieran las especificaciones composicionales expuestas en la Tabla 1, anteriormente.

### 5 Ejemplo 3: La formación de complejos de urea controlada enriquece de forma diferencial especies seleccionadas de omega-3 y omega-6

Como cabía esperar, la etapa de formación de complejos de urea disminuyó sustancialmente el porcentaje de ácidos grasos saturados y ácidos grasos monoinsaturados en la composición resultante, enriqueciendo sustancialmente de este modo con ácidos grasos poliinsaturados. Véanse las Tablas 3 - 6, y la Figura 3A. No obstante, inesperadamente, la formación de complejos de urea usando cantidades de urea que están dentro del intervalo determinado por algoritmo tuvo un efecto diferencial sobre el enriquecimiento de especies individuales de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y ácidos grasos poliinsaturados omega-6.

La Tabla 7 proporciona una evaluación cualitativa del enriquecimiento de diversas especies de ácidos grasos poliinsaturados, comparando la prevalencia en la materia prima intermedia de éster etílico con la del API de ácido libre, promediado en los cuatro lotes de producción descritos en las Tablas 3-6. Véase también la Figura 3B.

<b>Tabla 7</b>	
<b>Especie de ácido graso poliinsaturado</b>	<b>Efecto cualitativo de la formación de complejos de urea controlada</b>
ácido linoleico (C18:2 n-6)	neutro
ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6)	enriquecido
ácido $\alpha$ -linolénico (C18:3 n-3)	reducido
ácido moróctico (C18:4 n-3)	enriquecido
ácido eicosadienoico (C20:2 n-6)	neutro
ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6)	reducido
ácido araquidónico (C20:4 n-6) ( <b>AA</b> )	enriquecido
ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3)	enriquecido
ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3)	enriquecido
ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) ( <b>EPA</b> )	enriquecido
ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3)	enriquecido
ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6)	reducido
ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3) ( <b>DPA</b> )	enriquecido
ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3) ( <b>DHA</b> )	enriquecido

Aunque los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, como clase, están sustancialmente enriquecidos, el efecto de la formación de complejos de urea sobre los PUFA omega-6, como clase, no es tan predecible. De media, las especies omega-6 DGLA y ácido docosapentaenoico se reducen en términos de prevalencia; el ácido gamma-linolénico y el ácido araquidónico se aumentan, y existe poco o ningún efecto sobre el ácido linolénico y el ácido eicosadienoico.

Se ha observado, en particular, que la especie de ácido docosapentaenoico omega-3, DPA (C22:5 n-3), está enriquecida, mientras que la especie de omega-6 correspondiente, con longitud de cadena y grado de insaturación

idénticos, ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), tiene una prevalencia reducida. El efecto divergente de la formación de complejos de urea en el enriquecimiento de estos dos isómeros, junto con diferencias en sus concentraciones relativas en la materia prima intermedia de éster etílico, da como resultado una diferencia de orden log en sus concentraciones en el ácido libre final ("API"). Al promediar los cuatro lotes de API presentados en las Tablas 3 - 6, la especie de ácido docosapentaenoico omega-3, DPA, está presente en el API final en un 5,85 % (a/a), mientras que la especie de ácido docosapentaenoico omega-6 está presente en una concentración promedio de 0,46 % (a/a).

A una concentración media de 5,85 % (a/a), el DPA es la tercera especie más prevalente de ácido graso poliinsaturado en el API, superada solo por EPA y DHA. A este nivel, la concentración de DPA también es 10 veces mayor que la indicada para una composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre, denominada Purepa, en la que se indicó que DPA estaba presente a un nivel del 0,5 %. Véase, Belluzzi et al., Dig. Dis. Sci. 39(12): 2589-2594 (1994).

#### **5.4 Ejemplo 4: El análisis composicional de diez (10) lotes de producción ejemplares de API demuestra niveles reproduciblemente elevados de DPA**

Se prepararon lotes de producción adicionales de acuerdo con los métodos descritos en el Ejemplo 2.

Los datos de diez (10) lotes de API, incluidos los cuatro lotes descritos en las Tablas 3-6 en el Ejemplo 2, producidos a partir de ocho (8) lotes diferentes de materia prima intermedia transesterificada (éster etílico), se presentan en las tablas siguientes. La composición de cada uno de los lotes de materia prima intermedia se muestra en la Tabla 8. La Tabla 9 presenta el promedio ("AVG"), la desviación estándar ("DESV. EST.", "DE"), y Delta ("Δ", la diferencia absoluta entre +1 DE y -1 DE, +2 DE y -2 DE, etc.) en los 8 lotes de materia prima intermedia para cada una de las especies enumeradas (éster etílico). La composición de cada uno de los diez lotes del API final se muestra en la Tabla 10, más adelante; la Tabla 11 presenta el promedio, la desviación estándar y los valores Delta para cada una de las especies enumeradas (ácido libre) en los 10 lotes de API.

**Tabla 8**  
**Lotes de materia prima (éster etílico) intermedia**

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8
	BV N.º	319553	319554	320613	320766	320941	320824	320862
	ONC N.º	24876	24906	27008	27824	27824	28069	28139
Identidad	Nombre común	% de área						
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,552	0,522	0,571	0,689	0,712	0,657	0,611
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,166	0,146	0,157	0,253	0,218	0,283	0,159
C18:3(n-3)	Ácido α-linolénico	0,379	0,368	0,351	0,516	0,498	0,419	0,491
C18:4(n-3)	Ácido moróctico	1,403	0,991	1,008	1,432	1,462	1,372	1,505
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,156	0,181	0,194	0,167	0,366	0,274	0,212
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,314	0,384	0,421	0,376	0,473	0,446	0,398
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	1,977	2,362	2,316	2,805	2,884	3,306	2,152
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,171	0,200	0,216	0,181	0,223	0,220	0,245
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	1,855	1,908	1,870	1,653	2,142	1,896	2,132
C20:5(n-3)	EPA	46,131	45,698	44,908	45,317	45,675	45,416	46,185
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,239	2,105	2,156	2,165	1,761	2,140	2,407
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,658	0,575	0,556	0,508	0,524	0,509	0,572
C22:5(n-3)	DPA	5,341	4,634	4,598	5,178	2,874	4,324	4,834
C22:6(n-3)	DHA	15,875	16,102	15,997	15,700	17,046	16,128	16,852

**Tabla 9**  
**Materia prima (éster etílico) intermedia**  
**Estadística de 8 lotes**

Identidad	Nombre común	AVG	DE	-3DE	-2DE	-1DE	+1DE	+2DE	+3DE	1DE Δ	2DE Δ	3DE Δ
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,60	0,08	0,38	0,45	0,53	0,68	0,76	0,83	0,15	0,30	0,45
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,19	0,05	0,03	0,08	0,14	0,24	0,30	0,35	0,11	0,22	0,32
C18:3(n-3)	Ácido α-linolénico	0,43	0,06	0,24	0,30	0,37	0,49	0,56	0,62	0,13	0,26	0,38
C18:4(n-3)	Ácido moróctico	1,28	0,21	0,64	0,86	1,07	1,50	1,71	1,93	0,43	0,86	1,28
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,25	0,10	-0,05	0,05	0,15	0,35	0,45	0,54	0,20	0,40	0,60
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,40	0,05	0,26	0,31	0,36	0,45	0,50	0,55	0,10	0,19	0,29
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	2,58	0,45	1,23	1,68	2,13	3,03	3,48	3,93	0,90	1,80	2,70
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,22	0,03	0,12	0,15	0,18	0,25	0,28	0,31	0,07	0,13	0,19

C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	1,95	0,18	1,42	1,60	1,77	2,13	2,31	2,49	0,36	0,71	1,07
C20:5(n-3)	EPA	45,56	0,45	44,20	44,65	45,10	46,01	46,46	46,92	0,91	1,81	2,72
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,09	0,22	1,42	1,64	1,87	2,32	2,54	2,76	0,45	0,90	1,34
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,56	0,05	0,41	0,46	0,51	0,60	0,65	0,70	0,10	0,20	0,30
C22:5(n-3)	DPA	4,33	0,96	1,45	2,41	3,37	5,29	6,25	7,21	1,92	3,84	5,76
C22:6(n-3)	DHA	16,32	0,52	14,77	15,29	15,80	16,84	17,36	17,87	1,04	2,07	3,10

Tabla 10

## Lotes de API (ácido libre) finales

		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Lote 10
	Lote de API N.º	36355	36395	37225	37289	38151	38154	38157	38300	38303	38306
	Lote intermedio N.º	1	1	2	3	4	4	5	7	8	6
Identidad	Nombre común	% de área									
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,55	0,49	0,59	0,55	0,60	0,61	0,78	0,62	0,53	0,72
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,15	0,14	0,12	0,12	0,17	0,16	0,16	0,22	0,15	0,15
C18:3(n-3)	Ácido $\alpha$ -linolénico	0,39	0,34	0,38	0,37	0,45	0,45	0,55	0,41	0,44	0,50
C18:4(n-3)	Ácido moróctico	1,70	1,67	1,16	1,26	1,37	1,37	1,87	1,65	1,77	1,81
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,10	0,13	0,12	0,09	0,10	0,10	0,27	0,12	0,11	0,12
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,35	0,39	0,45	0,42	0,42	0,45	0,52	0,51	0,42	0,51
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	2,43	2,45	2,84	2,86	3,50	3,50	3,64	4,02	2,57	3,60
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,15	0,25	0,22	0,16	0,20	0,17	0,25	0,18	0,17	0,23
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	2,18	2,02	2,11	2,09	1,96	1,90	2,64	2,13	2,34	2,54
C20:5(n-3)	EPA	57,25	57,64	55,81	57,08	56,25	56,38	56,88	56,30	56,72	57,15

	Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Lote 10
	36355	36395	37225	37289	38151	38154	38157	38300	38303	38306
	Lote de API N.º	1	2	3	4	4	5	7	8	6
	Lote intermedio N.º									
<b>Identidad</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>	<b>% de área</b>
C21:5(n-3)	2,79	2,75	2,72	2,78	2,68	2,60	2,15	2,57	2,88	2,18
C22:5(n-6)	0,20	0,17	0,72	0,71	0,61	0,62	0,66	0,63	0,71	0,66
C22:5(n-3)	6,23	6,22	5,46	5,49	6,12	5,97	3,41	5,15	5,59	3,43
C22:6(n-3)	19,58	19,65	19,45	20,00	19,16	18,79	20,60	20,10	20,97	21,01

Identidad	Nombre común	AVG	DE	-3 DE	-2 DE	-1 DE	+1 DE	+2 DE	+3 DE	1DE Δ	2DE Δ	3DE Δ
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,61	0,09	0,34	0,43	0,52	0,69	0,78	0,87	0,18	0,35	0,53
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,15	0,03	0,07	0,10	0,13	0,18	0,21	0,24	0,06	0,11	0,17
C18:3(n-3)	Ácido α-linolénico	0,43	0,06	0,23	0,30	0,36	0,49	0,56	0,62	0,13	0,26	0,39
C18:4(n-3)	Ácido moróctico	1,56	0,25	0,81	1,06	1,31	1,81	2,06	2,31	0,50	1,00	1,50
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,13	0,05	-0,03	0,02	0,07	0,18	0,23	0,29	0,11	0,21	0,32
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,44	0,06	0,28	0,33	0,39	0,50	0,56	0,61	0,11	0,22	0,33
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	3,14	0,58	1,41	1,99	2,57	3,72	4,29	4,87	1,15	2,30	3,46
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,20	0,04	0,08	0,12	0,16	0,24	0,28	0,32	0,08	0,16	0,24
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	2,19	0,24	1,46	1,71	1,95	2,43	2,68	2,92	0,49	0,97	1,46
C20:5(n-3)	Ácido eicosapentaenoico (EPA)	56,74	0,56	55,07	55,63	56,19	57,30	57,86	58,42	1,12	2,23	3,34
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,61	0,25	1,85	2,11	2,36	2,86	3,12	3,37	0,51	1,01	1,52
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,57	0,21	-0,05	0,16	0,36	0,78	0,98	1,19	0,41	0,83	1,24
C22:5(n-3)	Ácido docosapentaenoico (DPA)	5,31	1,06	2,13	3,19	4,25	6,37	7,42	8,48	2,12	4,23	6,35
C22:6(n-3)	Ácido docosahexaenoico (DHA)	19,93	0,75	17,68	18,43	19,18	20,68	21,43	22,18	1,50	2,99	4,49

Como es evidente a partir de la Tabla 11, la diferencia de orden log en la concentración relativa en el API de la especie de ácido docosapentaenoico omega-3, DPA (C22:5 n-3), y el isómero de ácido docosapentaenoico omega-6 (C22:5 n-6), se mantiene - 5,31 % (a/a) para DPA (C22:5 n-3) frente al 0,57 % (a/a) para ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) - que es el aumento de 10 veces en la concentración de DPA en comparación con la formulación Purepa 5 de ácido libre omega-3 anterior notificada en Belluzzi *et al.* (5,31 frente al 0,5 %).

#### 5.5 Ejemplo 5: El análisis composicional de 21 lotes de producción ejemplares demuestra niveles reproduciblemente elevados de DPA

10 Ahora se ha observado la elevada concentración absoluta y relativa del ácido docosapentaenoico omega-3, DPA, en 21 lotes de API producidos usando formación de complejos de urea, como se resume en las Tablas 12 y 13, más adelante.

<b>Identidad</b>	<b>Nombre común</b>	<b>% mín. (a/a)</b>	<b>% máx. (a/a)</b>	<b>% AVG (a/a)</b>
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,49	1,00	0,74
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,12	0,52	0,24
C18:3(n-3)	Ácido $\alpha$ -linolénico	0,34	0,83	0,54
C18:4(n-3)	Ácido estearidónico (moróctico)	1,16	5,83	2,83
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,10	0,27	0,15
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,24	0,52	0,40
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico ( <b>AA</b> )	2,32	4,02	3,17
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,10	0,25	0,16
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	1,40	2,82	2,13
C20:5(n-3)	Ácido eicosapentaenoico (timnodónico) ( <b>EPA</b> )	48,61	57,64	55,40
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	1,81	2,88	2,33
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,17	0,73	0,58
C22:5(n-3)	Ácido docosapentaenoico ( <b>DPA</b> )	2,77	6,23	4,44
C22:6(n-3)	Ácido cervónico ( <b>DHA</b> )	15,99	21,78	19,35

Identidad	Nombre común	% AVG (a/a)	DE	-3DE	-2DE	-1DE	+1DE	+2DE	+3DE	1DE Δ	2DE Δ	3DE Δ
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,74	0,16	0,26	0,42	0,58	0,90	1,07	1,23	0,32	0,65	0,97
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,24	0,11	-0,09	0,02	0,13	0,35	0,46	0,58	0,22	0,44	0,66
C18:3(n-3)	Ácido α-linolénico	0,54	0,15	0,09	0,24	0,39	0,69	0,84	0,99	0,30	0,60	0,90
C18:4(n-3)	Ácido estearidónico (moróctico)	2,83	1,49	-1,63	-0,15	1,34	4,31	5,80	7,28	2,97	5,94	8,92
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,15	0,04	0,02	0,07	0,11	0,20	0,24	0,28	0,09	0,17	0,26
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,40	0,07	0,18	0,25	0,32	0,47	0,55	0,62	0,15	0,30	0,45
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	3,17	0,51	1,65	2,16	2,67	3,68	4,19	4,70	1,01	2,03	3,04
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,16	0,05	0,01	0,06	0,11	0,21	0,26	0,31	0,10	0,20	0,31
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	2,13	0,41	0,92	1,32	1,73	2,54	2,94	3,35	0,81	1,62	2,43
C20:5(n-3)	Ácido timnodónico (EPA)	55,40	2,13	49,00	51,13	53,27	57,53	59,66	61,80	4,26	8,53	12,79
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,33	0,34	1,29	1,64	1,98	2,67	3,02	3,36	0,69	1,38	2,07
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,58	0,16	0,11	0,27	0,43	0,74	0,90	1,06	0,31	0,63	0,94
C22:5(n-3)	Ácido docosapentaenoico (DPA)	4,44	1,16	0,98	2,13	3,29	5,60	6,75	7,91	2,31	4,62	6,93
C22:6(n-3)	Ácido cervónico (DHA)	19,35	1,69	14,28	15,97	17,66	21,04	22,73	24,42	3,38	6,76	10,14

### 5.6 Ejemplo 6: Los efectos del DPA sobre la expresión génica en células hepáticas predicen una mayor eficacia clínica de las composiciones enriquecidas en DPA

El DPA es la tercera especie de ácido graso poliinsaturado más prevalente en las composiciones farmacéuticas analizadas en los ejemplos anteriores, y está presente a una concentración de 10 veces la de Purepa, una composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre. Aunque el DPA es un intermedio en la ruta biosintética de EPA en DHA (véase la Figura 1), sorprendentemente se conoce poco sobre los efectos biológicos específicos de DPA. Véase, Kaur et al., "Docosapentaenoico acid (22:5n-3): a review of its biological effects," Prog. Lipid Res. 50:28-34 (2011). Para aclarar la potencial contribución de DPA a la eficacia clínica de la composición farmacéutica se realizaron experimentos de perfil de la expresión génica.

#### 5.6.1 Métodos

**Cultivo celular y tratamiento** - Se cultivaron células de hepatocarcinoma HepG2 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) sin suero (Sigma-Aldrich) con 4,5 g/l de glucosa, 1-glutamina, NaHCO<sub>3</sub> y piridoxina HCl complementado con un 1 % (vol/vol) de aminoácidos no esenciales, Na-piruvato al 1 %, penicilina al 1 %/estreptomycinina y el 10 % (vol/vol) de albúmina sérica bovina (BSA) sin ácidos grasos, todos adquiridos en Gibco BRL.

Los cultivos celulares se transfirieron semanalmente mediante digestión con tripsina y se incubaron a 37 °C en un incubador humidificado que contenía CO<sub>2</sub> al 5 %. Después de 5 semanas de cultivo celular, se añadieron EPA (ácido eicosapentaenoico, lote #0439708-2, Cayman Chemicals), DPA (ácido docosapentaenoico, lote 163481-26, Cayman Chemicals), y DHA (ácido docosahexaenoico, lote 0437083-5, Cayman Chemicals), diluidos inmediatamente antes del uso en DMEM libre de suero, para triplicar los pocillos (250.000 células/pocillo) a las concentraciones eficaces finales expuestas en la Tabla 14, a continuación.

Las relaciones de EPA (a 100 µM), DHA (a 40 µM), y DPA (a 11 µM) se escogieron aproximándose a las relaciones de EPA, DHA, y DPA en las composiciones farmacéuticas (API) descritas en la Sección 4.2 y el Ejemplo 5 (véanse las Tablas 12 y 13). Las concentraciones absolutas se escogieron aproximándose mejor, dentro de las restricciones impuestas por las relaciones composicionales deseadas y las restricciones impuestas por las condiciones de cultivo, a los intervalos plasmáticos observados en los brazos de tratamiento de 2 g y 4 g del ensayo EVOLVE (véase el Ejemplo 10). La concentración de DPA inferior (1 µM) se seleccionó aproximándose a la exposición sistémica de lo que se esperaba por el uso de la composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre, denominada Purepa, en la que se notificó que había DPA presente a un nivel de 1/10 el observado en la composición farmacéutica actual.

Las células HepG2 se incubaron con el ácido graso identificado (EPA, DHA, DPA o mezclas especificadas) durante un total de 48 horas antes de la recolección celular y de la extracción de ARN.

Tabla 14				
Muestra N.º	Especies de PUFA	Concentración final por pocillo	Pocillo	Calidad de ARN (260/280)
GL 01	EPA	30 µM	a	2,0
GL 02	EPA	30 µM	b	2,1
GL 03	EPA	30 µM	c	2,0
GL 04	EPA	100 µM	a	1,98
GL 05	EPA	100 µM	b	2,05
GL 06	EPA	100 µM	c	2,0
GL 07	DHA	12 µM	a	2,0
GL 08	DHA	12 µM	b	2,04
GL 09	DHA	12 µM	c	2,0
GL 10	DHA	40 µM	a	2,0
GL 11	DHA	40 µM	b	2,0
GL 12	DHA	40 µM	c	2,11
GL 13	DPA	0,3 µM	a	2,07
GL 14	DPA	0,3 µM	b	2,0
GL 15	DPA	0,3 µM	c	2,0
GL 16	DPA	3,0 µM	a	2,09

GL 17	DPA	3,0 $\mu$ M	b	2,0
GL 18	DPA	3,0 $\mu$ M	c	1,99
GL 19	DPA	1 $\mu$ M	a	2,2
GL 20	DPA	1 $\mu$ M	b	2,03
GL 21	DPA	1 $\mu$ M	c	2,03
GL 22	DPA	11 $\mu$ M	a	2,0
GL 23	DPA	11 $\mu$ M	b	2,08
GL 24	DPA	11 $\mu$ M	c	2,06
GL 25	EPA:DHA:DPA 100:40:1(50:20:0,5)	200 $\mu$ M totales	a	2,05
GL 26	EPA:DHA:DPA 100:40:1(50:20:0,5)	200 $\mu$ M totales	b	2,0
GL 27	EPA:DHA:DPA 100:40:1(50:20:0,5)	200 $\mu$ M totales	c	2,0
GL 28	EPA:DHA:DPA 100:40:11 (50:20:5,5)	200 $\mu$ M totales	a	2,0
GL 29	EPA:DHA:DPA 100:40:11 (50:20:5,5)	200 $\mu$ M totales	b	2,06
GL 30	EPA:DHA:DPA 100:40:11 (50:20:5,5)	200 $\mu$ M totales	c	2,07
GL 31	EPA:DHA:DPA 30:12:0,3 (50:20:0,5)	60 $\mu$ M totales	a	2,07
GL 32	EPA:DHA:DPA 30:12:0,3 (50:20:0,5)	60 $\mu$ M totales	b	2,13
GL 33	EPA:DHA:DPA 30:12:0,3 (50:20:0,5)	60 $\mu$ M totales	c	2,05
GL 34	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	60 $\mu$ M totales	a	2,0
GL 35	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	60 $\mu$ M totales	b	2,12
GL 36	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	60 $\mu$ M totales	c	2,01
GL 37	BSA (libre de ácido graso)		a	2,03
GL 38	BSA (libre de ácido graso)		b	2,00
GL 39	BSA (libre de ácido graso)		c	2,00

**Recogida de células y aislamiento de ARN** - El ARN total se aisló usando TRIzol, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La calidad del ARN se evaluó con un espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Como se expone en la Tabla 14, anteriormente, cada una de las extracciones de ARN para cada tratamiento tenía una relación de 260/280 entre 2,0 y 2,2. El ARN se purificó entonces adicionalmente con columnas de Qiagen RNeasy. De 300 ng del ARN total por preparación, se usó el kit de amplificación de ARN Illumina TotalPrep (Ambion) para generar ARNc biotinilado amplificado después de la transcripción inversa mediante el procedimiento de Eberwine. Las alícuotas de las muestras de ARN tratadas y de control se enviaron a un laboratorio central de expresión génica para su análisis. El resto de las muestras de ARN total se almacenó a -70 °C.

10

**Ensayo de expresión y análisis de datos** - Los transcritos específicos en el ARNc biotinilado se midieron mediante obtención de imágenes por fluorescencia después de la hibridación directa en matrices de microesferas Illumina HT-12, v. 4.0. Los datos de expresión génica se analizaron usando el software iReport™ de Ingenuity® (Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

15

## 5.6.2 Resultados

### 5.6.2.1 El perfil de expresión demuestra que DPA tiene efectos biológicos diferentes de EPA y DHA

20 Aunque el DPA es un intermedio en la vía de biosíntesis de EPA en DHA y aunque se sabe que el DPA se vuelve a convertir en EPA *in vivo*, Kaur et al., Prog. Lipid Res. 50:28-34 (2011), se observaron efectos notablemente diferentes sobre la expresión génica en células hepáticas después de la incubación con DPA, en comparación con los efectos observados con EPA y con DHA.

25 Para una evaluación de alto nivel de las similitudes y diferencias en los efectos sobre la expresión génica, se usó el

software iReport™ de Ingenuity® para consultar los datos de expresión génica para las 5 respuestas principales, clasificadas por el algoritmo iReport™ de Ingenuity®, observadas después de la exposición a cada uno de EPA (100 µM), DHA (40 µM), y DPA (11 µM), en diversas categorías curadas de genes. Los resultados se resumen en la Tabla 15 a continuación. En la Tabla 16 a continuación se presenta una evaluación análoga usando una clasificación 5 diferente. Los símbolos usados son: "I" - el atributo es único de la especie de ácido graso especificada; "II" - el atributo se comparte con otra especie de ácido graso; y "◆" - " | " - el atributo se observó típicamente con las 3 especies de ácidos grasos.

<b>Tabla 15</b>			
	<b>EPA</b>	<b>DHA</b>	<b>DPA</b>
<b>Enfermedades y trastornos</b>			
Cáncer	◆	◆	◆
Trastornos del tejido conectivo			
Enfermedades y afecciones dermatológicas		II	II
Trastorno del desarrollo			
Enfermedad hematológica			
Enfermedad inmunitaria			
Enfermedad infecciosa	◆	◆	◆
Enfermedad inflamatoria			
Enfermedad renal y urológica			
Enfermedad del sistema reproductor			
<b>Funciones moleculares y celulares</b>			
Compromiso celular			
Muerte y supervivencia celular	II	II	
Desarrollo celular	◆	◆	◆
Función y mantenimiento celular			
Crecimiento y proliferación celular	◆	◆	◆
Movimiento celular			
Señalización e interacción entre células		II	II
Expresión génica			
Modificación post-transcripción del ARN			
<b>Desarrollo y función del sistema fisiológico</b>			
Desarrollo y función del tejido conectivo			
Desarrollo y función del sistema hematológico	II		II
Hematopoyesis			
Tráfico de células inmunes			
Estructura y desarrollo de tejidos linfoides			
Desarrollo y función del sistema reproductivo	II	II	
Desarrollo y función del sistema esquelético y muscular			
Desarrollo de los tejidos		II	II
Morfología de los tejidos			
Morfología tumoral	◆	◆	◆
<b>Principales ruta canónicas</b>			
<b>Tabla 15</b>			
	<b>EPA</b>	<b>DHA</b>	<b>DPA</b>
CD27 Señalización en linfocitos			
IL-17A Señalización en las células de las vías respiratorias		II	II
IL-17A Señalización en células gástricas		II	II
IL-8 Señalización			
IMLP Señalización de neutrófilos			
Papel de IL-17F en las enfermedades inflamatorias alérgicas de las vías respiratorias			
Papel de IL-17A en la artritis	◆	◆	◆
Papel de IL-17A en la psoriasis		II	II
Papel de los macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en la artritis reumatoide			
TREM1 Señalización			

<b>Tabla 16</b>			
	<b>EPA</b>	<b>DHA</b>	<b>DPA</b>
<b>Listas Tox</b>			
Hipertrofia cardíaca			
Colestasis hepática	◆	◆	◆
Activación de células estrelladas hepáticas			
Aumenta el potencial transmembrana de las mitocondrias y la membrana mitocondrial			
Necrosis hepática/muerte celular			
Proliferación del hígado	↑	↑	
Mecanismo de regulación génica por proliferadores de peroxisoma a través de PPARα			
Activación de PPARα/RXRα		↑	↑
Panel de biomarcadores de glomerulonefritis primarios (Humano)			
Necrosis renal/muerte celular	↑		↑
<b>Química Clínica y Hematología</b>			
Niveles aumentados de albúmina			
Niveles aumentados de creatinina	◆	◆	◆
Niveles aumentados de hematocrito			
Niveles aumentados de glóbulos rojos	↑	↑	
<b>Tabla 16</b>			
	<b>EPA</b>	<b>DHA</b>	<b>DPA</b>
<b>Cardiotoxicidad</b>			
Arritmia cardíaca			
Daño cardíaco			
Disfunción cardíaca			
Fibrosis cardíaca	↑	↑	
Hipertrofia cardíaca	◆	◆	◆
Inflamación cardíaca	◆	◆	◆
Necrosis cardíaca/muerte celular	↑		↑
Proliferación cardíaca			
Anomalía cardíaca congénita			
<b>Hepatotoxicidad</b>			
Hiperplasia biliar			
Colestasis hepática	◆	◆	◆
Daño hepático			
Agrandamiento del hígado		↑	↑
Hepatitis Hepática		↑	↑
Inflamación del hígado	◆	◆	◆
Necrosis hepática/muerte celular			
Proliferación del hígado	↑	↑	
<b>Nefrotoxicidad</b>			
Daño renal	↑	↑	
Hidronefrosis renal			
Inflamación renal	◆	◆	◆
Necrosis renal/muerte celular	◆	◆	◆
Nefritis renal	◆	◆	◆
Proliferación renal	◆	◆	◆

Los datos destacados marcaron diferencias en los efectos de DPA, EPA y DHA en múltiples categorías.

Las diferencias en los efectos sobre la expresión génica también se observaron usando un análisis diferente, en el cual se identificaron los genes específicos regulados positivamente y regulados negativamente más significativamente por cada uno de EPA (100 µM), DHA (40 µM) y DPA (11 µM). Los datos se recopilan respectivamente en las Tablas 17 (genes regulados por aumento) y 18 (genes regulados por disminución) a continuación. Los símbolos usados son: "→" -expresión afectada en ambas concentraciones de DPA; "↑" Expresión regulada en común con otra especie de ácido graso, identificada entre paréntesis; "◆" gen regulado por las tres especies de ácidos grasos.

<b>Tabla 17</b>			
Genes resultados por aumento principales			
<b>Especie de ácido graso</b>	<b>Conc. µM</b>	<b>Genes</b>	
DPA	11	↑ MST1 (incluye EG:15235)	→¶(DHA)
		↑ MGC16121	→
		↑ AMT	→
		↑ AHSA2	→◆
		↑ SRSF1	→¶(EPA)
		↑ HNRNPA2B1	
		↑ ALDOC	
		↑ TOP3B	
		↑ STK36	
		↑ SRSF5	
DHA	40	↑ HIST2H2AA3/HIST2H2AA4	¶(EPA)
		↑ AHSA2	◆
		↑ MT1X	
		↑ SNORA62	
		↑ HIST1H3A (incluye otros)	
		↑ MST1 (incluye EG: 15235)	¶(DPA)
		↑ HIST2H2AC	
		↑ LOX	¶(EPA)
		↑ LSMD1	
		↑ MRPS34	
EPA	100	↑ HIST2H2BE (incluye otros)	
		↑ AHSA2◆	
		↑ SRSF1	¶(DPA)
		↑ RGS2 (incluye EG: 19735)	
		↑ HIST2H2AA3/HIST2H2AA4	¶(DHA)
		↑ MAT2A	
		↑ ZNF91	
		↑ HIST1H3A (incluye otros)	¶(DHA)
		↑ LOX	¶(DHA)
		↑ GNAI3	

<b>Tabla 18</b>			
Genes resultados por disminución principales			
<b>Especie de ácido graso</b>	<b>Conc. µM</b>	<b>Genes</b>	
DPA	11	↓ IL8	◆
		↓ CDKN2AIPNL	◆
		↓ CATSPER2	→◆
		↓ CCBE1	(DHA)
		↓ ALPP	(DHA)
		↓ CCL20	◆
		↓ DDX51	(DHA)
		↓ QRFPR	
		↓ ZNF14	
		↓ RELB	¶(EPA)
DHA	40	↓ CATSPER2	◆
		↓ IL8	◆
		↓ CCL20	◆
		↓ CDKN2AIPNL	◆
		↓ MAP2K2	
		↓ DDX51	¶(DPA)

		↓ CCBE1	↑(DPA)
		↓ JOSD1	
		↓ ALPP	↑(DPA)
		↓ ZNF652	
EPA	100	↓ IL8	◆
		↓ CCL20	◆
		↓ NFKBIA	
		↓ IER3	
		↓ RELB	↑(DPA)
		↓ CATSPER2	◆
		↓ CDKN2AIPNL	◆
		↓ ZFP38	
		↓ HERDSPUD1	

Las diferencias en los efectos de DPA, EPA y DHA también se observaron fácilmente al comparar los genes cuya expresión se ve afectada únicamente por cada una de las especies de PUGA omega-3.

<b>Tabla 19</b>			
Genes principales regulados únicamente por DPA (11 µM)			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. ALDOC			↑
2. AMT			↑
3. HNRNPA2B1			↑
4. MGC16121			↑
5. PRKCD			←
6. RELA (inhibido)			←
7. SRSF5			↑
8. STK36			↑
9. TLR7 (inhibido)			←
10. TOP3B			↑
11. QRFPR			↓
12. ZNF14			↑

<b>Tabla 20</b>			
Genes principales regulados únicamente por DHA (40 µM)			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. FOXO3		←	
2. LSMD1		↑	
3. MAP2K2		↓	
4. MRPS34		↑	
5. MT1X		↑	
6. NFKB1		←	
7. SNORA62		↑	
8. TNFSF11		←	
9. ZNF652		↓	

<b>Tabla 21</b>			
Genes principales regulados únicamente por EPA (100 µM)			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. Beta-estradiol (inhibido)	←		
2. GNAI3	↑		
3. G0S2	↓		
4. HERPUD 1	↓		
5. HIST2H2BE (incluye otros)	↑		
6. IL2 (inhibido)	←		

7. IER3	↓		
8. Lipopolisacárido (inhibido)	←		
9. MAT2A	↑		
10. NFκB (complejo) (inhibido)	←		
11. NFKBIA	↓		
12. RGS2 (incluye EG:19735)	↑		

Las diferencias en los efectos de DPA, EPA y DHA en la expresión génica también se pueden ver mediante la comparación de los genes cuya expresión se ve afectada más significativamente por al menos dos de las especies de ácidos grasos poliinsaturados.

5

Tabla 22			
Genes principales comúnmente regulados por DHA y DPA			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. AHS2	↑	↑	↑
2. ALPP		↓	↓
3. CATSPER2	↓	↓	↓
4. CCL20	↓	↓	↓
5. CDKN2AIPNL	↓	↓	↓
6. CCBE		↓	↓
7., DDX51		↓	↓
8. IL8	↓	↓	↓
9. MST1 (incluye EG:15235)		↑	↑

Tabla 23			
Genes principales comúnmente regulados por EPA y DPA			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. AHS2	↑	↑	↑
2. CATSPER2	↓	↓	↓
3. CCL20	↓	↓	↓
4. CDKN2AIPNL	↓	↓	↓
5. IL8	↓	↓	↓
6. RELB	↓		↓
7. SRSF1	↑		↑

Estos análisis demuestran colectivamente que existen marcadas diferencias en los efectos de EPA, DHA y DPA en múltiples categorías fisiológicas, farmacológicas y bioquímicas. EPA, DHA y DPA no tienen un efecto idéntico; las especies particulares que están presentes en una composición de PUFA omega-3 claramente importan con respecto a los efectos fisiológicos que la composición tendrá en la administración.

**5.6.2.2 DPA tiene una actividad significativa a concentración mayor, pero no inferior**

Se evaluaron dos concentraciones de DPA. Como se indicó anteriormente, la mayor concentración de DPA (a 11 μM), se eligió de manera que las relaciones de EPA (a 100 μM), DHA (a 40 μM) y DPA (a 11 μM) se aproximaran a las relaciones de EPA, DHA, y DPA en las composiciones farmacéuticas (API) descritas en la Sección 4.2 y el Ejemplo 5, con concentraciones absolutas elegidas para aproximarse lo mejor posible, dentro de la restricción impuesta por la relación de composición deseada y las restricciones impuestas por las condiciones de cultivo, a los intervalos plasmáticos observados en los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE (véase el Ejemplo 10). La concentración de DPA inferior (1 μM) se seleccionó aproximándose a la exposición sistémica de lo que se esperaba por el uso de la composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre, denominada Purepa, en la que se notificó que había DPA presente a un nivel de 1/10 el observado en la composición farmacéutica actual.

25

En general, 310 genes respondieron de manera única al nivel de DPA más alto, pero no al más bajo. La gran cantidad de genes que muestran cambios estadísticamente significativos en la expresión génica predice que el DPA tendrá efectos biológicos significativos cuando se alcance la concentración más alta *in vivo*. Por el contrario, la menor concentración de DPA es claramente una dosis por debajo del umbral, al menos con respecto a la regulación

de estos 310 genes, y se esperaría una respuesta mucho menor a esta menor concentración plasmática *in vivo*.

Cuando se evaluaron los efectos en los genes que el software iReport™ clasifica ampliamente como que afectan la función molecular y celular, dos subcategorías aparecen de forma exclusiva dentro de los 5 principales, clasificados por el algoritmo iReport™ de Ingenuity®, en la concentración de CPA superior, pero no inferior - aquellos involucrados en la expresión génica, y aquellos que afectan a la modificación postranscripcional del ARN. Dado el potencial de efectos pleiotrópicos de segundo orden causados por cambios en la expresión de genes que codifican proteínas que afectan a la expresión génica, y en genes que codifican proteínas que afectan a la modificación postranscripcional, estos resultados sugieren que el DPA es capaz de modular un gran número de las vías metabólicas en la concentración más alta, pero no en la más baja.

El efecto de dosis umbral también se puede ver centrándose en tres categorías de genes que se sabe que son relevantes para los efectos clínicos de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3: genes implicados en el metabolismo lipídico, genes implicados en la fisiología cardiovascular, y genes implicados en la inflamación (asignación de genes a las categorías identificadas realizadas automáticamente por el software iReport™). Los resultados se representan en la Tabla 24, a continuación.

Tabla 24			
	Respuestas génicas totales	Respuestas génicas totales	Respuestas génicas en común
	Bajo [DPA]	Alto [DPA]	
Metabolismo lipídico	2	22	0
Cardiovascular	10	51	6
Inflamatorio	18	22	4

Como se muestra en la Tabla 24, solo 2 genes implicados en el metabolismo lipídico respondieron a la concentración 1 µM de DPA, mientras que 22 genes del metabolismo lipídico respondieron de manera única con cambio estadísticamente significativo en la expresión tras la incubación en presencia de DPA 11 µM. Centrándose en el metabolismo lipídico, el DPA 1 µM es claramente una dosis por debajo del umbral, mientras que 11 µM tiene efectos significativos.

Un mayor número de genes demostró ser sensible a la dosis de DPA 1 µM en la categoría de fisiología cardiovascular, y se observó un aumento de cinco veces (en lugar de 10 veces) en el número de genes afectados a 11 µM de DPA. Un número aún mayor de genes implicados en las vías inflamatorias respondía a DPA 1 µM, con solo un pequeño aumento en el número de genes observado a 11 µM.

La concentración 11 µM *in vitro* es menor que la concentración en plasma ~90 µM observada en los pacientes EVOLVE 4 g/día. Véase el Ejemplo 10. Por lo tanto, los resultados predicen que una dosis clínicamente relevante de las composiciones enriquecidas en DPA descritas en la Sección 4.2 y el Ejemplo 5 (véanse las Tablas 12 y 13) tendrá efectos metabólicos significativos, incluidos los efectos sobre el metabolismo de los lípidos, la fisiología cardiovascular y la inflamación. Pocos, si alguno, de estos efectos específicos de DPA se esperarían en los niveles de DPA 10 veces más bajos vistos en la preparación anterior de Purepa.

### 5.6.2.3 DPA, a mayor concentración, afecta a la expresión de múltiples genes de metabolismo de lípidos

Los 22 genes del metabolismo lipídico que demuestran cambios estadísticamente significativos en la expresión a la concentración de DPA 11 µM, pero no a la concentración 1 µM, se identifican en la Tabla 25, a continuación.

