

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 697 533**

51 Int. Cl.:

<b>A23D 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/122</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/202</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/232</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 3/04</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2010 PCT/NO2010/000223**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.12.2010 WO10143977**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2010 E 10727515 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.09.2018 EP 2440065**

---

54 Título: **Composición de aceite de copépodo, composiciones que comprenden la composición de aceite y su uso para reducir la acumulación de grasa visceral, mejorar la tolerancia a la glucosa y prevenir o tratar enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad**

---

30 Prioridad:

**12.06.2009 NO 20092282**

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

**24.01.2019**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

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

74 Agente/Representante:

**SÁEZ MAESO, Ana**

ES 2 697 533 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

- 5 Composición de aceite de copépodo, composiciones que comprenden la composición de aceite y su uso para reducir la acumulación de grasa visceral, mejorar la tolerancia a la glucosa y prevenir o tratar enfermedades y trastornos relacionados con la obesidad.
- Campo de la invención
- 10 La presente invención se refiere a una composición de aceite, particularmente una composición de aceite que reduce la acumulación de grasa visceral en el cuerpo y mejora la tolerancia a la glucosa y puede usarse para prevenir o tratar enfermedades relacionadas con la obesidad. Las composiciones de la presente invención comprenden preparaciones farmacéuticas, suplementos dietéticos y formulaciones de piensos y alimentos funcionales.
- Antecedentes de la invención
- 15 La prevalencia de la obesidad humana ha aumentado dramáticamente durante las últimas 2-3 décadas en todos los países industrializados y urbanizados, la obesidad es una amenaza emergente para la salud, también para las personas de los países en desarrollo que adoptan el estilo de vida y los hábitos alimentarios occidentales. No existen indicios de que la actual epidemia mundial de obesidad esté bajo control y no hay indicios de cambio para mejorar la tendencia actual.
- 20 La obesidad tiene varias consecuencias para la salud humana, como el deterioro metabólico relacionado con la edad, la resistencia a la insulina, la diabetes tipo 2, las enfermedades cardiovasculares, los accidentes cerebrovasculares, el síndrome metabólico y la muerte súbita y temprana.
- 25 La causa obvia de la obesidad es un desequilibrio neto en el tiempo en la ingesta de energía en la dieta y el gasto de energía del cuerpo. Cuando las personas consumen más energía de la que gastan, el exceso se almacenará como grasa. La consecuencia fisiológica y médica de tal desequilibrio energético empeora debido a un estilo de vida sedentaria y por comer en exceso alimentos ricos en azúcares y grasas saturadas.
- 30 La obesidad visceral es un factor de riesgo mucho mayor para la mortalidad en humanos que la obesidad general; existe una fuerte correlación entre las enfermedades relacionadas con la obesidad y la acumulación de grasa visceral. Los individuos que acumulan mucha grasa visceral y que desarrollan un patrón de distribución de grasa clínicamente conocido como obesidad central u obesidad abdominal, son, por ejemplo, particularmente propensos a desarrollar diabetes (D. Callagher y otros Adipose tissue distribution is different in type 2 diabetes. American Journal of Clinical Nutrition 2009; 89: 807-814). Se ha demostrado un vínculo causal directo entre la diabetes y la acumulación de grasa visceral mediante el estudio de los efectos de la extirpación quirúrgica de la grasa visceral. (Barzilai, N. y G. Gupta. Interaction between Aging and Syndrome X: New Insights on the Pathophysiology of Fat Distribution. Annals New York Academy of Sciences 1999; 58-72; D. M. Huffman, N. Barzilai, Role of visceral adipose tissue in aging, Biochim. Biophys. Acta 1790, 2009: 1117-1123). Dichos estudios han demostrado que el tejido adiposo visceral es metabólicamente muy activo y desempeña un papel predominante en el desarrollo de problemas de salud relacionados con la obesidad y que la expresión génica en el tejido graso subcutáneo está controlada por el tejido adiposo visceral. Para controlar y reducir los impactos en la salud de la epidemia mundial de obesidad, se debe prestar especial atención a la búsqueda de formas para contrarrestar el desarrollo de la obesidad en la parte central del cuerpo y la acumulación de grasa visceral.
- 45 No hay duda entre los profesionales de la salud de que un estilo de vida más saludable y una mejor nutrición general tendrían los mayores impactos positivos en las enfermedades relacionadas con la obesidad. Además de un estilo de vida sedentario, la cantidad de alimentos consumidos y la naturaleza de los carbohidratos y los lípidos usados en los alimentos occidentales han sido culpados a menudo de las epidemias actuales de obesidad. Pero ha sido difícil predecir cómo los componentes dietéticos individuales afectarían el patrón de acumulación de grasa en el cuerpo y las enfermedades relacionadas con la obesidad. Por ejemplo, ha sido casi imposible para los expertos en el campo predecir, basado en el mejor conocimiento disponible en bioquímica y fisiología, que el consumo de bebidas endulzadas con fructosa, pero no endulzadas con glucosa, promovería la dislipidemia y conduciría a un aumento de la adiposidad visceral y una disminución de la sensibilidad a la insulina en humanos obesos (K. L. Stanhope y otros, Consuming fructose-sweetened, not glucose-sweetened, beverages increase visceral adiposity and lipids and decrease insulin sensitivity in overweight/obese humans. J. Clin. Invest. 2009; 119 (5):1322-1334). El conocimiento actual sobre qué es lo que determina el patrón de acumulación de grasa dentro del cuerpo se ha desarrollado principalmente como resultado de la experiencia. Esto se aplica también a la evidencia acumulada de una correlación entre las enfermedades relacionadas con la obesidad y la relación de ácidos grasos n-6/n-3 en los lípidos de la dieta. Cuando esta relación es demasiado alta, como en las dietas occidentales, los impactos en la salud humana son negativos (A. P. Simopoulos. The importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. Society for Experimental Biology and Medicine 2008; 674-688; G. Ailhaud y otros, An emerging risk factor for obesity: does disequilibrium of polyunsaturated fatty acid metabolism contribute to excessive adipose tissue development? British Journal of Nutrition 2008;100:461-470), particularmente si una relación alta de los ácidos grasos n-6 en la dieta consiste en el "ácido graso esencial" ácido linoleico (C18:3n-6).
- 60 En las dietas occidentales, la relación de ácidos grasos n-6/n-3 puede ser tan alta como 15/1, mientras que esta relación probablemente fue de alrededor de 1/1 en la dieta en la que los seres humanos evolucionaron y que ha moldeado nuestra
- 65

composición genética relacionada con la nutrición. Por lo tanto, los nutricionistas recomiendan contrarrestar los impactos negativos de las dietas occidentales mediante el enriquecimiento de los alimentos con aceites vegetales o aceites marinos, ricos en ácidos grasos n-3, y así llevar la relación dietética n-6/n-3 lo más cerca a lo que los seres humanos se han adaptado genéticamente. Los aceites ricos en ácidos grasos n-3, tanto los aceites marinos como los aceites vegetales, pueden usarse para ajustar el equilibrio n-6/n-3 de los lípidos de la dieta en una dirección más saludable.

