

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 307**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 31/202</b>	(2006.01)	<b>A23L 33/12</b>	(2006.01)
<b>A61K 31/375</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/593</b>	(2006.01)		
<b>A61K 31/05</b>	(2006.01)		
<b>A61K 35/60</b>	(2006.01)		
<b>A61K 36/73</b>	(2006.01)		
<b>A61K 9/107</b>	(2006.01)		
<b>A23L 2/02</b>	(2006.01)		
<b>A23L 33/105</b>	(2006.01)		
<b>A23L 33/115</b>	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.06.2014 PCT/NO2014/050099**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **18.12.2014 WO14200356**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.06.2014 E 14811285 (7)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2019 EP 3016666**

54 Título: **Una formulación de aceite marino que comprende resveratrol o derivados del mismo para su uso en el tratamiento, retraso y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer**

30 Prioridad:  
**13.06.2013 US 201361834455 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**21.11.2019**

73 Titular/es:  
**SMARTFISH AS (100.0%)  
Gaustadallèen 21  
0349 Oslo, NO**

72 Inventor/es:  
**MATHISEN, JANNE SANDE y  
MATHISEN, HENRIK**

74 Agente/Representante:  
**ARIAS SANZ, Juan**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 732 307 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

Una formulación de aceite marino que comprende resveratrol o derivados del mismo para su uso en el tratamiento, retraso y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer

5

### Campo de la invención

La presente invención se refiere a una formulación que comprende aceite marino fresco en una emulsión de aceite en agua y resveratrol o derivados del mismo para su uso en el tratamiento, retraso y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer. La invención se refiere además a retrasar y/o prevenir la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo el deterioro cognitivo leve (DCL). La presente invención también se refiere a un método para tratar, retrasar y/o prevenir la enfermedad de Alzheimer, incluyendo el DCL mediante la administración de dicha formulación a un ser humano.

10

### 15 Antecedentes de la invención

Se conocen los efectos promotores de la salud de los aceites poliinsaturados. Se conocen también los efectos promotores de la salud de los antioxidantes. El documento WO2009/120091 describe una composición que combina estos nutrientes en una fórmula que dan como resultado una mayor absorción y donde el cuerpo es capaz de utilizar los nutrientes de manera óptima. Las composiciones descritas proporcionan formulaciones en las que estos nutrientes promotores de la salud naturales pero inestables se mantienen intactos y frescos.

20

Están bien documentados los efectos de los ácidos grasos omega-3 (ácido eicosapentaenoico (EPA), ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido docosapentaenoico (DPA)) en varias enfermedades y afecciones, tales como cardiovasculares, mentales, cutáneas y del envejecimiento. El aporte de omega-3 aumenta en todo el mundo. Hay un aumento en el consumo de productos que contienen omega-3, y el omega-3 en forma de pescado y/o complemento alimenticio está altamente recomendado por las autoridades sanitarias.

25

El estrés oxidativo es una especie de "estrés químico" inducido por la presencia en nuestro cuerpo de cantidades anormales de radicales libres. Cualquiera sea la causa, se cree que el estrés oxidativo es responsable del envejecimiento prematuro y de una larga serie de enfermedades comunes - aproximadamente un centenar - que van desde la hipertensión arterial a la aterosclerosis, del infarto al ictus, del Parkinson al Alzheimer, de la colitis a la pancreatitis, de la obesidad a la diabetes, de la bronquitis crónica a la artritis reumatoide, del SIDA a varios tipos de cáncer.

30

35

El cuerpo se protege contra los radicales libres mediante los antioxidantes, tanto los antioxidantes autoproducidos como los suministrados a través de alimentos y bebidas. Los antioxidantes pueden ser vitaminas, minerales y enzimas, ya sean solubles en grasa o en agua.

40

En situaciones en las que el cuerpo se somete a una oxidación mejorada (una gran cantidad de radicales libres), el cuerpo podría no tener suficientes antioxidantes para neutralizar o inactivar los radicales libres. Se producen reacciones en cadena destructivas, que podrían provocar un mayor estrés oxidativo perjudicial.

45

La base teórica de los efectos de los antioxidantes es bien reconocida. También se reconoce que la absorción de los antioxidantes en el cuerpo a partir de los complementos antioxidantes es un desafío. Sin embargo, los estudios han demostrado que los antioxidantes en una forma no natural o como vitaminas son absorbidos inadecuadamente por el cuerpo. Algunos estudios indican que la ingestión de altas dosis de vitaminas aisladas puede convertir los antioxidantes en prooxidantes, lo que conduce a una oxidación elevada en el cuerpo. Los estudios y la bibliografía indican una mejor absorción y biodisponibilidad de los antioxidantes presentes de forma natural cuando se consumen en los alimentos, por ejemplo, como frutas y verduras.

50

Se sabe que los seres humanos con estrés oxidativo severo a menudo tienen deficiencia de ácidos grasos omega-3 (DHA y EPA), y poseen un estatus antioxidante bajo.

55

El daño oxidativo y la deficiencia antioxidante ahora son considerados como factores cruciales para muchas enfermedades, y son probablemente la razón principal para un reemplazo imperfecto de las células dañadas viejas por células nuevas.

60

El trabajo de investigación ha demostrado que los productos de oxidación de los ácidos grasos son altamente reactivos y pueden afectar e interferir con los procesos intracelulares. Muchos complementos comercialmente disponibles de omega-3 contienen aceite de pescado que tiene un grado significativo de oxidación, que a su vez puede inducir efectos adversos en los procesos intracelulares. Aunque a estos complementos dietéticos a menudo se le añaden antioxidantes, esto no revertirá el enranciamiento ya presente en el complemento dietético. Por otro lado, para evitar una mayor oxidación del aceite de pescado insaturado, los antioxidantes en el complemento se consumirán y finalmente (después de algunos meses) cesarán. En este caso, los antioxidantes en tales complementos dietéticos comercialmente disponibles no inducirán efecto promotor alguno de la salud en seres

65

humanos.

El documento WO2009/120091 proporciona composiciones ventajosas que combinan el aceite de pescado fresco y antioxidantes específicos para proporcionar una nueva fórmula de bebida que tenga un mejor efector promotor de la salud en los seres humanos. No hay, sin embargo, descripción alguna para tratar, retrasar y/o prevenir la enfermedad de Alzheimer incluyendo DCL con una composición que comprenda aceite marino y resveratrol.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más frecuente de demencia. La EA afecta a millones de personas en todo el mundo y en la actualidad no existe una cura conocida para la enfermedad. Los síntomas de la enfermedad de Alzheimer se vuelven progresivamente más debilitantes conforme avanza la enfermedad. En última instancia, la enfermedad de Alzheimer da como resultado la muerte del individuo afectado, típicamente, después de muchos años de perder gradualmente la capacidad de funcionar en la sociedad. Por lo tanto, existe una necesidad significativa de un tratamiento para prevenir, retrasar y/o tratar la enfermedad de Alzheimer. El DCL es considerado como una de las etapas más tempranas detectables de la enfermedad de Alzheimer.