Tabla 25				
Genes del metabolismo de lípidos que responden a DPA 11 µM				
Símbolo	Nombre Entrez Gene	ID Entrez Gene para ser humano	Nivel de cambio	Fármaco(s) que se sabe que afecta(n) a la expresión
APOA2	apolipoproteína A-II	336	-1,229	
CD83	molécula CD83	9308	-1,629	
DGAT1	diacilglicerol O-aciltransferasa 1	8694	1,602	omacor
DNAJB1	Homólogo DnaJ (Hsp40), subfamilia B, miembro 1	3337	-1,489	
FGFR3	receptor 3 del factor de crecimiento	2261	1,336	pazopanib

	de fibroblastos			
GNAI3	proteína de unión a nucleótido guanina (proteína G), polipéptido 3 de actividad de inhibición alfa	2773	1,455	
IL8	interleucina 8	3576	-2,535	
IL32	interleucina 32	9235	-1,629	
IL18 (incluye EG:16173)	interleucina 18 (factor inductor de interferón-gamma)	3606	-1,347	
IP6K1	inositol hexakisfosfato cinasa 1	9807	-1,242	
IP6K2	inositol hexakisfosfato cinasa 2	51447	1,319	
KIT	Homólogo del oncogen viral del sarcoma felino 4 v-kit Hardy-Zuckerman	3815	1,239	dasatinib, sunitinib, pazopanib, tivozanib, OSI-930, telatinib, tandutinib, imatinib, sorafenib
NFKB1	factor nuclear de potenciador de genes de polipéptidos de cadena ligera kappa en linfocitos B 1	4790	-1,386	
PDPN (incluye EG:10630)	podoplanina	10630	-1,307	
PGF	factor de crecimiento placentario	5228	-1,284	aflibercept
PIP4K2B	fosfatidilinositol-5-fosfato 4-cinasa, tipo II, beta	8396	-1,578	
PLA2G16	fosfolipasa A2, grupo XVI	11145	-1,337	
PLIN5	perilipina 5	440503	-1,371	
PTGR2	prostaglandina reductasa 2	145482	-1,416	
PTX3	pentraxina 3, largo	5806	-1,536	
RGS2 (incluye EG:19735)	regulador de señalización de proteína G 2, 24 kDa	5997	1,289	
STIP1	fosfoproteína 1 inducida por estrés	10963	-1,469	

Los efectos del DPA sobre la expresión de varios de estos genes sugieren que el DPA, a una concentración análoga *in vivo*, debería conducir a una mejora en diversos parámetros lipídicos clínicamente relevantes.

- 5 Por ejemplo, el DPA a 11  $\mu$ M regula positivamente **ACADSB**, la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta/ramificada. El producto del gen ACADSB está involucrado en la descomposición de los triglicéridos; se esperaría que la regulación positiva produjera niveles de triglicéridos en suero más bajos. **HMGCR**, que está regulado negativamente, codifica HMG-CoA reductasa, la enzima limitante de la velocidad para la síntesis de colesterol y la diana para la inhibición de estatinas. Por lo tanto, análogamente a la acción de la estatina, la regulación negativa de la expresión del gen HMGCR por DPA debería conducir a disminuciones favorables en la relación colesterol total:HDL. **SQLE**, que también está regulado negativamente, codifica la escualeno epoxidasa, que cataliza la primera etapa de oxigenación en la biosíntesis de esteroides y se cree que es una de las enzimas limitantes de la velocidad en esta vía. La regulación negativa de SQLE también debería conducir a niveles de colesterol total reducidos.

15

#### 5.6.2.4 Resumen de resultados de perfiles de expresión

- Los experimentos de perfil de expresión que usan una línea celular hepática demuestran que el DPA tiene una actividad biológica significativa a una concentración que se aproxima a los niveles plasmáticos observados en pacientes humanos a los que se administró una dosis diaria de 4 g de un lote ejemplar de la composición farmacéutica enriquecida en DPA.

- A esta concentración, DPA afecta a la expresión de los genes en múltiples vías metabólicas, incluyendo los genes en categorías que se conoce que son relevantes para los efectos clínicos de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3: los genes implicados en el metabolismo de los lípidos, los genes implicados en la fisiología cardiovascular, y los genes implicados en la inflamación. Se esperan efectos significativos de segundo orden, dados los cambios que se observaron en la expresión de los genes que codifican proteínas que por sí mismas afectan a la expresión génica, y en genes que codifican proteínas que afectan a la modificación postranscripcional.

25

Efectos específicos sobre la expresión de varios genes implicados en el metabolismo de los lípidos sugieren que DPA, a una concentración *in vivo* análoga, debería conducir a la mejora de diversos parámetros lipídicos clínicamente relevantes. En particular, se observó la regulación positiva de **ACADSB** impulsada por DPA, la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta/ramificada, que se espera que dé como resultado niveles de triglicéridos en suero más bajos; la regulación negativa de **HMGCR**, que, como el tratamiento con estatinas, debería conducir a disminuciones favorables en la relación colesterol total:HDL; y regulación negativa en **SQLC**, que de manera análoga, conduciría a niveles de colesterol total reducidos.

Estos efectos son distinguibles de los observados con EPA y DHA.

10

Estos experimentos demostraron efectos dependientes de la dosis estadísticamente significativos para DPA, con la concentración inferior, elegida para imitar la concentración inferior de 10 veces de DPA en una formulación de omega-3 de ácido libre anterior, afectando a genes 10 veces menos que la concentración superior de DPA, elegida para imitar la exposición al plasma observada en un ensayo clínico de las composiciones farmacéuticas enriquecidas en DPA descritas aquí. Al menos con respecto a los 300 genes únicamente regulados por la mayor concentración de DPA, incluyendo particularmente genes que afectan beneficiosamente al metabolismo de los lípidos, la menor concentración de DPA proporciona una exposición por debajo del umbral, y se espera que proporcione una dosis subterapéutica *in vivo*.

15

## 20 5.7 Ejemplo 7: Ensayo clínico ECLIPSE

### 5.7.1 AGENTES FARMACOLÓGICOS

Lovaza® - Prescripción Se adquirieron cápsulas de Lovaza® a través de fuentes comerciales de Estados Unidos. De acuerdo con la ficha técnica del producto aprobada por la FDA, cada cápsula de 1 gramo de Lovaza® contiene al menos 900 mg de los ésteres etílicos de los ácidos grasos omega-3 procedentes de aceites de pescado, predominantemente una combinación de ésteres etílicos de ácido eicosapentaenoico (EPA, aproximadamente 465 mg) y ácido docosahexaenoico (DHA, aproximadamente 375 mg). El análisis composicional independiente no se realizó.

30

ESTUDIO FARMACOLÓGICO (Epanova®) - Se prepararon cápsulas de gelatina blanda porcina de tipo A recubiertas con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG), conteniendo cada una un gramo de una composición de PUFA en la que los ácidos grasos poliinsaturados están presentes en la forma de ácidos grasos libres ("API"). El API encapsulado tenía la composición expuesta en la Tabla 26.

35

Especies de PUFA		API
(nombre común)	(longitud de cadena de carbono: número de dobles enlaces, serie omega)	(composición de ácido graso libre final) (% de a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,55
ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,15
ácido $\alpha$ -linolénico	18:3 n-3	0,39
ácido moróctico	18:4 n-3	1,70
ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,10
ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA)	20:3 n-6	0,35
ácido araquidónico ( <b>AA</b> )	20:4 n-6	2,43
ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,15
ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	2,18
ácido eicosapentaenoico ( <b>EPA</b> )	20:5 n-3	57,25
ácido heneicosapentaenoico	21:5 n-3	2,79
ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,83
ácido docosapentaenoico ( <b>DPA</b> )	22:5 n-3	6,23
ácido docosahexaenoico ( <b>DHA</b> )	22:6 n-3	19,58
	% total	98,43
	% de PUFA	96,30

	Omega 3 total	90,26
	Omega 6 total	4,41
	PUFA restantes	1,63
	% de saturados	0,35
	% de mono-insaturados	1,35
	% de desconocidos	0,42

### 5.7.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se realizó un estudio de biodisponibilidad abierto, de dosis única, aleatorizado, cruzado de 4 vías con dos tratamientos diferentes: 4 gramos de Epanova® o 4 g de Lovaza®, cada uno administrado con una comida baja en grasas y rica en grasas a 54 adultos sanos. La Figura 4 proporciona un diagrama de flujo de tratamiento que ilustra el diseño del estudio: brevemente, después de un periodo de lavado, los sujetos se asignaron al azar a una de dos secuencias de tratamiento:

- 10 (i) Epanova® (bajo en grasas) → Lovaza® (bajo en grasas) → Epanova® (rico en grasas) → Lovaza® (rico en grasas), o  
(ii) Lovaza® (bajo en grasas) → Epanova® (bajo en grasas) → Lovaza® (rico en grasas) → Epanova® (rico en grasas).
- 15 Comidas con periodos bajos en grasas (periodos 1 y 2): sin desayuno (ayuno); almuerzo sin grasa (0 g de grasa; 600 kcal) después de la extracción de sangre en 4 horas; cena baja en grasas (9 g de grasa, 900 kcal) después de la extracción de sangre en 12 horas. Los artículos alimentarios bajos en grasa fueron: yogur sin grasa, tazón de fruta, Fig Newtons sin grasa, comida Lean Cuisine. Comidas con periodos ricos en grasas (periodos 3 y 4): desayuno rico en grasas (20 g de grasa; 600 kcal) inmediatamente después de la extracción de sangre en 0,5 horas;
- 20 almuerzo rico en grasas (30 g de grasa; 900 kcal) después de la extracción de sangre en 4 horas; y cena rica en grasas (30 g de grasa; 900 kcal) después de la extracción de sangre en 12 horas. Los artículos alimentarios ricos en grasas fueron: sándwich de desayuno y mini donuts en polvo; pizza de queso; patatas fritas; y panini de queso y jamón.
- 25 Los requisitos de lavado de cribado previos al ensayo fueron: 60 días para aceite de pescado, complementos de EPA o DHA o alimentos enriquecidos; 7 días para aceites de pescado, linaza, semilla de perilla, cáñamo, espirulina o grosella negra, estatinas, secuestrantes de ácidos biliares, inhibidores de la absorción del colesterol o fibratos. El periodo de lavado cruzado fue de al menos 7 días.
- 30 La noche antes de la visita en la clínica, los sujetos consumieron una cena baja en grasa 12 horas antes del tiempo 0 de cada periodo de tratamiento (9 g de grasa; 900 kcal). El producto de investigación (Epanova® o LOVAZA®) se administró por la mañana después de la extracción de sangre previa a la dosis (tiempo 0). Muestreo de sangre farmacocinético para cada periodo de tratamiento de 2 días a -1,0, -0,5 y 0 horas (predosificación) y postdosificación a las 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 12 horas (+/-5 minutos) para el primer día y a las 24 horas (+/- 15 min) para el
- 35 segundo día.

### 5.7.3 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO Y ESTADÍSTICO

Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos para las concentraciones plasmáticas de EPA y DHA para el cambio ajustado con respecto al valor inicial en las concentraciones totales e individuales de EPA y DHA mediante métodos estándar no compartimentales:  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-inf}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$ , y  $T_{m\acute{a}x}$ .

Los determinantes principales de la biodisponibilidad: área transformada  $\ln$  bajo la curva de concentración plasmática frente al tiempo ( $AUC_t$ ) y la concentración plasmática máxima medida ( $C_{m\acute{a}x}$ ) en un intervalo de 24 horas para el cambio ajustado con respecto al valor inicial en concentraciones totales e individuales de EPA y DHA.

Las concentraciones de plasma se ajustaron con respecto al valor inicial antes del cálculo de los parámetros farmacocinéticos. Las Figuras se representan para el cambio ajustado con respecto al valor inicial en los medios geométricos (transformada  $\ln$ ).

Se usó el análisis de varianza (ANOVA) para evaluar los parámetros farmacocinéticos transformados  $\ln$  para las diferencias debidas a los tratamientos, el periodo, la secuencia de dosificación y los sujetos dentro de la secuencia.

Se calcularon las relaciones de las medias usando las medias por mínimos cuadrados para  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-inf}$ , y  $C_{m\acute{a}x}$  transformadas In.

- 5 Las relaciones de medias y sus intervalos de confianza del 90 % deben estar por encima del límite superior del 125,00 % para  $AUC_{0-t}$ ,  $AUC_{0-inf}$  y  $C_{m\acute{a}x}$  para mostrar que Epanova® tiene una biodisponibilidad relativa superior en comparación con Lovaza® con respecto a la dieta.

**5.7.4 RESULTADOS**

10

Población de estudio: El estudio incluyó a 54 adultos sanos, 41 varones (75,9 %) y 13 mujeres (24,1 %), de 21 a 77 años. Todos los periodos de tratamiento se completaron en 51 sujetos (94,4 %), completando 53 sujetos (98.1 %) la porción baja en grasa del estudio. La población era predominantemente negra o afroamericana (66,7 %) con un 31,5 % blanca y un 1,8 % asiática.

15

Biodisponibilidad - La Figura 5 compara la biodisponibilidad de EPA + DHA total (cambio ajustado al valor inicial) después de una dosis única (4 g) de Lovaza® durante los periodos ricos en grasa y bajos en grasas (condiciones de dosis en ayunas), confirmando que la biodisponibilidad de Lovaza® se disminuyó significativamente con la dieta baja en grasas. El cambio ajustado al valor inicial en los niveles totales de EPA + DHA en plasma muestra que el AUCt para Lovaza® en el periodo de comida baja en grasa disminuye un 83,3 % en comparación con Lovaza® en el periodo de comida rica en grasas: 661,6 frente a 3959,5 nmol-h/ml, respectivamente ( $p < 0,0001$ ) (datos de la media LS en la Tabla 27, a continuación). La  $C_{m\acute{a}x}$  de Lovaza® en el periodo bajo en grasas disminuyó en un 80,6 % en comparación con el periodo rico en grasa ( $p < 0,0001$ ) y  $T_{m\acute{a}x}$  aumentó un 62 % en el periodo bajo en grasa en comparación con el periodo rico en grasa (10,2 frente a 6,3 horas, respectivamente,  $p = 0,0001$ ).

25

Tabla 27							
Parámetro de biodisponibilidad	Media por mínimos cuadrados		Relación de medias (%)	Valor p <sup>a</sup>	C.V. intra-sujetos % <sup>b</sup>	Límites del intervalo de confianza al 90 % (%)	
	Bajo en grasas	Rico en grasas				Inferior	Superior
Cambio ajustado al valor inicial							
$AUC_t$ (nmol·h/ml)	661,63	3959,52	16,7	<0,0001	69,1	3,47	29,95
$C_{m\acute{a}x}$ (nmol/ml)	86,89	448,63	19,4	<0,0001	70,7	5,50	33,23
$T_{m\acute{a}x}$ (h)	10,19	6,28	162,3	0,0001	54,5	138,32	186,24
Datos de cambio ajustado al valor inicial (transformado Ln) (Medias geométricas)							
Ln $AUC_t$ (nmol·h/ml)	652,06	3468,17	18,8	<0,0001	55,3	15,72	22,49
Ln $C_{m\acute{a}x}$ (nmol/ml)	60,61	398,07	15,2	<0,0001	69,2	12,35	18,78
N = 53							
<sup>a</sup> El valor p es para la diferencia de la media por mínimos cuadrados (LS) entre Epanova® y Lovaza® del modelo ANOVA							
<sup>b</sup> % de covarianza							

- La Figura 6 compara la biodisponibilidad de EPA + DHA total (cambio ajustado al valor inicial) durante el periodo rico en grasas después de una dosis única (4 g) de Lovaza® frente a una dosis única (4 g) de Epanova®, lo que demuestra que en los periodos de comida rica en grasas, en los que se confirmó que la biodisponibilidad de Lovaza® era la más alta, la biodisponibilidad EPA + DHA fue significativamente mayor cuando se administró en forma de ácido graso libre (Epanova®) que como la composición correspondiente de éster etílico omega-3 (Lovaza®) ( $p < 0,0007$ ).
- 30

- La Figura 7 compara la biodisponibilidad de EPA + DHA total (cambio ajustado al valor inicial) después de una dosis única de Epanova® frente a Lovaza® durante el periodo de dieta baja en grasa, demostrando que el cambio ajustado al valor inicial en los niveles plasmáticos de EPA + DHA es  $AUC_t$  4,6 veces mayor para Epanova® que Lovaza® durante periodos de comidas bajas en grasas: 3077,8 frente a 668,9 nmol-h/ml, respectivamente ( $p < 0,0001$ ) (datos de la media LS en la Tabla 28, a continuación).  $C_{m\acute{a}x}$  de Epanova® es 3,2 veces mayor que para Lovaza® ( $p < 0,0001$ ) y  $T_{m\acute{a}x}$  es un 20 % más corto que para LOVAZA® (8 frente a 10 h, respectivamente;  $p = 0,0138$ ).
- 35
- 40

**Tabla 28**

Parámetro de biodisponibilidad	Media por mínimos cuadrados		Relación de medias (%)	Valor p <sup>a</sup>	C.V. intra-sujetos % <sup>b</sup>	C.V. entre sujetos % <sup>b</sup>	Límites del intervalo de confianza al 90 % (%)		
	Epanova®	Lovaza®					Inferior	Superior	
Cambio ajustado al valor inicial									
AUC <sub>t</sub> (nmol·h/ml)	3077,83	668,95	460,10	<0,0001	62,9	253	402,77	517,42	
C <sub>máx</sub> (nmol/ml)	277,58	86,35	321,46	<0,0001	71,6	48,9	27236	370,56	
T <sub>máx</sub> (h)	8,08	10,21	79,23	0,0138	45,8	24,6	65,60	92,86	
Datos de cambio ajustado al valor inicial (transformado Ln) (Medias geométricas)									
Ln AUC <sub>t</sub> (nmol·h/ml)		2651,41	658,09	402,90	<0,0001	63,9	243	329,71	492,33
Ln C <sub>máx</sub> (nmol/ml)		225,79	60,70	371,95	<0,0001	66,3	42,7	304,37	454,53

N = 53  
<sup>a</sup> El valor p es para la diferencia de la media por mínimos cuadrados (LS) entre Epanova® y Lovaza® del modelo ANOVA  
<sup>b</sup> % de covarianza

La Figura 8 compara la biodisponibilidad de EPA (cambio ajustado al valor inicial) después de una dosis única de Epanova® frente a Lovaza® durante el periodo de dieta baja en grasa, que muestra un AUC<sub>t</sub> 13,5 veces mayor para Epanova® que para Lovaza® durante periodos de comidas bajas en grasas: 578,2 frente a 42,7 µg·h/ml, respectivamente (p<0,0001) (los datos de la media LS se presentan en la Tabla 29, a continuación). C<sub>máx</sub> de Epanova® es 5,6 veces mayor que para Lovaza® (p<0,0001) y T<sub>máx</sub> es un 12 % más corto que para Lovaza® (8 frente a 9 horas, respectivamente; p = 0,2605).

**Tabla 29**

Parámetro de biodisponibilidad	Media por mínimos cuadrados		Relación de medias (%)	Valor p <sup>a</sup>	C.V. intra-sujetos % <sup>b</sup>	C.V. entre sujetos % <sup>b</sup>	Límites del intervalo de confianza al 90 % (%)		
	Epanova®	Lovaza®					Inferior	Superior	
Cambio ajustado al valor inicial									
AUC <sub>t</sub> (µg·h/ml)	578,22	42,67	1355,1	<0,0001	80,8	18,2	1163,8	1546,4	
C <sub>máx</sub> (µg/ml)	52,64	9,45	557,0	<0,0001	83,9	49,8	467,32	646,68	
T <sub>máx</sub> (h)	8,06	9,13	88,28	02605	54,7	25,8	71,02	105,54	
Datos de cambio ajustado al valor inicial (transformado Ln) (Medias geométricas)									
Ln AUC <sub>t</sub> (µg·h/ml)		495,66	48,65	457,09	<0,0001	93,0	23,5	713,46	1283,9
Ln C <sub>máx</sub> (µg /ml)		39,02	4,66	837,53	<0,0001	102,1	52,3	630,85	1111,9

N = 53  
<sup>a</sup> El valor p es para la diferencia de la media por mínimos cuadrados (LS) entre Epanova® y Lovaza® del modelo ANOVA  
<sup>b</sup> % de covarianza

10 La Figura 9 compara la biodisponibilidad de DHA (cambio ajustado al valor inicial) después de una dosis única de Epanova® frente a Lovaza® durante el periodo de dieta baja en grasa, que muestra un AUC<sub>t</sub> 2,2 veces mayor para Epanova® que para Lovaza® durante periodos de comidas bajas en grasas: 383,1 frente a 173,4 µg·h/ml, respectivamente (p<0,0001) (datos de la media LS presentados en la Tabla 30, a continuación). C<sub>máx</sub> de Epanova® es 1,9 veces mayor que para Lovaza® (p<0,0001) y T<sub>máx</sub> es un 21 % más corto que para Lovaza® (8 frente a 11 horas, respectivamente; p = 0,0148). La biodisponibilidad de DHA 2,2 veces mayor en Epanova® frente a Lovaza® se produjo a pesar de que había un 42 % menos de DHA en la formulación de Epanova®.

**Tabla 30**

Parámetro de biodisponibilidad	Media por mínimos cuadrados		Relación de	Valor p <sup>a</sup>	C.V. intra-	C.V. entre	Límites del intervalo de confianza al 90 % (%)	
	Epanova®	Lovaza®					Inferior	Superior

			medias (%)		sujetos % <sup>b</sup>	sujetos % <sup>b</sup>		
Cambio ajustado al valor inicial								
AUC <sub>t</sub> (µg·h/ml)	383,06	173,40	220,91	<0,0001	55,2	32,1	192,10	249,72
C <sub>máx</sub> (µg/ml)	35,50	19,19	185,02	<0,0001	66,0	48,3	154,43	215,61
T <sub>máx</sub> (h)	8,45	10,72	78,84	0,0148	47,3	24,0	64,82	92,87
Datos de cambio ajustado al valor inicial (transformado Ln) (Medias geométricas)								
Ln AUC <sub>t</sub> (µg·h/ml)	337,09	162,19	207,84	<0,0001	61,3	21,4	171,98	251,17
Ln C <sub>máx</sub> (µg/ml)	30,17	15,00	201,14	<0,0001	52,5	42,2	170,73	236,96
N = 53								
<sup>a</sup> El valor p es para la diferencia de la media por mínimos cuadrados (LS) entre Epanova® y Lovaza® del modelo ANOVA								
<sup>b</sup> % de covarianza								

Las Figuras 10A y 10B presentan respuestas AUC<sub>0-t</sub> de sujetos individuales durante las dietas bajas en grasas y ricas en grasas expresadas como la relación (%) entre AUC<sub>0-t</sub> de bajas en grasas y AUC<sub>0-t</sub> de ricas en grasas. Las relaciones negativas no se representaron. Los datos muestran que durante el periodo de dieta baja en grasas, 30 de 54 (56 %) sujetos en Epanova® (ácidos grasos libres) frente a 3 de 52 (6 %) en Lovaza® (ésteres etílicos) mantuvieron un AUC<sub>t</sub> que era ≥50 % del AUC<sub>t</sub> del periodo de dieta rica en grasas respectiva.

29 sujetos informaron un total de 51 eventos adversos. Los eventos adversos más comunes fueron dolores de cabeza (10 sujetos) y deposiciones sueltas o diarrea (9 sujetos). Todos los eventos adversos fueron de gravedad leve y ninguno fue grave. No hubo cambios clínicamente significativos en las evaluaciones físicas, de laboratorio o de signos vitales.

### 5.7.5 CONCLUSIONES

El cambio ajustado por el valor inicial en los perfiles de absorción (AUC) de EPA+DHA total y EPA y DHA individual con Epanova® (PUFA omega-3 en forma de ácido libre) fue significativamente mayor que con Lovaza® (ésteres etílicos de PUFA omega-3) durante el periodo de dieta rica en grasas y espectacularmente mejor durante el periodo de dieta baja en grasas. Adicionalmente, hubo un impacto muy profundo del contenido en grasas de las comidas sobre la biodisponibilidad de Lovaza®, mientras que la biodisponibilidad de Epanova® fue mucho más predecible, debido a un efecto del alimento únicamente modesto. La superior biodisponibilidad independiente de la grasa de Epanova® sobre Lovaza® es clínicamente importante ya que los sujetos con triglicéridos gravemente elevados requieren una dieta muy baja en grasas. Estos hallazgos demuestran una ventaja terapéutica significativa de la composición de Omega-3 de ácido graso libre para el tratamiento de hipertrigliceridemia grave en vista de la recomendación de NCEP ATP III para que estos sujetos sigan una dieta baja en grasas durante la terapia adyuvante.

### 5.8 Ejemplo 8: Ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días

Para determinar si los efectos observados después de una única dosis se mantuvieron después de la dosificación repetida, se realizó un estudio a más largo plazo. La Figura 11 es un diagrama de flujo de tratamiento que ilustra el diseño de la prueba de biodisponibilidad comparativa de 14 días, en la que el fármaco del estudio (Lovaza® o Epanova®) se consumió con un desayuno bajo en grasa. Por el contrario, las dosis se administraron en ayunas en el brazo con bajo contenido de grasa del ensayo ECLIPSE original descrito en el Ejemplo 7.

Los cambios desde el valor inicio hasta el estado estable en los niveles de EPA y DHA en el brazo de Lovaza® de la biodisponibilidad comparativa de 14 días fueron consistentes con estudios anteriores, como se muestra en la Tabla 31, que presenta el cambio porcentual medio en EPA y DHA en el estudios anteriores.

Fármaco	Estudio	N.º de sujetos	N.º de semanas	Δ EPA (%)	Δ DHA (%)
éster etílico omega-3	CK85-013	17	8	276	34
	CK85-014	54	12	300	50
	CK85-017	29	12	300	50
	CK85-019	26	12	200	29
	CK85-022	30	12	233	23

	CK85-023	28	12	139	11
	CK85-95014	30	24	260	54
	CK85-95009	22	16	173	-10*
	CK85-94010	20	6	202	77**
	CK85-95011	49	12	361**	59
	CK85-95012	6	6	156*	40
Intervalo de EPA (% de $\Delta$ ): (156*---- <b>209</b> ----361**)					
Intervalo de DHA (% de $\Delta$ ): (-10*----- <b>34</b> -----77**)					

La Figura 12A representa las concentraciones medias sin ajustar totales de EPA + DHA frente al tiempo (escala lineal), tanto para el tratamiento con Lovaza® como para el tratamiento con Epanova®. La Figura 12B es un histograma que muestra la diferencia en EPA + DHA sin ajustar (nmol/ml) para los puntos de tiempo entre paréntesis en la Figura 12A. Las Figuras 12A y 12B demuestran que después de 14 días de dosificación, la acumulación de EPA + DHA de Epanova® fue 2,6 veces mayor que la de Lovaza® en sujetos mantenidos con una dieta baja en grasas.

La Figura 13 representa concentraciones totales de EPA + DHA en plasma ajustadas al valor inicial frente al tiempo (escala lineal) para el tratamiento con Lovaza® frente al tratamiento con Epanova® en el estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días, lo que demuestra que después de 14 días de dosificación con comida baja en grasas, los niveles de EPA + DHA ( $AUC_{0-24}$ ) de Epanova® fueron 5,8 veces más altos que para Lovaza® en sujetos mantenidos con una dieta baja en grasas.

La Figura 14A es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial hasta el estado estable en niveles sanguíneos no ajustados para EPA + DHA en los brazos de Lovaza® y Epanova® del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días, demostrando que los niveles sanguíneos de EPA + DHA aumentaron un 316 % desde el valor inicial al estado estable en la cohorte de Epanova® en comparación con un 66 % en la cohorte de Lovaza®. La Figura 14B es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial al estado estable en  $C_{avg}$  sin ajustar para EPA + DHA en los brazos de Lovaza® y Epanova® del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días, demostrando que los niveles de concentración promedio ( $C_{avg}$ ) de EPA + DHA aumentaron un 448 % del valor inicial en la cohorte de Epanova® en comparación con un 90 % en la cohorte de Lovaza®.

La Figura 15A es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial hasta el estado estable para niveles sanguíneos totales de DHA en los brazos de Lovaza® y Epanova® del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días, demostrando que los niveles de DHA aumentaron un 109 % desde el valor inicial al estado estable en la cohorte de Epanova® en comparación con un 34 % en la cohorte de Lovaza®. La Figura 15B representa los aumentos desde el valor inicial al estado estable para los niveles  $C_{avg}$  de DHA en la cohorte de Epanova® en comparación con la cohorte de Lovaza® en el estudio comparativo de biodisponibilidad de 14 días, y demuestra que los niveles de concentración promedio ( $C_{avg}$ ) de DHA aumentaron un 157 % desde el valor inicial en la cohorte de Epanova® en comparación con un 47 % en la cohorte de Lovaza®.

La Figura 16A es un histograma que representa los aumentos desde el valor inicial hasta el estado estable para los niveles totales de EPA en sangre en los brazos de Lovaza® y Epanova® del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días, y demuestra que los niveles de EPA aumentaron un 1021 % desde el valor inicial al estado estable en la cohorte de Epanova® en comparación con un 210 % en la cohorte de Lovaza®. La Figura 16B representa los aumentos promedio de la concentración desde el valor inicial hasta el estado estable, y demuestra que los niveles  $C_{avg}$  de EPA aumentaron un 1,465 % desde el valor inicial en la cohorte de Epanova® en comparación con el 297 % en la cohorte de Lovaza®.

Los datos demuestran que el aumento en la biodisponibilidad observado después de la dosificación única en el ensayo ECLIPSE se mantiene, incluso se mejora, a largo plazo (2 semanas). Además, los datos desglosados por específicos por sujeto (no mostrados) demuestran que el sujeto con la menor respuesta a Epanova® aún tenía una  $C_{m\acute{a}x}$  de EPA + DHA de 14 días mayor que el sujeto con mejor respuesta a Lovaza®.

El aumento de  $C_{avg}$  y los niveles sanguíneos totales de especies de PUFA omega-3 clínicamente relevantes logrados con Epanova® en comparación con Lovaza® predice una eficacia significativamente mejorada en la reducción de los niveles de triglicéridos en suero y en la reducción del riesgo cardiovascular.

## 5.9 Ejemplo 9: Estudio de ratas de 13 semanas

Este estudio comparó la exposición a omega-3 y sus efectos sobre los niveles de lípidos en suero en ratas tratadas con dosis equivalentes de Epanova® o LOVAZA® durante 13 semanas.

- 5 Se seleccionó la rata Sprague Dawley para este estudio porque era la cepa de rata utilizada en el programa de toxicología realizado con Lovaza®, y por lo tanto, permitió la comparación directa de los datos del presente estudio con Epanova® con los datos de toxicidad para ratas públicamente disponibles en Lovaza® Summary Basis of Approval. El diseño del estudio proporcionó una sólida evaluación toxicológica de Epanova® con selecciones de dosis basadas en los datos de toxicidad para ratas públicamente disponibles para Lovaza® (dosis máxima tolerada = 10 2000 mg/kg). Las ratas Sprague Dawley proporcionan un modelo reconocido para predecir los efectos de los PUFA omega-3 sobre los cambios lipídicos para los triglicéridos y el colesterol total en sujetos humanos. Los resultados a las 13 semanas se muestran en la Tabla 32, a continuación.

Tratamiento	Sexo	Exposición a DHA <sup>a</sup>		Exposición a EPA <sup>a</sup>		TG (% de diferencia del control)	Colesterol (% de diferencia del control)
		AUC <sub>(0-t)</sub> (µg·h/ml)	C <sub>máx</sub> (µg/ml)	AUC <sub>(0-t)</sub> (µg·h/ml)	C <sub>máx</sub> (µg/ml)		
Epanova®	M	15,56	1,82	14,02	2,15	-32	-45
	F	13,00	2,05	9,50	1,38	-53	-41
	Ambos	14,28	1,94	11,76	1,77	-43	-43
Lovaza®	M	6,55	0,47	7,57	0,73	-14	-25
	F	4,97	0,40	6,04	0,55	-38	-36
	Ambos	5,76	0,43	6,81	0,64	-26	-31

**AUC<sub>(0-t)</sub>** Área bajo la curva de tiempo de concentración en plasma hasta el último tiempo de muestra. Medición de exposición sistémica  
**C<sub>máx</sub>** Concentración plasmática máxima  
<sup>a</sup> Valores normalizados a la dosis basados en dosis estimadas de DHA y EPA

- 15 Como se muestra en la Tabla 32, Epanova® proporcionó no solo concentraciones plasmáticas máximas (C<sub>máx</sub>) notablemente superiores de DHA y EPA que Lovaza®, sino que también proporcionó un AUC<sub>(0-t)</sub> notablemente superior para las dos especies de omega-3; AUC<sub>(0-t)</sub> es una medida de la exposición sistémica. La mayor biodisponibilidad y la exposición sistémica a largo plazo de estas dos especies de PUFA omega-3 con terapia de Epanova® dieron como resultado diferencias a largo plazo en la eficacia de reducción lipídica, realizando Epanova® 20 reducciones sustancialmente mayores en los triglicéridos plasmáticos y en el colesterol total que las observadas con LOVAZA®. Las composiciones descritas en el presente documento proporcionan, por lo tanto, una mayor eficacia con respecto a dos parámetros cardiovasculares clínicamente importantes.

### 5.10 Ejemplo 10: Ensayo EVOLVE

25

#### 5.10.1 AGENTES FARMACOLÓGICOS

- FÁRMACO DE ESTUDIO (Epanova®) - Se prepararon cápsulas de gelatina blanda porcina de tipo A, conteniendo cada una un gramo (1 g) de una composición de PUFA que comprendía PUFA omega-3 en forma de ácido libre 30 ("API"). Las cápsulas se recubrieron con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). El API tenía la composición dada en el lote 2 de la Tabla 10 (véase el Ejemplo 4, anteriormente).

PLACEBO - Se prepararon cápsulas que contenían aceite de oliva para su uso como control.

#### 35 5.10.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

- Se realizó un estudio de 12 semanas de doble ciego, controlado con aceite de oliva en Estados Unidos, Dinamarca, Hungría, India, Países Bajos, Rusia y Ucrania. Los sujetos se seleccionaron sobre la base de altos niveles de triglicéridos, en el intervalo de 500-2.000 mg/dl. Los sujetos se seleccionaron al azar para recibir 2, 3 o 4 gramos de Epanova®, o 4 gramos de aceite de oliva como placebo. El diseño del ensayo general se ilustra en la Figura 17, proporcionando la Figura 18 un diagrama de flujo de tratamiento más detallado identificando además el momento de las visitas de estudio. El criterio de valoración principal del estudio fue el cambio porcentual de los niveles plasmáticos de triglicéridos desde el valor inicial al final del tratamiento ("EOT"). El criterio de valoración secundario fue el cambio porcentual en plasma de colesterol no HDL ("No HDL-C") desde el valor inicial a EOT.

### 5.10.3 RESULTADOS

La Figura 19 muestra la disposición de todos los sujetos, abreviando "AE" "evento adverso" y abreviando "SAE" "evento adverso grave".

Se seleccionó un total de 1.356 sujetos inicialmente, y de estos, 399 fueron seleccionados para participar en el estudio. De los 399 sujetos, 99 recibieron placebo de aceite de oliva, 100 recibieron Epanova® 2 g/día; 101 recibieron Epanova® 3 g/día; y 99 recibieron Epanova® 4 g/día. La Tabla 33 muestra las mediciones promedio de triglicéridos (TG) y colesterol para los sujetos aleatorizados (antes del tratamiento), en comparación con los niveles deseables que se describen en el Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), producido por el National Heart Lung and Blood Institute.

Parámetro	Deseable (mg/dl) <sup>1</sup>	Pacientes asignados al azar para el ensayo			
		4 g/día	3 g/día	2 g/día	Aceite de oliva
TG	<150	655	715	717	686
HDL-C	>40	29	28	27	29
LDL-C	<100	90	81	77	78
No HDL-C	<130	225	215	205	215
VLDL-C	<30	126	124	123	125

<sup>1</sup> NCEP ATP III, septiembre de 2002

De los pacientes que recibieron aceite de oliva, cinco fueron retirados del estudio debido a los siguientes motivos: consentimiento retirado (1), pérdida durante el seguimiento (1) y otras razones (3). De los pacientes que recibieron Epanova® 2 g/día, se retiraron siete por las siguientes razones: efectos adversos (5), consentimiento retirado (1) y otros (1). De los pacientes que recibieron Epanova® 3 g/día, 14 fueron retirados debido a: efectos adversos (7), incumplimiento (2), consentimiento retirado (1), pérdida durante el seguimiento (3) y otras razones (1). De los pacientes que recibieron Epanova® 4 g/día, 9 se retiraron, debido a: efectos adversos (5), incumplimiento (1), consentimiento retirado (2) y otras razones (1).

Epanova® alcanzó el criterio de valoración primario de la reducción de triglicéridos y el criterio de valoración secundario de reducción del colesterol no HDL (nivel de colesterol total menos el nivel de colesterol HDL) ("no HDL-C") en todas las dosis, y produjo reducciones estadísticamente significativas en múltiples marcadores establecidos de aterogenicidad: Apo B, Apo CIII, RLP, y LpPLA2. En pacientes en tratamiento concomitante con estatinas, Epanova® proporcionó eficacia aditiva sobre los parámetros lipídicos clave: TG; no HDL-C; HLD-c; colesterol total (TC); y TC/HDL-C.

Se midieron los niveles plasmáticos de EPA, DHA y DPA, las tres especies de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en mayor abundancia en Epanova®, al inicio y al final del tratamiento (EOT), al igual que los niveles plasmáticos Ic-PUFA omega-6, ácido araquidónico (AA). La Tabla 34, a continuación, representa por separado el valor inicial promedio, el valor inicial de la mediana, el fin del tratamiento (EOT) promedio, y los niveles en plasma EOT de la mediana para EPA, DHA, DPA y AA, así como TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C y LDL-C.

Los niveles plasmáticos iniciales de EPA, DHA, DPA y AA indican la aleatorización eficaz de los sujetos entre los brazos de tratamiento. Las relaciones de EPA:AA al inicio del estudio fueron aproximadamente 0,10 (véase la Tabla 37, a continuación).

Las Figuras 20A - 20E representan los niveles plasmáticos promedio al inicio y al final del tratamiento ("EOT") (en µg/ml) para EPA (Figura 20A), DHA (Figura 20B), DPA (Figura 20C) y AA (Figura 20D), para cada uno de los brazos de tratamiento en el ensayo EVOLVE. La Figura 20E compara los niveles promedio al inicio y EOT de EPA para cada brazo de tratamiento y el brazo control (aceite de oliva) con respecto a los valores notificados anteriormente para ECLIPSE (véase el Ejemplo 7), estudio de biodisponibilidad de 14 días (véase el Ejemplo 8), un estudio de interacción fármaco-fármaco con estatinas (Estatina DDI) y el ensayo JELIS no relacionado realizado por otros con una formulación diferente de PUFA omega-3 ("JELIS"). Se ha de apreciar que los sujetos japoneses en el ensayo JELIS tenían niveles iniciales de EPA más altos. Las Figuras 21A - 21D representan los niveles plasmáticos de la mediana iniciales y al final del tratamiento (EOT) (en µg/ml) para EPA (Figura 21A), DHA (Figura 21B), DPA (Figura 21C), y AA (Figura 21D).