En 1993, Belzung y coautores publicaron estudios nutricionales que comparaban el patrón de acumulación de grasa en ratas Wistar alimentadas con dietas de alto contenido en grasas (20% p/p) con relaciones de ácidos grasos n-6/n-3 de 6,85/1 (1:1 mezcla de sebo de res y aceite oliva), 0,3/1 (aceite de arenque) y 0,14/1 (un concentrado de EPA (ácido eicosapentaenoico = C20:5n-3) y DHA (ácido docosahexaenoico = C22:6n-3) (F. Belzung y otros, Fish oil n-3 fatty acids selectively limit the hypertrophy of abdominal fat depots in growing rats fed high-fat diets. The American Physiological Society 1993; R1111-R1118). Demostraron que los animales crecieron con estas tres dietas altas en grasas y que sus tejidos adiposos subcutáneos y mesentéricos no se afectaron. Sin embargo, los animales alimentados con aceite de arenque o concentrado de EPA/DHA en lugar de sebo de res/aceite de oliva, acumularon menos tejido adiposo abdominal que los alimentados con la mezcla de sebo de res y aceite de oliva. Los autores plantearon la hipótesis de que las diferencias que pudieron observar estaban relacionadas con el metabolismo muy diferente de estas tres fuentes de lípidos, incluyendo las diferencias inducidas por la dieta en la composición de ácidos grasos de la membrana de los animales y diferencias en la síntesis de ácidos grasos, en la producción de prostaglandinas y en la modulación de las actividades de las enzimas hepáticas. Cabe señalar que los omega-3 constituyen como mucho 40 % (usado como concentrado) y 20 % (aceite de arenque) del total de lípidos en la dieta (> 20 % p/p) en estos estudios, correspondiente a una ingesta diaria de omega-3 en el intervalo de 0,7 a 1,4 gramos. En estudios con ratas sobre el efecto de EPA o DHA en la expresión de genes implicados en el metabolismo de los lípidos y la glucosa en tejidos adiposos blancos (T. Raclot y otros, Site-specific regulation of gene expression by n-3 polyunsaturated fatty acids in rat white adipose tissues. Journal of Lipid Research 1997;38:1963-1971), la ingesta diaria de estos ácidos grasos fue de 0,9 gramos. En conclusión, las ratas Wistar que consumen cantidades muy altas de aceite de pescado o de omega-3 concentrado, acumulan menos grasa visceral que las ratas que se alimentan de una dieta de sebo de res/aceite de oliva.

A pesar de nuestro conocimiento sobre la importancia del estilo de vida y la nutrición en la salud humana, los obstáculos psicosociológicos son altos cuando se trata de la voluntad de cambiar los malos hábitos. Es particularmente difícil cambiar las prioridades alimentarias establecidas en una sociedad, incluso entre las personas que entienden y aceptan que su estilo de vida y sus hábitos alimentarios no son saludables. En esta situación, puede ser deseable contar con varias estrategias complementarias a las de insistir en que las personas deben cambiar su estilo de vida completo, lo que se puede implementar para contrarrestar las epidemias de obesidad actuales, particularmente la obesidad visceral que resulta en diabetes y otros problemas de salud. Existen fármacos contra la diabetes, pero no existen fármacos que actúen principalmente mediante la inhibición de la acumulación de tejido adiposo visceral, que se sabe que está involucrado en el desarrollo de la diabetes 2 y otras enfermedades. Los fármacos antiadiabéticos en el grupo llamado tiazolidinadionas funcionan, por ejemplo, mediante el aumento de la sensibilidad del cuerpo a la insulina y se usan en combinación con la dieta y el ejercicio para tratar la diabetes tipo 2 Sin embargo, estos fármacos conducen a un aumento de la adiposidad de todo el cuerpo, una paradoja a la luz de la comprensión general de que la adiposidad visceral es un factor condicionante en el desarrollo de la diabetes 2. Los fármacos del grupo de las estatinas se han considerado para la prevención de la obesidad y la diabetes, porque los fármacos en este grupo inhiben el aumento de peso y la acumulación de grasa. Sin embargo, no inhiben la adiposidad visceral de manera selectiva y su modo de acción contra la obesidad está aparentemente relacionado con su capacidad para mejorar el consumo de oxígeno respiratorio y la degradación metabólica de la grasa.

La composición de aceite de la presente invención es, por lo tanto, muy necesaria, particularmente porque carece de efectos secundarios tóxicos, ya que disminuye la acumulación de grasa visceral incluso cuando se usa como un suplemento menor en las dietas existentes de tipo occidental con alto contenido de grasa.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra la grasa perirrenal total en función del peso corporal en ratas alimentadas con una dieta de referencia de bajo contenido de grasas (Control), dieta con alto contenido de grasas que induce obesidad (HF) y dieta de alto contenido de grasas que induce obesidad que contiene 1,5 % en peso de la composición de aceite de la presente invención, CO (aceite de copépodo) (HF + 1,5 % CO) (n=10).

La Figura 2 muestra la capacidad de oxidación de la glucosa (como  $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{g}$  en peso seco) del tejido muscular del corazón de ratas alimentadas con una dieta de referencia baja en grasas (Control), dieta de alto contenido de grasas que induce obesidad (HF) y dieta de alto contenido de grasas que induce obesidad que contiene 1,5 % en peso de la composición de aceite de la presente invención (HF +1,5 % CO). Los valores son la media  $\pm$  95 % C.I. (n = 8, 6 y 6 para Control, HF y HF + 1,5 % CO, respectivamente).