### Sumario de la invención

La presente invención se refiere a una formulación para su uso en el tratamiento, retraso y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer y para prevenir y/o retrasar la aparición de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo el DCL en los seres humanos. Dicha formulación comprende aceite marino fresco y el antioxidante resveratrol o derivados del mismo. En una realización preferida la formulación es una bebida. Preferiblemente, la formulación se administra diariamente, y más preferiblemente es una formulación de bebida administrada diariamente. Como se utiliza en el presente documento, diariamente significa administrar al menos una vez al día, pero también incluye múltiples administraciones en un día, por ejemplo, dos o tres veces al día.

Se muestran en las reivindicaciones dependientes las realizaciones preferidas de la presente invención.

### Descripción de las figuras

Las realizaciones preferidas de la presente invención se ilustrarán ahora con más detalle con referencia a las figuras adjuntas.

La figura 1 ilustra la mejor fagocitosis de beta amiloide después de la administración de la formulación de bebida del Ejemplo 1 a pacientes con EA (Grupo 1) que muestra una regulación descendente de genes inflamatorios.

La figura 2 ilustra el cambio en las expresiones iniciales de genes inflamatorios después de la administración de la formulación de bebida del ejemplo 1 a los pacientes con EA del Grupo 1.

La figura 3 ilustra el cambio en el efecto del patógeno exógeno ( $sA\beta_{1-42}$ ) en los pacientes con EA del Grupo 1 después de la administración durante 3 meses de la formulación de bebida.

La figura 4 ilustra el cambio en el efecto del patógeno exógeno ( $sA\beta_{1-42}$ ) en los pacientes con EA del Grupo 1 después de la administración durante 5 meses de la formulación de bebida.

La figura 5 ilustra la mejor fagocitosis de beta amiloide después de la administración de la formulación de bebida del Ejemplo 1 a pacientes con EA (Grupo 2) que muestra una regulación ascendente de genes inflamatorios.

La figura 6 ilustra los macrófagos obtenidos de los pacientes del Grupo 1 y Grupo 2 después de la administración de la formulación de bebida.

La figura 7 ilustra los resultados del paciente G del Grupo 2 después de la administración de la formulación de bebida del Ejemplo 1.

La figura 8 ilustra el cambio en la expresión inicial de genes inflamatorios después de la administración de la formulación de bebida del Ejemplo 1 a los pacientes con EA del Grupo 2.

La Figura 9 ilustra una comparación de la inflamación en pacientes con EA del Grupo II en un régimen diario de la formulación de bebida del Ejemplo 1 en comparación con la inflamación en dos pacientes del grupo 2 que no cumplieron con la administración de la formulación de bebida.

La figura 10 ilustra la fagocitosis de FAM-beta-amiloide por monocitos frescos. Obsérvese el número superior = intensidad de fluorescencia media de la fagocitosis de FAM-A $\beta$ ; número inferior = % de células positivas para A $\beta$ .

A: Sujetos cognitivamente normales o cuidadores: RB y DS son cuidadores; CE es paciente con enfermedad de Parkinson; DN es paciente diabético con cognición normal; EB es paciente con ELA; MF y FD son controles normales.

B: Pacientes con deterioro cognitivo con la mini prueba del estado mental (MMSE)  $\geq 19$  al inicio del estudio que recibieron complementos con la formulación de bebida después de la primera visita.

5 C. Pacientes con la enfermedad de Alzheimer (MMSE $<19$ ) que recibieron complementos con la formulación de bebida después de la primera visita.

La figura 11 ilustra la fagocitosis de FAM-betaA por macrófagos de pacientes con EA tras la administración de complementos con la formulación de bebida de la presente invención (visita 1 = antes de la ingesta de la formulación; Visitas 2, 3, después de la ingesta de la formulación).

10 La figura 12 ilustra el efecto *in vitro* de la formulación de bebida (SMF/Res) en fagocitosis de A $\beta$  por los macrófagos del paciente N.º 2 con EA. La formulación de bebida sin resveratrol (SMF) sirve como control junto con la formulación de bebida sin resveratrol pero con curcumina (SMF/Cur). Obsérvese un aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) (MFI inicial = 563) tras la adición de la formulación de control sin resveratrol (MFI = 752),  
15 la formulación de control con curcumina (MFI = 660), y la formulación de la presente invención que comprende resveratrol (MFI = 890).

### Descripción detallada de la invención

20 La presente invención se refiere a una formulación para su uso en el tratamiento, retraso y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer en seres humanos, dicha formulación comprende aceite marino fresco y el antioxidante resveratrol o derivados del mismo. Dicha formulación se utiliza además en la prevención y/o retraso de la aparición de los síntomas de la enfermedad de Alzheimer, incluyendo DCL. En este contexto, la enfermedad de Alzheimer y los síntomas de la enfermedad de Alzheimer incluyen la afección de deterioro cognitivo leve (DCL).

25 La presente invención es una formulación de aceite marino fresco y resveratrol o derivados del mismo. Preferiblemente, la formulación es una formulación de bebida, aunque también se contempla que la formulación pueda presentarse en otras formas de administración bien conocidas, tales como un comprimido o cápsula o gel. Por ejemplo, una formulación de bebida se puede preparar y después se seca, por ejemplo, se liofiliza en un polvo o granulación, y luego se presenta en una forma de dosificación de comprimido o cápsula. Como alternativa, la formulación de bebida podría concentrarse para formar un concentrado para su uso por un paciente o gelificarse usando técnicas de gelificación estándar para proporcionar un gel comestible.

30 Preferiblemente, la formulación de bebida puede tener una base que contiene antioxidantes naturales, por ejemplo zumo de fruta o verduras, té verde, pero puede utilizarse cualquier líquido bebible. Más preferiblemente, la base es un zumo de fruta, tal como, por ejemplo, los seleccionados del grupo que consiste en concentrado de manzana, concentrado de pera, concentrado de granada, concentrado de bayas de aronia y combinaciones de los mismos.

35 La formulación de bebida combina una emulsión estable de omega-3 conocida de la técnica anterior, y resveratrol o derivados del mismo. La preparación de la formulación de bebida utilizada en la presente invención se describe en el documento US2011/0135745. Dichas formulaciones de bebida muestran un mejor suministro, mejor captación y mejor efecto sobre el estrés oxidativo.

40 Tanto el aceite de omega-3 como los antioxidantes contenidos en la formulación de bebida utilizada en la presente invención son notablemente estables en la composición, y el avance del envejecimiento y la pérdida de efectos antioxidantes son mucho menores que en el producto conocido formulado como cápsulas separadas.