<b>Tabla 34</b>					
<b>(Niveles plasmáticos absolutos iniciales y EOT)</b>					
		Valor inicial (Promedio)	EOT (Promedio)	Valor inicial (Mediana)	EOT (Mediana)
EPA (µg/ml)	2 g	36,6	126,8	26,7	104
	3 g	41,4	174,7	30,7	141,9
	4 g	38,9	199,7	25,7	170
DHA (µg/ml)	2 g	106,6	159,9	93,5	148,3
	3 g	113,7	183,6	97,4	156,9
	4 g	104,8	188,8	91,8	169,1
DPA (µg/ml)	2 g	37,6	61,77	35,23	54,59
	3 g	38,71	69,36	34,71	58,56
	4 g	36,84	69,73	32,53	66,03
AA (µg/ml)	2 g	377,9	327,4	358,4	279,2
	3 g	394,9	344	368,8	313,8
	4 g	393,9	298,1	363,4	274,2
TG (mg/dl)	2 g	760,1	608,7	669	554
	3 g	766,9	754,5	612	560,8
	4 g	730,5	557,2	631	511
No HDL-C (mg/dl)	2 g	219,6	208,2	205,3	209,3
	3 g	223,4	221,5	215,3	197
	4 g	230,7	214,1	225	211
HDL-C (mg/dl)	2 g	28	30,7	27,3	29
	3 g	29,1	30,4	28	28
	4 g	29,9	32,2	28,7	29
V-LDL-C (mg/dl)	2 g	138,1	106,9	123,3	98
	3 g	143	121,5	124	93,8
	4 g	143,9	100,7	126	87
LDL-C (mg/dl)	2 g	83,1	101,3	77,3	93,3
	3 g	84,9	99,7	81	95
	4 g	90,4	113,4	90,3	109,5
ApoB (mg/dl)	2 g	115,6	121,1	114	120
	3 g	114,5	116	112	115
	4 g	119,3	126,6	118	121,5
ApoCIII (mg/dl)	2 g	26,5	24,3	22	21
	3 g	27,8	25	27	21
	4 g	27,5	22,7	27	21
RLP (mg/dl)	2 g	55,5	49,7	49,7	37
	3 g	62,7	54,4	54,4	34,5
	4 g	58,1	43,4	43,4	33
LpPLA2 (ng/ml)	2 g	270,6	236,7	266	225
	3 g	271,2	241,4	244,5	223,5
	4 g	266,9	223,2	249	208

La Tabla 35, a continuación, representa el cambio promedio y el cambio de la mediana en los niveles de plasma absolutos desde el valor inicial a EOT para EPA, DHA, DPA, y AA, así como para TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C, y 5 LDL-C.

<b>Tabla 35</b>									
	AA (µg/ml)	EPA (µg/ml)	DPA (µg/ml)	DHA (µg/ml)	TG (mg/dl)	no HDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
<b>cambio promedio desde el valor inicial a EOT</b>									
<b>2 g</b>	-50,5	90,2	24,17	53,3	-183,6	-13,3	2,6	-31,2	18
<b>3 g</b>	-50,9	133,3	30,65	69,9	-69	-6,1	1,7	-21,9	15,5

<b>g</b>									
<b>4 g</b>	-95,8	160,8	32,89	84	-220,2	-21,9	2,1	-42,5	21,7
<b>cambio de la mediana desde el valor inicial a EOT</b>									
<b>2 g</b>	-79,2	77,3	19,36	54,8	-172,2	-16	1,7	-31,5	14,8
<b>3 g</b>	-55	111,2	23,85	59,5	-150,1	-6,7	1,8	-25,3	11,9
<b>4 g</b>	-89,2	144,3	33,5	77,3	-178	-17	1,7	-37,7	22,3

Las Figuras 22A, 22B, 26A, y 26B representan los datos en la tabla anterior, mostrando el cambio del valor inicial a EOT en los niveles plasmáticos absolutos (en µg/ml) de AA, DHA, EPA, y DPA para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE, representando la Figura 22A el cambio promedio, y representando la Figura 22B el cambio de la mediana desde el valor inicial.

La Tabla 36A, a continuación, representa por separado el cambio porcentual promedio, de la mediana, y de la media por mínimos cuadrados desde el valor inicial a EOT en los niveles plasmáticos de EPA, DHA, DPA, y AA, así como TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C, y LDL-C, para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE.

10

La Tabla 36B, a continuación, representa por separado el cambio porcentual promedio, de la mediana y de la media por mínimos cuadrados desde el valor inicial a EOT en los niveles plasmáticos de ApoB, ApoCIII, LpPLA2, y RLP, para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE.

<b>Tabla 36A</b>									
	<b>AA</b> (µg/ml)	<b>EPA</b> (µg/ml)	<b>DPA</b> (µg/ml)	<b>DHA</b> (µg/ml)	<b>TG</b> (mg/dl)	<b>no HDL-C</b> (mg/dl)	<b>HDL-C</b> (mg/dl)	<b>VLDL-C</b> (mg/dl)	<b>LDL-C</b> (mg/dl)
<b>cambio porcentual promedio desde el valor inicial a EOT</b>									
<b>2 g</b>	-10,5	410,8	86,08	69	-21,2	-5,4	10	-21,2	25,6
<b>3 g</b>	-11,2	538,1	96,59	88,4	-14,1	-3,4	5,6	-18,6	20
<b>4 g</b>	-18	778,3	131,66	106	-25,2	-8	7,2	-27,5	26,2
<b>cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial a EOT</b>									
<b>2 g</b>	-15,6	253,9	75,3	61,2	-25,8	-7,7	7	-24,7	21,4
<b>3 g</b>	-17,9	317	68,6	61,9	-21,7	-3,2	6,2	-21,5	15,5
<b>4 g</b>	-25,9	404,8	74,87	65,5	-30,7	-7,7	5	-34,7	26,2
<b>cambio porcentual de la media LS</b>									
<b>2 g</b>	-15,14	267,04	--	56,72	-26,47	-7,77	7,46	-27,05	19,35
<b>3 g</b>	-15,98	331,86	--	64,07	-24,38	-6,49	3,33	-25,62	13,94
<b>4 g</b>	-23,2	406,32	--	71,77	-31,1	-9,76	5,71	-33,23	19,36

<b>Tabla 36B</b>				
	<b>ApoB</b>	<b>ApoCIII</b>	<b>LpPLA2</b>	<b>RLP</b>
<b>cambio porcentual promedio desde el valor inicial a EOT</b>				
<b>2 g</b>	5,9	-8,3	-11,3	-0,9
<b>3 g</b>	4,6	-8,5	-8,8	-6,9
<b>4 g</b>	5,7	-9,8	-14,1	-10,3
<b>cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial a EOT</b>				
<b>2 g</b>	6,3	-8,7	-11,3	-20,2
<b>3 g</b>	5,6	-12,8	-9,5	-16,2
<b>4 g</b>	5,7	-15	-14,6	-28,2
<b>cambio de la media LS (%)</b>				
<b>2 g</b>	3,84	-10,87	-14,93	-20,67
<b>3 g</b>	2,28	-12,16	-11,06	-22,63
<b>4 g</b>	3,78	-14,39	-17,17	-27,52

La Figura 23A representa el cambio promedio del valor inicial a EOT, como porcentaje del valor inicial, para AA, DHA, EPA, y DPA en cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE, y la Figura 23B representa el cambio porcentual de la mediana del valor inicial a EOT.

La Tabla 37 a continuación presenta las relaciones EPA/AA al comienzo y al final del tratamiento para cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo EVOLVE.

<b>Tabla 37</b>		
<b>Relaciones EPA/AA</b>		
	<b>valor inicial</b>	<b>EOT</b>
<b>promedio</b>		
<b>2 g</b>	0,096851	0,387294
<b>3 g</b>	0,104837	0,507849
<b>4 g</b>	0,098756	0,669909
<b>mediana</b>		
<b>2 g</b>	0,074498	0,372493

<b>Tabla 37</b>		
<b>Relaciones EPA/AA</b>		
	<b>valor inicial</b>	<b>EOT</b>
<b>3 g</b>	0,083243	0,452199
<b>4 g</b>	0,070721	0,619985

5 Como se puede ver en las Tablas 35 y 36A y las Figuras 20 - 23, el tratamiento de 12 semanas con Epanova® produjo aumentos drásticos en los niveles plasmáticos de EPA, DHA y DPA. Por ejemplo, a la dosis de 2 g, el cambio porcentual promedio desde el valor inicial a EOT en los niveles plasmáticos de EPA fue del 411 %; a la dosis de 4 g, del 778 %. El cambio porcentual de la mediana en los niveles plasmáticos de EPA fue respectivamente del 254 % y del 405 %. A la dosis de 2 g, el cambio porcentual promedio desde el valor inicial a EOT en los niveles plasmáticos de DHA fue del 69 %; a la dosis de 4 g, el cambio porcentual promedio fue del 106 %. El cambio porcentual promedio en los niveles plasmáticos de DHA parece menos drástico, con un cambio del 61,2 % a 2 g de Epanova®, y un cambio del 65,5 % a 4 g.

15 Los aumentos en los niveles plasmáticos de EPA, DHA, y DPA se acompañaron de reducciones significativas en los niveles plasmáticos de AA, realizando el régimen de dosificación de 4 g una reducción promedio de 95,8 µg/ml y una reducción de la mediana de 89,2 µg/ml, lo que corresponde a una reducción porcentual promedio del 18 %, un cambio porcentual de la mediana del 25,9 %, y un cambio de la media LS del 23,2 %. Cabe señalar que la disminución en los niveles plasmáticos de ácido araquidónico se observó a pesar de la administración exógena de ácido araquidónico, que estaba presente al 2,446 % (a/a) en el lote de Epanova® utilizado en este ensayo.

20 El aumento en los niveles plasmáticos de EPA y una reducción concomitante en los niveles plasmáticos de AA causaron una mejora significativa en la relación EPA/AA, como se muestra en la Tabla 37, de aproximadamente 0,10 en el valor inicial a aproximadamente 0,67 (promedio) y 0,62 (mediana) al EOT a la dosis de 4 g.

25 Adicionalmente, el tratamiento con Epanova® dio como resultado reducciones sustanciales de los niveles de TG, como se muestra en la Figura 26A y la Figura 26B que representan el promedio y la mediana, respectivamente, para el cambio absoluto desde el valor inicial. La Figura 27 ilustra el porcentaje de sujetos que presentaron una reducción del 0-10 % en TG, una reducción del 10-20 % en TG, una reducción del 20-30 % en TG, una reducción del 30-40 % en TG, una reducción del 40-50 % en TG, y mas del 50 % de reducción en TG, para las dosis Epanova® 2 g y 4 g.

30 La Figura 26A y la Figura 26B también muestran que no HDL-C y VLDL-C se redujeron, mientras que HDL-C se elevó. Los niveles de LDL-C también se elevaron, una medición que probablemente se debe a un aumento en el tamaño de partícula de LDL después del tratamiento (analizado adicionalmente en el Ejemplo 12). Los cambios porcentuales promedio y de la mediana se muestran en la Figura 28A y la Figura 28B, respectivamente.

35 Los niveles promedio absolutos iniciales y EOT se representan gráficamente en las Figuras 24A - 24I para TG (Figura 24A), no HDL-C (Figura 24B), HDL-C (Figura 24C), V-LDL-C (Figura 24D), LDL-C (Figura 24E), ApoB (Figura 24F), ApoCIII (Figura 24G), RLP (Figura 24H), y LpPLA2 (Figura 24I). Los niveles de la mediana absolutos iniciales y EOT se representan gráficamente en las Figuras 25A - 25I para TG (Figura 25A), no HDL-C (Figura 25B), HDL-C (Figura 25C), V-LDL-C (Figura 25D), LDL-C (Figura 25E), ApoB (Figura 25F), ApoCIII (Figura 25G), RLP (Figura 25H), y LpPLA2 (Figura 25I).

40 La extremadamente elevada biodisponibilidad de los PUFA omega-3 en Epanova® reveló diferencias en la respuesta farmacocinética entre las diversas especies de plasma. La Figura 29 representa la tasa de cambio en el

cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial en los niveles plasmáticos de EPA, DHA, DPA, AA, TG, no HDL-C, y HDL-C (valor absoluto) entre las dosis de 2 g y 4 g de Epanova®. La Tabla 38, a continuación, representa los resultados:

<b>Tabla 38</b>						
(tasa de cambio en el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial) (valor absoluto)						
<b>EPA</b>	<b>DHA</b>	<b>DPA</b>	<b>AA</b>	<b>TG</b>	<b>no HDL-C</b>	<b>HDL-C</b>
0,59432847	0,07026143	0,00571049	0,66025641	0,189922	0	0,285714

5

Dado el poco o ningún aumento en los niveles plasmáticos de DHA y DPA después de la duplicación de la dosis de Epanova® de 2 g a 4 g al día, la tasa de cambio (pendiente) en el cambio porcentual de la mediana desde el valor inicial es casi nulo, lo que predice que se observará poco aumento adicional en los niveles plasmáticos de DHA y DPA tras un aumento adicional de la dosis. Se observa un estancamiento similar de la respuesta en los niveles de triglicéridos, niveles de HDL-C y niveles de no HDL-C (datos no mostrados).

10

Por el contrario, la tasa de cambio para EPA sigue siendo alta, con una pendiente de 0,59; se espera obtener un aumento adicional de los niveles plasmáticos de EPA aumentando la dosis de Epanova® por encima de 4 g/día. Significativamente, la tasa de cambio en los niveles de AA tras la duplicación de la dosis de Epanova® de 2 g a 4 g al día es todavía mayor que la observada para EPA; cabe esperar que se produzcan reducciones adicionales en los niveles plasmáticos de AA a medida que se aumenta la dosis de Epanova® por encima de 4 g/día. Por lo tanto, Epanova® presenta una potencia sin precedentes en la capacidad de reducir los niveles de AA.

15

El resumen de los resultados del ensayo EVOLVE se representa en la Tabla 39, a continuación.

	OO (n = 98=)			2 gramos (n = 99)			3 gramos (n = 97)			4 gramos (n = 99)				
	Valor inicial (mg/dl)	% de A	Valor inicial (mg/dl)	% de A	valor p	Diferencia LSM ref. a OO	Valor inicial (mg/dl)	% de A	valor p	Diferencia LSM ref. a OO	Valor inicial (mg/dl)	% de A	valor p	Diferencia LSM
TG	686,3	-10,4	717	-25,8	0,003	-22,1	715	-21,7	0,021	-20	655	-30,7	<0,001	-26,7
No HDL-C	214,5	-0,9	205,3	-7,7	0,018	-10,3	215,3	-3,2	0,042	-9	225	-7,7	0,002	-12,2
HDL-C	28,7	2,2	27,3	7	0,088	5,5	28	6,2	0,127	1,4	28,7	5	0,127	3,7
TC/HDL-C	8,8	-1,9	8,8	-9,5	0,024	-11,8	8,8	-7,2	0,137	-7,7	9	-14,1	0,004	-12,9
LDL-C	78,2	9,8	77,3	21,4	0,003	16,2	81	15,5	0,092	10,8	90,3	26,2	<0,001	16,3
VLDL-C	124,5	-11,3	123,3	-24,7	0,006	-18,4	124	-21,5	0,017	-17	126	-34,7	<0,001	-24,6
ApoB	110	2,3	114	6,3	0,344	3	112	5,6	0,834	1,4	118	5,7	0,449	2,9

El ensayo EVOLVE también demostró que la Apolipoproteína CIII (ApoCIII) se había reducido significativamente mediante el tratamiento con Epanova®. ApoCIII inhibe la actividad de la lipoproteína lipasa y la absorción hepática de las lipoproteínas ricas en triglicéridos. Se ha encontrado que los niveles elevados de ApoCIII son un predictor independiente de riesgo de cardiopatía cardiovascular (CHD), mientras que la ApoCIII genéticamente reducida está asociada con la protección contra la CHD.

Se ha demostrado que las formulaciones de ácidos grasos omega-3 que contienen DHA aumentan el LDL-C en pacientes con hipertrigliceridemia grave (Kelley et al., 2009, J. Nutrition, 139(3):495-501). Se postula que este efecto sobre el LDL-C es resultado del aumento del tamaño de partícula de las lipoproteínas (Davidson et al., 2009, J. Clin. Lipidology, 3(5):332-340). Los datos clínicos sugieren que el ácido eicosapentaenoico (EPA) solo, a una dosis que reduce los triglicéridos en una medida similar a EPA + DHA, no aumenta el LDL-C, pero tampoco disminuye la ApoCIII (Homma et al., 1991, Atherosclerosis, 91(1):145-153).

La Figura 34 muestra la correlación entre el cambio porcentual en LDL y el cambio porcentual en ApoCIII para los datos del ensayo EVOLVE. Se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de -0,28 cuando estos datos se ajustaron usando una regresión lineal, demostrando que los aumentos en LDL se correlacionaron con disminuciones en ApoCIII tras el tratamiento con Epanova®. Estos resultados son consistentes con informes previos de aumento de LDL tras la administración de DHA, una observación que puede atribuirse al aumento del tamaño de partícula de las lipoproteínas. Los efectos de Epanova® sobre el tamaño de partícula de la lipoproteína se analizan adicionalmente en el Ejemplo 12 a continuación.

Un subconjunto de sujetos, que se muestra en la Tabla 40, presentó un aumento de más del 800 % en EPA con menos del 5 % de disminución en los niveles de triglicéridos. Esta falta de respuesta puede atribuirse probablemente a una deficiencia o defecto funcional en la enzima lipoproteína lipasa de tipo 1 (LPL). La LPL hidroliza los triglicéridos presentes en quilomicrones a ácidos grasos libres, y se sabe que el deterioro de la LPL está asociado con hipertrigliceridemia grave (Fojo y Brewer, 1992, J. of Int. Med. 231:669-677). Los sujetos que muestran un aumento sustancial de EPA después del tratamiento con Epanova®, acompañados por un cambio menor en los parámetros clínicos, tales como los niveles de triglicéridos, niveles de AA, etc., pueden clasificarse como no respondedores. Dichos sujetos pueden eliminarse del tratamiento con Epanova®.

PAÍS del sujeto	Dosis	IMC	TG INICIALES (mg/dl)	TG EOT (mg/dl)	Cambio % de TG desde el valor inicial	EPA INICIAL (mcg/ml)	EPA EOT (mcg/ml)	Cambio % de EPA desde el valor inicial	HbA1c inicial	HbA1c EOT
Hungría	2	32,4	778	831	6,8	18,4	171,4	832	7,3	8,1
Hungría	2	33,4	924	937	1,4	11,4	133,6	1067	5,9	6,2
Hungría	2	36,2	782	803	2,6	12,5	173,6	1288	6,0	5,6
Rusia	2	31,2	857	1723	101,1	22,1	243,7	1001	5,6	6,2
Países Bajos	2	27,1	511	589	15,2	15,4	257,4	1572	5,0	5,0
India	2	25,1	460	544	18,4	4,6	79,9	1632	6,7	6,6
Estados Unidos	3	34,6	1047	1077	2,8	16,7	273,7	1543	6	5,6
Estados Unidos	3	36	622	687	10,3	16,4	193,8	1080	6,6	7,2
Estados Unidos	3	31	838	870	3,8	14,3	151,2	961	5,6	6,1
Estados Unidos	3	40,8	888	995	12	61,8	650,6	953	8	8,7
Hungría	3	36,3	484	463	-4,3	10,1	185,3	1740	6,1	6,0
Hungría	3	29,6	647	627	-3,1	8,6	110,3	1177	6,2	6,3
Hungría	3	36,6	851	1016	19,3	10,4	94,4	811	8,2	8,6
Hungría	3	28,6	707	730	3,2	8,3	408,5	4827	5,8	6
Hungría	3	32,8	2158	2273	5,3	24,5	480,1	1863	5,6	5,1
Hungría	3	31,7	1034	992	-4,1	10,6	280,5	2538	5,3	5,5
Hungría	3	34,8	976	1110	13,7	22,4	224,8	905	7,3	7,9
Hungría	3	28,8	728	1210	66,1	22,4	289	1071	7,1	7,9
Ucrania	3	36,2	1664	10317	520,1	91,9	1238,8	1248	8,1	10,8
Hungría	4	30,1	714	702	-1,7	11,1	256,7	2214	5,1	5,4
Hungría	4	31,7	785	1300	65,6	11,7	466	3886	8,5	10,9
Hungría	4	27,3	513	527	2,6	16,6	198,3	1093	7,8	8
Hungría	4	31,9	508	625	23,2	3,5	198,4	5504	6	7,3
Ucrania	4	33,6	563	589	-2,5	34,9	327,9	841	7	7,3

PAÍS del sujeto	Dosis	IMC	TG INICIALES (mg/dl)	TG EOT (mg/dl)	Cambio % de TG desde el valor inicial	EPA INICIAL (mcg/ml)	EPA EOT (mcg/ml)	Cambio % de EPA desde el valor inicial	HbA1c inicial	HbA1c EOT
Rusia	4	29,7	664	702	5,7	38,2	795,2	1984	5,5	5,1
Rusia	4	41,6	483	504	4,3	10,9	231,1	2026	6,2	6,3
India	4	32,8	839	1721	105,0	13,8	1066,6	7624	5,6	5,2

## 5.11 Ejemplo 11: Ensayo de interacción fármaco-fármaco con estatinas

### 5.11.1 AGENTES FARMACOLÓGICOS

5 FÁRMACO DE ESTUDIO (Epanova®) - Se prepararon cápsulas de gelatina blanda porcina de tipo A, conteniendo cada una un gramo (1 g) de una composición de PUFA que comprendía PUFA omega-3 en forma de ácido libre ("API"). Las cápsulas se recubrieron con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). El API tenía la composición dada en el lote 3 de la Tabla 9 (véase el Ejemplo 4, anteriormente).

10 FÁRMACO DE ESTUDIO (Zocor®) - Se obtuvieron comprimidos de 40 mg de simvastatina producidos por Merck Sharp & Dohme Ltd. de una fuente comercial.

FÁRMACO DE ESTUDIO (Aspirin®) - Se obtuvieron comprimidos recubiertos entéricamente de 81 mg producidos por Bayer HealthCare Pharmaceuticals a partir de una fuente comercial.

15

### 5.11.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

Se diseñó un estudio abierto, aleatorizado, cruzado de 2 vías para evaluar el efecto de dosis múltiples de Epanova® sobre la farmacocinética de dosis múltiples de simvastatina en sujetos sanos normales. La dosis baja de aspirina (81 mg) también se administró diariamente en ambos brazos del estudio.

20

La condición de tratamiento "A" consistió en la administración conjunta de una dosis oral de 40 mg de simvastatina (1 comprimido), 81 mg de aspirina (1 comprimido) y 4 g (4 cápsulas) de Epanova®, una vez al día (cada 24 horas) con 240 ml de agua por las mañanas los Días 1 a 14, durante un total de 14 dosis, en condiciones en ayunas. La condición de tratamiento "B" consistió en la administración de una dosis oral de 40 mg de simvastatina (1 comprimido) y 81 mg de aspirina (1 comprimido) una vez al día (cada 24 horas) con 240 ml de agua por las mañanas los Días 1 a 14, durante un total de 14 dosis, en condiciones en ayunas. Hubo un lavado de 14 días entre los tratamientos.

25

30 Se incluyeron un total de 52 sujetos y se asignaron al azar con respecto al orden del tratamiento. De estos, 46 participantes eran hispanos.

Se extrajo sangre para los niveles de ácido graso en plasma (EPA, DHA, AA) en el momento de la inscripción (día - 1) y al momento de la salida (día 15) después del brazo de tratamiento con Epanova® (tratamiento "A"). La genotipificación se realizó en diversos SNP identificados previamente, incluyendo SNP en el gen FADS1 (por ejemplo, rs174546), incluyendo un SNP asociado con la conversión de DGLA en AA (SNP rs174537), el gen FADS2 y el gen Scd-1.

35

### 5.11.3 RESULTADOS

40

Los niveles plasmáticos promedio iniciales y al final del tratamiento ("EOT") (en µg/ml) para los niveles de EPA se muestran en la Figura 20E.

La Figura 56 muestra los niveles plasmáticos de ácido araquidónico (AA) para los sujetos agrupados según el genotipo en el SNP rs174546, en (A) valor inicial (en µg/ml), y (B) día 15 de tratamiento con Epanova® (en porcentaje de cambio desde el valor inicial). Para cada genotipo, el intervalo intercuartil se indica con un recuadro, la mediana está indicada por una línea horizontal en el interior del recuadro intercuartil, y la media se representa con un rombo. Los valores atípicos se representan con círculos de color blanco. Los trazos se extienden al valor no atípico mínimo y máximo. La Puntuación 1 identifica los sujetos que son homocigotos en el alelo principal; la Puntuación 3 identifica los sujetos homocigotos en el alelo secundario; y la Puntuación 2 representa heterocigotos.

45

50

Antes del tratamiento, la población hispana tenía una mayor prevalencia de homocigotos TT (41 %) en comparación con homocigotos CC (24 %) para SNP rs174546. Esto correspondía a niveles iniciales significativamente diferentes de EPA (CC = 18 µg/ml, CT = 11 µg/ml, TT = 7 µg/ml,  $p < 0,0001$ ) y ácido araquidónico (AA) (CC = 266 µg/ml; CT = 202 µg/ml, TT = 167 µg/ml,  $p < 0,0001$ ) en todos los genotipos.

55

En respuesta al tratamiento con Epanova®, se observó un aumento sustancial de EPA, con el mayor porcentaje de aumento en el genotipo TT (TT: 1054 %, CT: 573 %, CC: 253 %).

## 5.12 Ejemplo 12: Ensayo ESPRIT

### 5.12.1 AGENTES FARMACOLÓGICOS

- 5 FÁRMACO DE ESTUDIO (Epanova®) - Se prepararon cápsulas de gelatina blanda porcina de tipo A, conteniendo cada una un gramo (1 g) de una composición de PUFA que comprendía PUFA omega-3 en forma de ácido libre ("API"). Las cápsulas se recubrieron con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). El API tenía la composición dada en el lote 3 de la Tabla 9 (véase el Ejemplo 4, anteriormente).
- 10 PLACEBO - Se prepararon cápsulas que contenían aceite de oliva para su uso como control.

### 5.12.2 DISEÑO DEL ESTUDIO

15 Como se muestra en la Figura 38, un subconjunto de sujetos en el brazo de tratamiento de 2 g del ensayo EVOLVE que estaban recibiendo terapia concurrente con estatinas mostró cambios porcentuales de mayor magnitud (diferencia de la media LS), con respecto al control, para TG, no HDL-C, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C y TC/HDL-C, en comparación con los sujetos en el brazo de tratamiento de 2 g que no recibieron terapia concurrente con estatinas. Los sujetos que recibían terapia concurrente con estatinas mostraron una respuesta a Epanova® dependiente de la dosis, como se muestra en los datos comparativos para 2 g de Epanova® y 4 g de Epanova® que se muestra en la Figura 39.

20 Como seguimiento de la eficacia mejorada observada para Epanova® junto con la terapia con estatinas, se realizó el ensayo clínico ESPRIT para estudiar a los pacientes en tratamiento inicial con estatinas. Como se muestra en la Figura 40, los pacientes se seleccionaron para el estudio ESPRIT basándose en los niveles de TG entre 200-500 mg/dl y la terapia inicial con estatinas. De los 660 pacientes que fueron seleccionados para el ensayo, 220 fueron tratados con aceite de oliva placebo, 220 fueron tratados con dosis de Epanova® de 2 g, y 220 fueron tratados con dosis de Epanova® de 4 g. Todos los tratamientos con placebo y Epanova® se administraron junto la terapia inicial con estatinas.

30 La Tabla 41, a continuación, muestra los niveles iniciales para TG, HDL-C, LDL-C, no HDL-C y VLDL-C para los sujetos en el ensayo ESPRIT, en comparación con los niveles deseables descritos por el Third Report of the Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III), publicado por el National Heart Lung and Blood Institute.

	<b>Deseable (mg/dl)</b>	<b>2 g/día</b>	<b>4 g/día</b>	<b>Aceite de oliva (OO)</b>
TG	<150	265	265	269
HDL-C	>40	38	37	38
LDL-C	<100	92	91	87
No HDL-C	<130	139	135	132
VLDL-C	<30	42	43	42

35

### 5.12.3 RESULTADOS

40 La Figura 41 ilustra la disposición de pacientes para el ensayo ESPRIT, que muestra que se retiraron 6 pacientes del brazo de placebo, se retiraron 6 pacientes del brazo de tratamiento de 2 g, y se retiraron 12 pacientes del brazo de tratamiento de 4 g. El número de pacientes que experimentaron efectos adversos (AE) fue bajo en general, con 2 en el brazo de placebo, 3 en el brazo de tratamiento de 2 g y 7 en el brazo de tratamiento de 4 g.

45 Los pacientes en el ensayo ESPRIT presentaron cambios porcentuales significativos en los niveles de EPA y DHA en plasma, como se muestra en la Figura 42A y la Figura 42B, respectivamente. Estos pacientes también demostraron reducciones dependientes de la dosis en TG, reducciones en no HDL-C y aumentos en HDL-C, en comparación con el placebo de aceite de oliva (véase la Figura 43). Además, se observaron reducciones dependientes de la dosis en VLDL-C y TC/HDL-C (véase la Figura 44). En conjunto, los resultados de las Figuras 42-44 demuestran la eficacia de Epanova® como auxiliar en la terapia con estatinas.

50 Se presentan detalles adicionales de los resultados del ensayo ESPRIT en las Figuras 45 - 52, lo que demuestra

que Epanova® es eficaz como auxiliar a las estatinas tanto de baja potencia como de alta potencia, en una serie de condiciones iniciales para los pacientes. La Figura 45 muestra los resultados para el cambio porcentual de la mediana de TG desde el valor inicial para tres terciles de pacientes, dividido por los niveles iniciales de TG. La Figura 46 muestra los resultados para el cambio porcentual de la mediana de no HDL-C desde el valor inicial para tres terciles de pacientes, dividido por los niveles iniciales de no HDL-C. La Figura 47 muestra los resultados para el cambio porcentual de la mediana de LDL-C desde el valor inicial para tres terciles de pacientes, dividido por los niveles iniciales de LDL-C.

Como se observa a partir de la Figura 48, se observaron reducciones en los niveles de TG para pacientes que recibieron terapia concurrente con rosuvastatina, atorvastatina y simvastatina. Se observaron efectos estadísticamente significativos sobre los niveles de triglicéridos, no HDL-C y LDL-C, con independencia de si las estatinas de baja potencia o de alta potencia se habían coadministrado, como se muestra en las Figuras 49-51.

La Figura 52 compara los cambios porcentuales de la mediana desde el valor inicial para los triglicéridos para (A) pacientes que tienen niveles iniciales de TG más altos ( $\geq 294$  mg/dl), (B) pacientes que tienen niveles iniciales altos de EPA ( $\geq 26,58$   $\mu\text{g/ml}$ ), y (C) pacientes que reciben terapia concurrente con rosuvastatina. Los resultados muestran que la dosis de Epanova® de 2 g funciona de manera similar a la dosis de 4 g en las poblaciones de pacientes que se muestran en la Figura 52.

Los niveles elevados de LDL-C observados tras el tratamiento con Epanova® fueron consistentes con el tamaño de partícula de la lipoproteína aumentado observado. Se midieron las VLDL grandes, las VLDL medias, las VLDL pequeñas, las VLDL totales y las VLDL para el placebo y cada uno de los brazos de tratamiento del ensayo ESPRIT. Los resultados se muestran en la Figura 53 y muestran que el tratamiento con Epanova® dio como resultado cantidades disminuidas de partículas grandes de VLDL y cantidades correspondientemente aumentadas de partículas pequeñas de VLDL. Se observó un tamaño de partícula de VLDL disminuido, como se muestra en la Figura 53 junto con aumentos en el tamaño de partícula de LDL, como se muestra en la Figura 54. Se muestra en la Figura 55, a medida que los niveles de TG al final del tratamiento disminuyeron, los aumentos porcentuales en el tamaño de LDL-P fueron mayores. En conjunto, las Figuras 53 - 55 demuestran que el tratamiento con Epanova® dio como resultado un aumento en el tamaño de partícula de las lipoproteínas, una observación que puede explicar el aumento observado del LDL-C.

La Tabla 42, a continuación, resume los resultados del ensayo ESPRIT.

		Tabla 42												
		Aceite de oliva (OO)			4 g/día*					2 g/día*				
		Base	EOT	% de $\Delta$	Base	EOT	% de $\Delta$	valor p	dif.	Base	EOT	% de $\Delta$	valor p	dif.
No HDL-C	mediana	132	134	1	135	129	-6	<0,001	-6	139	133	-3	0,037	-3
	media	135	136	1	139	132	-5			140	136	-2		
TG	mediana	269	260	-4	265	215	-21	<0,001	-15	265	222	-15	<0,001	-9
	media	280	268	-3	287	233	-18			284	244	-14		
HDL-C	mediana	38	38	2	37	38	3	0,988	1	38	39	2	0,988	0
	media	39	40	3	39	40	4			39	40	3		
LDL-C	mediana	87	91	2	91	92	1	0,647	0	92	95	5	0,025	4
	media	92	93	4	94	94	4			92	97	6		
VLDL-C	mediana	42	41	-3	43	33	-20	<0,001	-16	42	37	-12	0,008	-8
	media	46	44	3	47	38	-14			47	40	-10		
TC	mediana	174	174	1	170	167	-4	<0,001	-4	177	174	-1	0,049	-2
	media	174	176	1	178	172	-3			179	176	-1		
TC/HDL-C	mediana	5	5	-2	5	4	-7	0,001	-5	5	5	-4	0,119	-3
	media	5	5	-1	5	5	-6			5	5	-3		

**REIVINDICACIONES**

1. Una composición farmacéutica, que comprende:
  - 5            ácido eicosapentaenoico (omega-3) (EPA), en forma de ácido libre, en una cantidad del 50 % (m/m) al 60 % (m/m);
  - ácido docosahexaenoico (omega-3) (DHA), en forma de ácido libre, en una cantidad del 17 % (m/m) al 23 % (m/m); y
  - 10            ácido docosapentaenoico (omega-3) (DPA), en forma de ácido libre, en una cantidad de no menos del 1 % (m/m);
  - donde m/m representa el porcentaje en peso de todos los ácidos grasos en la composición.
2.            La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que al menos el 95 % en peso del ácido graso poliinsaturado en la composición está presente en la forma de ácido libre.
- 15            3.            La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que DPA está presente en una cantidad de no más del 10 % (m/m).
4.            La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que DPA está presente en una cantidad del
- 20            1 % (m/m) al 8 % (m/m).
5.            La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que EPA está presente en una cantidad del
- 55 % (m/m).
- 25            6.            La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que DHA está presente en una cantidad del
- 20 % (m/m).
7.            La composición farmacéutica de la reivindicación 1, en la que al menos el 90 % en peso del ácido poliinsaturado total en la composición está presente en la forma de ácido libre.
- 30            8.            Una forma de dosificación unitaria adecuada para administración oral, que comprende una cápsula, en la que la cápsula encapsula al menos 500 mg de la composición farmacéutica de la reivindicación 1.
9.            La forma de dosificación unitaria de la reivindicación 8, en la que la cápsula encapsula 1000 mg de la
- 35            composición farmacéutica de la reivindicación 1.
10.           La forma de dosificación unitaria de la reivindicación 9, en la que la cápsula es una cápsula de gelatina blanda.
- 40            11.           La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de hipertrigliceridemia grave en un paciente que tiene niveles de triglicéridos en suero o plasma previos al tratamiento  $\geq 500$  mg/dl, comprendiendo dicho tratamiento la administración oral de la composición farmacéutica de la reivindicación 1 en una cantidad de al menos 2 g al día y durante un periodo de al menos 30 días.
- 45            12.           La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 11, en la que dicho tratamiento comprende además la administración oral de una cantidad eficaz de una estatina.
13.           La composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que la estatina se selecciona del grupo que consiste en pravastatina, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina,
- 50            rosuvastatina y pitavastatina.
14.           La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de hipertrigliceridemia en pacientes que tienen niveles de triglicéridos en suero o plasma de 200 mg/dl a 500 mg/dl en terapia con estatinas, comprendiendo dicho tratamiento administrar por vía oral una cantidad eficaz de una estatina y
- 55            al menos 2 g al día de la composición farmacéutica de la reivindicación 1.
15.           La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 14, en la que la cantidad de la composición farmacéutica de la reivindicación 1 es al menos 3 g al día.

16. La composición farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11 o la reivindicación 14, en la que la cantidad de la composición farmacéutica de la reivindicación 1 es al menos 4 g al día.