La Figura 3 (A) muestra los niveles de glucosa en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratones que recibieron la dieta de control (Control), dieta de alto contenido de grasas (HF) y dieta de alto contenido de grasas que contiene 1,5 % en peso de la composición de aceite de la presente invención (HF + 1,5 % CO), respectivamente.

La Figura 3 (B) muestra el área bajo la curva de los niveles de glucosa en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratones de los mismos grupos que se muestran en la Figura 3 (A). Los datos se expresan como la media  $\pm$  S.E. \* $P < 0,05$  para HF vs. Control; # $P < 0,05$  para HF + 1,5 % CO vs. HF.

## 5 Descripción detallada de la invención

La presente invención se define en las reivindicaciones anexas. El siguiente término tendrá el significado que se indica a continuación, a menos que se indique lo contrario:

10 Ésteres de cera: Los ésteres de cera son ésteres de ácidos de cadena larga o de cadena muy larga (ácidos grasos) y alcoholes de cadena larga o de cadena muy larga (alcoholes grasos). Cadena larga en este contexto significa de 14 a 22 carbonos, mientras que la cadena muy larga se refiere a 24 o más átomos de carbono. Los ésteres de cera son componentes importantes en las ceras. Generalmente, el término "cera" se refiere a una amplia clase de lípidos caracterizados por ser sólidos a temperatura ambiente, por ejemplo, cuando tienen una apariencia de material de nido de abeja o cera de abejas. Sin embargo, las ceras pueden ser tanto sólidas como líquidas. Se producen por animales (cera de abejas, cera de lana (lanolina), cera de esperma de ballena y aceite de pez reloj anaranjado) y plantas (candelilla, carnauba, salvado de arroz, caña de azúcar (policosanol) y jojoba). Todas las superficies de las hojas y muchas verduras y frutas están cubiertas por una capa de cera microcristalina. Las ceras se usan en las industrias alimentaria, farmacéutica y cosmética para la protección de superficies.

20 Los ésteres de cera de la presente invención son monoésteres de alcoholes grasos insaturados de cadena larga y ácidos grasos insaturados de cadena larga, en particular los ácidos grasos omega-3, y la composición de aceite de la presente invención es completamente soluble y fluye libremente a temperatura ambiente.

25 Se ha demostrado que la composición de aceite de la presente invención, usada como un suplemento menor en una dieta de tipo occidental con alto contenido de grasa y que induce la obesidad, inhibe específicamente la acumulación de grasa visceral inducida por dicha dieta. Además, se ha demostrado que la composición de aceite de la presente invención puede contrarrestar el deterioro de la función cardíaca inducida por dicha dieta. En otras palabras, la composición del aceite de la presente invención puede usarse para contrarrestar los efectos más dañinos de la obesidad que inducen las dietas occidentales.

30 La composición del aceite de la presente invención se ha obtenido del copépodo marino *Calanus finmarchicus*. La composición química de este aceite difiere notablemente de la de otros aceites y se investigó si también diferiría con respecto a las posibles respuestas biomédicas que podría provocar. Sin embargo, no existe nada en la técnica anterior que lleve a una persona experta a considerar que es probable que la inclusión de tan poco como 1,5 % (p/p) de la presente composición de aceite en una dieta de tipo occidental de alto contenido de grasas (24 % p/p) que induce obesidad daría como resultado una reducción altamente significativa estadísticamente de la acumulación de grasa visceral en ratas, sin afectar el crecimiento o la deposición de grasa en otros tejidos adiposos. Además, e igualmente inesperado, la presente composición de aceite redujo la acumulación de grasa visceral en ratas alimentadas con esta dieta de alto contenido de grasas al mismo nivel que en ratas alimentadas con la dieta de bajo contenido de grasas (4 % p/p) usada como la dieta de referencia, que no inducen obesidad. También es evidente que la presente composición de aceite puede contrarrestar el deterioro de la función cardíaca saludable que se observa típicamente en la diabetes tipo 2 inducida por la obesidad, como lo demuestra el alto metabolismo cardíaco de la glucosa, incluso después de un largo tiempo de alimentación con una dieta rica en grasas que induce obesidad.

45 La relación n-6/n-3 de ácidos grasos en los lípidos de la dieta afecta el patrón de acumulación de grasa en el cuerpo. Las dietas en las que esta relación es alta (por ejemplo  $> 5/1$ ), como en las dietas occidentales ricas en grasa, tienen una tendencia más fuerte para inducir la obesidad central y la acumulación de grasa visceral que las dietas con una relación menor de n-6/n-3. A modo de comparación, dado que la composición de aceite de la presente invención constituía solo una fracción menor de una dieta de tipo occidental con alto contenido de grasas que induce obesidad, la relación de ácidos grasos n-6/n-3 todavía era tan alta como 5/1 en nuestra dieta experimental.

50 La composición de aceite de la presente invención contiene ácidos grasos n-3 (ácido eicosapentaenoico = C20:5n-3) y DHA (ácido docosahexaenoico = C22:6n-3), como otros aceites marinos. Sin embargo, el nivel de EPA y DHA es algo más bajo que en el aceite de pescado y el aceite de krill (Tabla 1), mientras que es rico en ácido estearidónico (SDA = C18: 4n-3). Sin embargo, podría argumentarse que la inhibición observada de la obesidad visceral inducida por la dieta podría deberse a la presencia de EPA y DHA. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que los ésteres de cera, incluidos los ésteres de cera marinos, se digieren muy lentamente en comparación con los triglicéridos y los fosfolípidos y que el EPA y el DHA en el éster de cera no están disponibles para la absorción como ácido libre. De hecho, es un entendimiento común entre los expertos en el campo que los ésteres de cera no son digeribles y que un aceite marino rico en éster de cera como el de *Calanus finmarchicus* es, por lo tanto, una fuente pobre de EPA y DHA. Además, en los experimentos de Belzung y otros (1993) descritos anteriormente, la cantidad de omega-3 consumida por los animales estaba en el intervalo de 0,7 a 1,4 gramos diarios. A modo de comparación, la composición de aceite de la presente invención contribuyó solamente con 0,06 gramos de omega-3 diarios a las ratas que se alimentaban con la dieta de alto contenido de grasas que induce la obesidad. Por consiguiente, se puede concluir que la inhibición de la acumulación de grasa visceral mostrada en la presente invención tampoco puede atribuirse al omega-3 como en los experimentos de Belzung y otros, ni puede deberse a un cambio en la relación de ácidos grasos n-6/n-3 en una dirección más saludable.