45 Un aspecto de la presente invención se refiere al descubrimiento inesperado y sorprendente de que una formulación de bebida que comprende aceite marino fresco en una emulsión de aceite en agua en donde el aceite marino tiene un valor totox por debajo de 15, con al menos un antioxidante adicional añadido, de resveratrol (3,5,4'-trihidroxi-transetilbeno) que no está presente naturalmente en dicha emulsión de aceite en agua, proporciona una formulación de bebida que se muestra prometedora en el tratamiento y/o prevención de la enfermedad de Alzheimer y/o en los síntomas asociados con la misma. Como se usa en el presente documento, el tratamiento incluye retrasar el avance o aparición de síntomas de EA, detener el desarrollo de los síntomas de EA y/o revertir los síntomas asociados con EA incluyendo el DCL. Como se usa en el presente documento, prevenir significa retrasar la aparición de los síntomas de la EA en una persona susceptible a EA, por ejemplo, una persona de al menos 55 años de edad, preferiblemente 60 años de edad, más preferiblemente al menos 65 años de edad.

50 Como se usa en el presente documento, los derivados de resveratrol incluyen, por ejemplo, derivados hidrolizables tales como ésteres, por ejemplo, ésteres alquílicos C1-6, de uno o más de los grupos hidroxilo del resveratrol.

55 El término aceite marino fresco describe un aceite preparado a partir de especies marinas frescas, donde se llevan a cabo todos los pasos del proceso cuidadosamente y bajo un estricto control de oxígeno de acuerdo con las normas funcionales para aceites, con el fin de prevenir la oxidación del aceite. El aceite marino fresco tendrá un bajo estado oxidativo, revelando un aceite incoloro sin el olor ni sabor característicos de, por ejemplo, el pescado. El nivel de oxidación dado como el valor totox (2 veces el valor de peróxido (PV) que se añade con el valor anisidina (AV)) debe

estar por debajo de 15, preferiblemente por debajo de 10, y mucho más preferiblemente por debajo de 5. El aceite marino presente en muchos complementos alimenticios hoy en día contiene aceite con un valor tototox mucho más alto, típicamente de 20 - 30 o incluso más.

- 5 El aceite marino fresco puede ser cualquier aceite rico en omega-3, por ejemplo, aceite de pescado, aceite de foca o aceite de krill. El aceite puede ser mezclado con otros aceites poliinsaturados de origen vegetal tales como el aceite de algas y aceite de hierbas, tales como el aceite de primula y aceite de colza.

- 10 En una realización preferida de la presente invención, la formulación de bebida comprende aceite marino, en una cantidad de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 % en peso en base al peso total de la formulación de bebida, más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 7 %, mucho más preferiblemente en el intervalo de aproximadamente el 1,5 % a aproximadamente el 4 %.

- 15 La emulsión de aceite en agua se prepara por cualquier método convencional, preferiblemente como se describe en las solicitantes noruegas de los propios Solicitantes NO 200444542, 20053136 y 20055620. En dichas emulsiones los antioxidantes están presentes para estabilizar el aceite durante la producción y el almacenamiento, no con el propósito de inducir ningún efecto promotor de la salud efectos en los seres humanos.

- 20 La fase acuosa de la emulsión de aceite en agua es preferiblemente una fase acuosa que contiene antioxidantes naturales, por ejemplo, zumos de fruta/verduras, té verde, té blanco y té de hierbas. El zumo puede ser un zumo exprimido fresco o zumo en forma de concentrado de zumo o néctar de zumo, o néctar diluido para obtener un zumo normal listo para usar. La fase acuosa también puede contener proteínas tales como soja, proteínas de avena, proteínas de suero de leche y/o proteínas de la leche. La formulación de bebida tendrá generalmente agua añadida en la cantidad de aproximadamente el 50 a aproximadamente el 90 por ciento en peso, preferiblemente de aproximadamente el 60 a aproximadamente el 80 por ciento en peso. Cuando se añade concentrado de zumo de fruta, la formulación de bebida contendrá de aproximadamente el 5 a aproximadamente el 30 por ciento en peso de concentrado de zumo de fruta, preferiblemente de aproximadamente el 10 a aproximadamente el 20 por ciento en peso de concentrado de zumo de fruta.

- 30 Se ha descubierto sorprendentemente que una formulación de bebida que contiene el aceite marino fresco descrito anteriormente en combinación con resveratrol o derivados del mismo, puede tener un impacto beneficioso sobre los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer o el tratamiento y/o sobre la prevención de la enfermedad de Alzheimer.

- 35 Preferiblemente, el resveratrol está presente en la formulación de bebida en una cantidad de aproximadamente el 0,01 a aproximadamente el 0,5 por ciento en peso de la fórmula, más preferiblemente de aproximadamente el 0,05 a aproximadamente el 0,25 por ciento en peso de la fórmula. En realizaciones preferidas particulares de la invención, una formulación de bebida de una porción contiene de aproximadamente 70 a 130 mg de resveratrol.

- 40 En una realización, la formulación también puede incluir una o más vitaminas tales como, por ejemplo, vitamina B, C y/o D y/o uno o más minerales tales como, por ejemplo, selenio, ácido fólico y/o cinc.

En una realización de la presente invención, la formulación también puede incluir prebióticos y/o probióticos.

- 45 En una realización de la presente invención, la formulación puede ser carbonatada.

La formulación de bebida se puede preparar, por ejemplo, por las siguientes etapas:

- 50 a) se añaden resveratrol y agentes saporíferos, junto con emulsionante a la fase de aceite,  
b) se añaden aditivos solubles en agua a la fase acuosa,  
c) la fase de aceite y acuosa se mezclan a una emulsión homogénea,  
55 d) la emulsión obtenida se somete opcionalmente a procesos de pasteurización y/o de homogeneización,  
e) la emulsión obtenida se enfría y se vierte en recipientes desechables limpios;

donde todos los pasos se llevan a cabo bajo un estricto control de oxígeno.

- 60 Como alternativa, en aún otro ejemplo, la formulación de bebida puede prepararse de acuerdo con las siguientes etapas:

- 65 a) se añaden transresveratrol y agentes saporíferos a la fase de aceite,  
b) se añaden aditivos solubles en agua a la fase acuosa,

c) la fase de aceite y acuosa se mezclan y se añade el emulsionante, seguido de una mezcla suave para conseguir una emulsión homogénea,

d) la emulsión obtenida se somete opcionalmente a procesos de pasteurización y/o de homogeneización,

e) la emulsión obtenida se enfría y se vierte en recipientes desechables limpios;

donde todos los pasos se llevan a cabo bajo un estricto control de oxígeno.