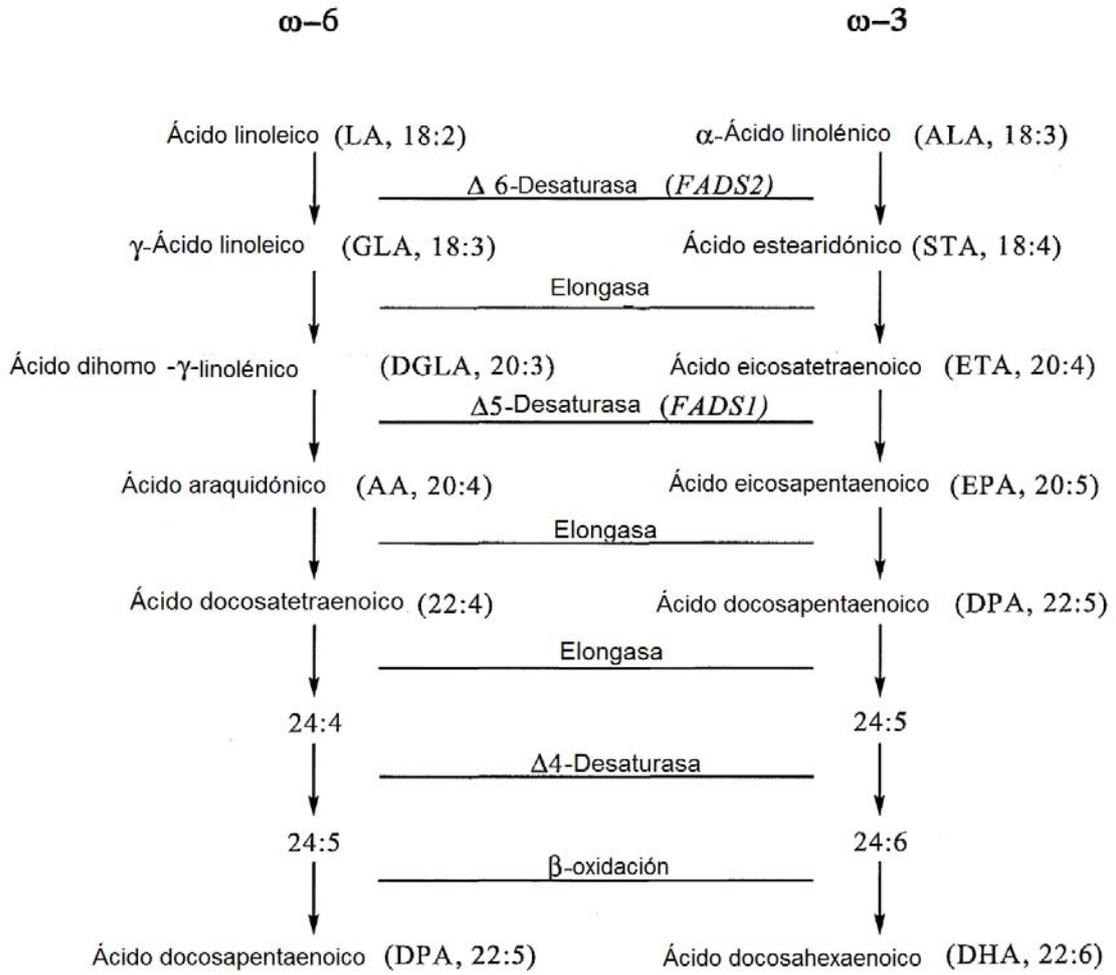


FIG. 1

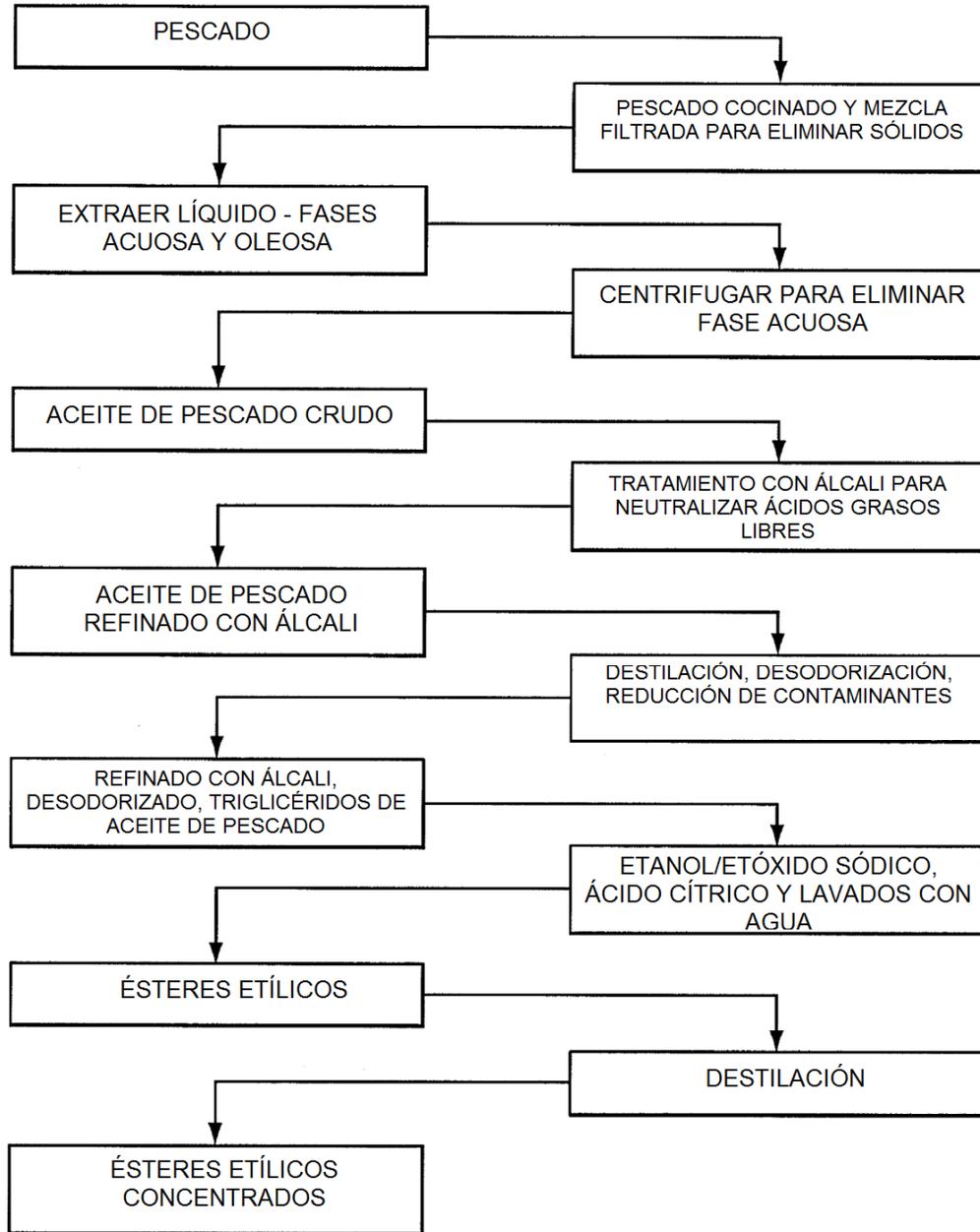


FIG. 2

**Efecto global de clatración de urea en intermedio de EE**

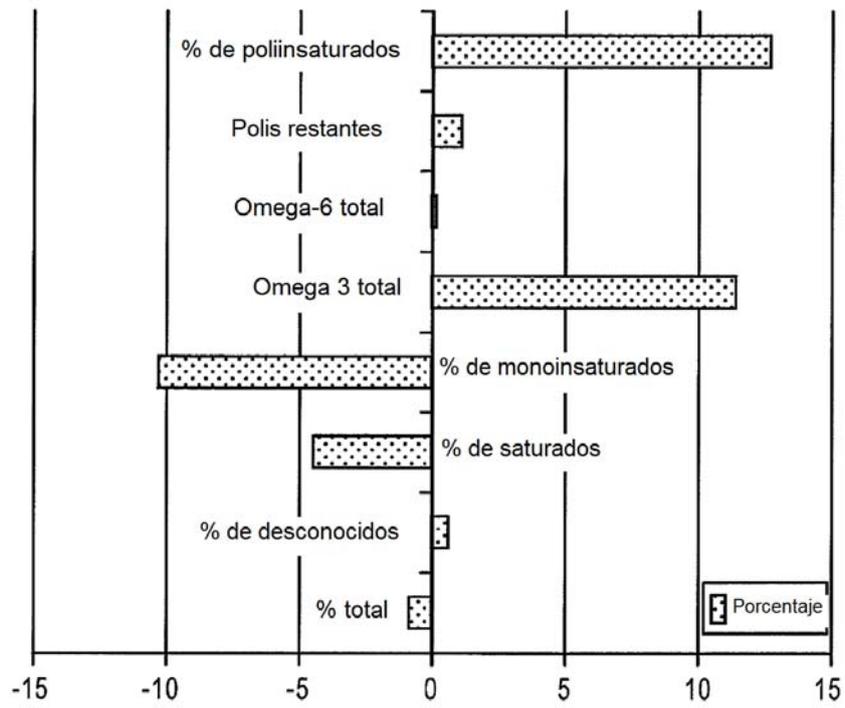


FIG. 3A

**Efecto de la formación de complejos de urea en especies de ácidos grasos Omega 3 y Omega 6**

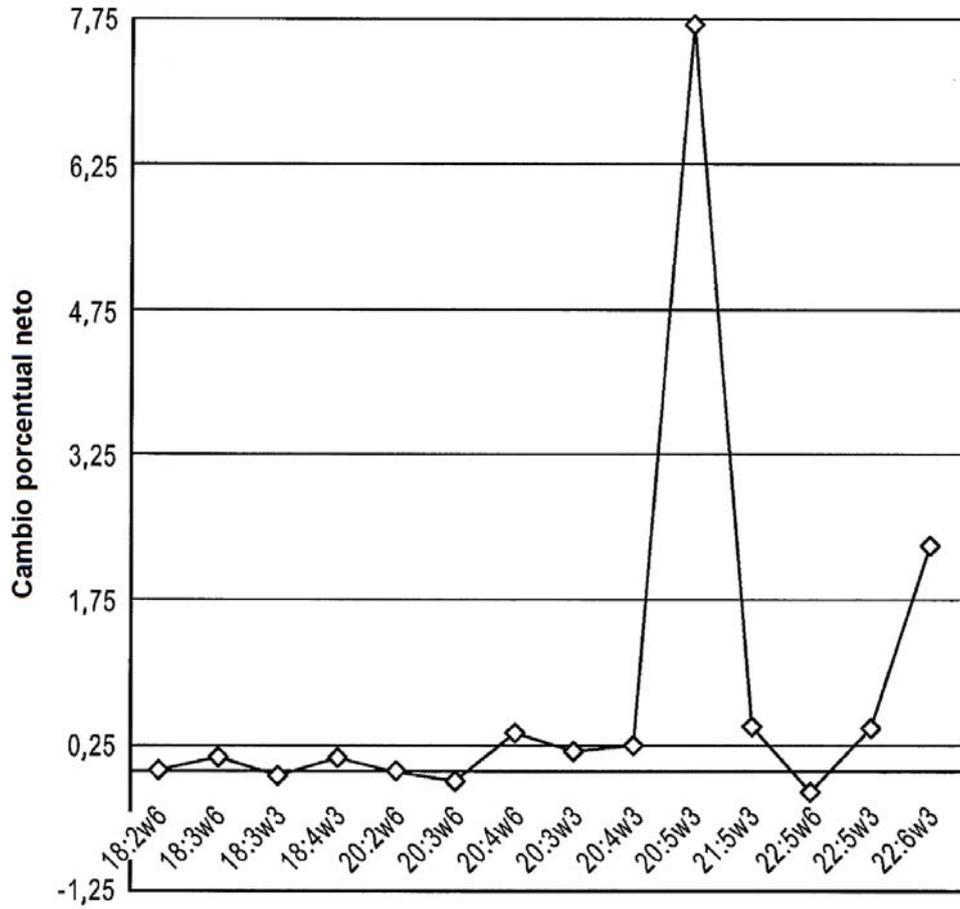


FIG. 3B

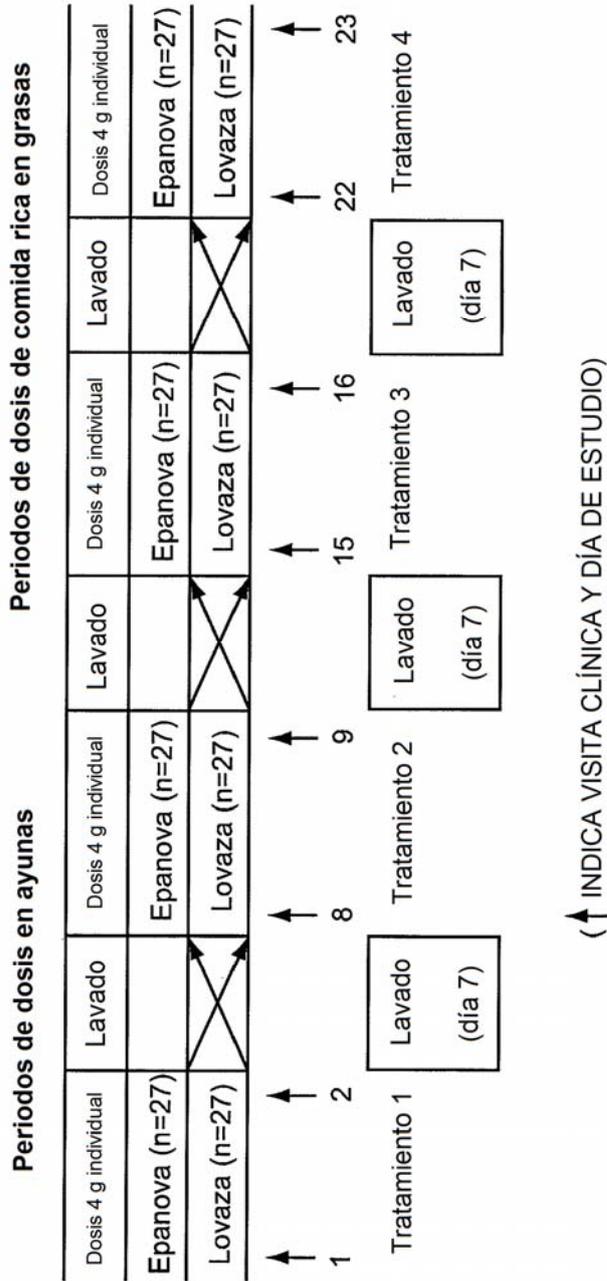


FIG. 4



EPA + DHA, Biodisponibilidad de FFA de comida rica en grasas significativamente mayor que EE-FA ( $p < 0,0007$ )