La composición de aceite de acuerdo con la presente invención puede derivarse de copépodos marinos, preferentemente un copépodo del género *Calanus*, tal como *Calanus finmarchicus*. La materia prima recién cosechada, congelada/descongelada o deshidratada puede usarse como materia prima para obtener las composiciones de aceite, usando cualquier método conocido por los expertos en la técnica, tal como, pero sin limitarse a la tecnología de producción de aceite de pescado convencional, métodos biotecnológicos, solventes orgánicos o extracción de fluidos supercríticos y prensado en frío. Independientemente del procedimiento para obtener el aceite y el rendimiento del aceite, la composición bruta típica será la que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Composición química típica de tres aceites marinos diferentes: (A) Aceite de copépodo de *Calanus finmarchicus* pescado en aguas de Noruega, (B) aceite de hígado de bacalao de bacalao del Atlántico *Gadus morhua*, y (C) aceite de krill de *Euphausia superba* pescado en el Océano del sur, dado en mg/g de aceite.

Clases de lípidos y ácidos grasos seleccionados	A <sup>1</sup>	B <sup>2,4</sup>	C <sup>3,5</sup>
Triglicéridos	10	955	260
Ácidos grasos libres	90	14	13
Ácidos grasos saturados	160	160	300
Ácidos grasos monoinsaturados	120	385	300
Ácidos grasos poliinsaturados	250	475	387
ácidos grasos n-3	240	395	332
ácidos grasos n-6	10	50	55
18:4 ácidos grasos n-3 (SDA)	86	21	51
20:5 ácidos grasos n-3 (EPA)	67	72	128
22:6 ácidos grasos n-3 (DHA)	49	188	101
Ésteres grasos	670	0	0
Lípidos polares	<50	18	670
Lípidos neutros	> 750	967	310

<sup>1</sup> Aceite de copépodo producido por Calanus AS ([www.calanus.no](http://www.calanus.no)).  
<sup>2</sup> de Falch, y otros, Process Biochemistry 2006;41: 666-674  
<sup>3</sup> de Phleger, y otros Comparative Biochemistry and Physiology Part B 2002;131:733-747  
<sup>4</sup> de Standal y otros, J. Am Oil Chem Soc 2008; 85:105-112  
<sup>5</sup> de Hagen y otros, Marine Biology 2001;139:95-104

Además de la notable diferencia en la composición química bruta, los tres aceites marinos que se usan aquí con propósitos ilustrativos también son diferentes en su contenido de ácidos grasos n-3 (Tabla 1).

Para ilustrar la singularidad de la composición de aceite de acuerdo con la presente invención, se muestran las composiciones correspondientes de aceite de hígado de bacalao convencional y aceite de krill para comparación. A partir de un análisis químico generalizado resulta evidente que estos aceites son muy diferentes, en particular con respecto a su contenido de ésteres de cera, triglicéridos, fosfolípidos y astaxantina (no se muestra). Cabe señalar que los ésteres de cera constituyen el componente lipídico principal en el aceite de copépodo de la presente invención, a diferencia del aceite de hígado de bacalao y el aceite de krill.

La diferencia más notable en la composición de ácidos grasos entre los tres aceites es el contenido superior de ácido estearidónico (SDA), pero menor de ácido docosahexaenoico (DHA) en el aceite de copépodo.

En la composición de aceite de la presente invención, SDA, EPA y DHA existen en gran medida como ésteres con alcoholes grasos de cadena larga insaturados. En conclusión, el aceite de copépodo de la presente invención difiere notablemente del aceite de pescado típico y del aceite de krill tanto en su composición química como en el contenido de ácidos grasos. Sin embargo, es similar a otros aceites marinos en su nivel general de ácidos grasos n-3.

En la Tabla 2 se muestra una composición típica de combinaciones de ésteres de cera y alcoholes grasos/ácidos grasos en una composición de aceite de la presente invención.

Tabla 2. Composición típica de ésteres de cera y combinaciones de alcohol graso/ácido graso (% (p/p)) en aceite de copépodo derivado de *Calanus finmarchicus*.<sup>1</sup>

ES 2 697 533 T3

	Éster de cera	Mayor alcohol graso/ácido graso	Menor alcohol graso/ácido graso	% p/p
5	30:1	14:0/16:1	16:1/14:0	0,8
	32:1	16:0/16:1	14:0/18:1	1,9
	32:2	16:1/16:1	14:0/18:2	0,6
10	32:4	14:0/18:4	16:0/16:4	0,9
	34:1	16:0/18:1	14:0/20:1	-
		20:1/14:0		17,6
15	34:2	16:0/18:2	16:1/18:1	0,9
	34:3	16:0/18:3	16:1/18:2	-
	34:4	16:0/18:4	16:1/18:3	2,7
	34:5	14:0/20:5	16:1/18:4	0,4
20	36:1	20:1/16:0	16:0/20:1	-
		22:1/14:0		21,9
	36:2	20:1/16:1	16:1/20:1	2,3
25	36:5	16:0/20:5	20:1/16:4	1,1
	36:6	16:1/20:5	14:0/22:6	0,3
	38:1	22:1/16:0	16:0/22:1	2,8
30	38:2	22:1/16:1	20:1/18:1	3,9
	38:3	20:1/18:2	22:1/16:2	0,4
	38:4	20:1/18:3	22:1/16:3	0,9
35	38:5	20:1/18:4	22:1/16:4	5,4
	38:6	16:0/22:6	16:1/22:5	-
	40:2	20:1/20:1	22:1/18:1	5,9
40	40:3	22:1/18:2		0,7
	40:5	22:1/18:4	20:1/20:4	4,7
	40:6	20:1/20:5		1,5
45	42:2	22:1/20:1	20:1/22:1	12,7
	42,6	22:1/20:5	20:1/22:5	1,5
	42:7	20:1/22:6		2,0
50	44:2	22:1/22:1		4,9
	44:7	22:1/22:6		0,6
55	<sup>1</sup> Compilado por Graeve, M, y Kattner, G, Species-specific differences in intact wax esters of Calanus hyperboreus and C. finmarchicus from Fram Strait - Greenland Sea, Marine Chemistry 1992; 39:269-281,			

Los ésteres de cera marina en la composición de aceite de la presente invención se caracterizan por ser mono o poliinsaturados, con alcoholes grasos monoinsaturados de cadena larga (dominados por los alcoholes grasos C16:1, C20:1 y C22:1) y una relación alta de ácidos grasos mono y poliinsaturados (predominantemente C16 a C22) incluidos los ácidos grasos n-3 SDA (C18:4), EPA (C20:5) y DHA (C22:6). La composición de aceite de la presente invención es, por lo tanto, un líquido de baja viscosidad y con flujo completamente libre a temperatura ambiente.