10 En la presente invención se ha encontrado que la formulación de bebida descrita en el presente documento muestra propiedades que sugieren que será útil en la prevención y/o tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. En particular, se ha descubierto que los individuos que beben diariamente la formulación de bebida descrita en el presente documento mostraron una mejora en las transcripciones de genes inflamatorios en pacientes con EA. En particular, se encontró que los macrófagos de los pacientes con EA recibieron la capacidad de los fagocitos beta amiloide. La fagocitosis defectuosa de beta amiloide es un marcador bien conocido de EA.

20 Un estudio adicional que mide la capacidad de los macrófagos a fagocitos beta amiloide y los beneficios cognitivos en personas con EA, demostró que los macrófagos de los pacientes tan rápido como a los 19 días después de la administración de la formulación de bebida de la presente invención, se hicieron funcionales en la absorción de beta amiloide. También se mostraron posibles beneficios cognitivos en pacientes con problemas cognitivos leves.

25 Se cree que la formulación de bebida específica utilizada en la presente invención proporciona ventajas significativas para los seres humanos a los que se administra, incluyendo, presentar los nutrientes esenciales y agentes promotores de la salud específicos (ácidos grasos poliinsaturados y antioxidantes añadidos) al sistema digestivo y a las células en un formato altamente beneficioso para las células y el cuerpo.

30 Aunque el uso de la formulación de la invención se pone en práctica preferiblemente mediante la administración de una formulación de bebida, también se contempla que la formulación de bebida pueda administrarse concentrada o secarse en una granulación o polvo. Tal granulación o polvo tal podrían formarse en una tableta o colocarse en una cápsula usando procedimientos bien conocidos. Como alternativa, la formulación de la invención podría adoptar la forma de un gel o concentrado que pueden prepararse a partir de la formulación de bebida, respectivamente, empleando uno o más agentes gelificantes estándar o preparando la formulación como un concentrado.

35 La formulación de bebida puede administrarse diariamente en un intervalo de volumen de 50-300 ml, preferiblemente 100 ml y más preferiblemente 200 ml. El intervalo de cada uno de DHA y EPA en la formulación de bebida que se administra puede ser de aproximadamente 500 mg a aproximadamente 5000 mg al día, preferiblemente aproximadamente 3000 mg al día, más preferiblemente aproximadamente 2000 mg al día, y mucho más preferiblemente aproximadamente 1000 mg al día.

40 Generalmente, el intervalo de resveratrol en la formulación administrada puede ser de aproximadamente 20 a aproximadamente 800 mg al día, preferiblemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 600 mg al día, más preferiblemente de aproximadamente 75 a aproximadamente 300 mg al día y mucho más preferiblemente de aproximadamente 75 a aproximadamente 130 mg, e incluso más preferiblemente aproximadamente 130 mg.

45 Por consiguiente, un primer aspecto de la presente invención se refiere a una formulación que comprende (i) un aceite marino fresco en una emulsión de aceite en agua, en el que el aceite marino puede tener un valor totox por debajo de 15 y (ii) resveratrol o derivados del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y/o para retrasar la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo el deterioro cognitivo leve (DCL).

50 En una realización preferida de la formulación, el contenido del aceite marino puede ser de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 % en peso del peso total de la formulación y el contenido del resveratrol puede ser de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,5 % en peso.

55 En una realización preferida, la formulación de bebida puede comprender además concentrado de zumo de fruta.

En una realización, el concentrado de zumo de fruta se puede seleccionar del grupo que consiste en concentrado de zumo de manzana, concentrado de zumo de pera y mezclas de los mismos.

60 En otra realización, la formulación de bebida puede comprender además granada y/o bayas de aronia.

En una realización adicional, la formulación de bebida puede comprender además vitaminas seleccionadas del grupo que consiste en Vitamina D, Vitamina C, Vitamina B y mezclas de las mismas.

65 En un segundo aspecto de la invención la formulación comprende (i) un aceite marino fresco en una emulsión de aceite en agua en una cantidad de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 % en peso, en la que el

aceite marino tiene un valor tototox inferior a 15; (ii) resveratrol o derivados del mismo en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,5 % en peso; (iii) concentrado de zumo de fruta; y (iv) una o más vitaminas para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y/o para retrasar la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo DCL.

5 En una realización, la formulación o formulaciones pueden ser una formulación de bebida.

En una realización adicional, la formulación o formulaciones se pueden utilizar a diario.

10 En aún otra realización, la formulación o formulaciones pueden tener un volumen en un intervalo de 50 a 300 ml.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un método de tratamiento de un paciente con la enfermedad de Alzheimer que comprende administrar la formulación como se describe anteriormente al paciente.

15 En un cuarto aspecto, la presente invención se refiere a un método para retrasar la aparición de síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo el DCL que comprende administrar la formulación como se describe anteriormente al paciente.

20 Habiendo descrito ahora completamente la presente invención con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplos con fines de claridad de comprensión, será obvio para un experto en la técnica que se puede realizar la misma modificando o cambiando la invención en un intervalo amplio y equivalente de las condiciones, formulaciones y otros parámetros de la misma, y que dichas modificaciones o cambios pretenden estar incluidos dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

## 25 Ejemplos

A continuación se ilustrará en detalle la invención con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

### 30 Ejemplo 1

Se preparó una formulación de bebida de 200 ml que proporciona aproximadamente 1000 mg de cada uno de EPA y DHA al día junto con 130 mg al día de resveratrol a partir de una emulsión de aceite marino con omega-3 y resveratrol.

	% en peso
Agua, purificada	74,3
Granada	3,5
Bayas de aronia	1
Vitamina D <sub>3</sub> (10µg)	-
Aislado de proteína de suero	4,2
Fibra	0,5
Concentrado de zumo de manzana	6
Concentrado de zumo de pera	5
Resveratrol (130 mg)	0,065
Aceite marino DHA y EPA 1000 mg cada uno	4,8
Suma	100,00

### 35 Ejemplo 2

40 Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes con EA muestran la regulación ascendente (Grupo 2) o la regulación descendente (Grupo 1) de los genes inflamatorios en comparación con los controles de la misma edad al inicio del estudio, pero las PBMC de todos los pacientes con EA se estimulan por beta amiloide (beta-

A) hasta su inflamación. Un biomarcador universal de pacientes con EA es la fagocitosis defectuosa de beta-A soluble o fibrilar por parte de los macrófagos. *In vitro*, el modulador de lípidos a partir de ácido docosahexaenoico (DHA), resolvinina D1 (RvD1) y la forma hormonal de la vitamina D3 1,25dihidroxitamina D3 (1,25D3) reparan la desregulación de estos genes y la fagocitosis beta-A (Mizwicki T et al. JAlz Dis 2013). El DHA y la vitamina D3 se toman con frecuencia como complementos nutricionales contra la demencia, pero sus efectos bioquímicos *in vivo* no se conocen bien. El ejemplo 1 es una fórmula de bebida que comprende aceite marino contrario con DHA y ácido eicosapentaenoico (EPA) estabilizado contra la oxidación a través de efectos aditivos y sinérgicos de componentes de las plantas (granada y bayas de aronia), vitamina D3, transresveratrol, aislado de proteína de suero y fibra. Se ensayó la transcripción de genes inflamatorios en pacientes con EA que habían estado consumiendo esta bebida al día durante más de 8 meses. En los pacientes del Grupo 1 de la transcripción de IL-1 beta aumentó, mientras que en el Grupo 2 de IL-1 la transcripción beta disminuyó, y los macrófagos de ambos grupos recuperaron la capacidad de fagocitar beta-A. Se estabilizaron las puntuaciones de la mini prueba del estado mental (MMSE). En conclusión, se encontró que la administración de complementos nutricionales con una bebida de la presente invención que comprende DHA, EPA y un derivado de resveratrol corrige la transcripción anormal y recupera la fagocitosis beta-A en pacientes con EA.