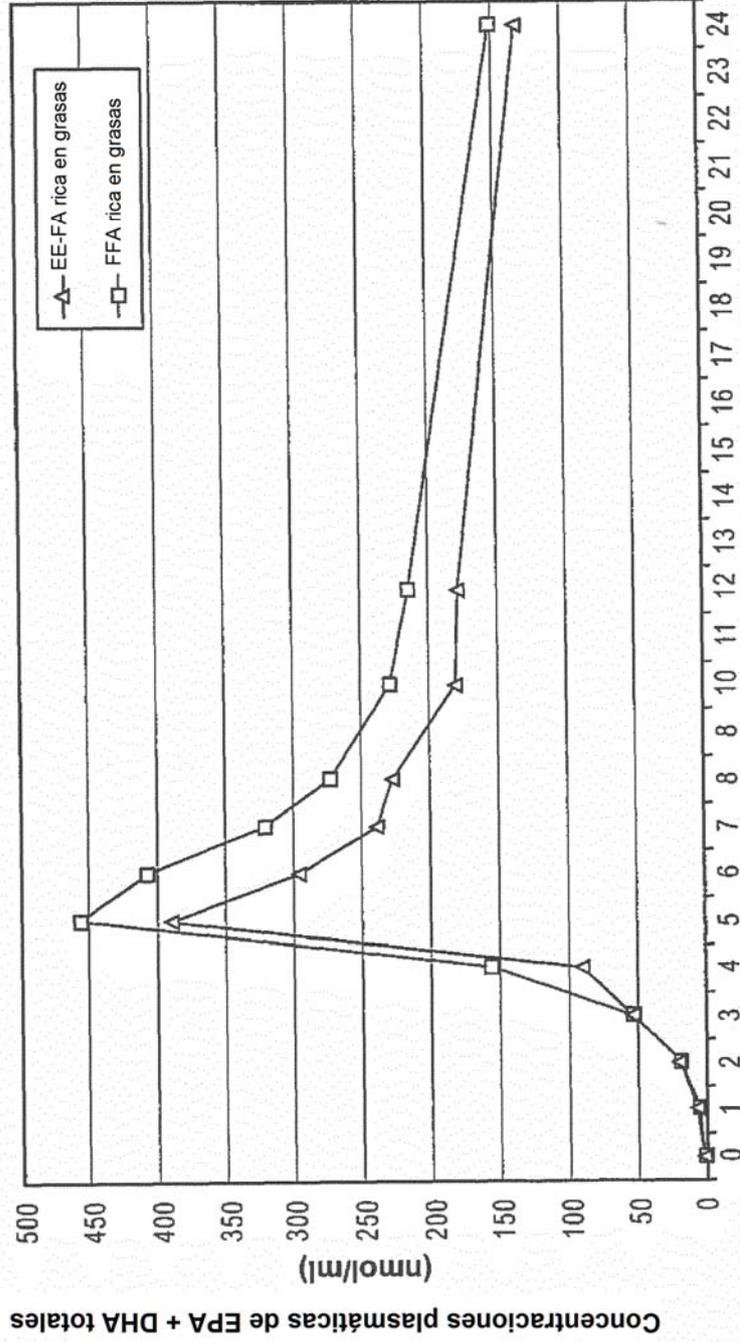


FIG. 6

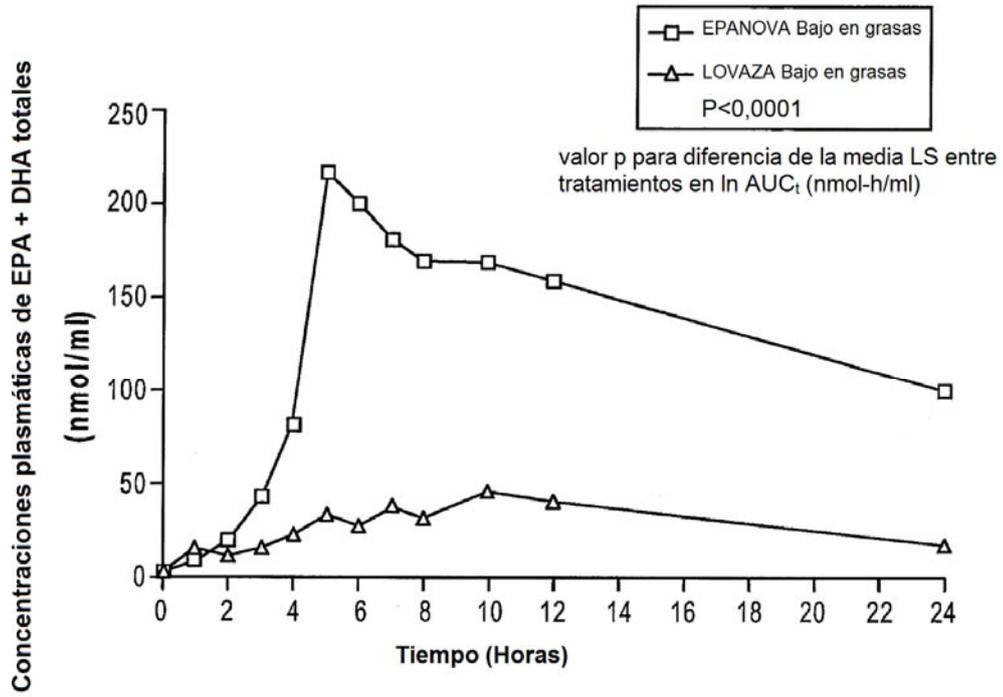


FIG. 7

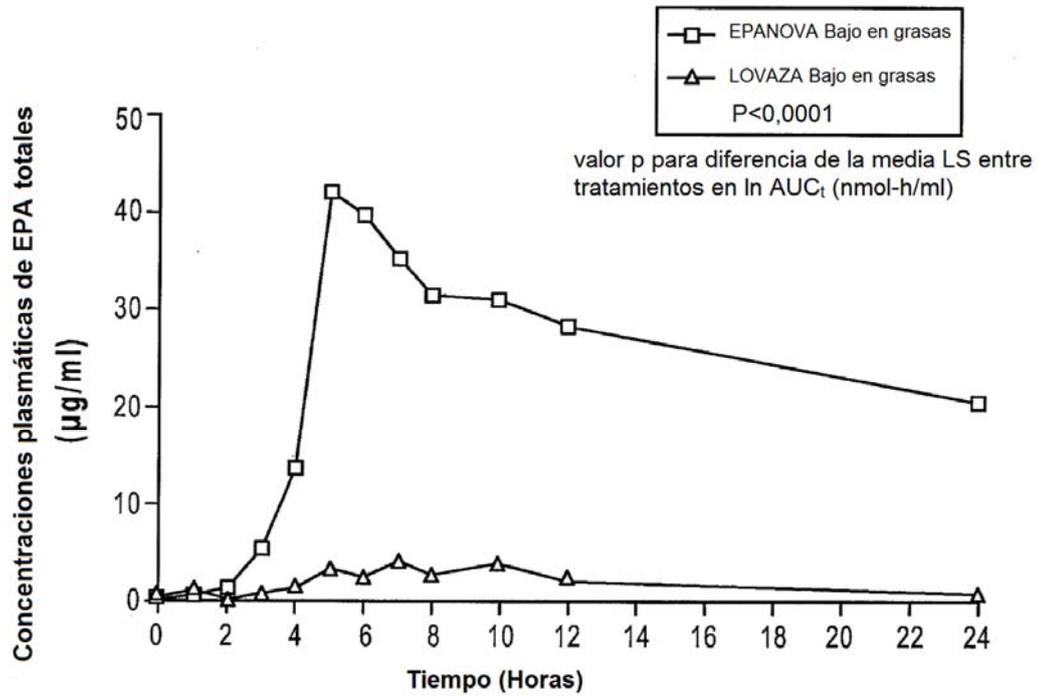


FIG. 8

Concentraciones plasmáticas de DHA totales

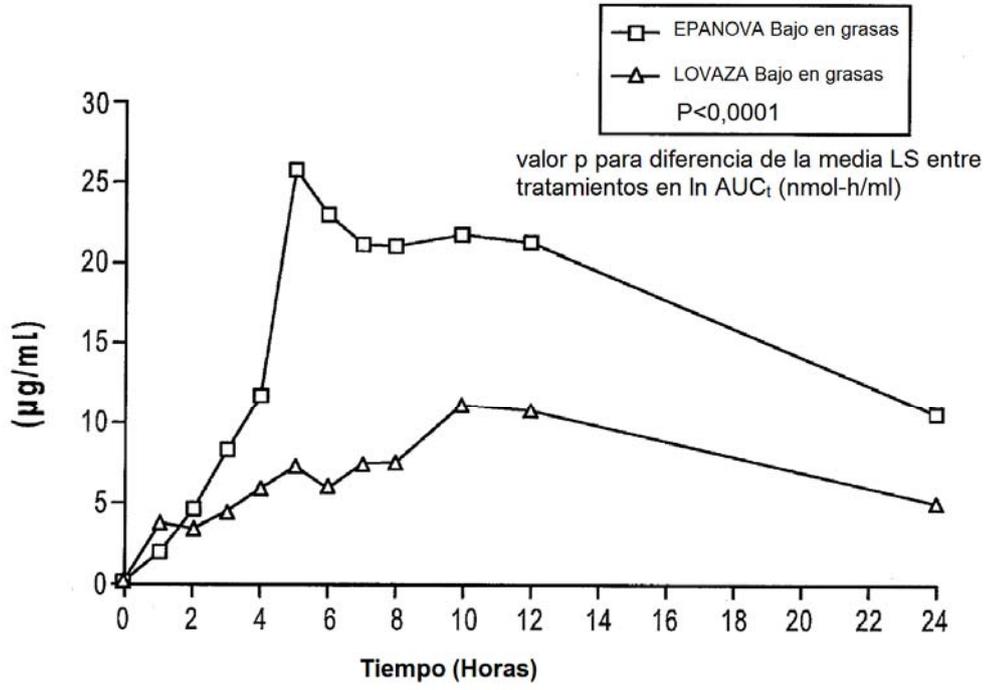


FIG. 9

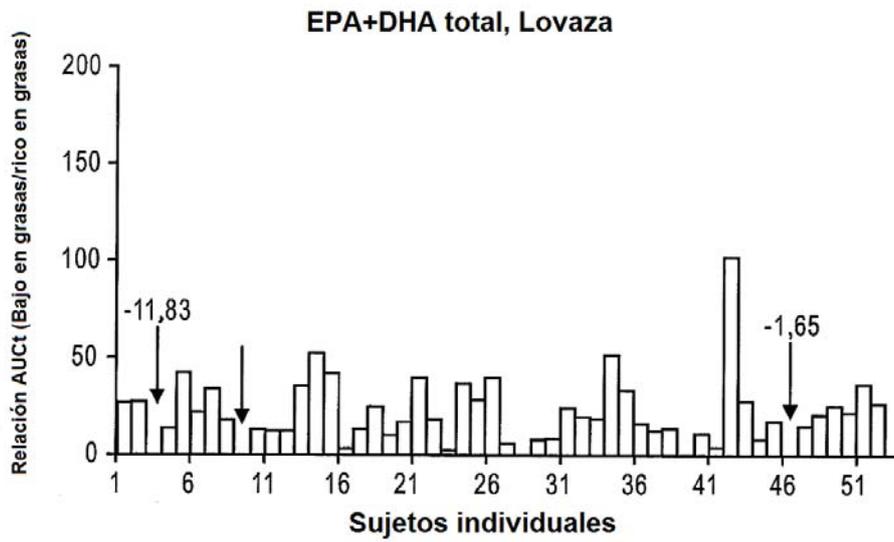


FIG. 10A

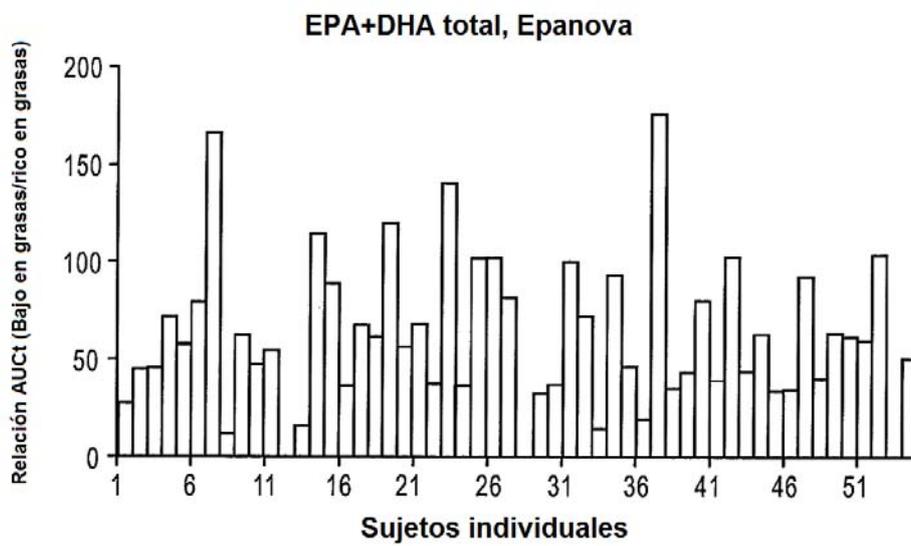


FIG. 10B

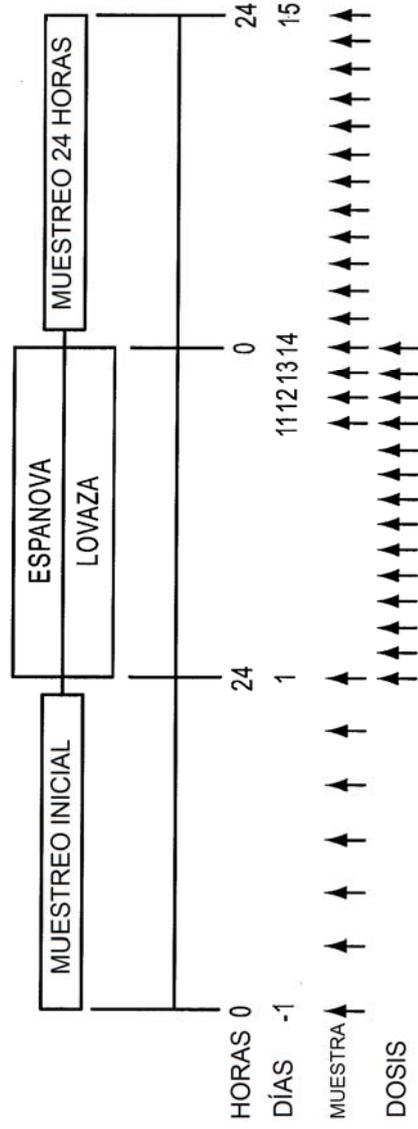


FIG. 11

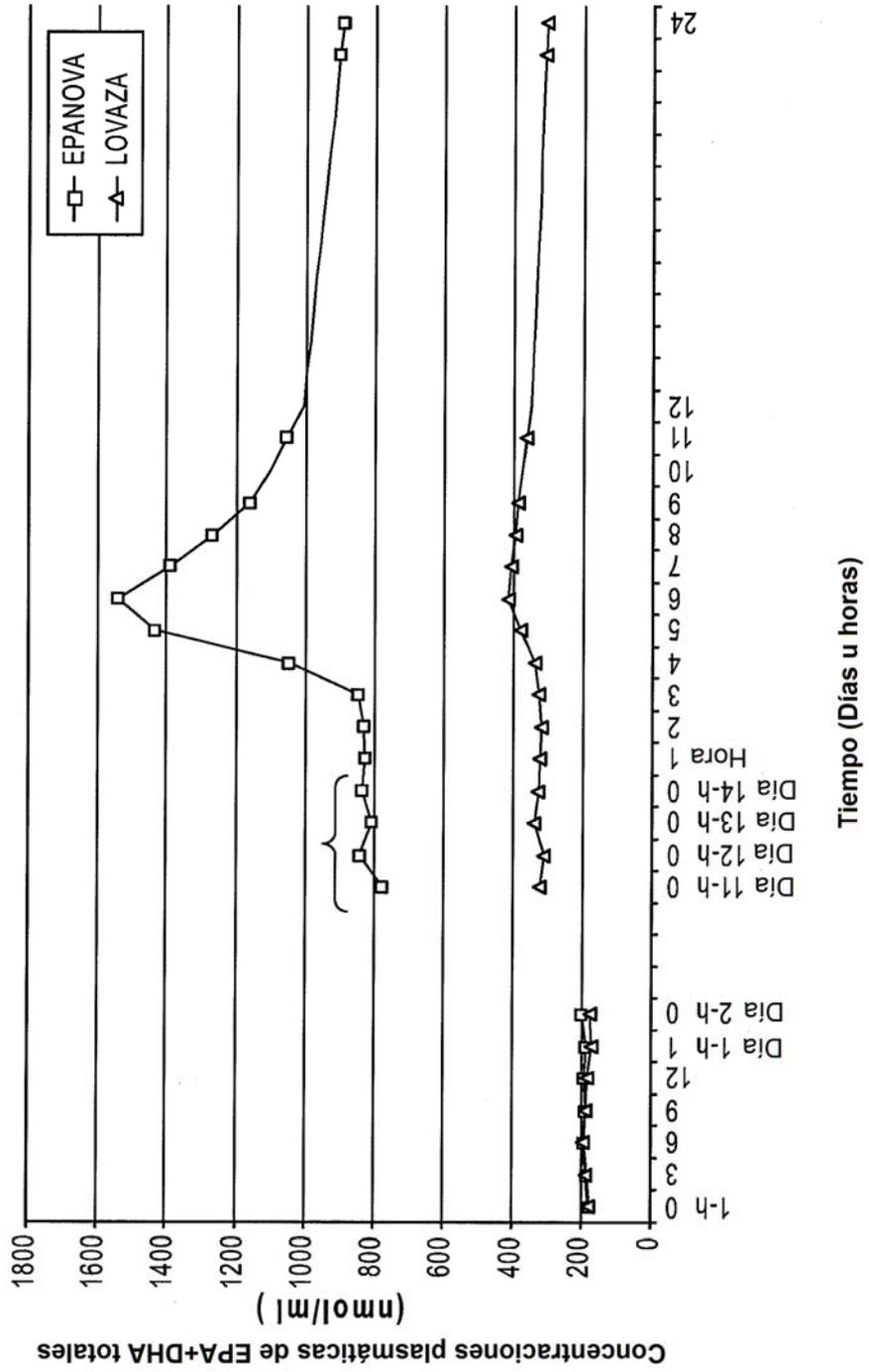


FIG. 12A

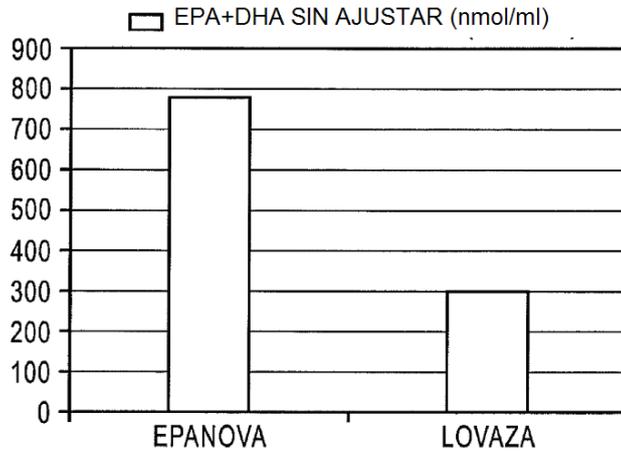


FIG. 12B

Concentraciones plasmáticas de EPA + DHA totales

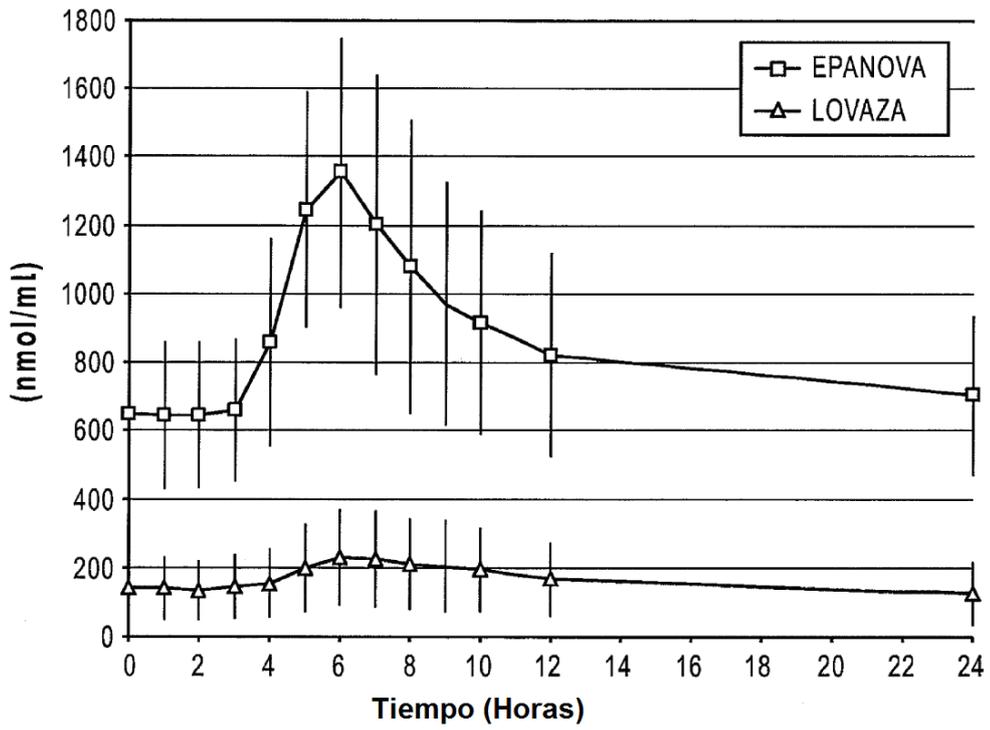


FIG. 13

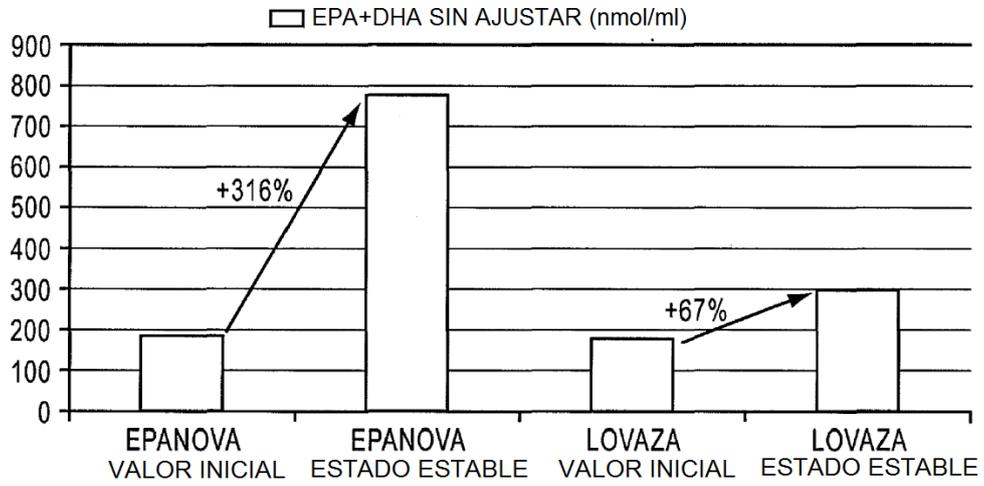


FIG. 14A

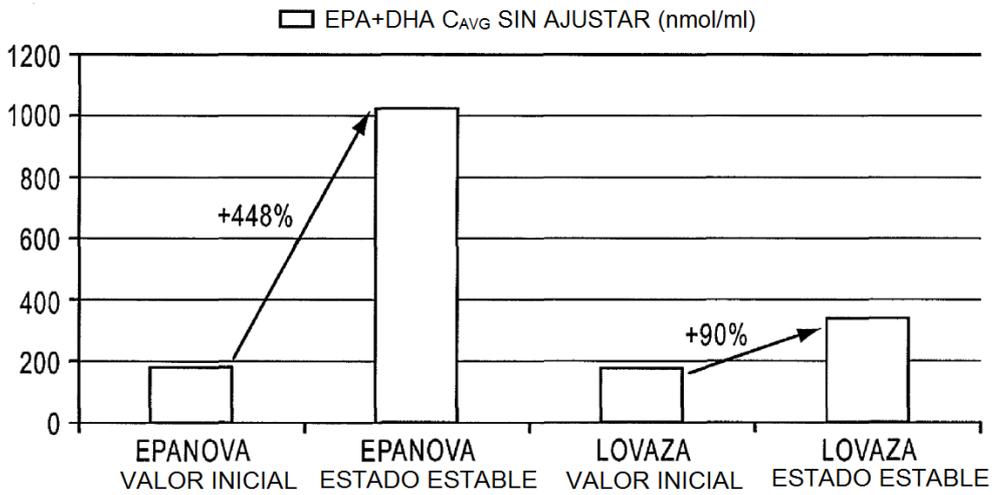


FIG. 14B

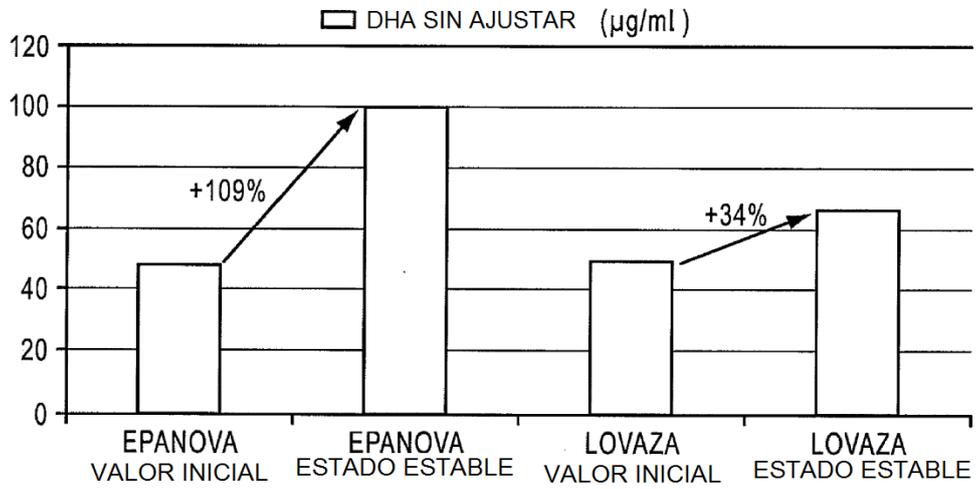


FIG. 15A

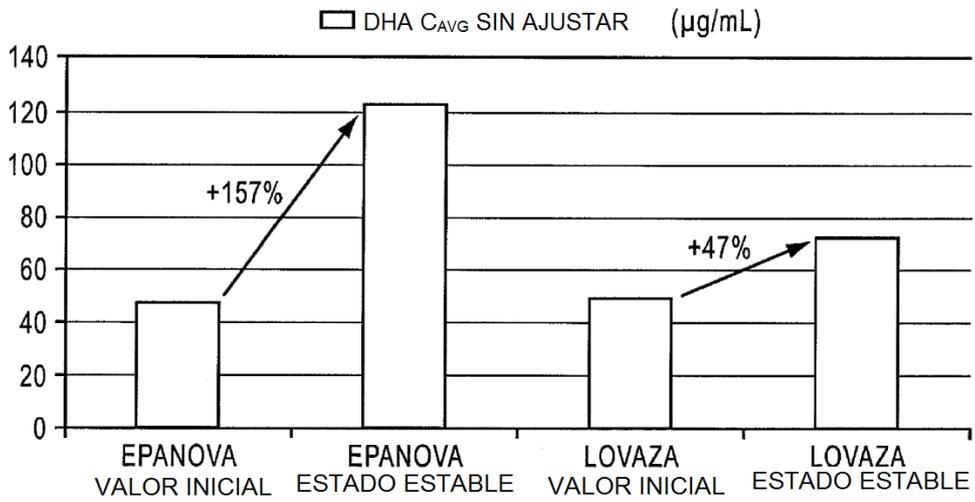


FIG. 15B

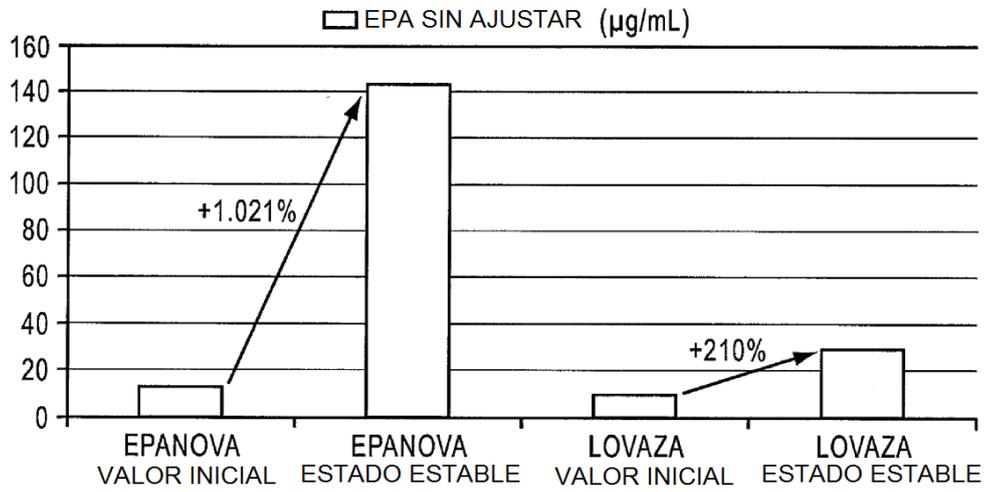


FIG. 16A

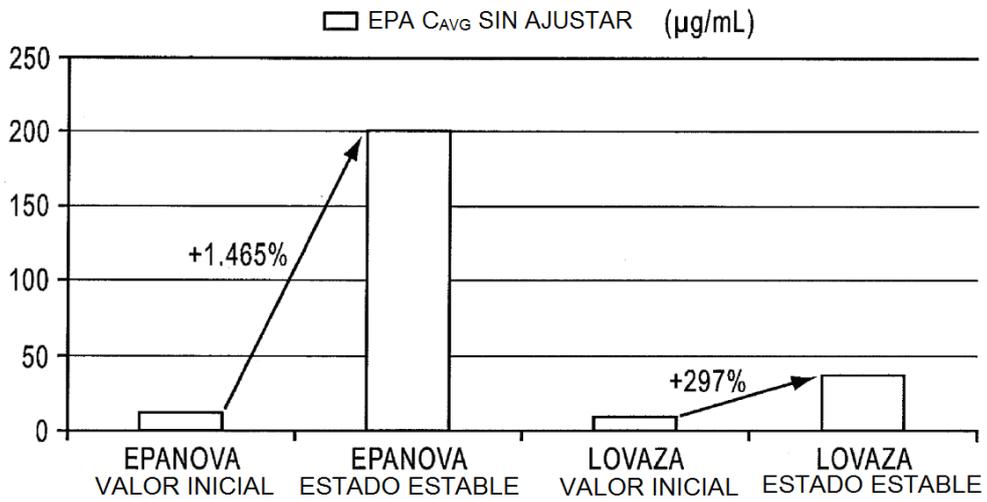


FIG. 16B

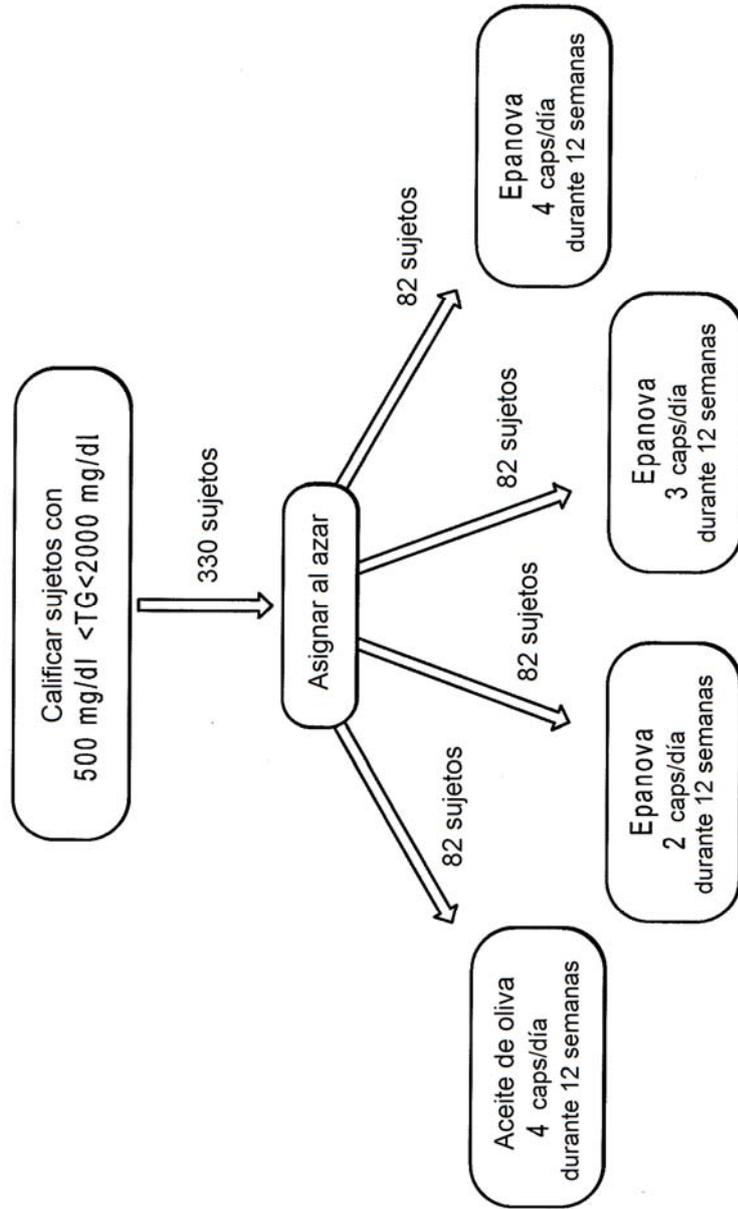


FIG. 17

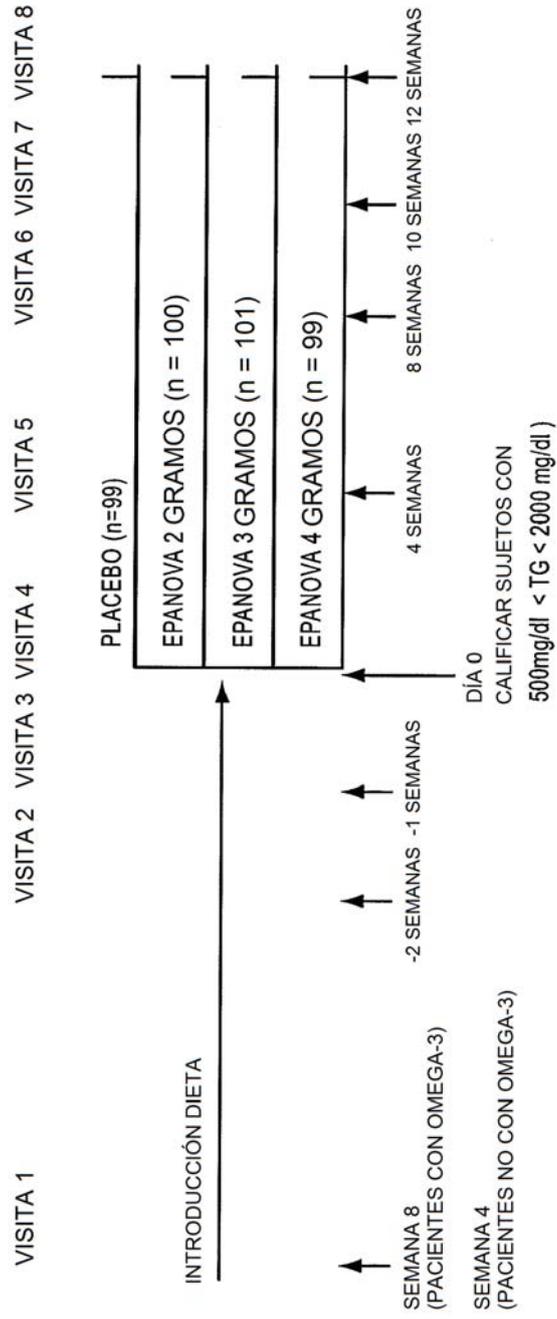


FIG. 18

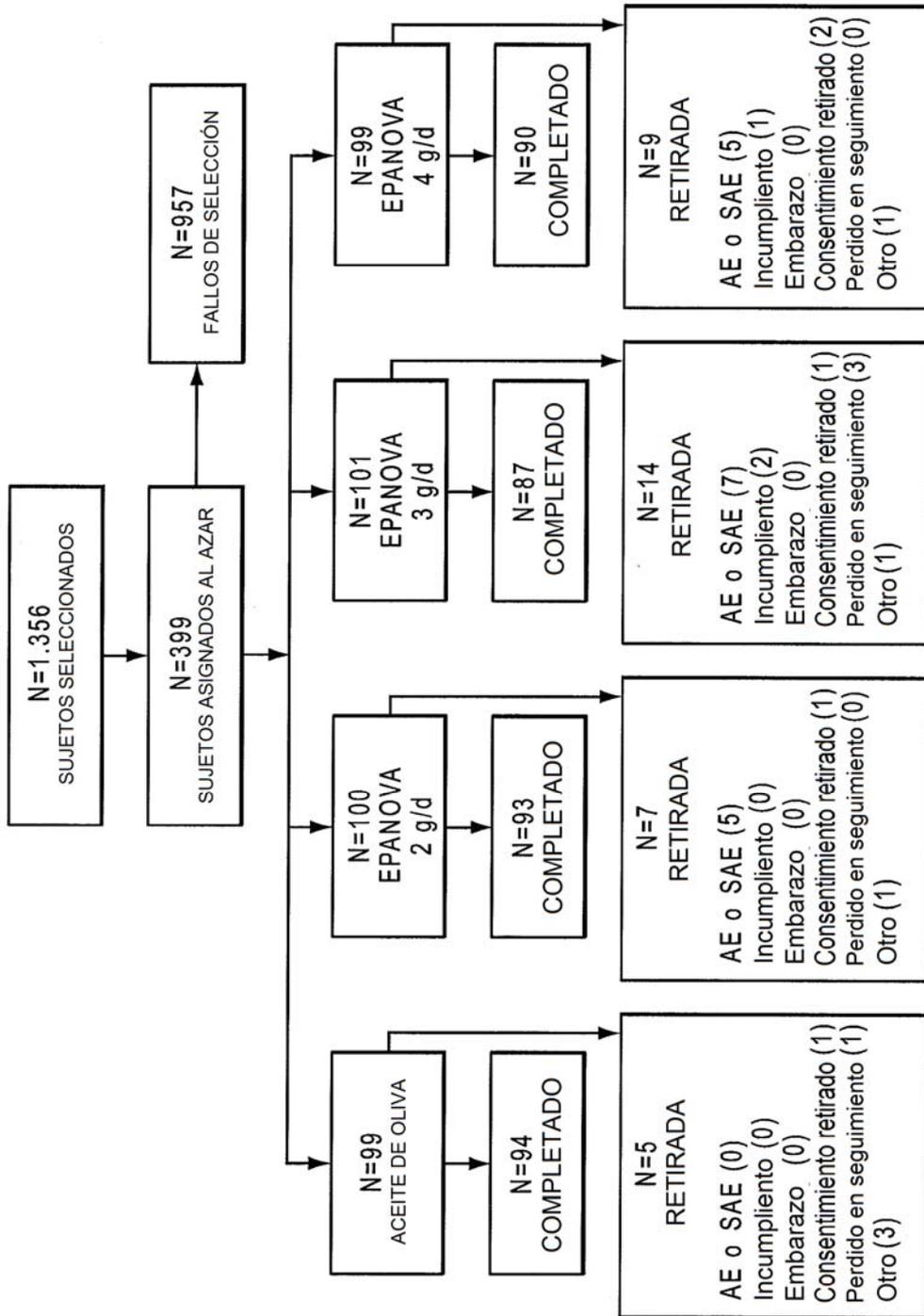


FIG. 19

Niveles plasmáticos absolutos promedio ( $\mu\text{g/ml}$ )

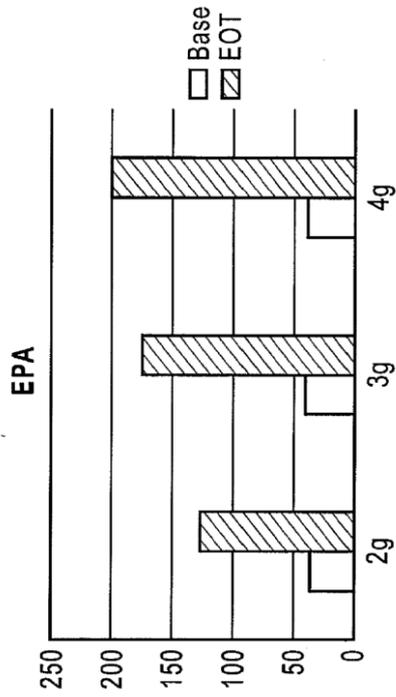


FIG. 20A

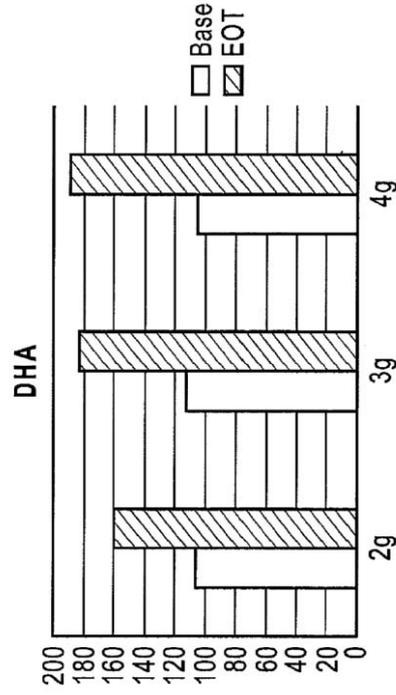


FIG. 20B

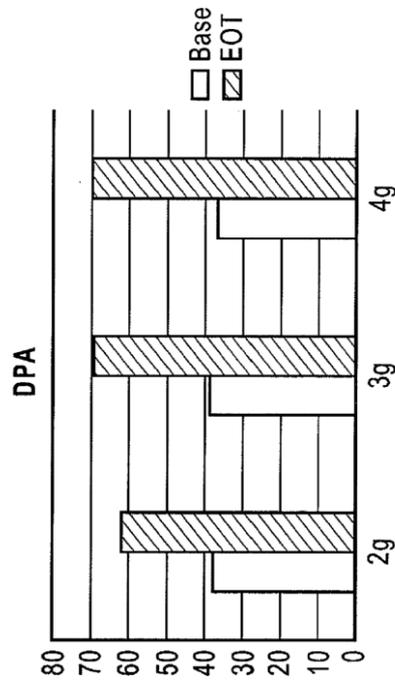


FIG. 20C

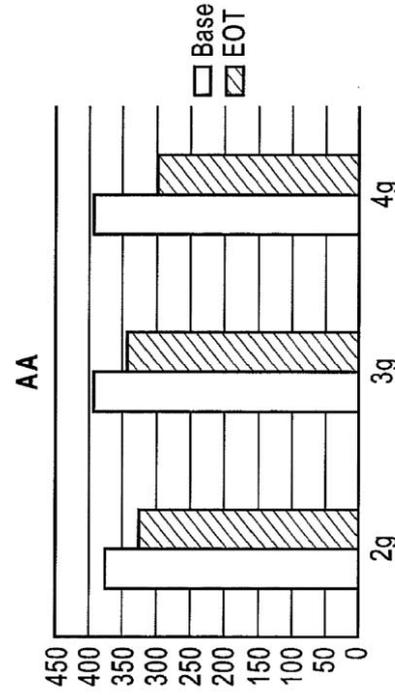


FIG. 20D

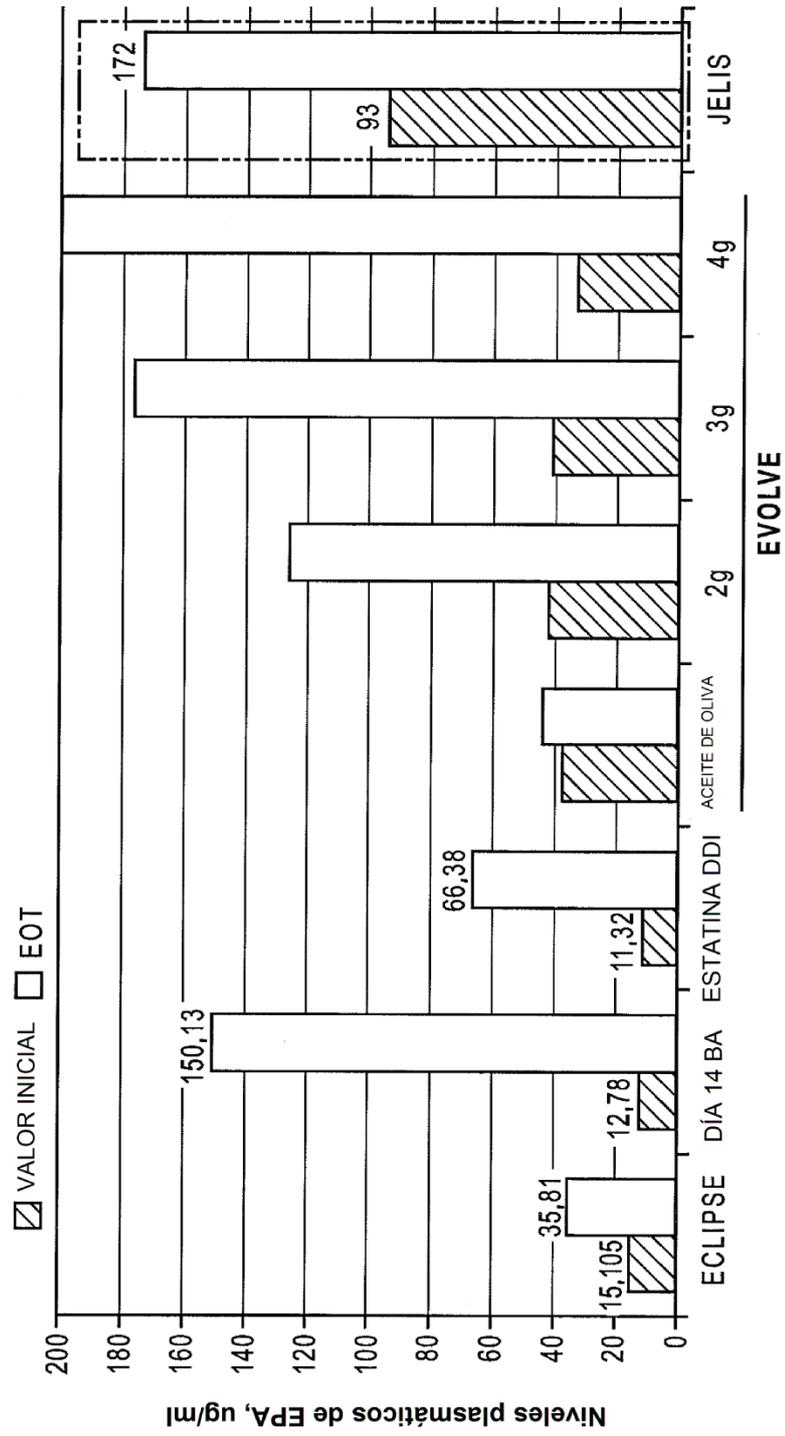


FIG. 20E

Niveles plasmáticos absolutos de la mediana ( $\mu\text{g/ml}$ )

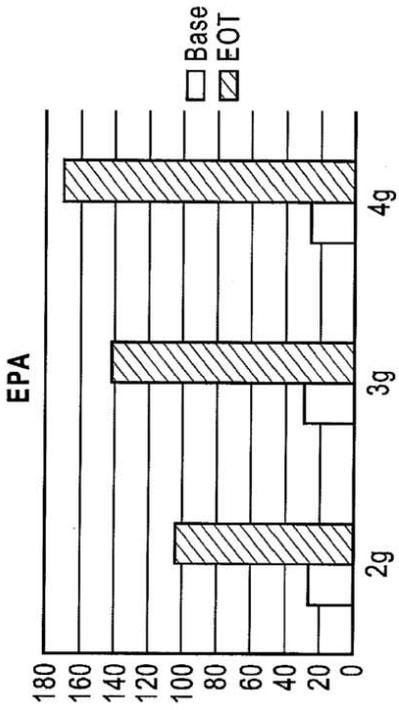


FIG. 21A

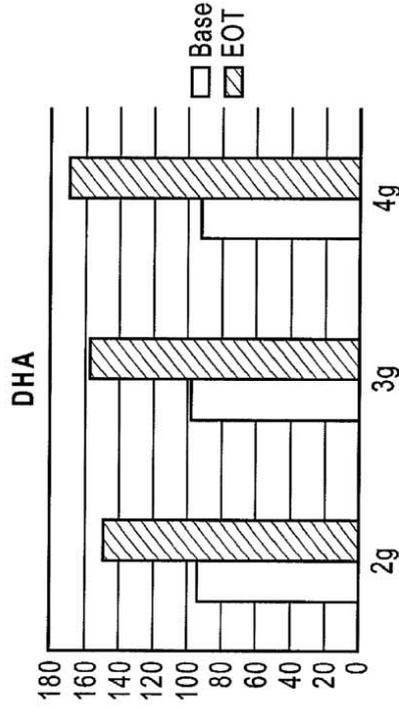


FIG. 21B

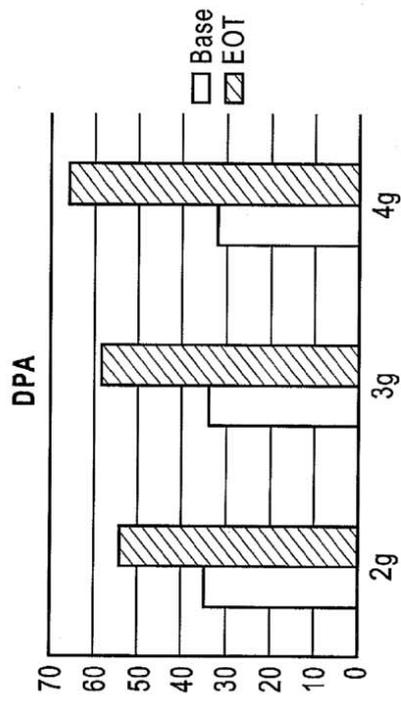


FIG. 21C

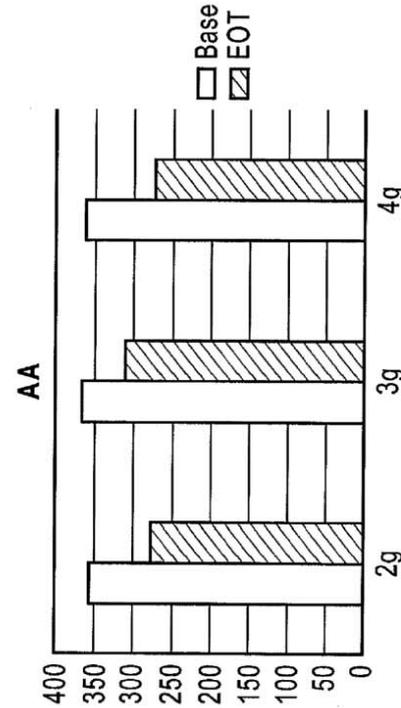


FIG. 21D

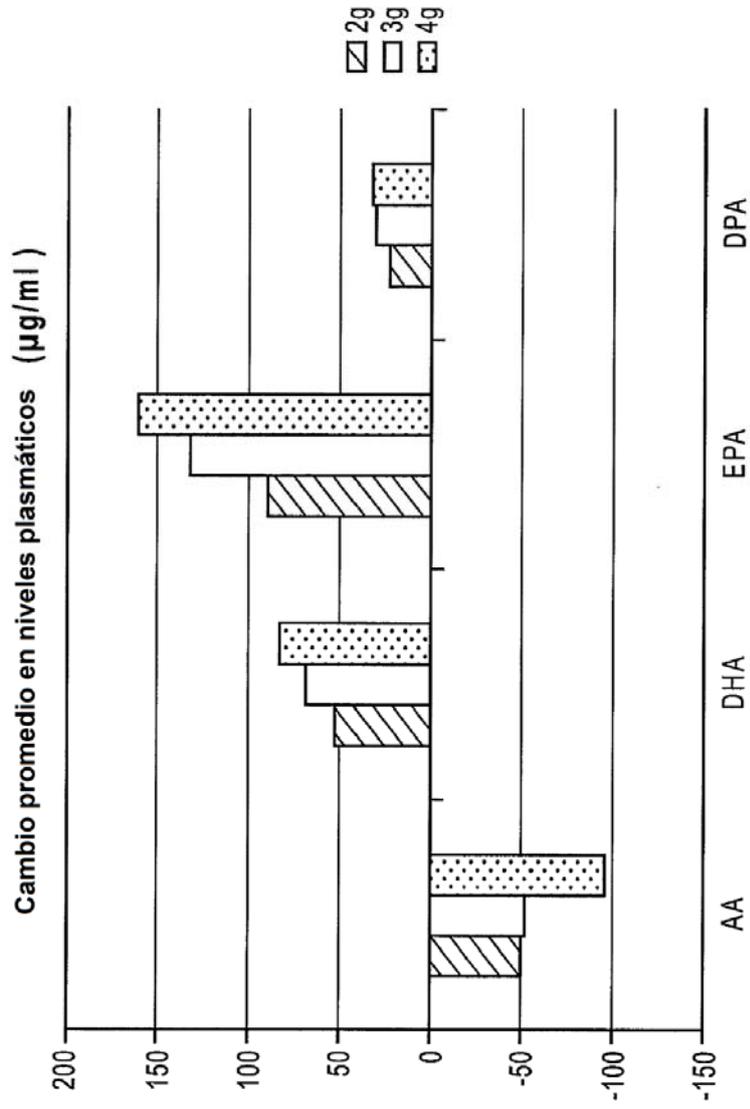


FIG. 22A

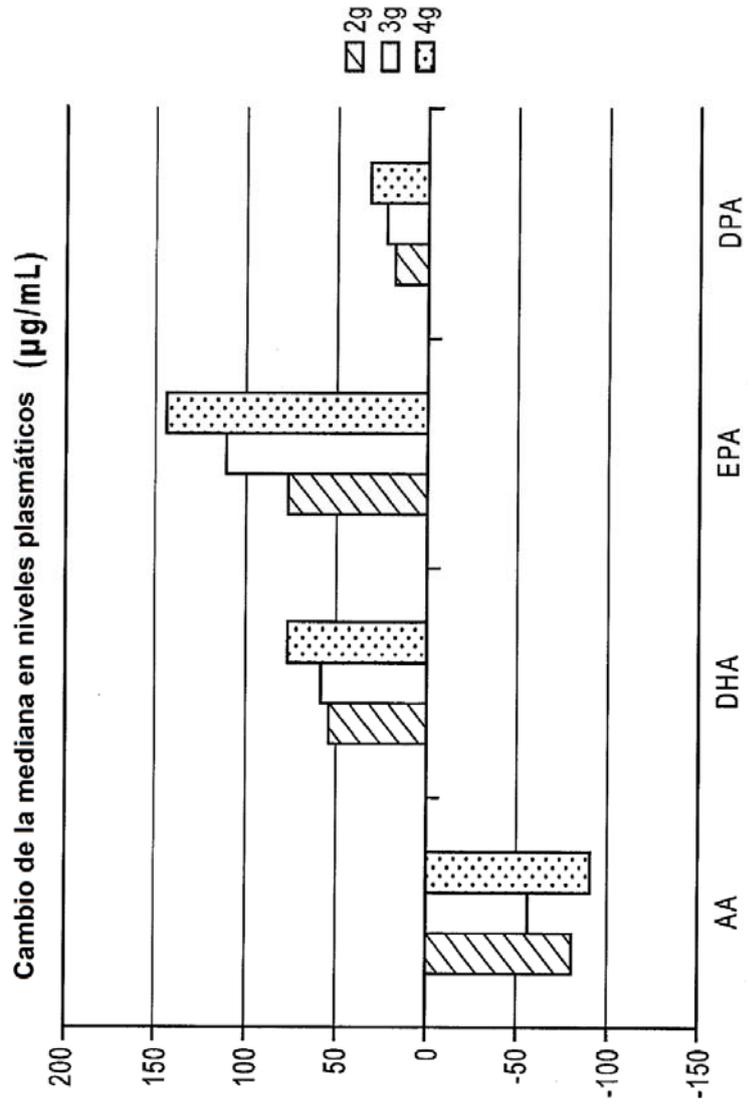


FIG. 22B

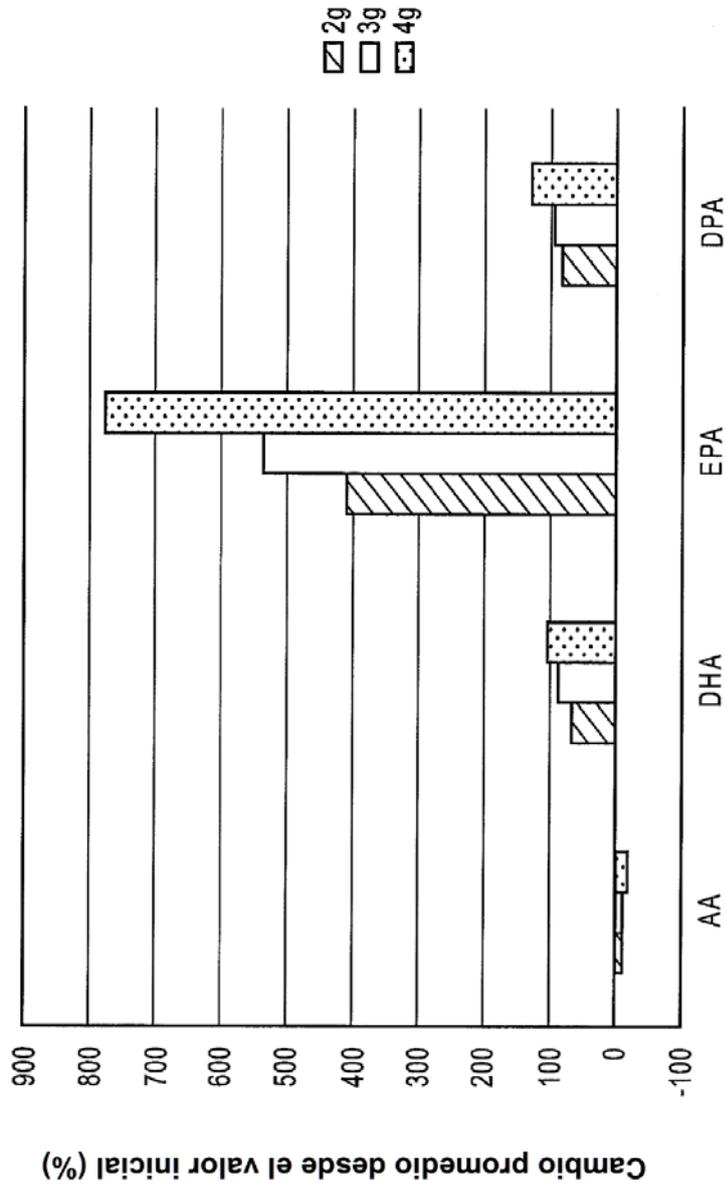


FIG. 23A

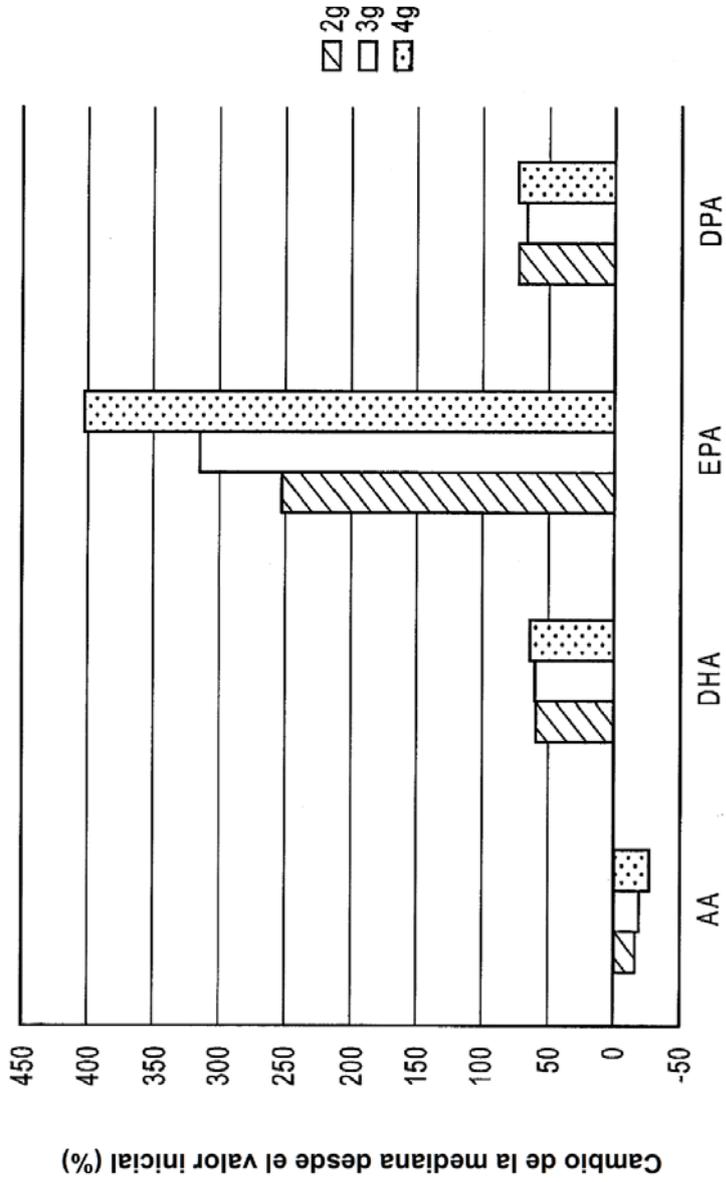
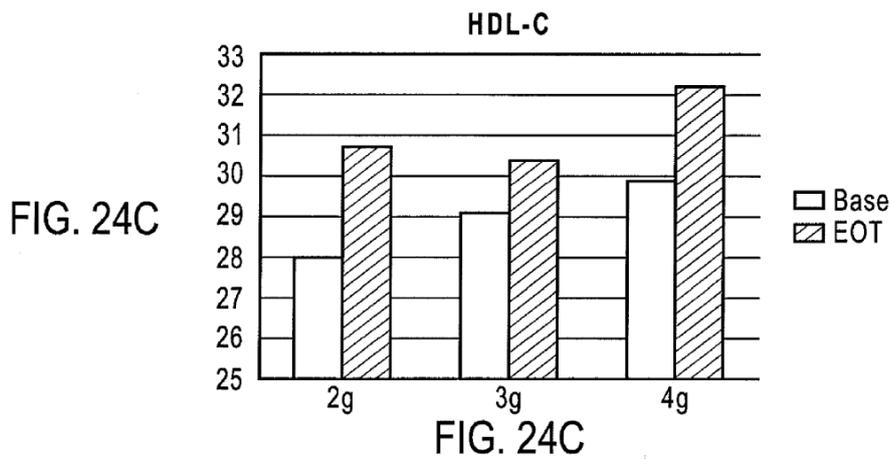
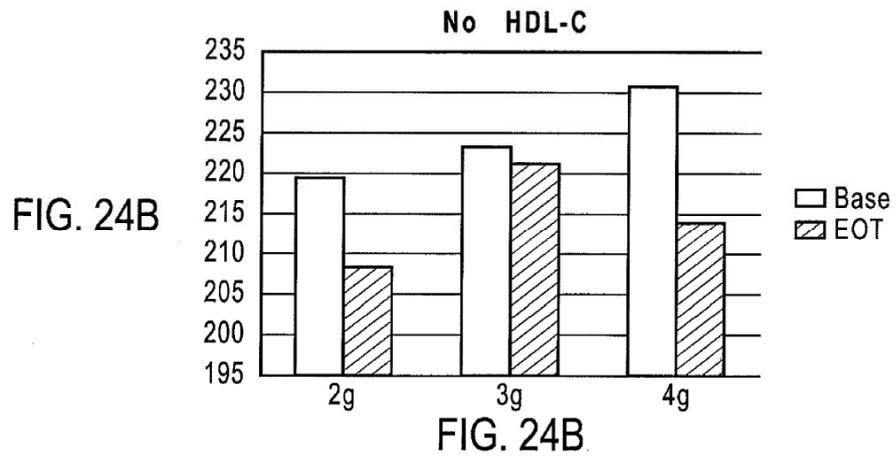
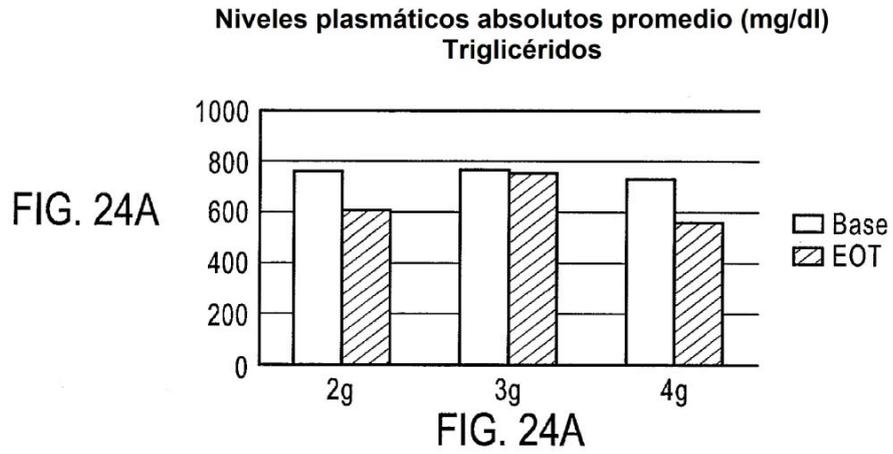


FIG. 23B



Niveles plasmáticos absolutos promedio (mg/dl)