Dependiendo de los métodos analíticos usados, el contenido típico del éster de cera de la composición de aceite de la presente invención es 60-90 %, mientras que contiene 10-20 % de otros componentes como ácidos grasos libres, triacilgliceroles, fosfolípidos y sus residuos, esteroides y pigmentos. En ciertas aplicaciones, puede ser ventajoso o incluso deseable eliminar los ácidos grasos libres y otros componentes mediante métodos adecuados conocidos por los expertos

en la técnica. Así, en una modalidad de la presente invención, la composición de aceite puede contener hasta 100 % de éster de cera.

5 Se ha demostrado que la composición de aceite de la presente invención puede inhibir la acumulación de grasa visceral y contrarrestar el deterioro de la función cardíaca saludable inducida por una dieta de tipo occidental con alto contenido de grasas, como se muestra en las Figuras 1 - 3. Por lo tanto, la composición de acuerdo con la presente invención puede ser útil en la prevención y el tratamiento de enfermedades inducidas por la obesidad, tales como, pero sin limitarse a diabetes tipo 2 y enfermedad cardiovascular.

10 La composición del aceite de acuerdo con la presente invención comprende de 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, en peso hasta 75 %, 80 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 100 % en peso de ésteres de cera. Preferentemente la composición del aceite comprende de 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 % en peso hasta 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, 99,5 %, 100 % en peso de ésteres de cera.

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

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

25 En la presente invención, se proporciona una composición de aceite, que comprende 20-100 % en peso de ésteres de cera, preferentemente 40-85 % en peso de ésteres de cera, en donde dichos ésteres de cera consisten en monoésteres de ácidos grasos mono o poliinsaturados C16 a C22 de acuerdo con la reivindicación 1 y alcoholes grasos monoinsaturados C16, C20 y C22 para usar como un medicamento para la prevención o el tratamiento de la obesidad abdominal y la diabetes tipo 2.

30 En una modalidad de la composición de aceite de acuerdo con la invención, el 70 % o más de los alcoholes grasos monoinsaturados de los ésteres de cera son C16:1, C20:1 y C22:1.

35 Los ácidos grasos en los ésteres de cera de la composición de aceite provistos comprenden 5-20 % en peso de ácido estearidónico (SDA), 3-20 % en peso de ácido eicosapentaenoico (EPA) y 2-15 % en peso de ácido docosahexaenoico (DHA).

En otra modalidad de la invención, la composición de aceite comprende alcoholes grasos y SDA, DHA y EPA como monoésteres.

40 En otra modalidad de la presente invención, se proporciona una composición que contiene además 500-4000 ppm de astaxantina.

45 En una modalidad de la presente descripción, se proporciona una composición de aceite en donde la composición de aceite se aísla de un copépodo, y en una modalidad adicional, el copépodo es del género *Calanus*. En otra modalidad, el copépodo es de la especie *Calanus finmarchicus*.

La formulación de suplemento dietético y la formulación de piensos y alimentos funcionales que comprende una composición de aceite como se define de acuerdo con la presente invención también se proporcionan como modalidades adicionales de la presente invención.

50 En una modalidad de la descripción, se proporciona una formulación farmacéutica que comprende una composición de aceite como se define de acuerdo con la presente invención. La formulación farmacéutica puede proporcionarse en cápsulas, tabletas, emulsiones o tónicos. Además, la formulación comprende uno o más aditivos farmacéuticamente aceptables seleccionados del grupo que consiste en adyuvantes, estabilizantes, antioxidantes, emulsionantes, tensioactivos y portadores.

55 En una modalidad de la presente descripción, se proporciona el uso de una composición de aceite como se definió anteriormente para la fabricación de medicamentos para la prevención o el tratamiento de la obesidad abdominal. Además, se proporciona el uso de la composición de aceite para la fabricación de medicamentos para la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con la obesidad, dicha enfermedad relacionada con la obesidad es diabetes tipo 2 o enfermedad cardiovascular.

60 En otra modalidad adicional de la presente descripción, se proporciona un método para la prevención o el tratamiento de la obesidad abdominal en donde se administra una cantidad diaria de 0,5-5 g de una composición de aceite como se definió anteriormente a un sujeto humano que necesita tal tratamiento. Además, se proporciona el método para la prevención o el tratamiento de una enfermedad relacionada con la obesidad; dicha enfermedad relacionada con la obesidad es diabetes tipo 2 o enfermedad cardiovascular.

Además de su utilidad para los mamíferos, particularmente los humanos, es además una modalidad de la presente invención que ésta pueda usarse para prevenir un problema importante en los peces de acuicultura, incluido, pero sin limitarse a, el salmón y la trucha. Entre los piscicultores y otras personas familiarizadas con la piscicultura se conoce que los peces como el salmón y la trucha acumulan grandes cantidades de grasa intestinal cuando se alimentan con gránulos de pienso seco, mientras que este "problema de calidad" del salmón de piscifactoría no es evidente en el salmón salvaje que se alimenta de los organismos alimentarios disponibles naturalmente en el océano. La acumulación de grasa visceral puede ser tan alta que a veces el intestino es meramente discernible en los peces de granja destripados. La razón de esta diferencia de calidad entre los peces silvestres y los de piscifactoría, como el salmón y la trucha, no se conoce en absoluto por los fabricantes internacionales de piensos ni por otras personas que trabajan en el sector de la acuicultura. Sin embargo, generalmente se acepta que tiene que ver con algún tipo de desequilibrio en la dieta artificial, o la falta de uno o más componentes que los peces silvestres obtienen de sus alimentos naturales en el océano. Otra modalidad de la presente invención es el enriquecimiento de los alimentos para peces con esta fuente de alimento, ya sea como una preparación completa de copépodos o como la composición de aceite de la presente invención, para prevenir la acumulación de grasa visceral también en peces de piscifactoría.