### Ejemplo 3

#### Métodos

**Población de estudio:** Los pacientes se enumeran en el orden en que se inscribieron en el estudio (Tabla 1). La mayoría de los sujetos estaban tomando medicación aprobada para la enfermedad de Alzheimer, tales como inhibidor de la colinesterasa y/o el inhibidor de NMDA memantina, y voluntariamente, la formulación de bebida de la presente invención. El estado cognitivo fue examinado mediante la mini prueba del estado mental (MMSE).

**Formulación de la presente invención:** Los sujetos estaban tomando diariamente 200 ml de la bebida de la invención que comprende 1000 mg de DHA, 1000 mg de EPA y 75 mg de resveratrol.

**Aislamiento de linfocitos y cultivos de macrófagos:** La sangre heparinizada a partir de los pacientes con EA se diluyó con PBS (relación 1:1; vol/vol). Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se aislaron de la sangre diluida por el método de gradiente de Ficoll-Hypaque a 2500 rpm durante 20 minutos a temperatura ambiente, la fracción mononuclear se recogió y se lavó dos veces con PBS, y las células se resuspendieron con medio IMDM. Los macrófagos se diferencian en las cámaras con pocillos a partir de 50.000 células mononucleares en medio IMDM con el 10% de suero autólogo.

**Ensayo de fagocitosis citométrico de flujo FAM-A $\beta$ :** 0,5x10<sup>6</sup> PBMC se suspendieron con medio IMDM con el 10 % de suero autólogo y se incubaron con o sin FAM-beta-A (Anaspec, San Jose, CA) durante una noche a 37° C en una incubadora de CO<sub>2</sub> al 5 %. Después las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se marcaron a continuación durante 30 minutos a 4 °C con anti-CD14 PE. Después de la incubación, las células se lavaron dos veces con tampón FACS y se fijaron con paraformaldehído al 1 %. Se realizó la citometría de flujo en FACSCalibur (Becton Dickinson) y los datos se analizaron mediante el software FlowJo (Ashland, Oregon) con compuerta de monocitos, basándose en una dispersión frontal y lateral.

Todos los pacientes fueron evaluados mediante la prueba de citometría de flujo de fagocitosis de A $\beta$ , y la mini prueba del estado mental.

#### Resultados

#### Fagocitosis de $\beta$ -amiloide por los monocitos de la sangre de pacientes con EA que tomaron la formulación de la presente invención

Los efectos sobre la administración de complementos de la formulación de la presente invención se ensayaron en relación con la fagocitosis A $\beta$  y la cognición en pacientes que padecen EA, incluyendo deterioro cognitivo leve (Tabla 2 y figuras 10). El intervalo normal de la prueba de fagocitosis A $\beta$  en sujetos cognitivamente normales de la misma edad se estableció anteriormente como >450 en intensidad de fluorescencia media (MFI) y en pacientes con EA como de  $\leq$ 450 (Avagyan, Goldenson et al. 2009; J Neuroimmunol 210 (1-2): 67-72).

Los resultados de este estudio confirmaron los valores previos al inicio. La puntuación media en la primera visita (antes de la administración de complementos) fue de 272 unidades MFI en el grupo con demencia avanzada (MMSE <19) y en el grupo con demencia leve o quejas subjetivas de memoria (MMSE  $\geq$ 19) fue de 280,5 (N.S.). Los pacientes con EA y con demencia avanzada que toman complementos nutricionales con la formulación de la presente invención aumentaron la absorción de  $\beta$ -amiloide en la segunda visita a 574 unidades MFI y los pacientes con demencia leve aumentaron la absorción a 643 unidades MFI. También se sometió a ensayo a sujetos cognitivamente normales y a pacientes con otras enfermedades neurológicas (Tabla 2 y figura 10).

**Fagocitosis de beta-amiloide por los macrófagos de pacientes con EA que toman la formulación de la presente invención**

Las PBMC de pacientes con EA se cultivaron durante 10-15 días hasta que los macrófagos se diferenciaron de los monocitos. Los inventores ensayaron estos macrófagos para determinar la fagocitosis beta-amiloide, exponiéndolos durante la noche a FAM-beta-A. De acuerdo con los resultados anteriores, los macrófagos de pacientes con EA derivados de la sangre antes de la primera visita fueron incapaces de fagocitar beta-A, pero los macrófagos aislados de la sangre después de la administración de complementos omega-3 en visitas subsiguientes mejoraron la fagocitosis en la mayoría de los sujetos (figura 11).

**Puntuaciones de la mini prueba del estado mental (MMSE) de pacientes con EA que toman la formulación de la presente invención**

En el grupo con demencia avanzada (MMSE <19), la puntuación media de MMSE antes de la administración de complementos fue de 9,0, y la puntuación no cambió significativamente después de la administración de complementos (puntuación media 9,5). En el grupo con deterioro cognitivo leve (MMSE ≥19); la puntuación MMSE aumentó de 23,8 a 27,5 después de la administración de complementos (Tabla 2).

**Aumento en la fagocitosis de β-amiloide por la formulación que contiene resveratrol**

El resveratrol ha demostrado promover la degradación del proteasoma de beta-amiloide en líneas celulares (Marambaud, Zhao et al. 2005; J Biol Chem 280(45): 37377-37382).

Aquí, se ensayó *in vitro* la actividad del resveratrol sobre la fagocitosis de beta-amiloide por parte de los monocitos. Las PBMC del paciente con EA N.º 2, que se complementó con la formulación de la presente invención *in vivo*, se sometieron a prueba durante una noche mediante la prueba de beta-amiloide después de la administración de complementos *in vitro* con:

- a) La formulación de la presente invención,
- b) la formulación de la presente invención sin resveratrol; o
- c) la formulación en b) con curcumina añadida.

La fagocitosis se aumentó al máximo con la formulación de la presente invención en comparación con los controles en b) y c) (figura 12).