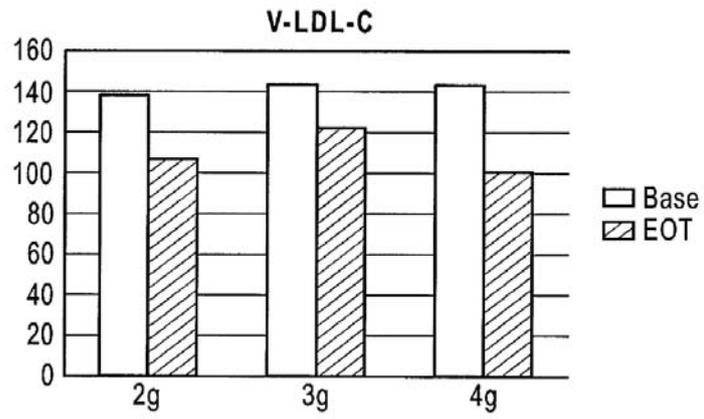


FIG. 24D

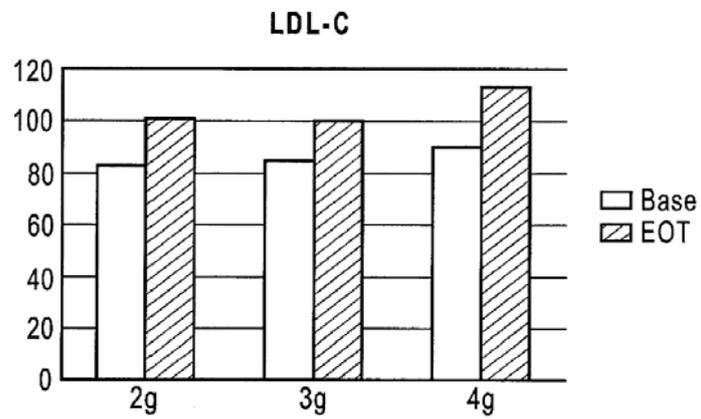


FIG. 24E

Niveles plasmáticos absolutos promedio (mg/dl)

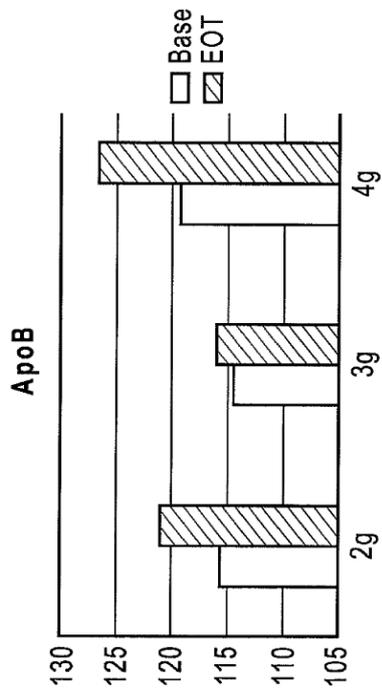


FIG. 24F

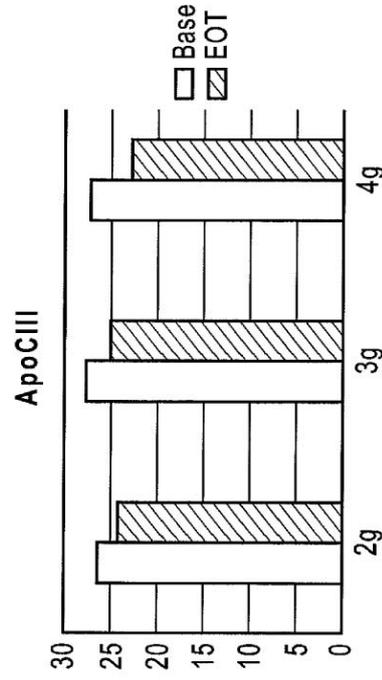


FIG. 24G

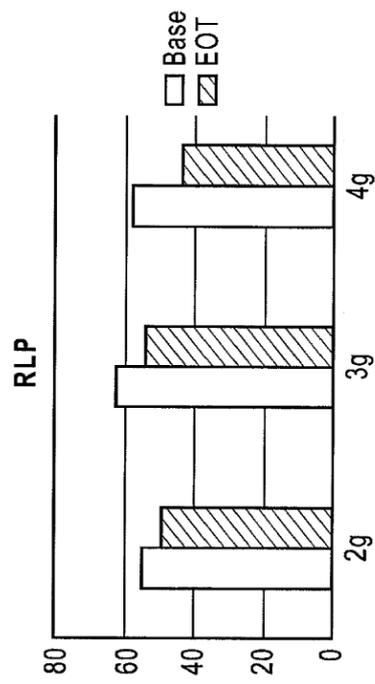


FIG. 24H

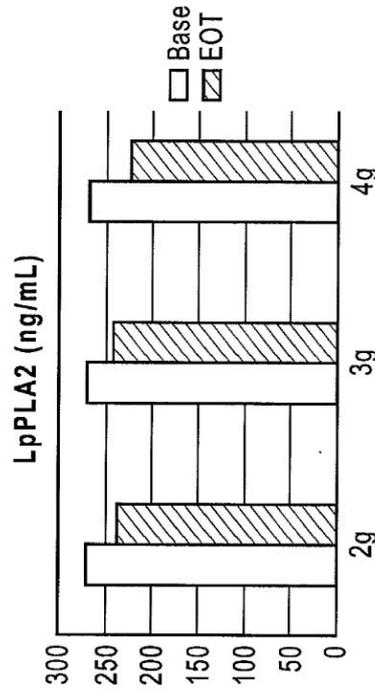


FIG. 24I

Niveles plasmáticos absolutos de la mediana (mg/dl)

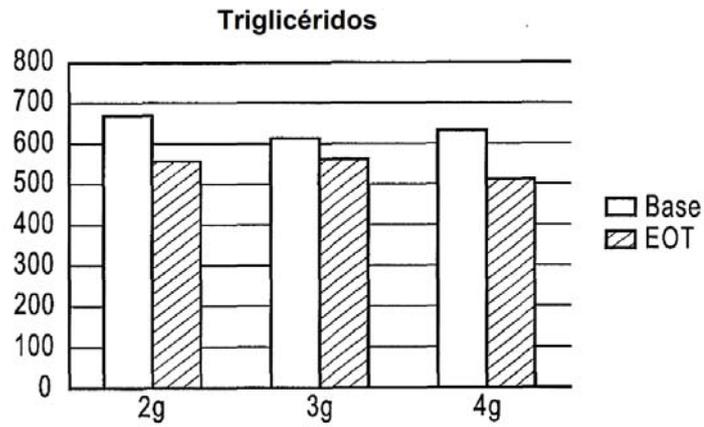


FIG. 25A

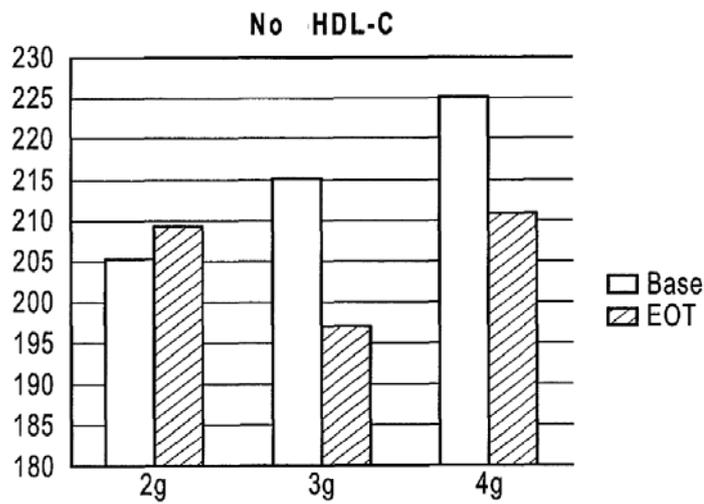
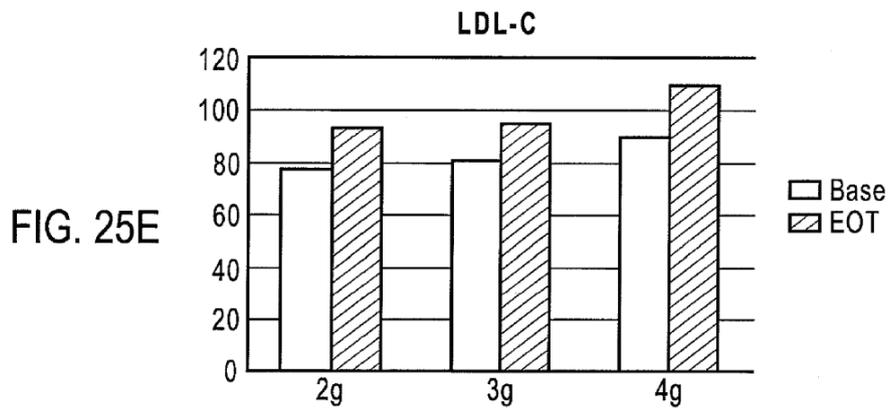
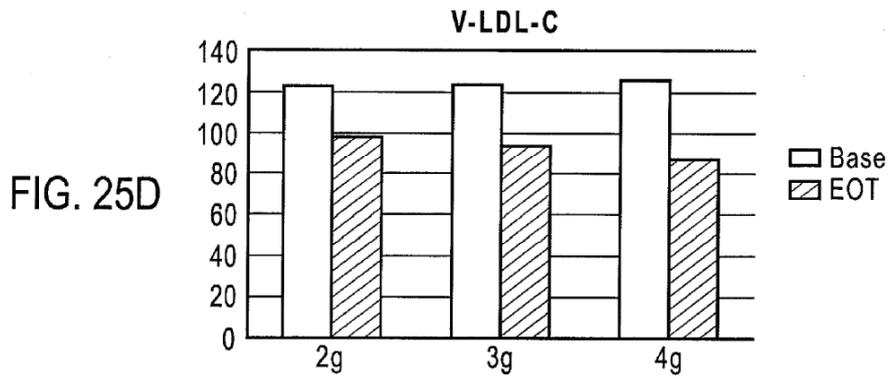
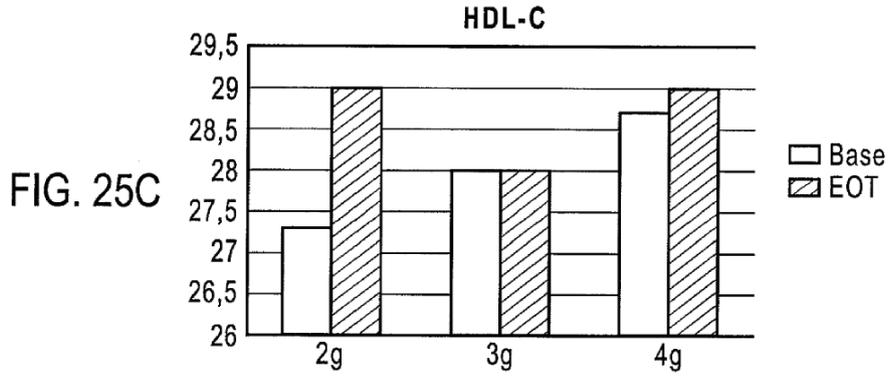


FIG. 25B

Niveles plasmáticos absolutos de la mediana (mg/dl)



Niveles plasmáticos absolutos de la mediana (mg/dl)