La siguiente parte experimental y ejemplos ilustran y documentan la presente invención.

## EJEMPLOS

### Parte experimental

Los experimentos con animales se llevaron a cabo en la Facultad de Medicina de la Universidad de Tromsø, Noruega. Ratas Wistar de seis semanas de edad, con un peso promedio de 162 gramos, se enjaularon individualmente y se alojaron en una habitación mantenida a 21 °C, 55 % de humedad y ciclo luz-oscuridad 12:12 h (luces de 7 AM a 7 PM). Los animales tenían libre acceso al agua y a los alimentos. Todos los procedimientos fueron aprobados por el Consejo Noruego de Animales Experimentales y se ajustaron a la Convención Europea para la protección de animales vertebrados usados con fines experimentales y otros fines científicos (EST NR. 123, 1986). Las ratas se alimentaron durante 110 días con tres dietas diferentes, que fueron producidas por TestDiet ([www.testdiet.com](http://www.testdiet.com)): 1) una dieta control que contenía 4 % de grasa (2,37 % de aceite de soja y 1,89 % de manteca de cerdo, p/p), correspondiente al 10 % del contenido energético total de la dieta (Control, 3,75 kcal/g); 2) una dieta alta en grasa que induce la obesidad que contenía 24 % de grasa (2,89 % de aceite de soja y 20,68 % de manteca de cerdo, p/p) correspondiente al 45 % el contenido energético total de la dieta (HF, 4,65 kcal/g); 3) una dieta alta en grasas experimental que contenía 24 % de grasa (2,91 % de aceite de soja, 19,15 % de manteca de cerdo y 1,5 % de la formulación de aceite de la presente invención), correspondiente al 45 % de la energía total de la dieta (HF + 1,5% CO, 4,47 kcal/g pienso). Las dietas se prepararon sin antioxidantes ni conservantes y se almacenaron congeladas antes de la alimentación.

En el día del sacrificio, después de la administración de heparina y anestesia, se registró el peso corporal total. El peso del hígado y del corazón se registró después de retirarlos del cuerpo y se diseccionó y pesó la grasa visceral (perirrenal). Los datos se muestran en la Tabla 3 y la Figura 1. El metabolismo cardíaco se midió como la oxidación de la glucosa en corazones perfundidos aislados de acuerdo con la metodología estándar (E. Aasum, A. M. Khalid, O. A. Gudbrandsen, O.-J. How, R. K. Berge, T. Larsen. Fenofibrate modulates cardiac and hepatic metabolism and increases ischemic tolerance in diet-induced obese mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 2008;44:201-209). Los resultados se muestran en la Figura 2.

En otra serie de experimentos, los ratones se alimentaron durante 50 días con las mismas dietas descritas para las ratas. Para la prueba de tolerancia a la glucosa, los ratones se mantuvieron en ayunas durante 5 horas y se les administró una inyección intraperitoneal de glucosa (1,3 g/kg). Se tomaron muestras de sangre de la vena safena antes de la inyección y a los 15, 30, 60 y 120 minutos después de la inyección. Los niveles de glucosa en sangre se determinaron usando un glucómetro (Bayer Ascensia Contour Glucose Meter). Los resultados se muestran en la Figura 3.

### Efectos biológicos

Tabla 3: Datos biométricos para ratas alimentadas con la dieta de referencia de bajo contenido de grasas (Control), la dieta de alto contenido de grasas que induce la obesidad (HF) y la dieta rica en grasas experimental que contiene 1,5 % en peso de la formulación de aceite de la presente invención (HF + 1,5 % CO). Valores dados para el peso corporal al inicio de los ensayos de alimentación (peso corporal inicial), peso corporal al final de los ensayos de alimentación (peso corporal en el sacrificio), peso del hígado al final de los ensayos de alimentación (peso del hígado), peso del corazón al final de las pruebas de alimentación (peso del corazón), y la relación entre el peso del corazón y el peso corporal, y la longitud de la tibia (espinilla) en mm, respectivamente, al final de las pruebas de alimentación. Los valores son la media  $\pm$  95 % C.I. (n= 10).

	Peso corporal al inicio (g)	Peso corporal en el sacrificio (g)	Peso del hígado (g)	Peso del corazón (g húmedo)	Peso del corazón (g seco)	Peso húmedo del corazón/peso corporal*	Peso seco del corazón/longitud de la tibia*	
5	Control	162±5	457±12	13,51±0,75	1,20±0,03	0,228±7	2,63±0,05	7,15±0,24
10	HF	162±3	483±16	12,27±0,44	1,21±0,03	0,232±7	2,54±0,10	7,31±0,19
15	HF + 1,5 % CO	162±4	484±9	11,85±0,37	1,29±0,08	0,249±14	2,69±0,20	7,67±0,44

\* wwt = peso húmedo en gramos, dwt = peso seco en gramos. Los valores se han multiplicado por 1000.

Como se muestra en la Tabla 3, el peso corporal total promedio (y, por lo tanto, el aumento de peso) después de 110 días fue el mismo que el de las ratas alimentadas con las dos dietas de alto contenido de grasas (alta energía), mientras que las ratas alimentadas con la dieta de referencia de menor energía tuvieron un menor aumento de peso, como se esperaba.

Otros datos biométricos muestran que no hay diferencias notables entre los grupos. Las ratas en los dos grupos dietéticos con alto contenido de grasas tuvieron la misma ingesta diaria de alimento y su ingesta de agua también fue la misma (datos no mostrados). El grupo de referencia consumió algo más de alimento que las ratas en los dos grupos con alto contenido de grasa, pero su consumo diario de energía fue menor, lo que explica su menor aumento de peso. En conclusión, el experimento mostró que la composición de aceite de la presente invención no afecta el rendimiento de las ratas alimentadas con una dieta alta en grasas y no hubo signos de efectos adversos en los animales.