**Tabla 1. Sujetos en el estudio**

**A. Paciente con deterioro cognitivo**

Paciente N.º	Edad, Sexo	Puntuación MMSE inicial	Duración de la enfermedad antes de la formulación de bebida (años)
1	60, M	19	3
2	88, F	<5	6
3	70, M	24	2
4	78	23	1
5	76, F	6	3
6	87, M	11	10
7	77, M	30	1
8	72, M	26	1
9	88, F	16	10
10	F	26	0,5
11	78, F	29	1
12		8	5

Tabla 2

Puntuaciones MMSE y MFI en pacientes con complemento de la formulación de la presente invención												
Puntuación MMSE al inicio	Sujeto N.º	Duración de EA (años)	MMSE					Unidades MFI				
			Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5	Visita 1	Visita 2	Visita 3	Visita 4	Visita 5
≤18	2	6	4	4	4	4	4		632	619		
	5	3	6	7	rechazada	5		226	318	131	473	279
	6	10	11	11				363	636			
	9	10	16	16				223	711			
	12	5	8					278				
	Media	6,8	9	9,5			4,5		272,5	574,2	375	
>18	1	3	19	22	23	18						
	3	2	24	23	23			54,1	396	814		
	4	1	23	30	30							
	7	1	30*	30#					377			
	8	1	26	30				298	1157			
	10	0,5	26					481				
	11		29	30				289				
Media	1,21	25,28	27	25,33				280,5	643,3			

\*El paciente se queja de "confusión mental"

#El paciente siente cierta mejora sobre la "confusión mental"

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una formulación que comprende (i) un aceite marino que tiene un valor tototox por debajo de 15 en una emulsión de aceite en agua, en la que la fase acuosa es zumo de fruta o verduras, y (ii) resveratrol o derivados de éster alquílico C1-6 del mismo para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y/o para retrasar la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo el deterioro cognitivo leve (DCL), en la que el contenido del aceite marino es de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 % en peso del peso total de la formulación y el contenido del resveratrol es de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,5 % en peso.
- 10 2. La formulación de la reivindicación 1, en la que el zumo de fruta o verdura se selecciona de zumo exprimido fresco o concentrado de zumo o néctar de zumo.
- 15 3. La formulación de la reivindicación 2, en la que, para el zumo de fruta, el concentrado se selecciona del grupo que consiste en concentrado de zumo de manzana, concentrado de zumo de pera y mezclas de los mismos.
- 20 4. La formulación de la reivindicación 3, en la que la formulación de bebida comprende además granada y/o bayas de aronia.
- 25 5. La formulación de la reivindicación 4, en la que la formulación de bebida comprende además vitaminas seleccionadas del grupo que consiste en vitamina D, Vitamina C, Vitamina B y mezclas de las mismas.
- 30 6. Una formulación que comprende (i) un aceite marino que tiene un valor tototox por debajo de 15 en una emulsión de aceite en agua en una cantidad de aproximadamente el 0,5 % a aproximadamente el 10 % en peso, en la que la fase acuosa es zumo de fruta o verdura; (ii) resveratrol o derivados de éster alquílico C1-6 del mismo en una cantidad de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,5 % en peso; (iii) concentrado de zumo de fruta; y (iv) una o más vitaminas para su uso en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer y/o para retrasar la aparición de los síntomas asociados con la enfermedad de Alzheimer, incluyendo deterioro cognitivo leve (DCL).
- 35 7. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que la formulación es una formulación de bebida.
8. La formulación de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el uso de la formulación es sobre una base diaria.
9. La formulación de acuerdo con la reivindicación 8, en la que la formulación de bebida tiene un volumen en un intervalo de 50 a 300 ml.

Fig. 1

Efecto de la formulación de bebida del Ejemplo 1 en la fagocitosis de FAM-A $\beta$  de EA del Grupo 1

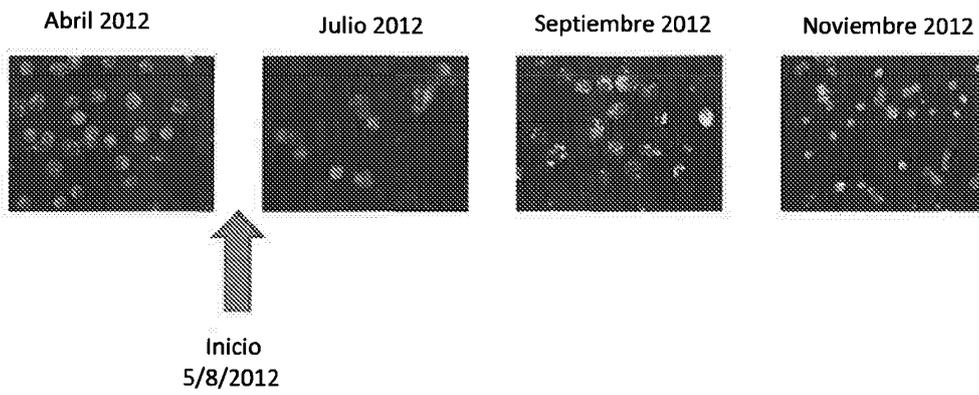
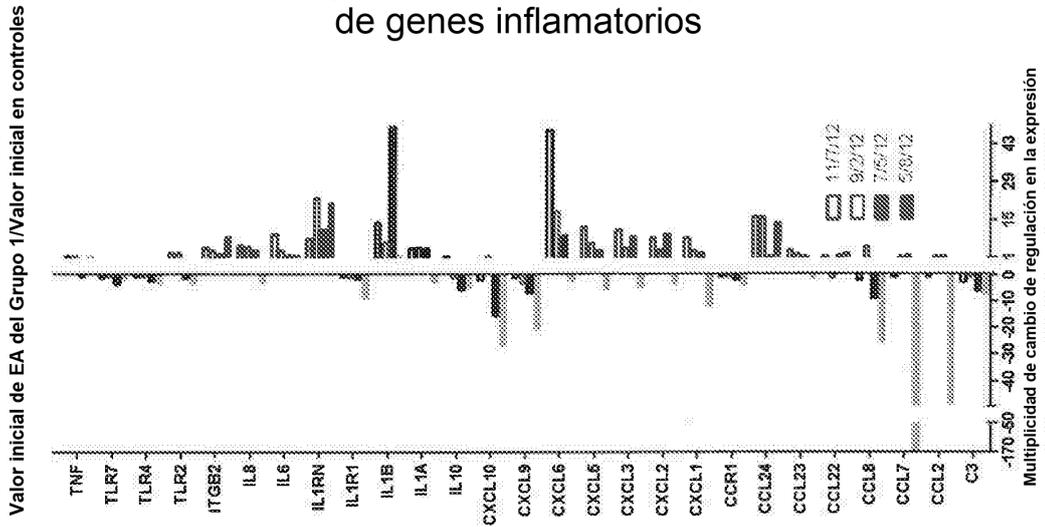