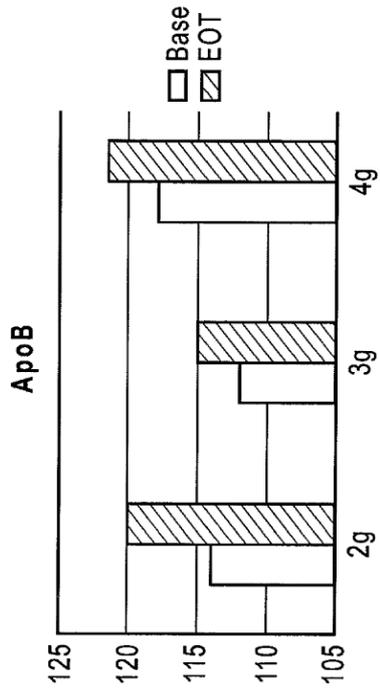


FIG. 25F

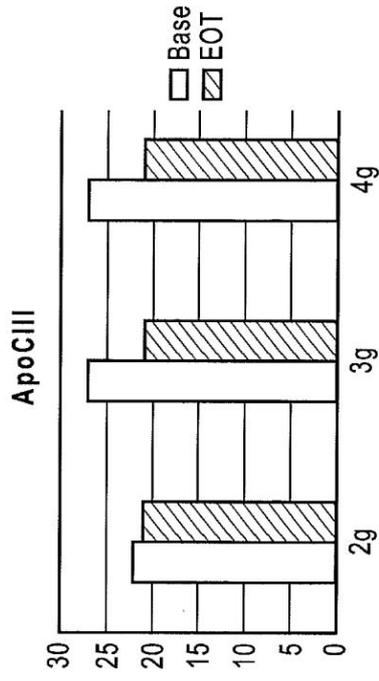


FIG. 25G

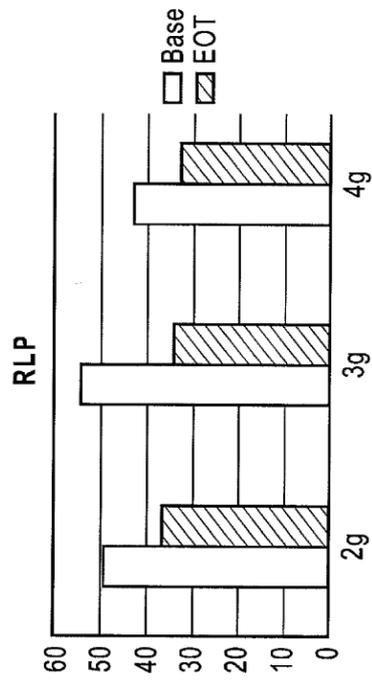


FIG. 25H

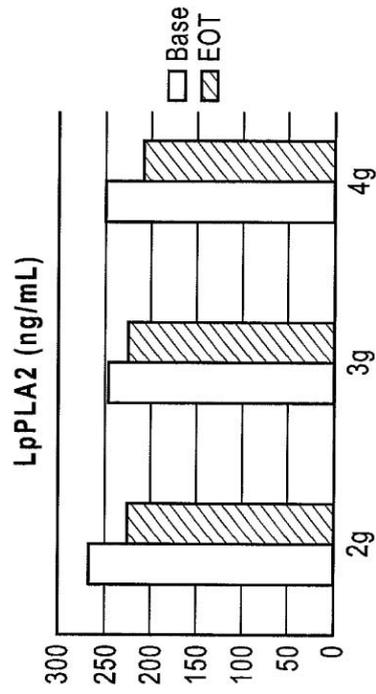


FIG. 25I

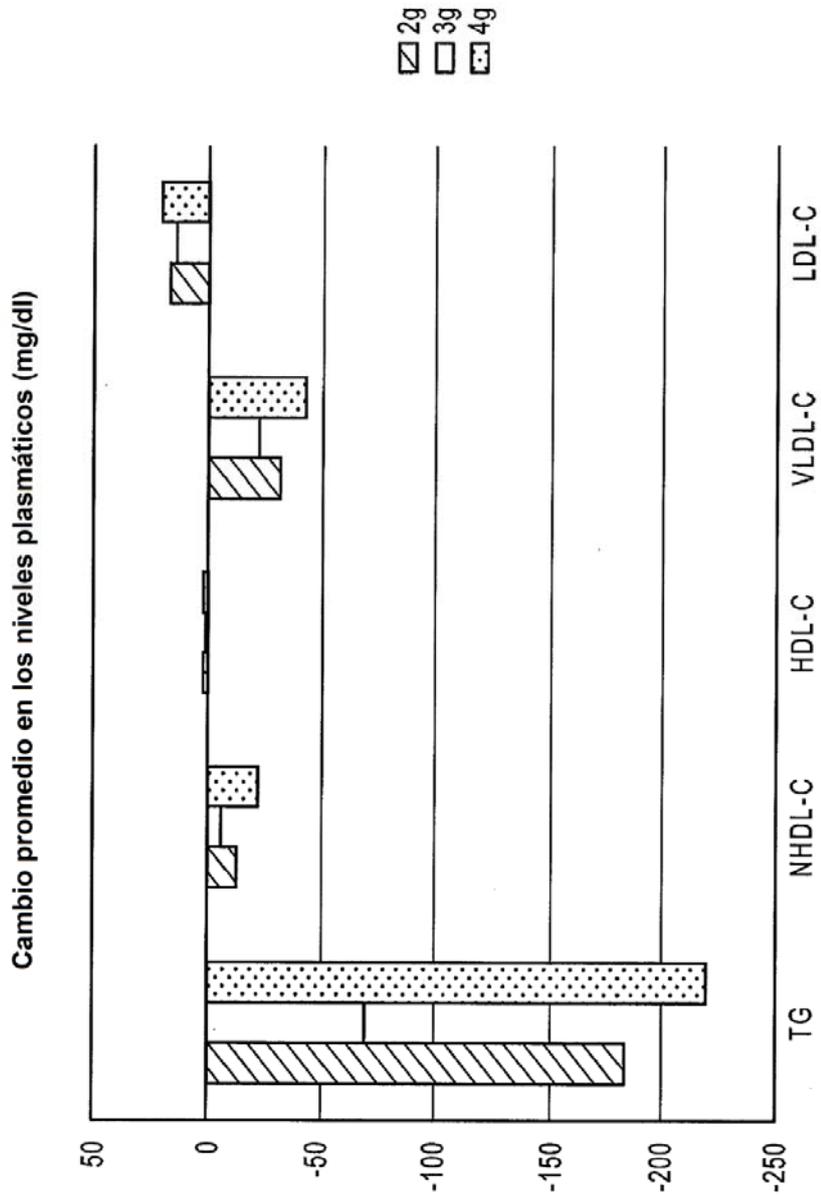


FIG. 26A

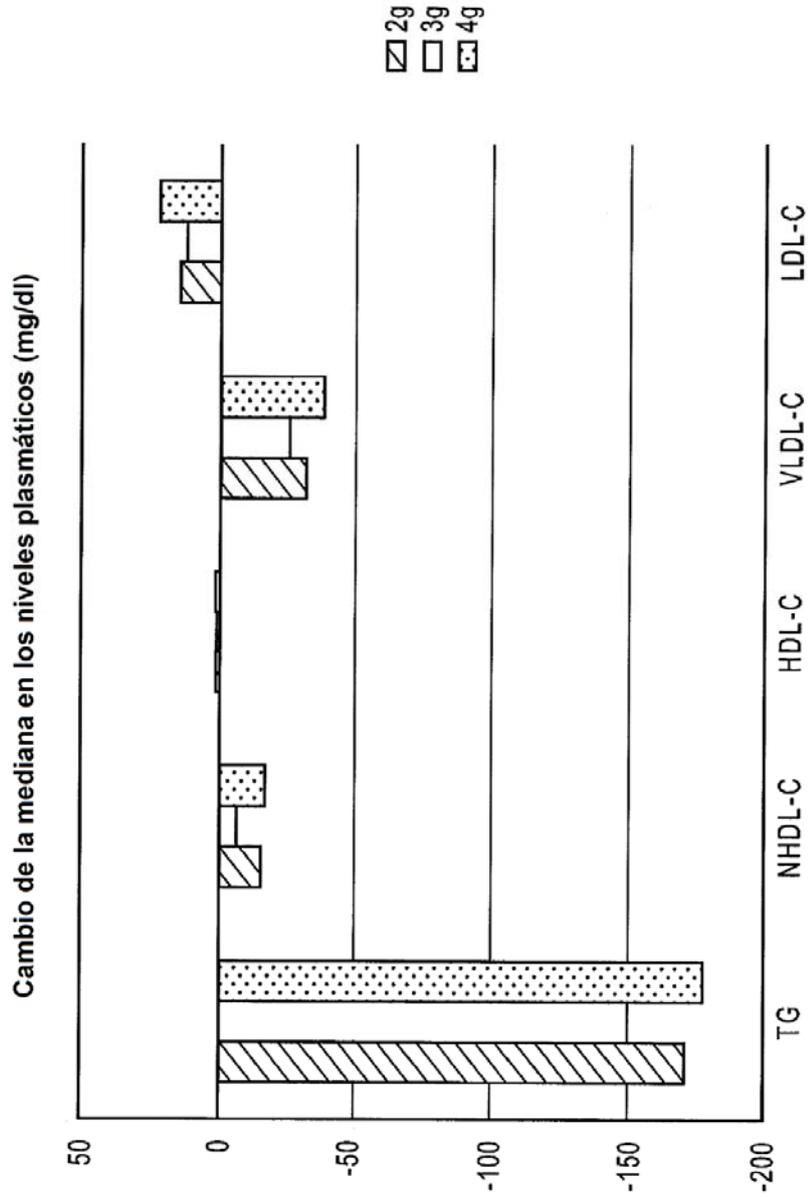


FIG. 26B

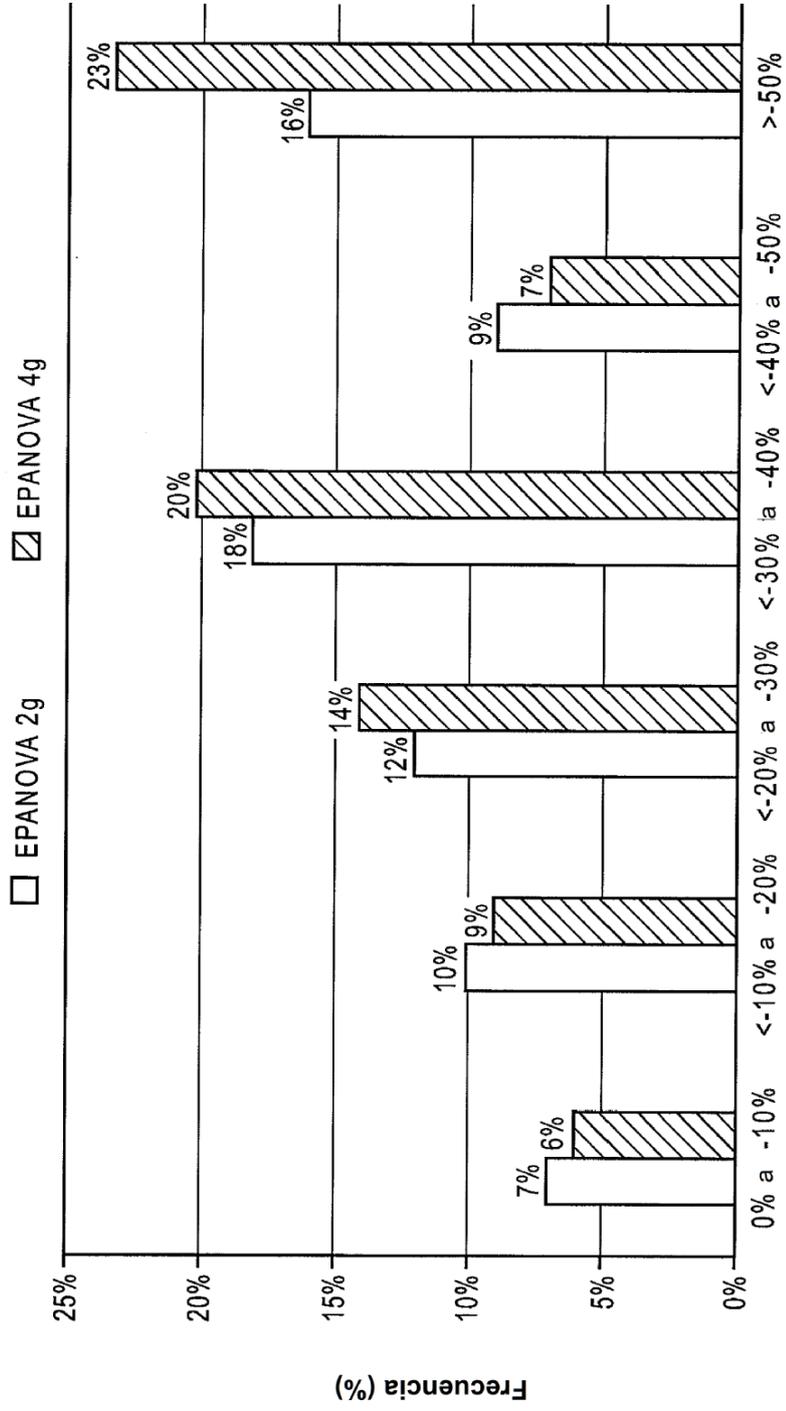


FIG. 27

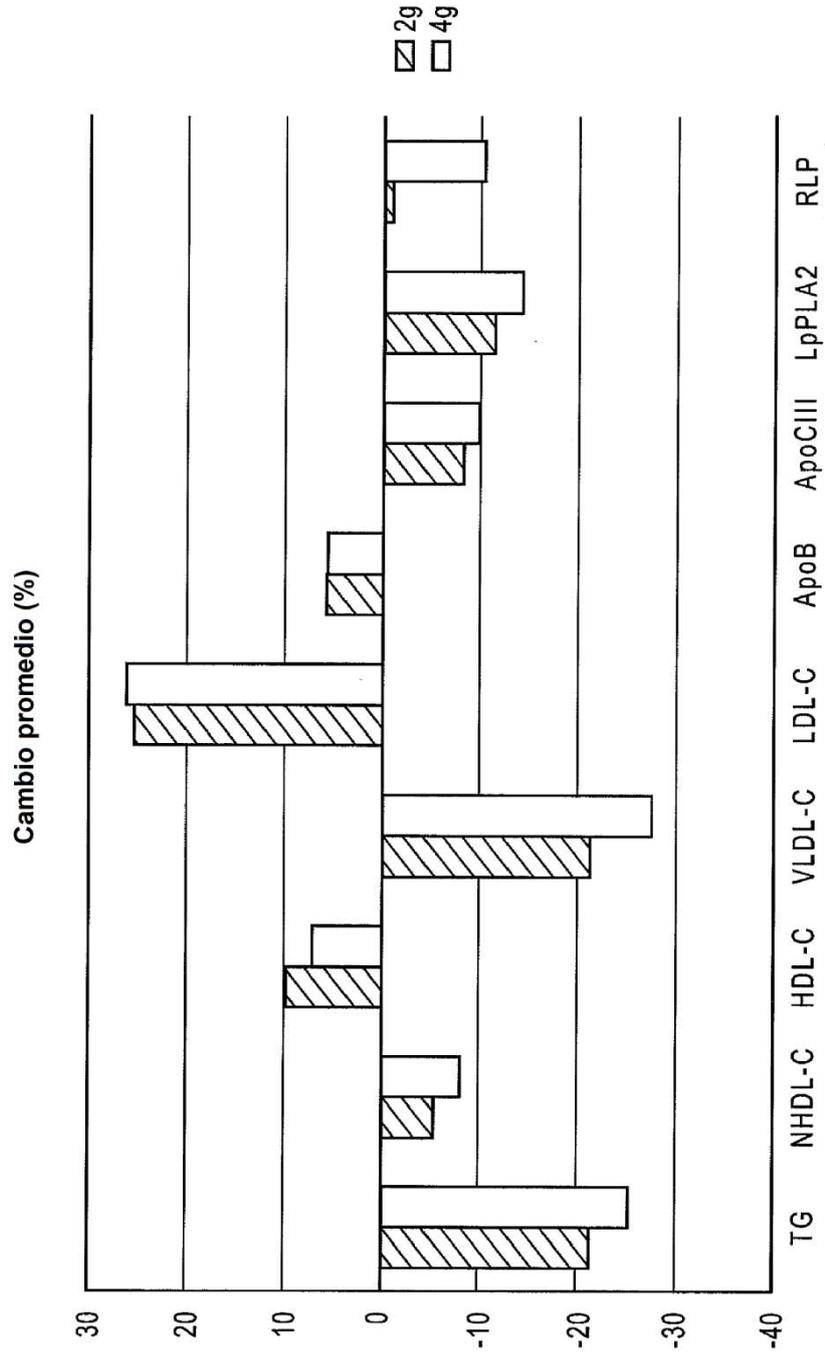


FIG. 28A

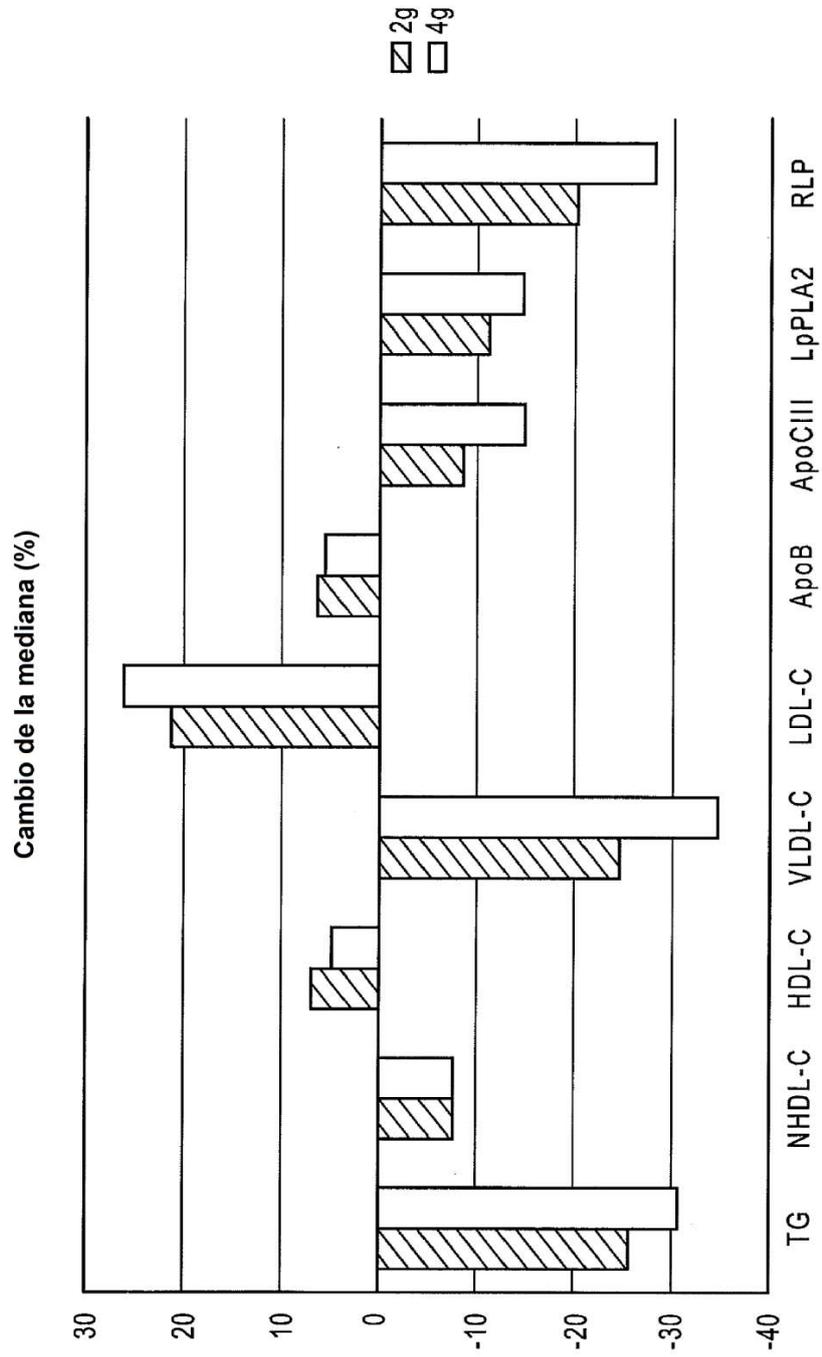


FIG. 28B

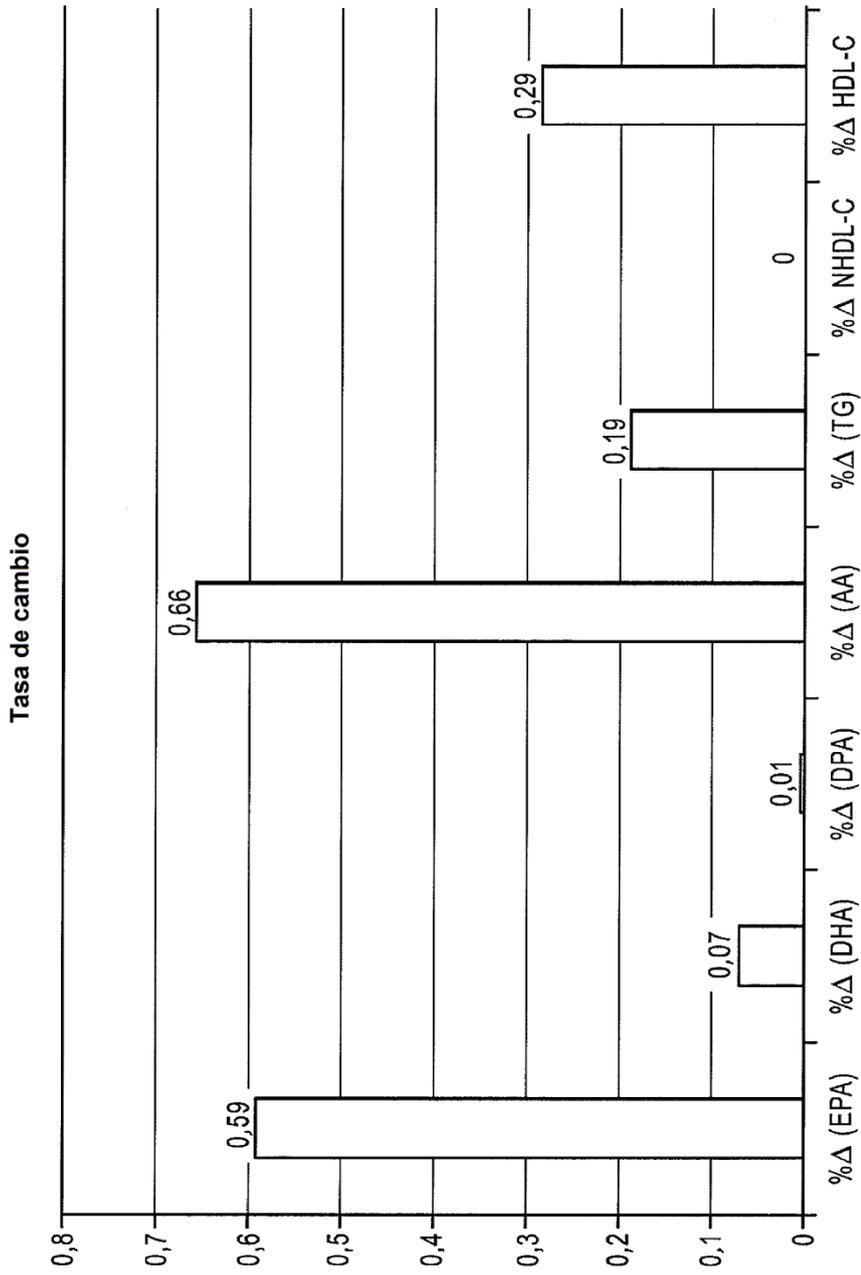


FIG. 29

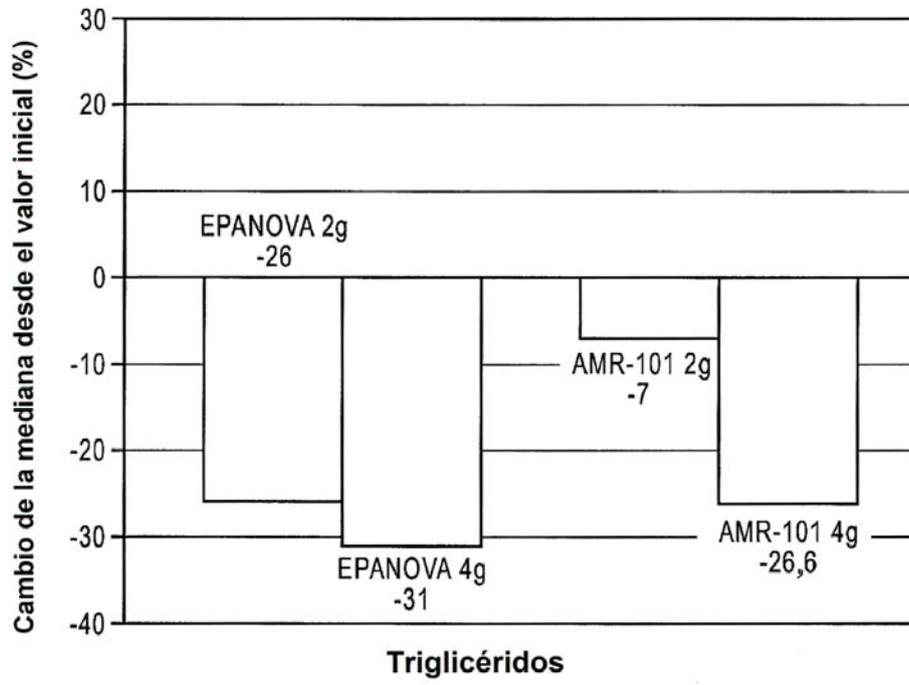


FIG. 30

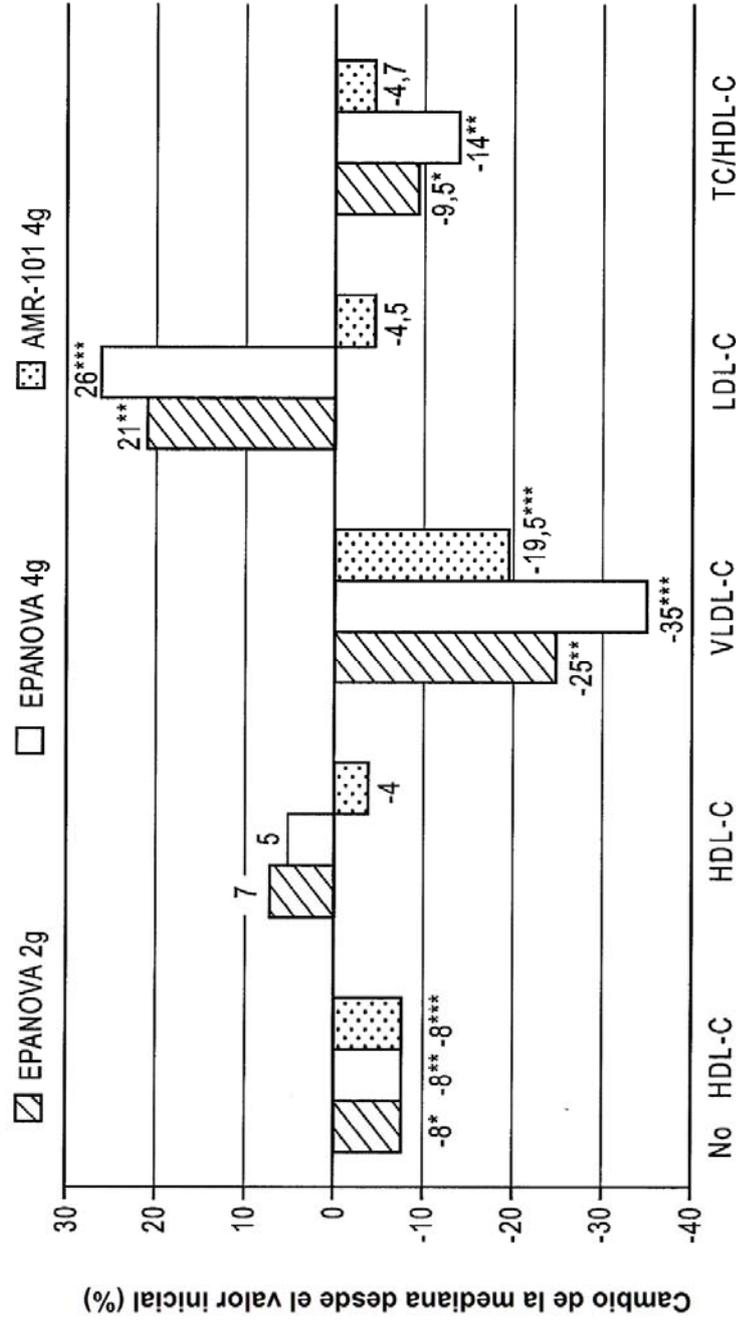


FIG. 31

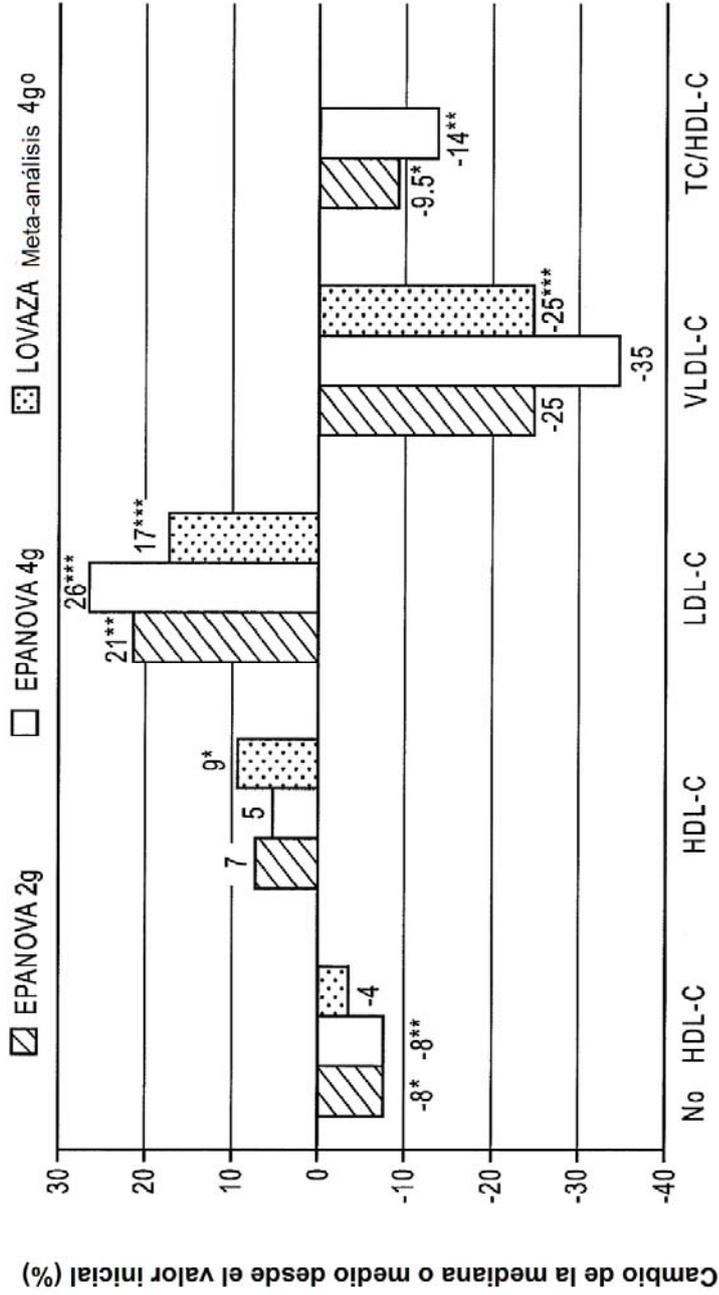


FIG. 32

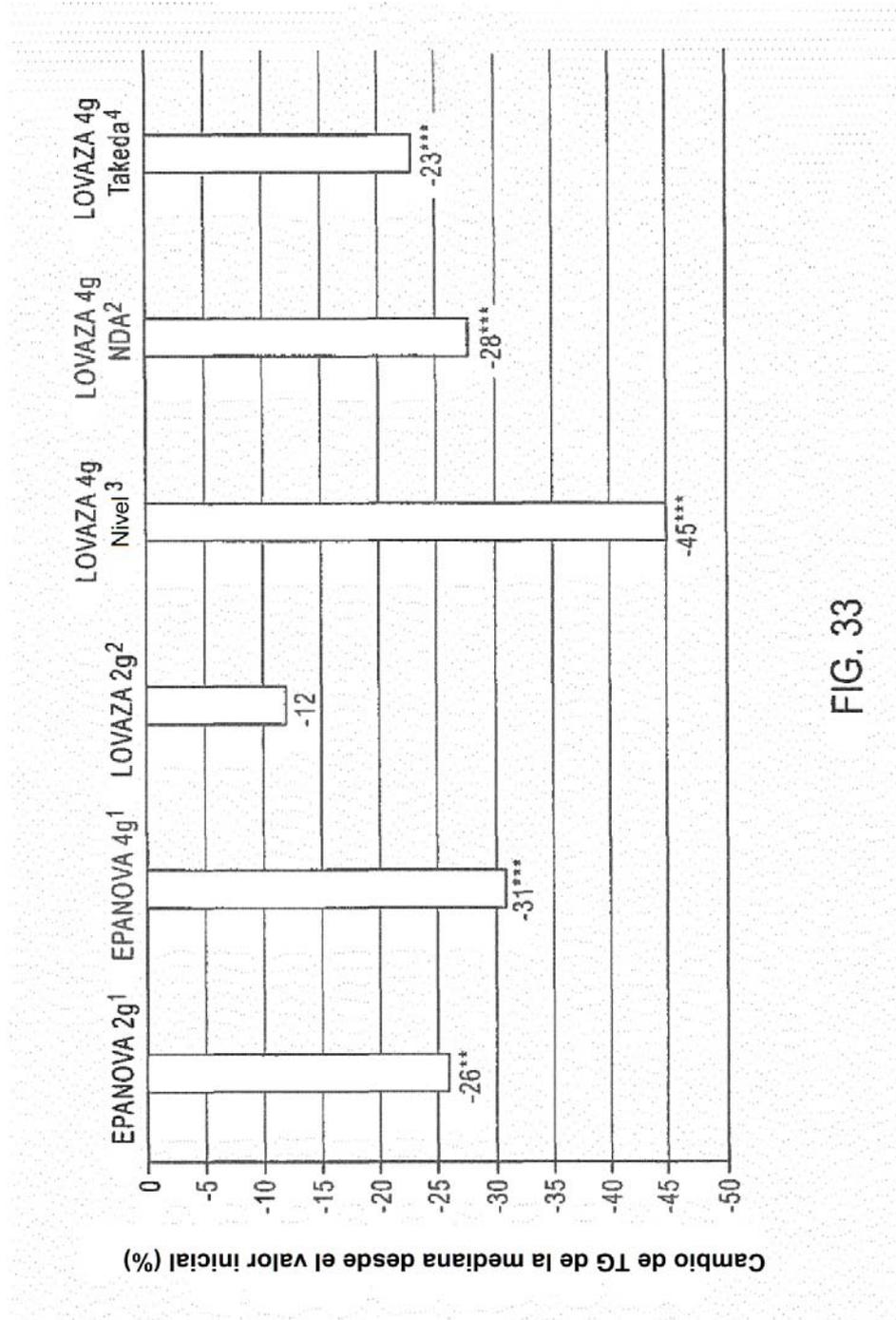


FIG. 33

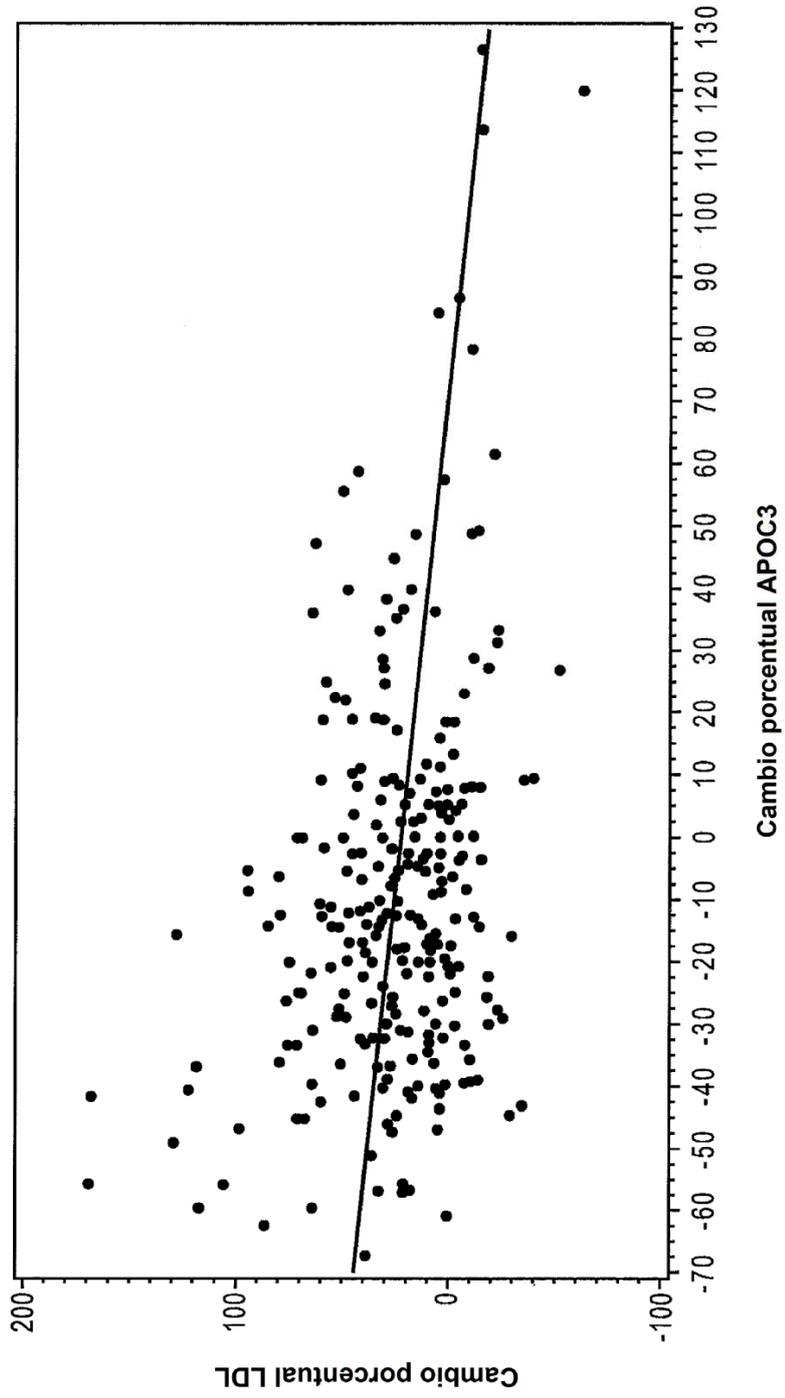


FIG. 34

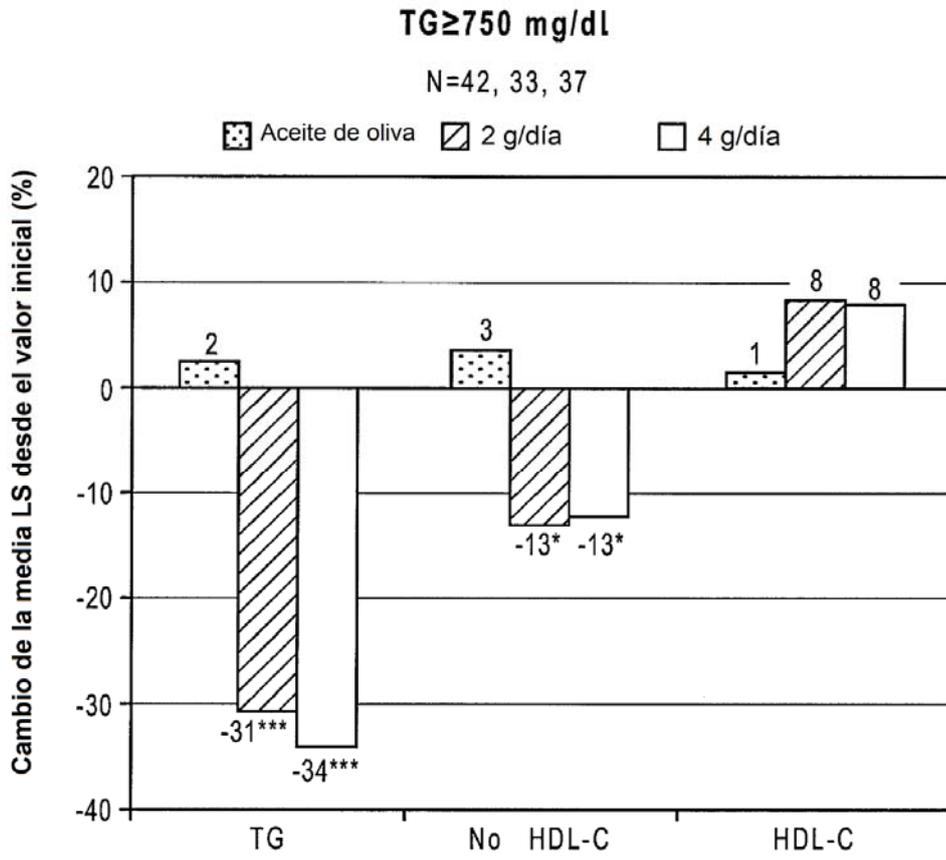


FIG. 35

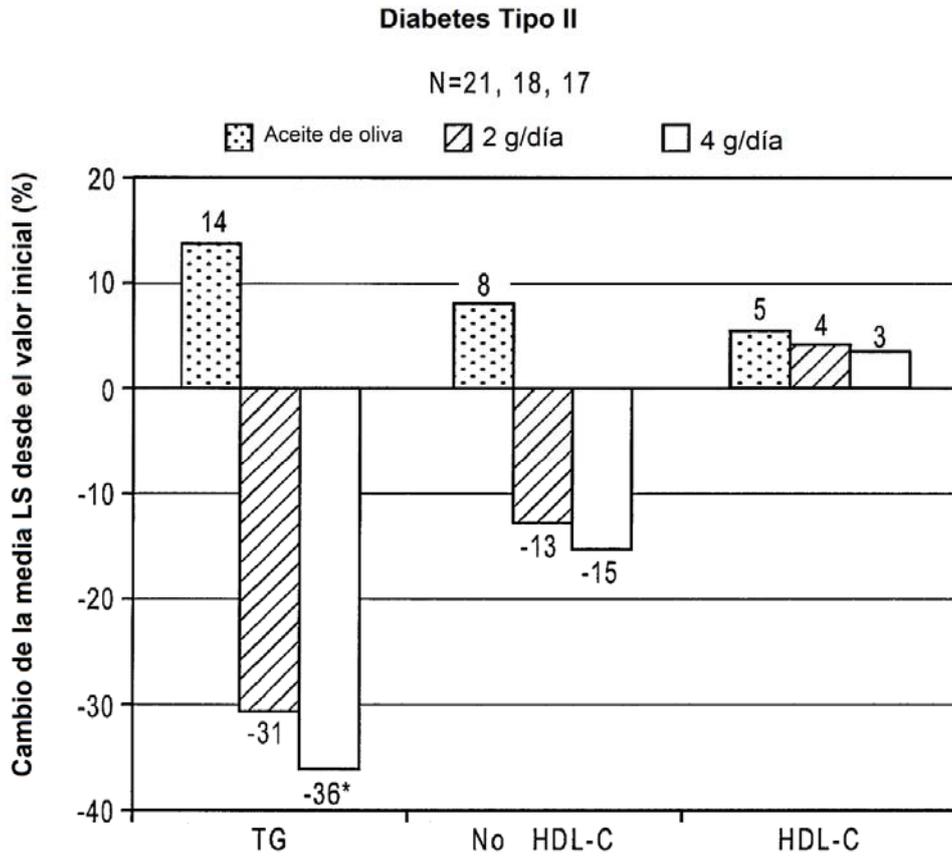


FIG. 36

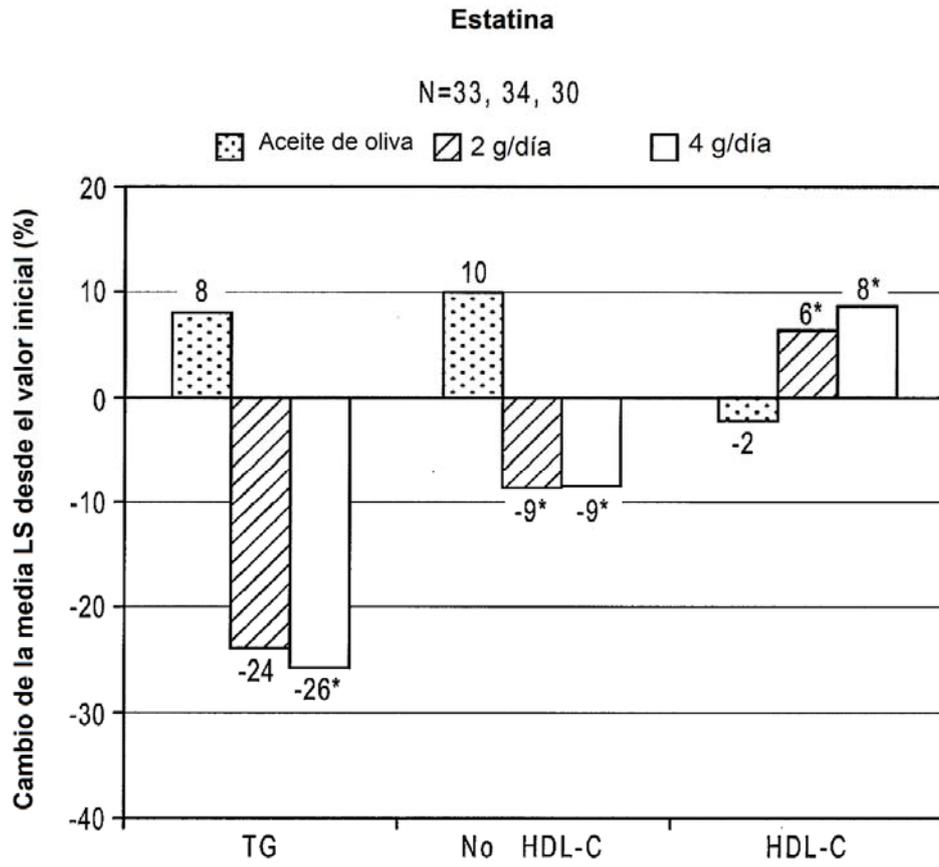


FIG. 37

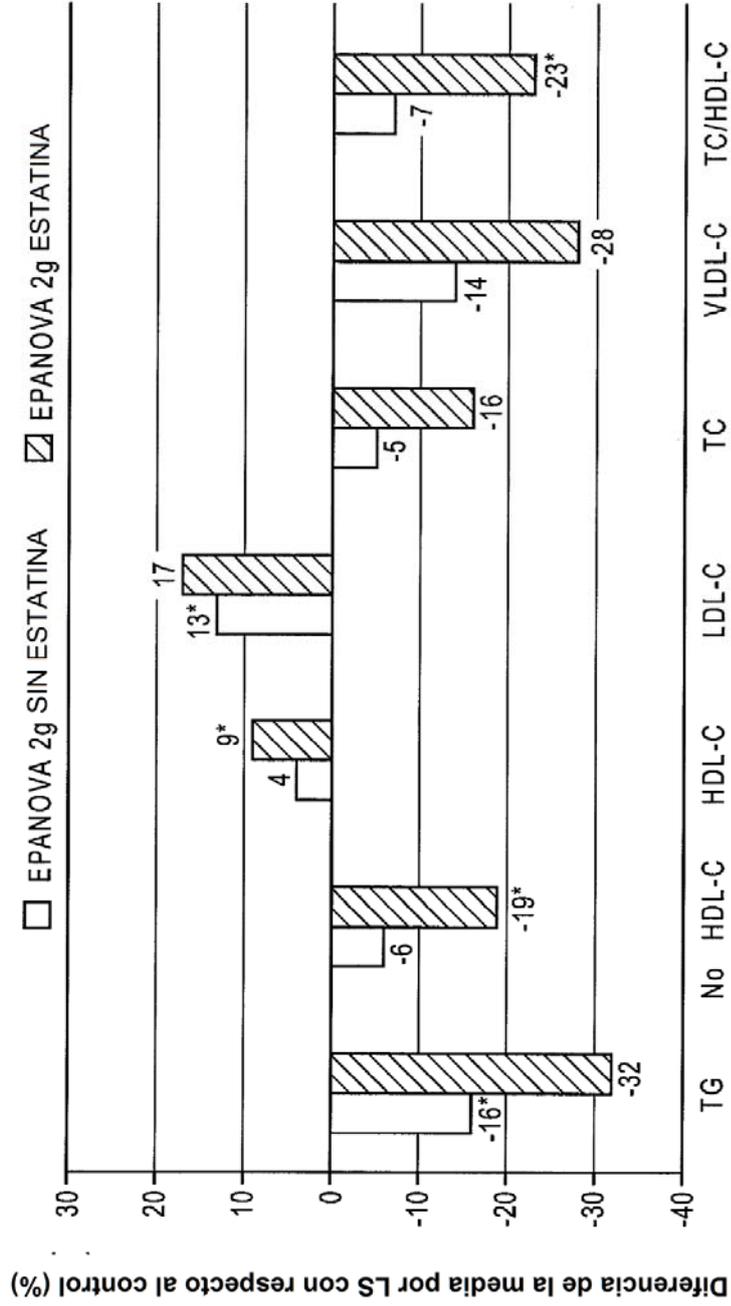


FIG. 38