Cuando los animales se sacrificaron después de 110 días de alimentación y se abrieron los vientres, se pudo observar una diferencia notable entre los dos grupos de altos contenidos de grasa a simple vista: Las ratas de la dieta experimental de alto contenido de grasa complementada con la composición de aceite de la presente invención, tenían una grasa visceral visiblemente menor que el grupo de alto contenido de grasa correspondiente, asemejándose más a la acumulación de grasa visceral en ratas que habían sido alimentadas con la dieta de referencia baja en grasa, cuando se comparan ratas de aproximadamente el mismo tamaño. El análisis estadístico de los pesos de la grasa visceral en los tres grupos confirmó esta observación visual directa. Como la cantidad de grasa visceral aumenta con el tamaño corporal, independientemente del régimen de alimentación, los datos primarios sobre la grasa perirrenal en los tres grupos dietéticos se graficaron como una función del peso corporal en el sacrificio, como se muestra en la Figura 1.

El tratamiento estadístico de estos datos de peso reveló lo siguiente: Hubo una clara correlación lineal entre el peso de la grasa visceral y el peso corporal en los tres grupos, con un nivel de significación estadística de  $p = 0,034$  para el grupo de referencia (Control),  $p = 0,003$  para el grupo de alto contenido de grasa (HF) y  $p = 0,018$  para el grupo experimental que contiene la composición de aceite de la presente invención (HF + 1,5 % CO). En función del hecho de que existe una correlación estadísticamente significativa entre el peso de la grasa visceral y el peso corporal, la diferencia estadística entre los grupos podría calcularse mediante el análisis de ANCOVA, con el uso del peso como covariable. El análisis mostró que la diferencia entre el grupo que contenía el aceite experimental y la dieta de alto contenido de grasa correspondiente fue estadísticamente significativa ( $p = 0,00241$ ), mientras que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el grupo de aceite experimental y el grupo con bajo contenido de grasa. El grupo de aceite experimental y el grupo de referencia de bajo contenido de grasa, tomados en conjunto, fueron significativamente diferentes al grupo de alto contenido de grasa ( $p = 0,0084$ ). En conclusión por lo tanto, el aceite de la presente invención, administrado como un suplemento menor en la dieta de alto contenido de grasa que induce obesidad, inhibe la acumulación de grasa visceral.

La Figura 2 muestra la capacidad de oxidación de la glucosa del tejido muscular del corazón de ratas que habían estado alimentándose con las tres dietas. Las ratas de la dieta de alto contenido en grasas (HF) tenían una capacidad reducida de oxidación de la glucosa en comparación con las ratas de la dieta de control de bajo contenido en grasa (Control), mientras que en las ratas alimentadas con la dieta de alto contenido de grasa que contenía 1,5 % de la presente composición de aceite (HF + 1,5 % CO), la capacidad de oxidación de la glucosa fue comparable a la de las ratas de control con bajo contenido de grasa. Es evidente, por lo tanto, que la presente composición de aceite puede contrarrestar el deterioro de la función cardíaca saludable, incluso después de un largo tiempo de alimentación con una dieta rica en grasas que induce obesidad.

La Figura 3 (A) muestra los niveles de glucosa en sangre durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en ratones a los que se les administró la dieta de control (Control), la dieta de alto contenido de grasa (HF) y la dieta de alto contenido de grasa con la composición de aceite (HF + 1,5 % CO), respectivamente. La Figura 3 (B) muestra el área bajo las curvas de tolerancia a la glucosa mostrada en el panel A. Los datos se expresan como la media  $\pm$  SE. \* $P < 0,05$  para HF vs Control; # $P < 0,05$  para HF + 1,5 % CO vs HF.

5 Los niveles de glucosa en sangre aumentaron significativamente durante la prueba de tolerancia a la glucosa intraperitoneal en los ratones HF en comparación con los ratones Control. Estos resultados muestran que la alimentación con una dieta de alto contenido de grasa durante 50 días indujo una resistencia a la insulina característica de la diabetes tipo 2. Es importante destacar que la inclusión del 1,5 % de la composición de aceite de la presente invención en la dieta de alto contenido de grasa contrarrestó el desarrollo de resistencia a la insulina.

10 Los ratones de la dieta de alto contenido de grasa (HF) tuvieron tasas de oxidación de la glucosa miocárdica reducidas en comparación con los ratones en la dieta control (Control) ( $p < 0,05$ ). Sin embargo, la oxidación de la glucosa se restauró parcialmente en ratones que habían sido alimentados con una dieta de alto contenido de grasa que contenía 1,5 % de la presente composición de aceite (F + 1,5 % CO) ( $p < 0,05$ ). Es evidente, por lo tanto, que la composición de aceite de la presente invención puede contrarrestar la reducción en la capacidad de oxidación de la glucosa del miocardio que se produce después de la alimentación con una dieta alta en grasas.

Reivindicaciones

- 5 1. Composición de aceite que comprende 20-100 % en peso de ésteres de cera, preferentemente 40-85 % en peso de ésteres de cera, en donde dichos ésteres de cera consisten en monoésteres de ácidos grasos mono- o poliinsaturados C16 a C22, dichos ácidos grasos comprenden 5-20 % en peso de ácido estearidónico (SDA), 3-20 % en peso de ácido eicosapentaenoico (EPA) y 2-15 % en peso de ácido docosahexaenoico (DHA), y alcoholes grasos C16 a C22 monoinsaturados para usar como un medicamento para la prevención o tratamiento de la obesidad abdominal y diabetes tipo 2.
- 10 2. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde 70 % o más de los alcoholes grasos monoinsaturados de los ésteres de cera son C16:1, C20:1 y C22:1.
- 15 3. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 en donde 70 % o más de los alcoholes grasos de los ésteres de cera son monoinsaturados y en donde 50 % o más de los ácidos grasos del éster de cera son ácidos grasos n-3 mono o poliinsaturados.
- 20 4. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 en donde la composición comprende alcoholes grasos y SDA, DHA y EPA como monoésteres.
- 25 5. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la composición contiene 500-4000 ppm de astaxantina.
- 30 6. La composición para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 en donde dicha composición se aísla de un copépodo.
- 35 7. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 6 en donde dicho copépodo es del género Calanus.
- 40 8. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 7 en donde dicho copépodo es de la especie Calanus finmarchicus.
- 45 9. Uso de una composición de acuerdo con las reivindicaciones 1-8 para la fabricación de medicamentos para la prevención o tratamiento de la obesidad abdominal y la diabetes tipo 2.