Fig. 2

EA del Grupo 1: Cambio en la expresión inicial de genes inflamatorios



\*Se ha observado una regulación ascendente en la expresión de la mayoría de los genes en las PBMC de EA del Grupo después del uso de la formulación de bebida del Ejemplo 1 (5/8/12)

Fig. 3

EA del Grupo 1: Cambio en el efecto del patógeno exógeno ( $sA\beta_{1-42}$ )

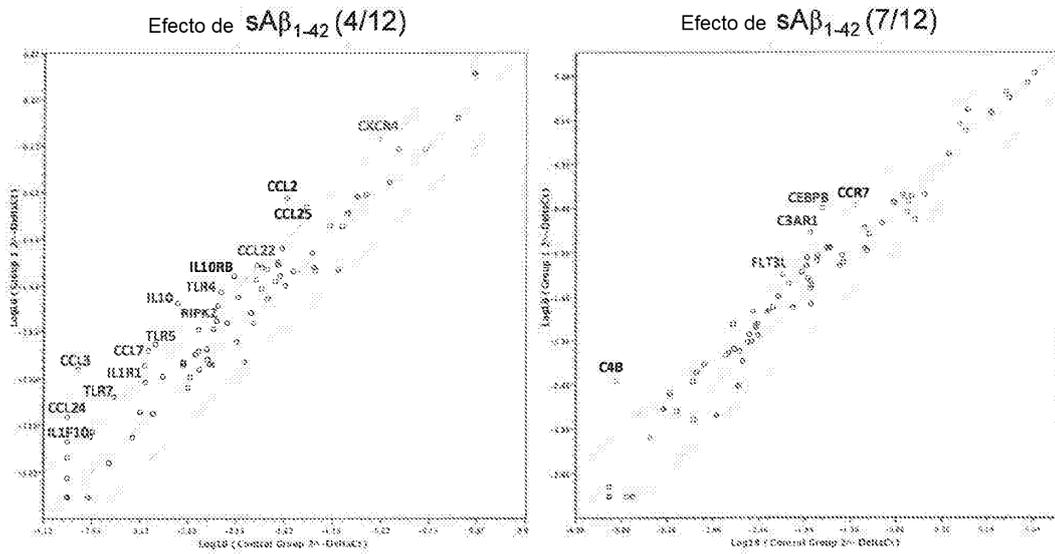


Fig. 4

EA del Grupo 1: Cambio en el efecto del patógeno exógeno ( $sA\beta_{1-42}$ )

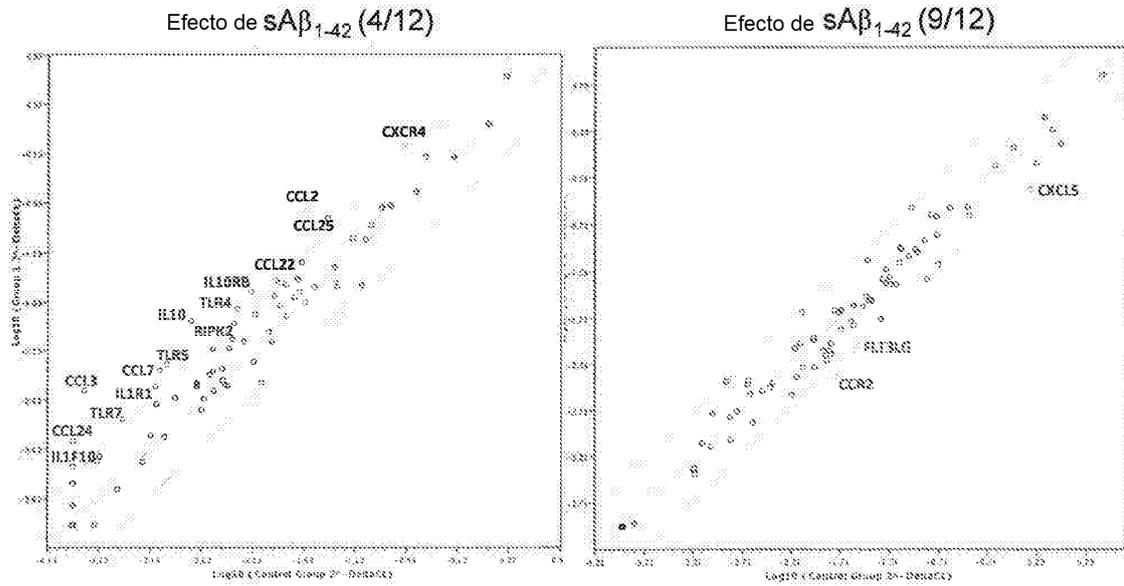
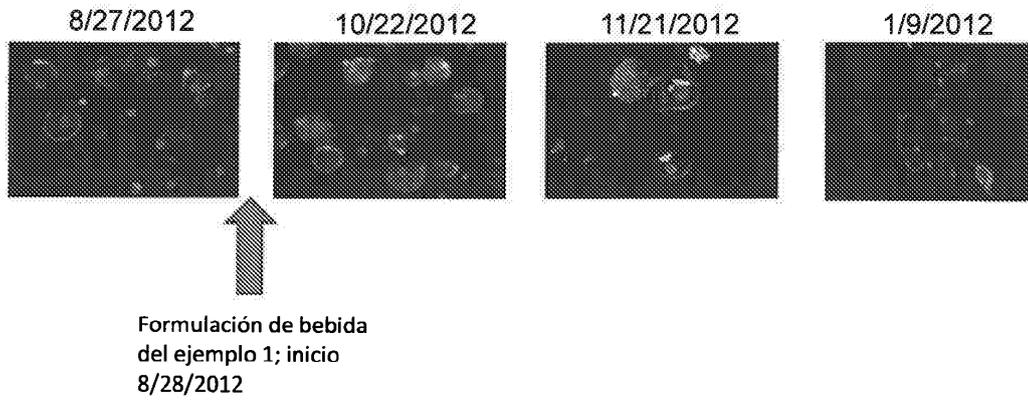


Fig. 5

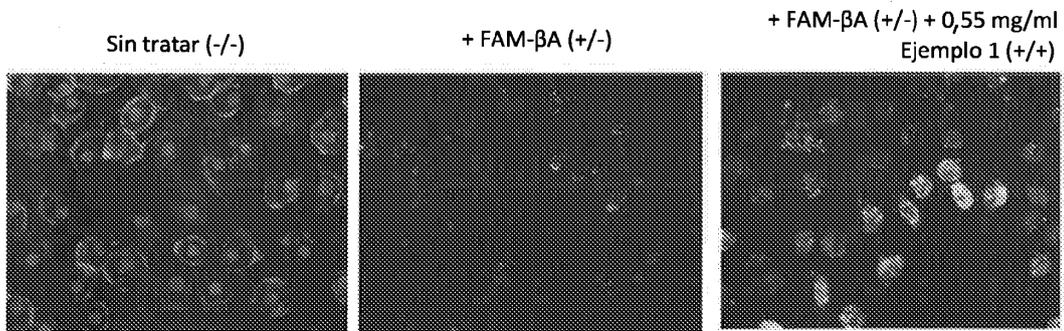
Fagocitosis de FAM- $\beta$ A de EA del Grupo 2