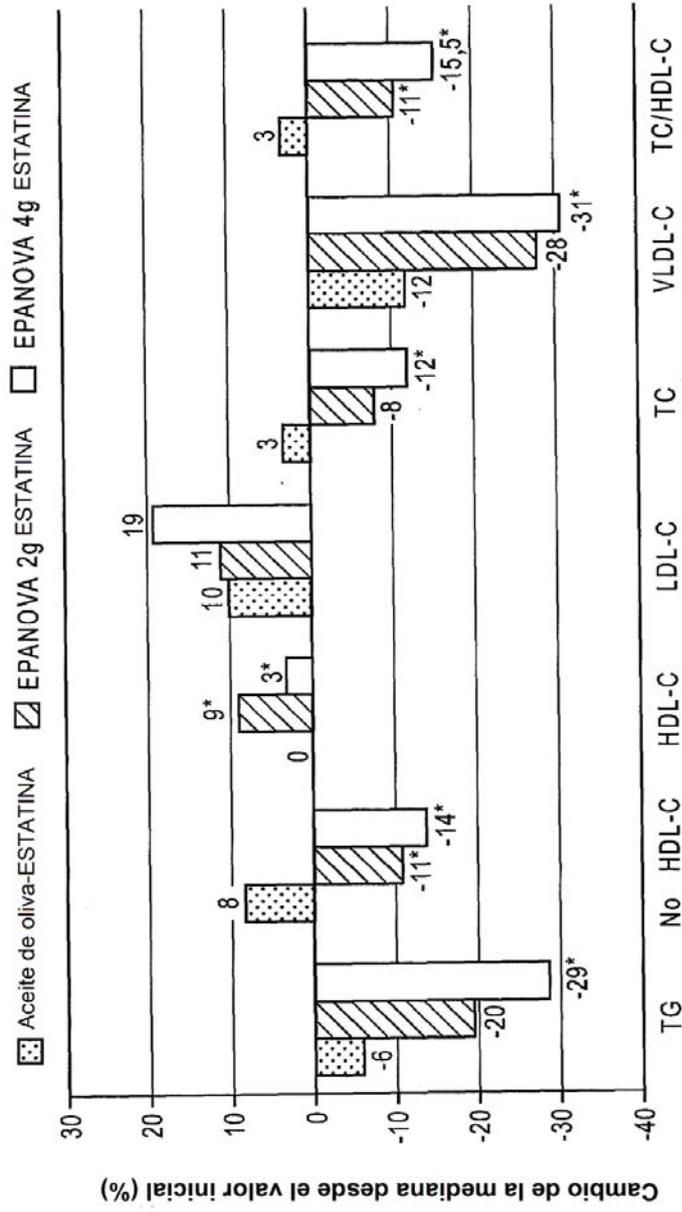


FIG. 39

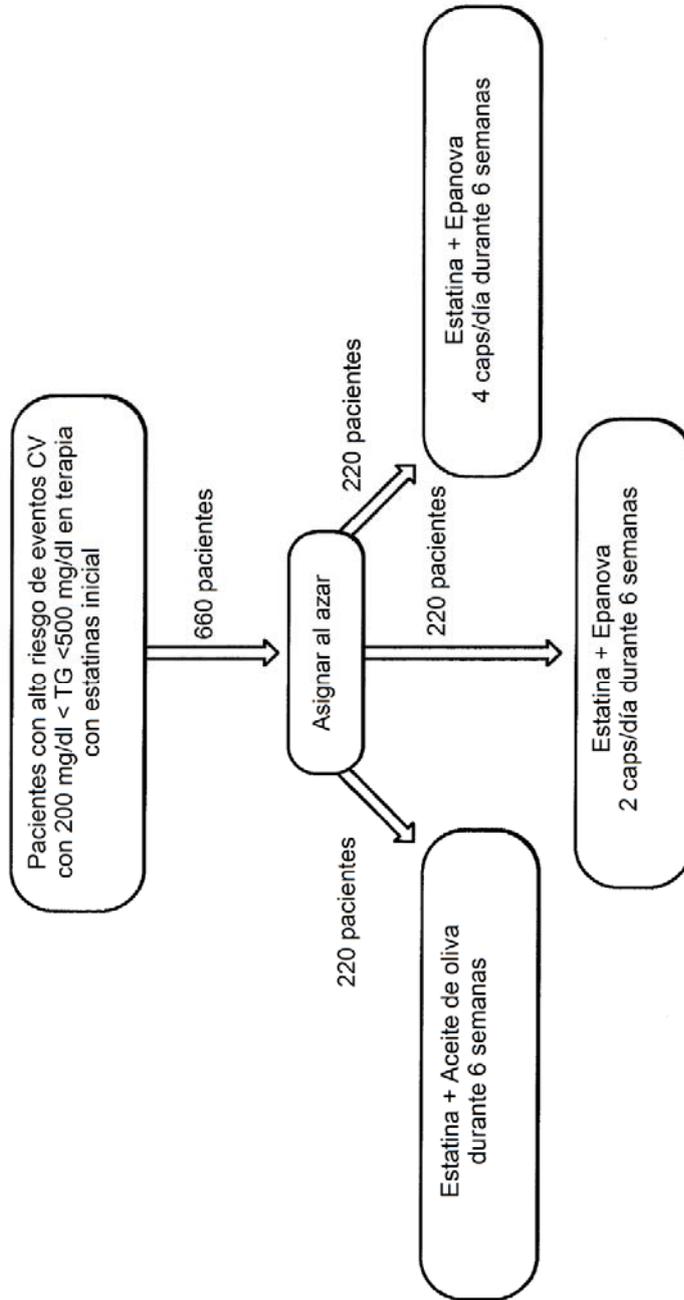


FIG. 40

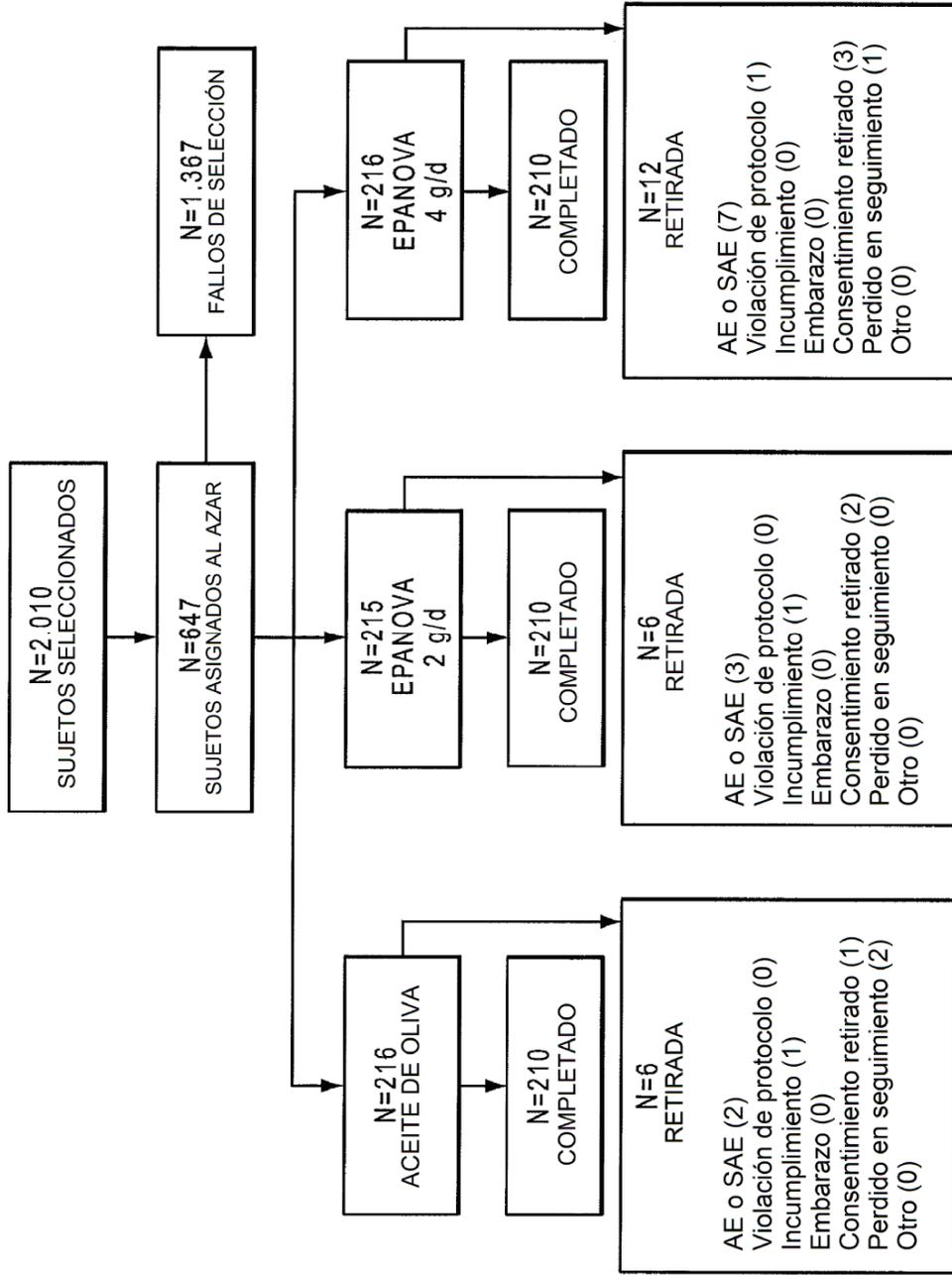


FIG. 41

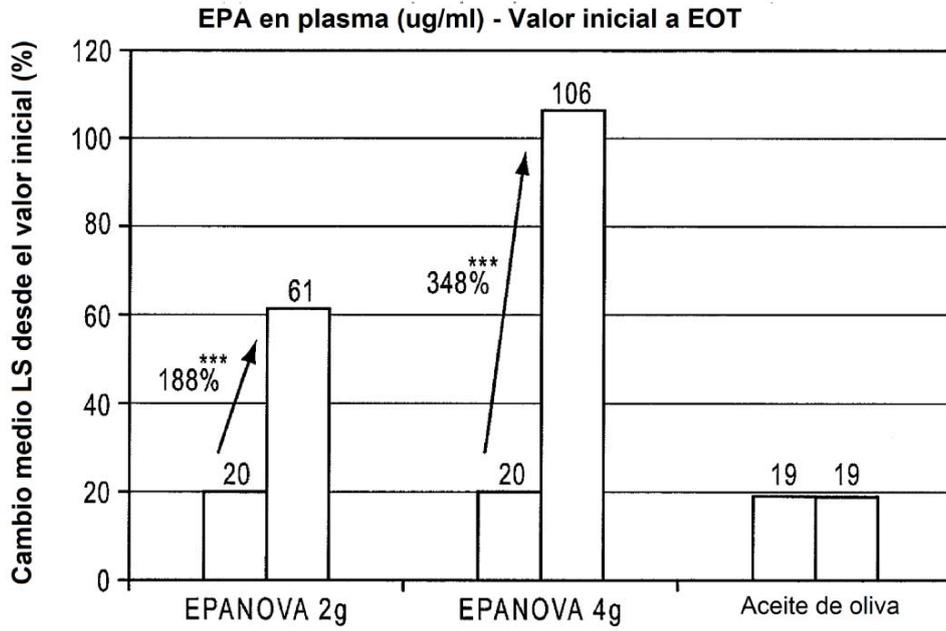


FIG. 42A

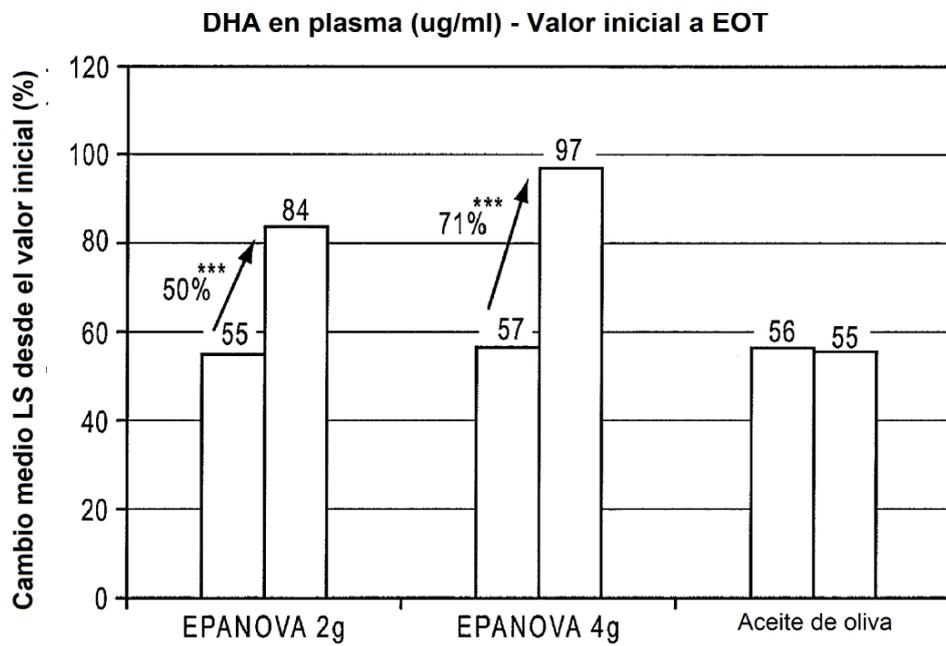


FIG. 42B

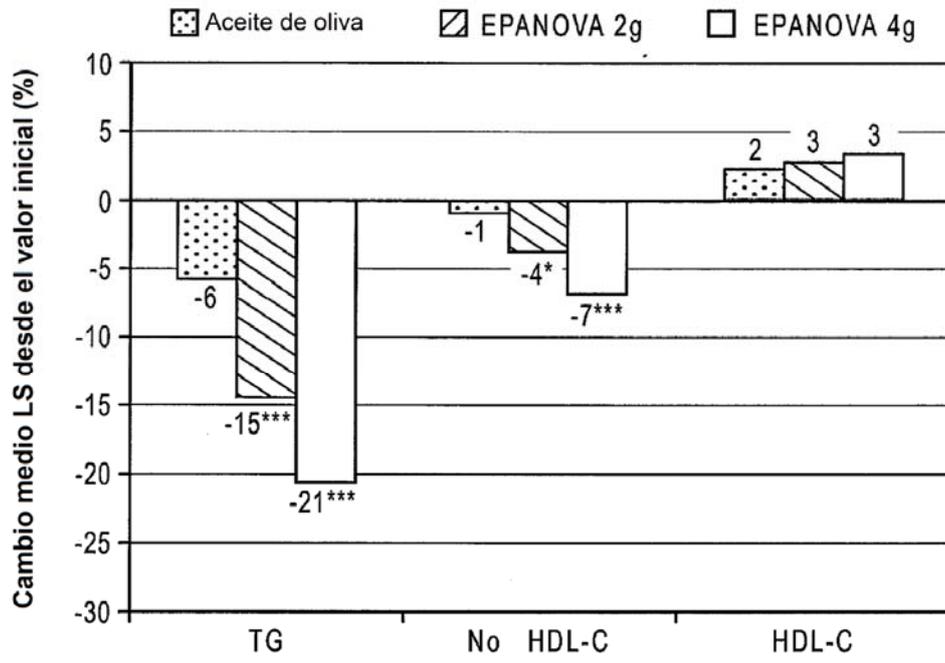


FIG. 43

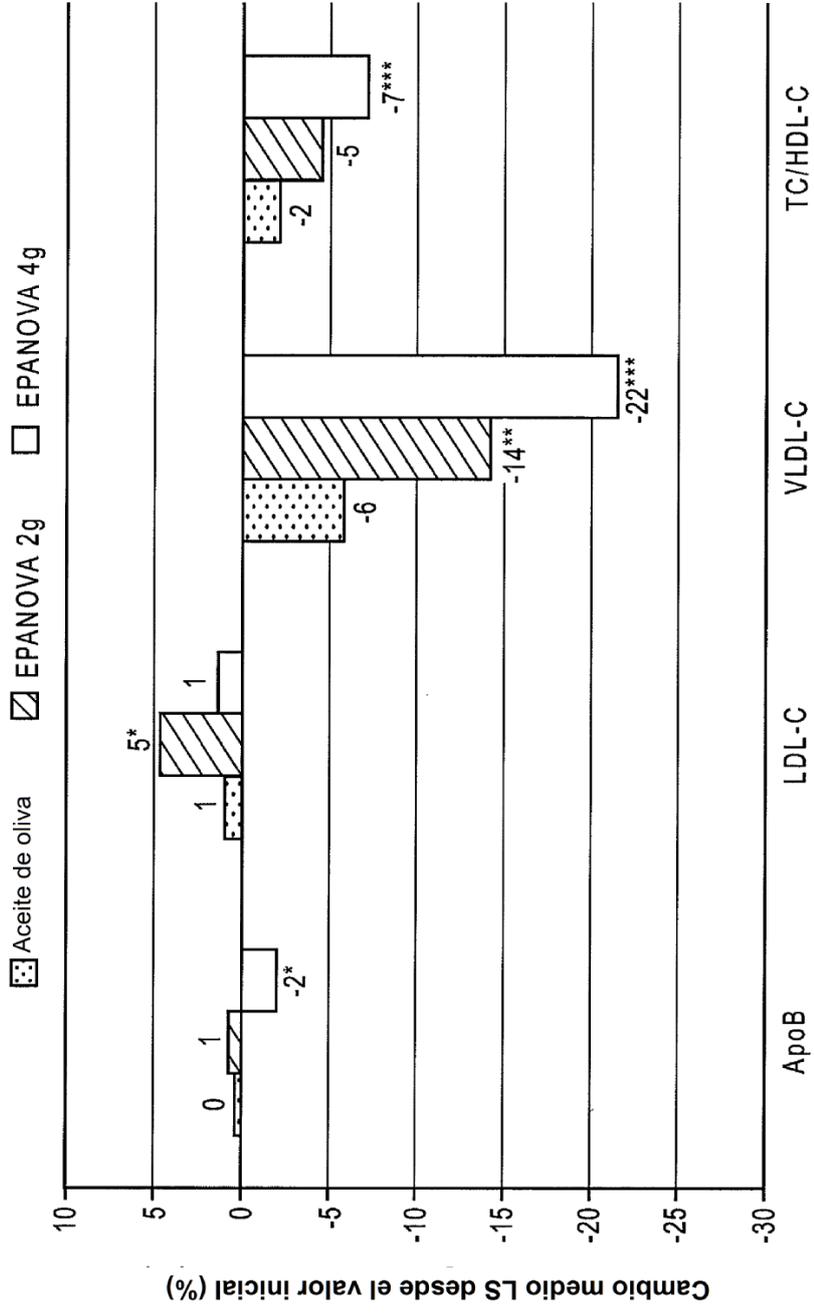


FIG. 44

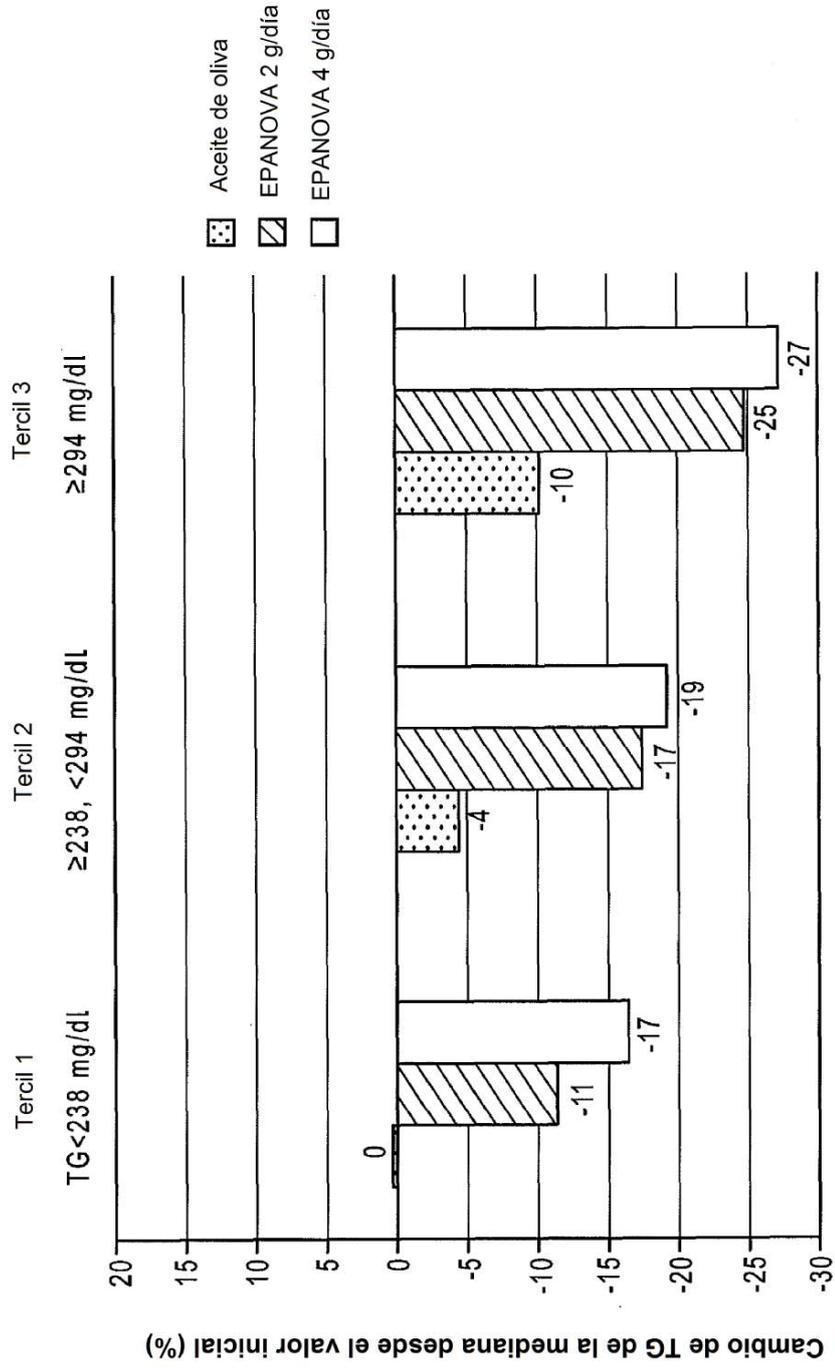


FIG. 45

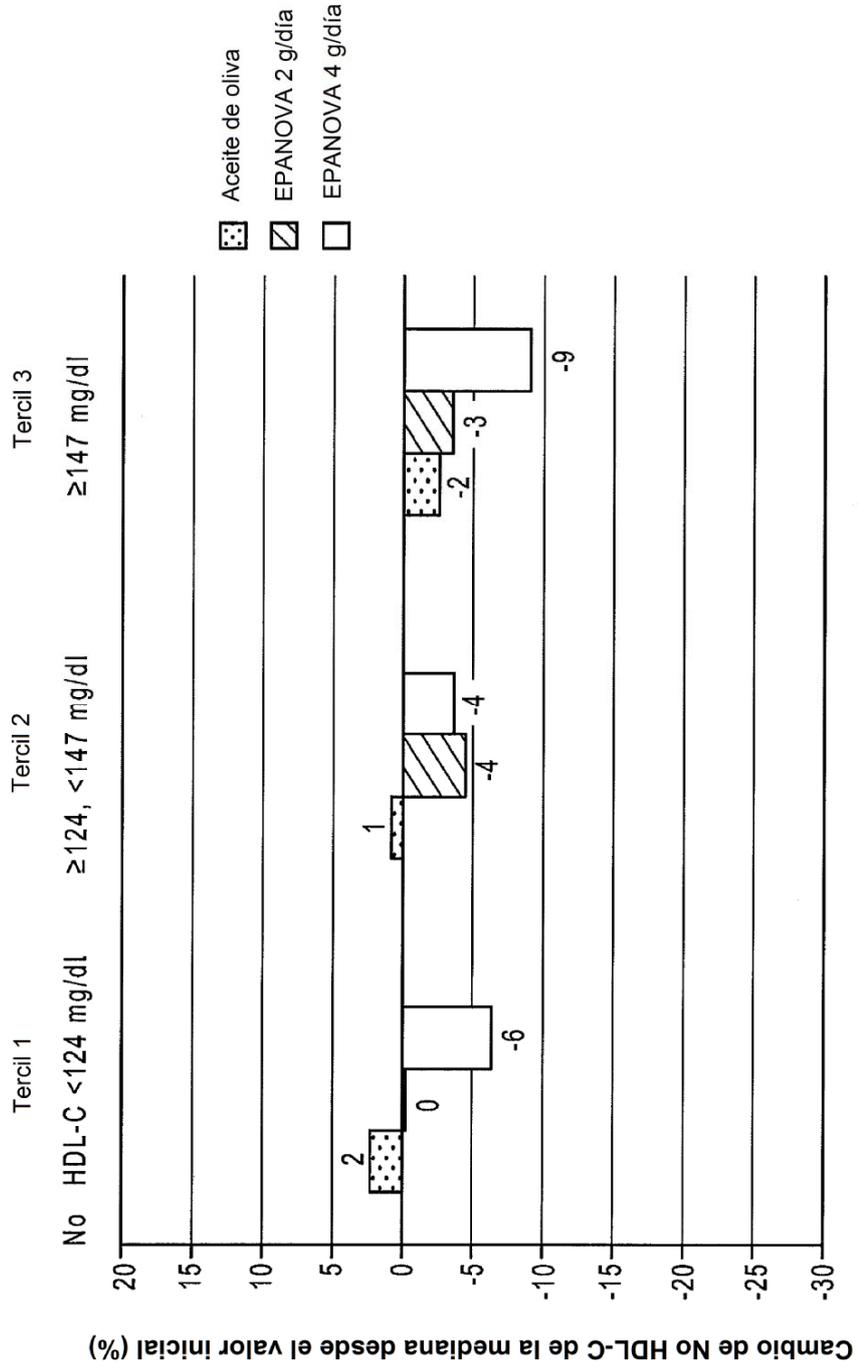


FIG. 46

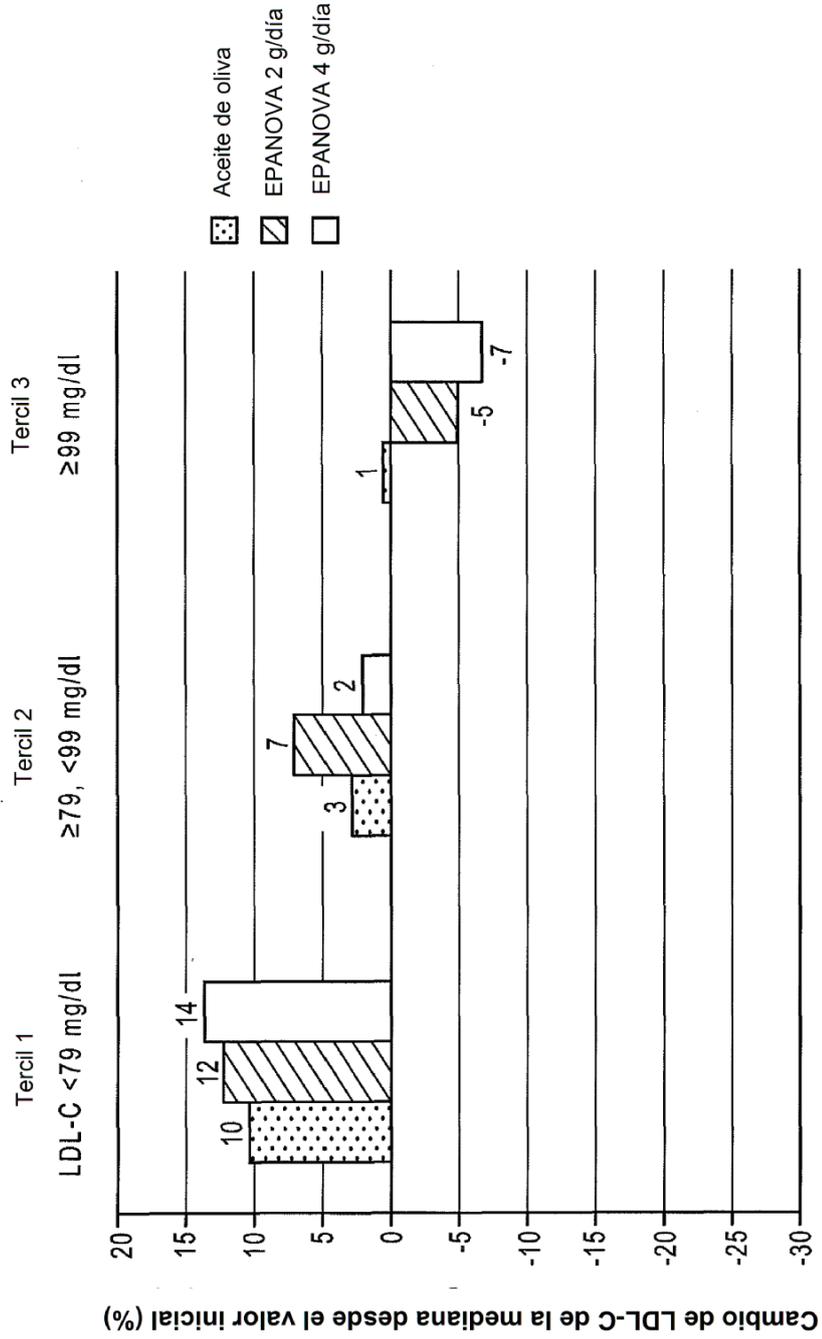


FIG. 47

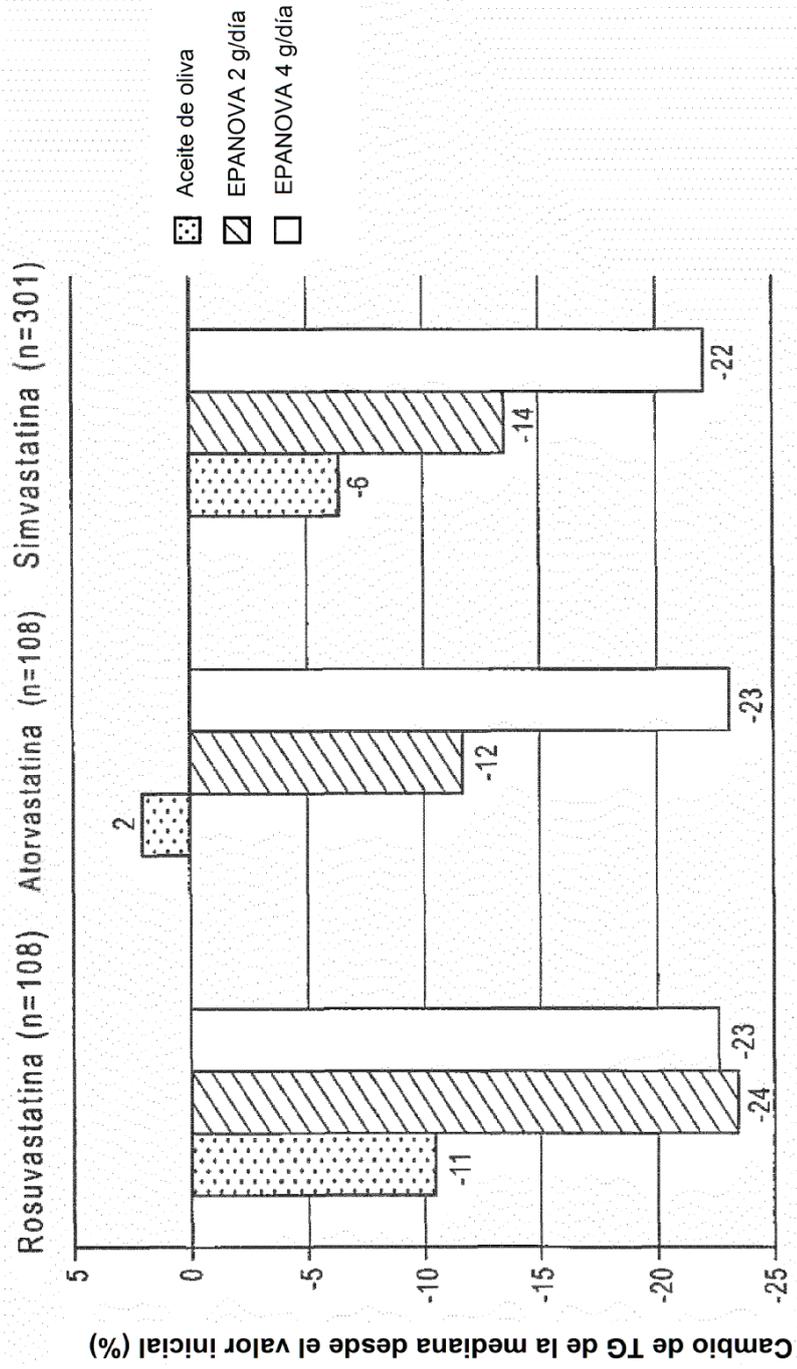


FIG. 48

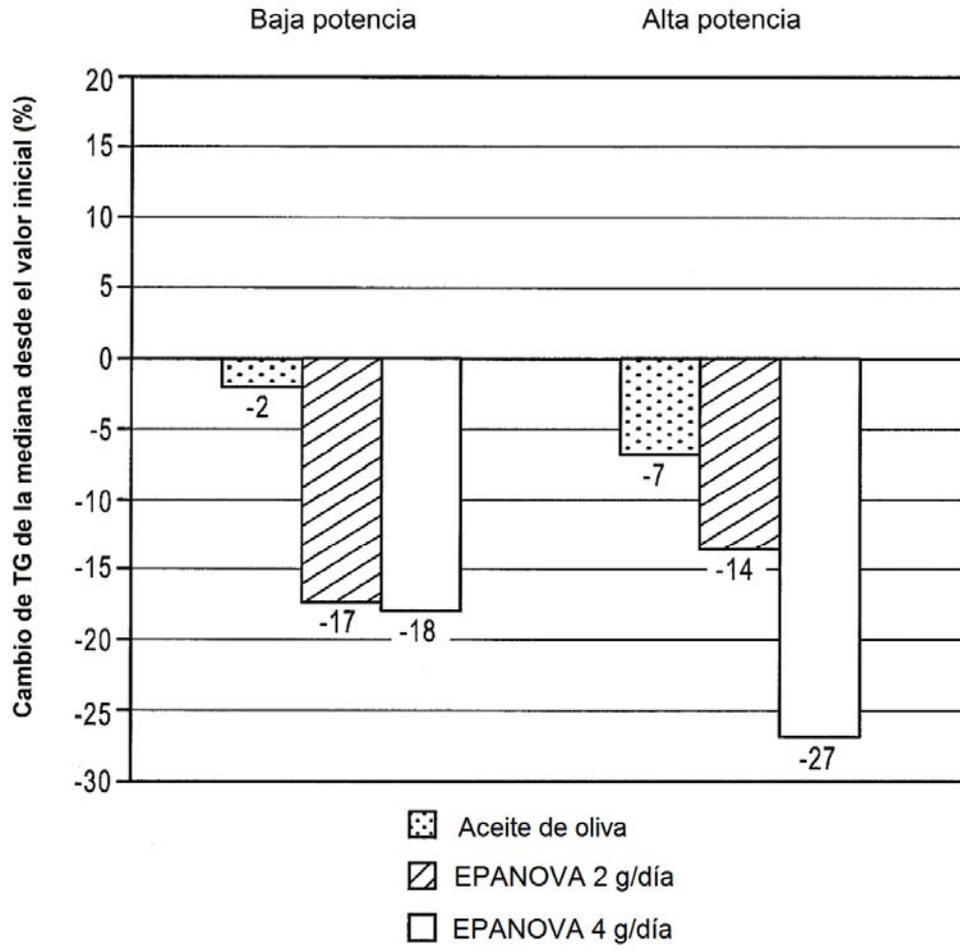


FIG. 49

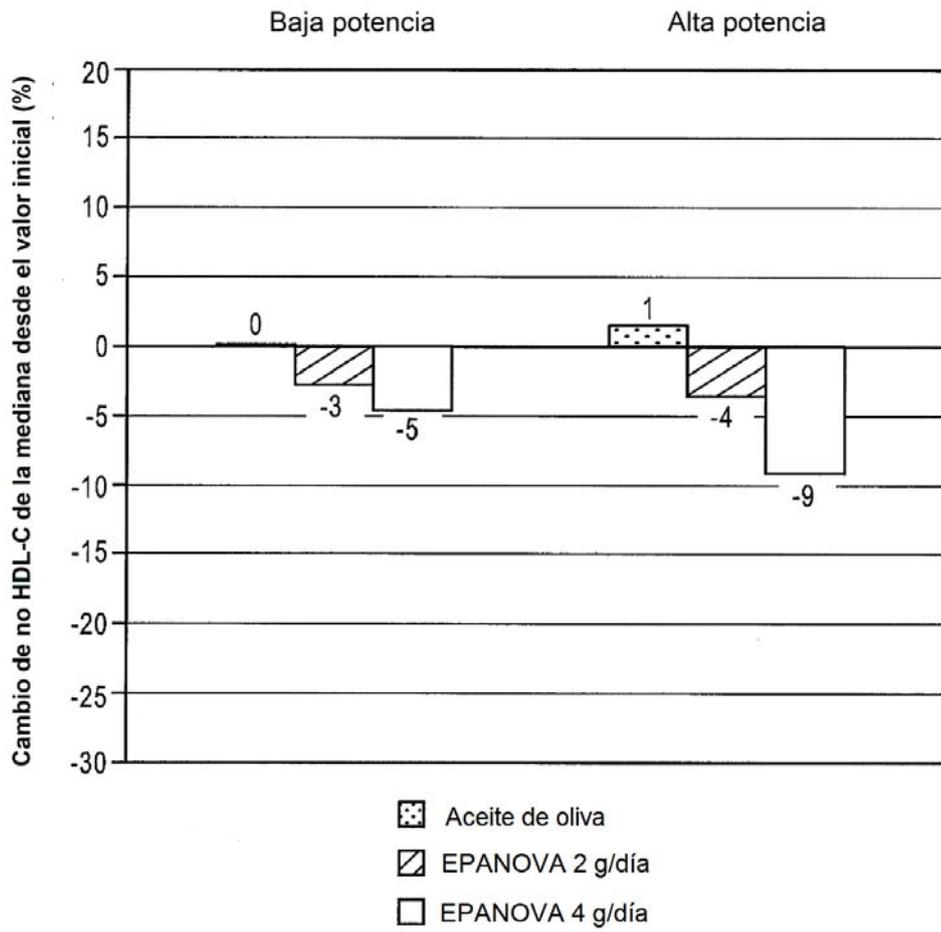


FIG. 50

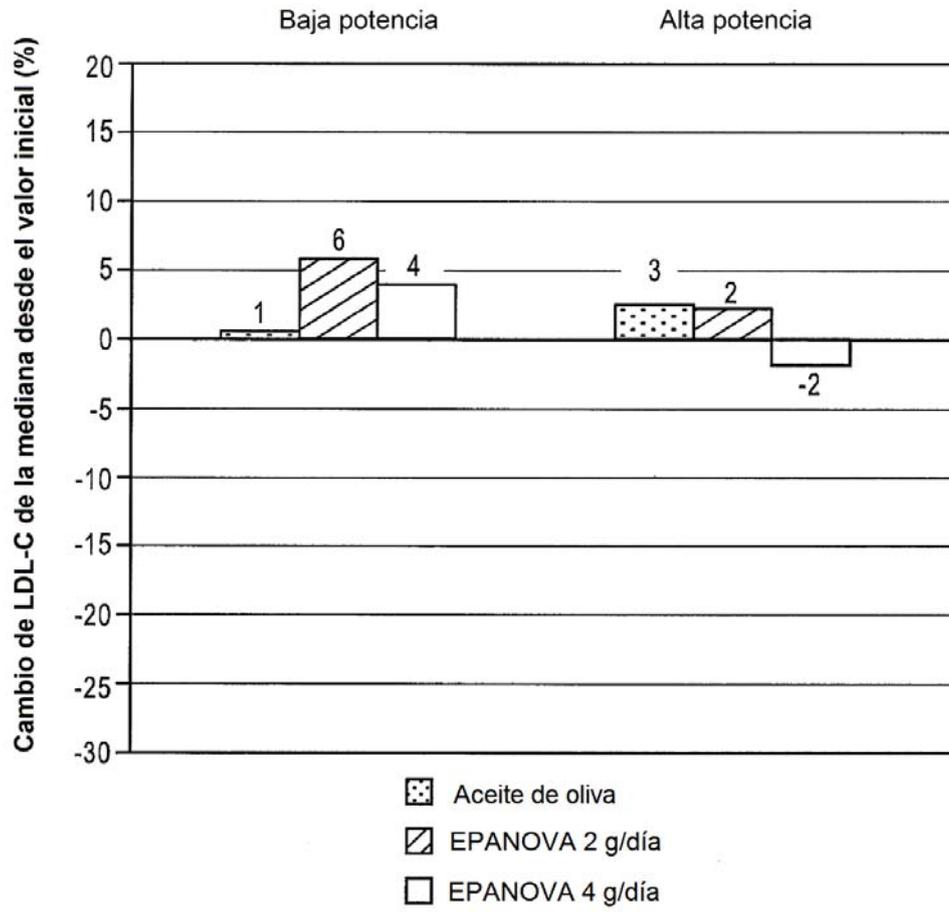


FIG. 51

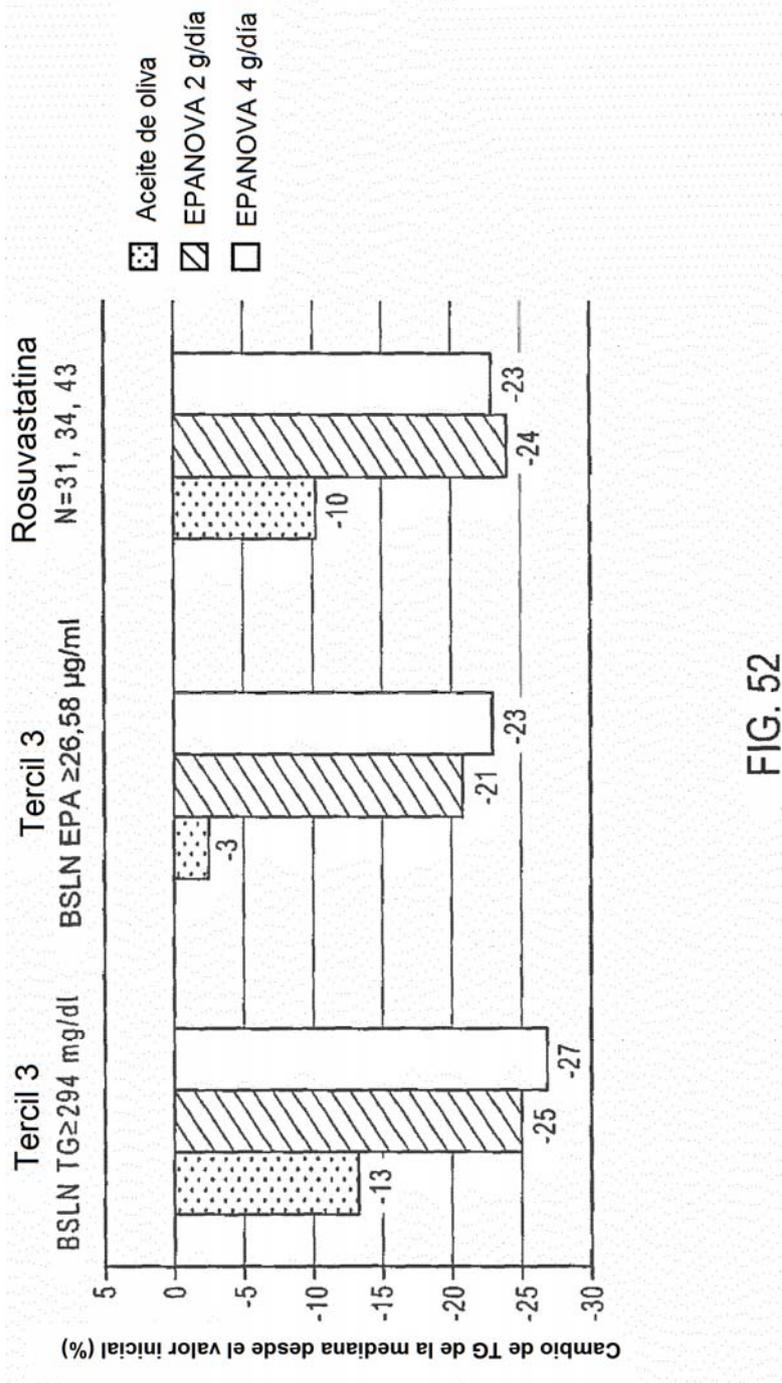


FIG. 52

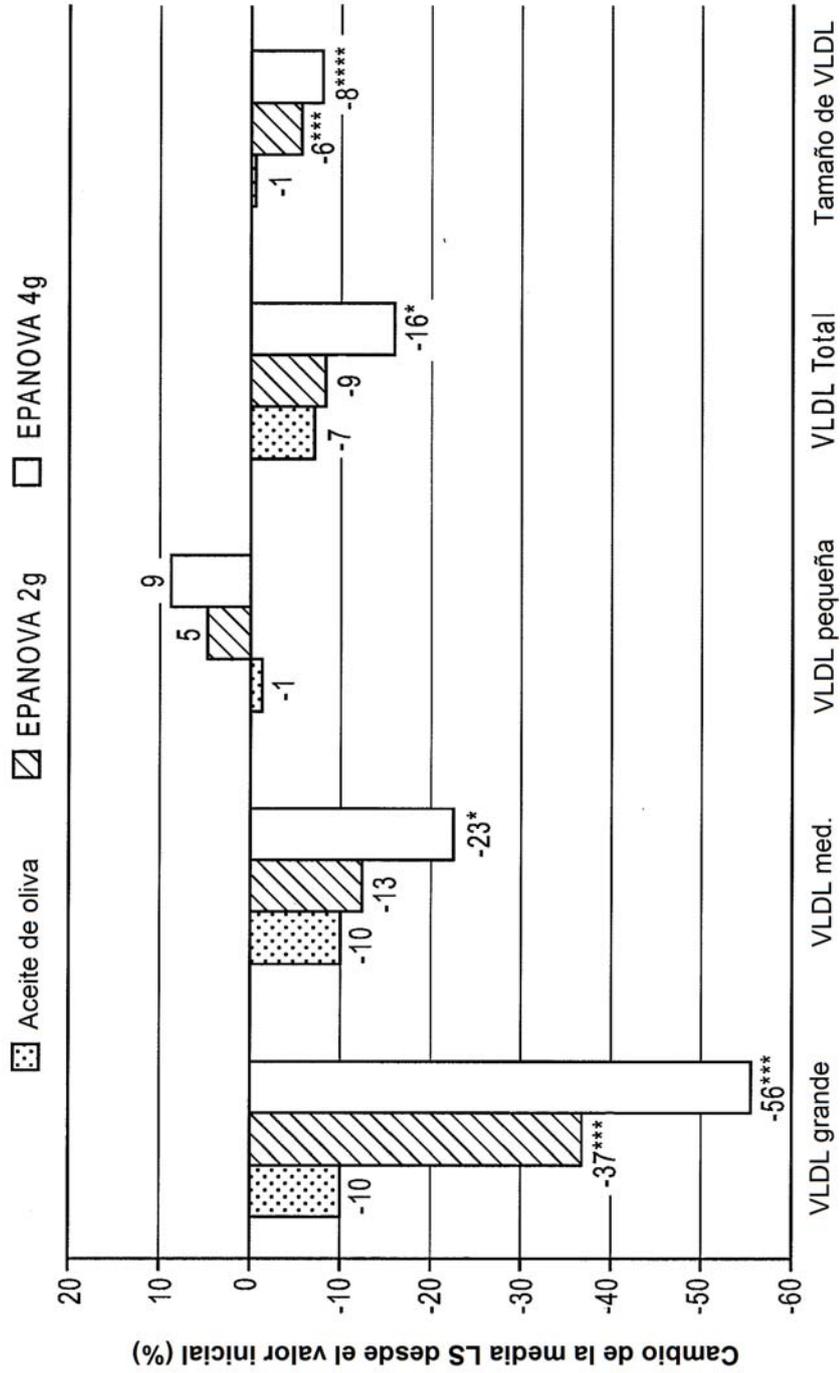


FIG. 53

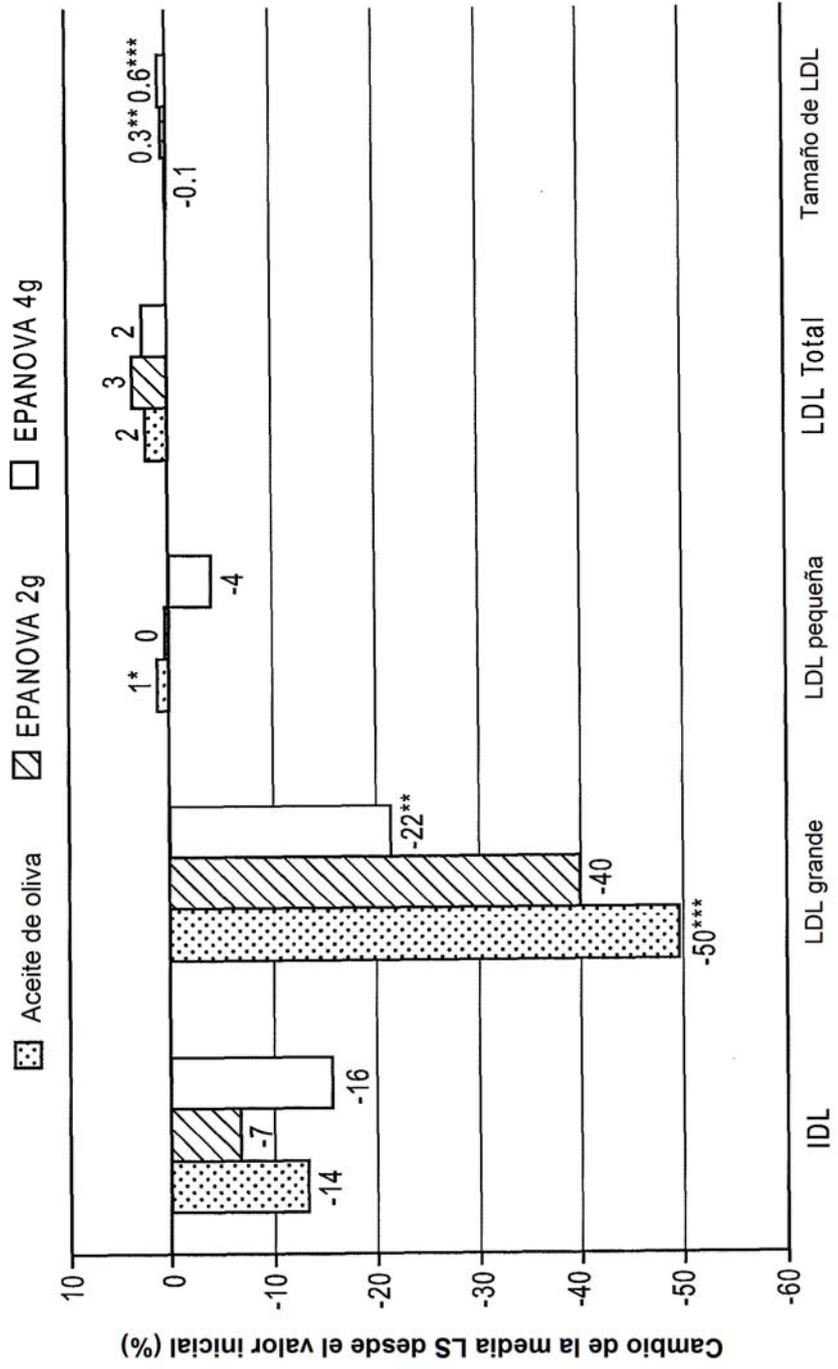


FIG. 54

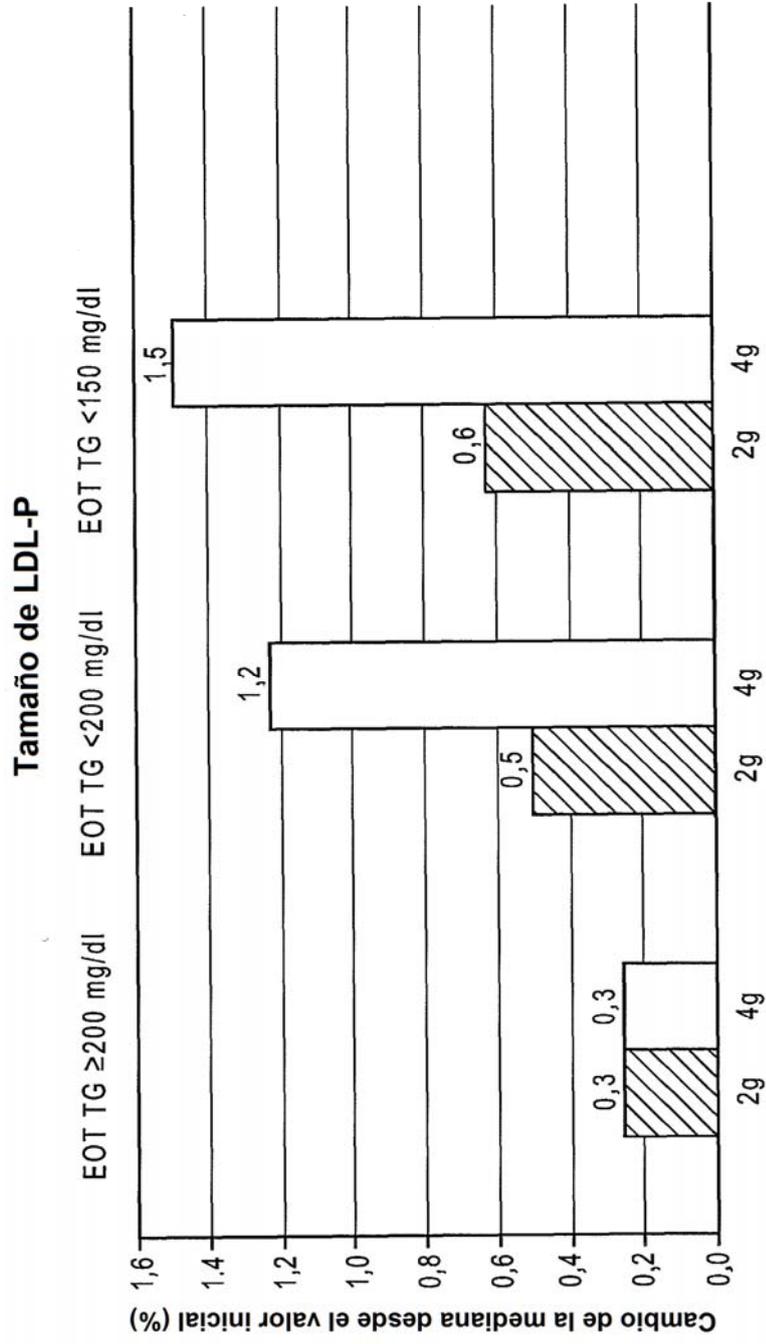
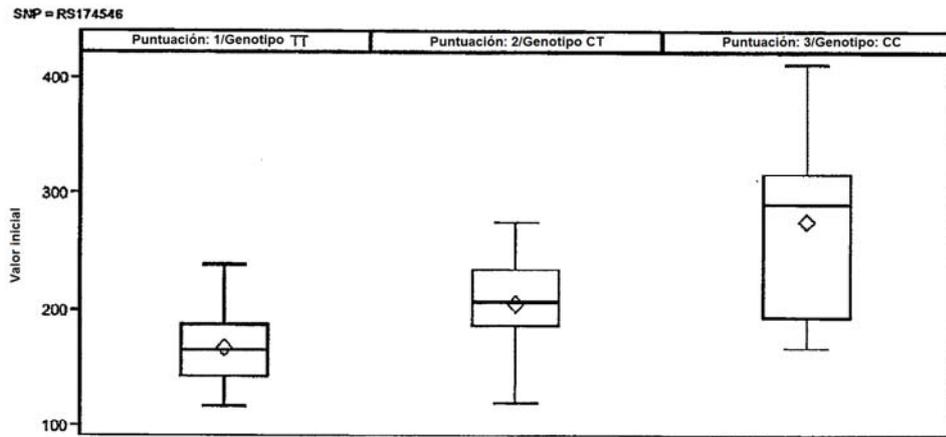


FIG. 55

A



B

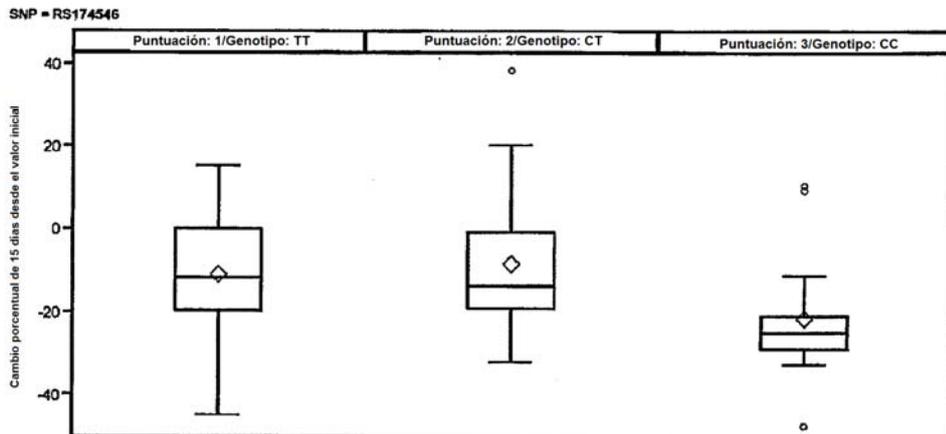


FIG. 56