Figura 1

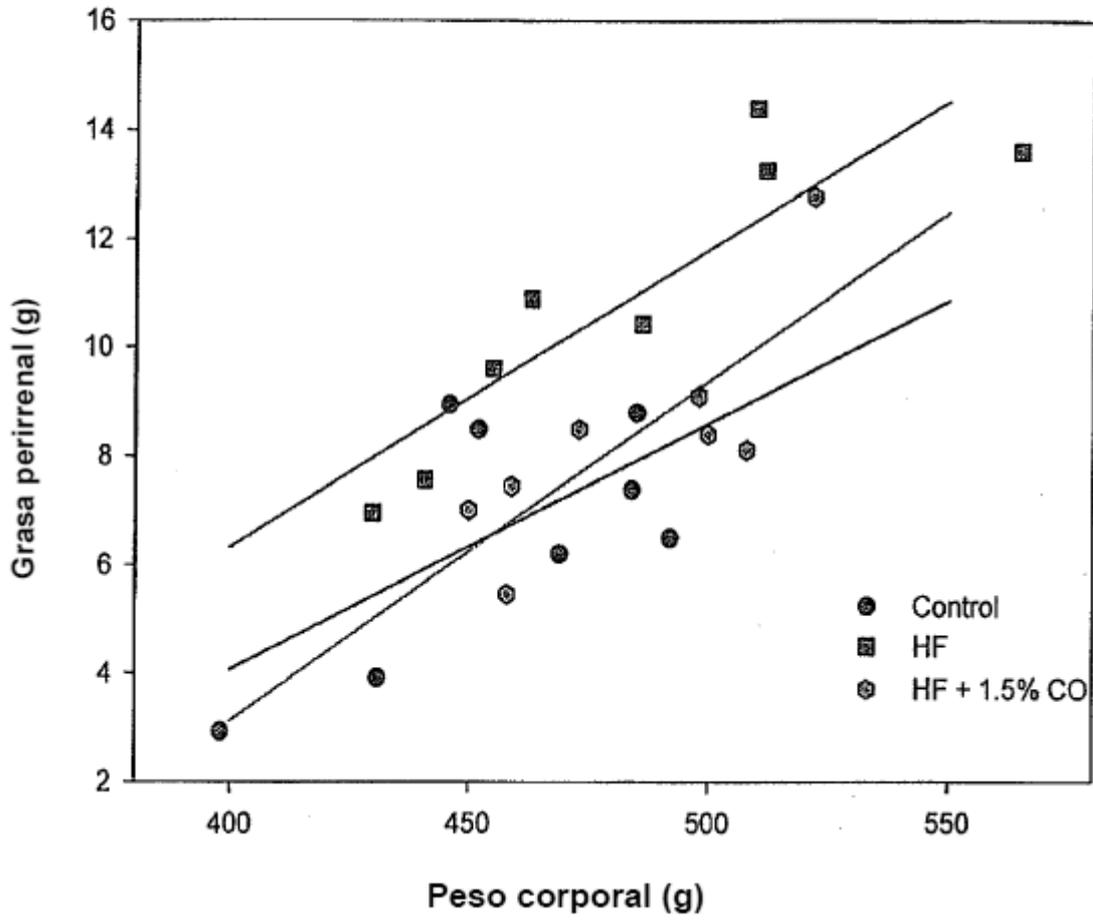


Figura 2

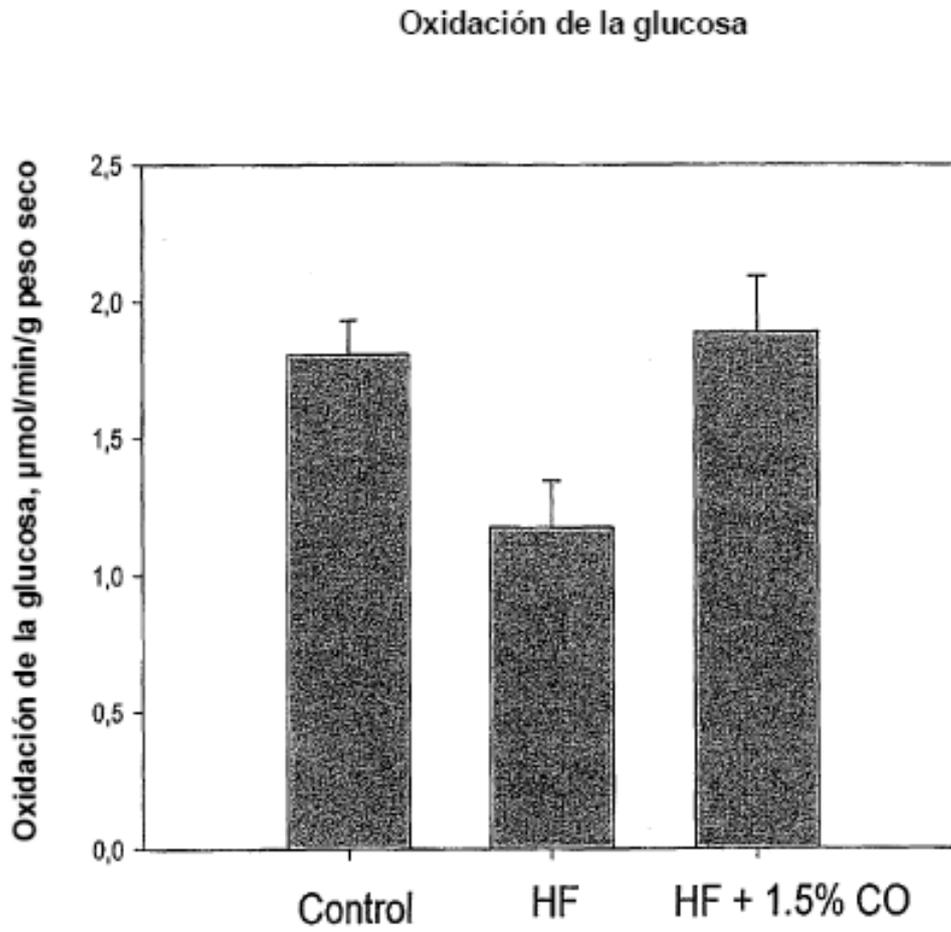


Figura 3