- (+/-): 2 $\mu$ g/ml FAM- $\beta$ A<sub>(1-42)</sub> [Verde], aumento marginal en la unión a beta-A después de la formulación de bebida del ejemplo 1

Fig. 6

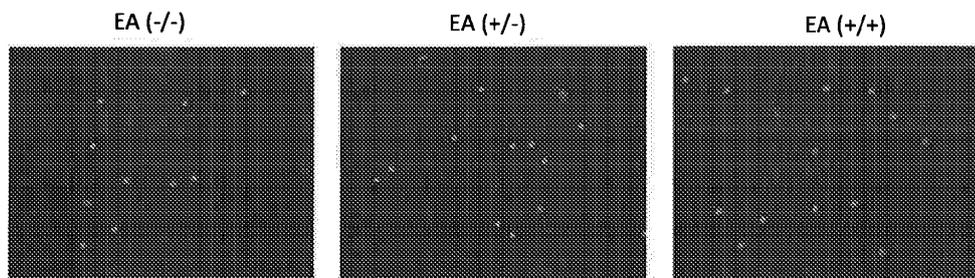
Fagocitosis de FAM- $\beta$ A de EA del Grupo 2 in vitro



- (-/-): en pSTST3 inicial localizada en citosol
- (+/-): 2  $\mu$ g/ml FAM- $\beta$ A<sub>(1-42)</sub> [verde]
- (+/+): 0,055  $\mu$ g/ml del tratamiento para mejora de unión de FAM- $\beta$ A<sub>(1-42)</sub> [verde]

Fig. 7

Efecto de la formulación de bebida del ejemplo 1 en la localización de STAT3 en un paciente con EA del grupo 2



- (-/-): en pSTAT3 inicial localizada en citosol
- (+/-): 2  $\mu\text{g/ml}$  FAM- $\beta\text{A}_{(1-42)}$  induce una translocación nuclear pronunciada de pSTAT3
- (+/+): 0,055  $\mu\text{g/ml}$  de tratamiento que atenúa la translocación de pSTAT al núcleo

Fig. 8  
EA del Grupo 2/Controles: Valor inicial

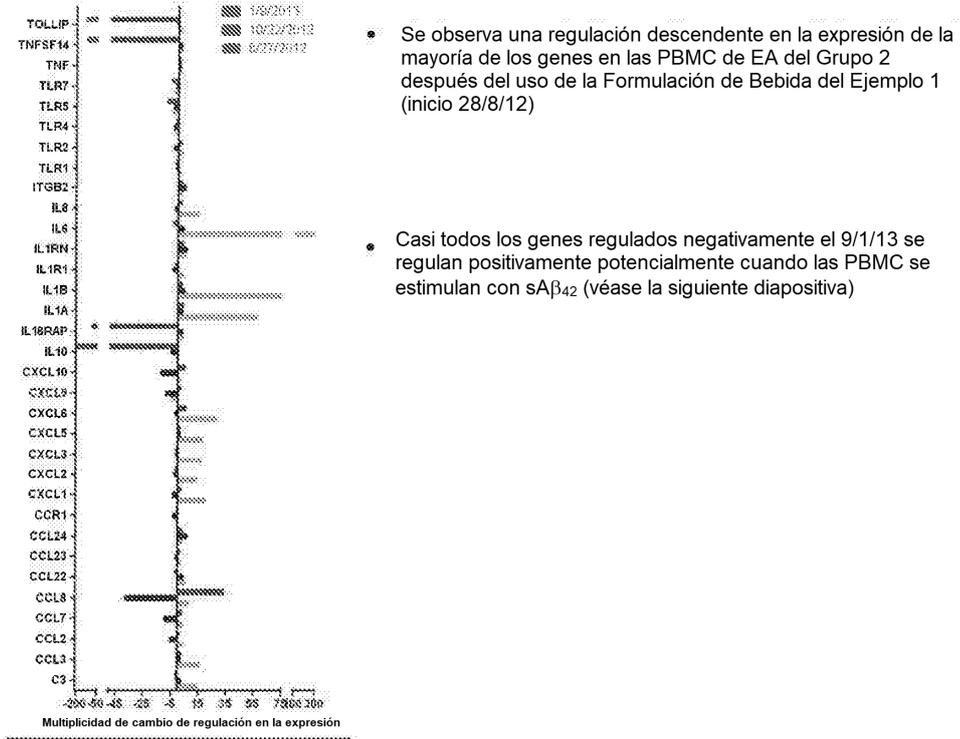


Fig. 9

EA del Grupo 2: Efecto de la Formulación de Bebida del Ejemplo 1

- Durante el pasado año se han hecho al menos dos seguimientos con tres pacientes de EA del Grupo 2 o con alta inflamación inicial
- Dos de estos pacientes tomaron la Formulación de Bebida, pero la interrumpieron, el otro ha estado tomando la Formulación de Bebida a diario desde el 28/8/12

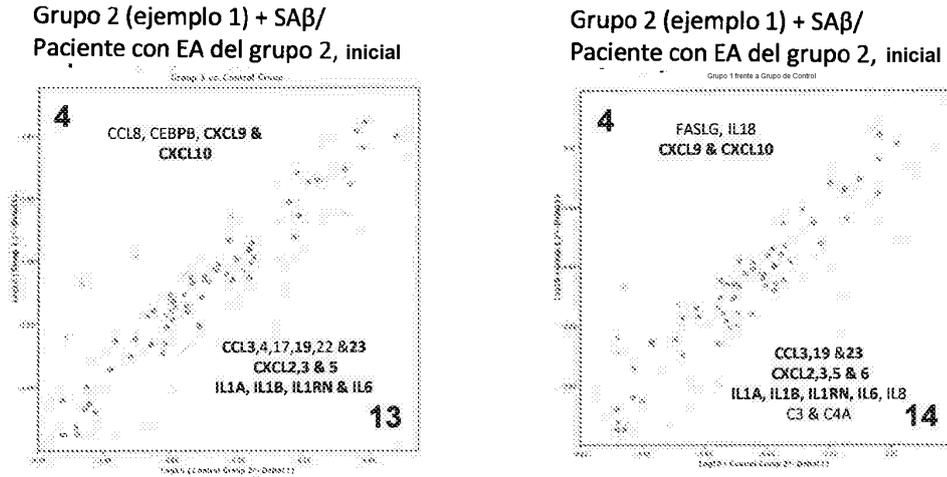


Fig. 10 A.

Fagocitosis de FAM- $\beta$ -amiloide mediante monocitos recién aislados

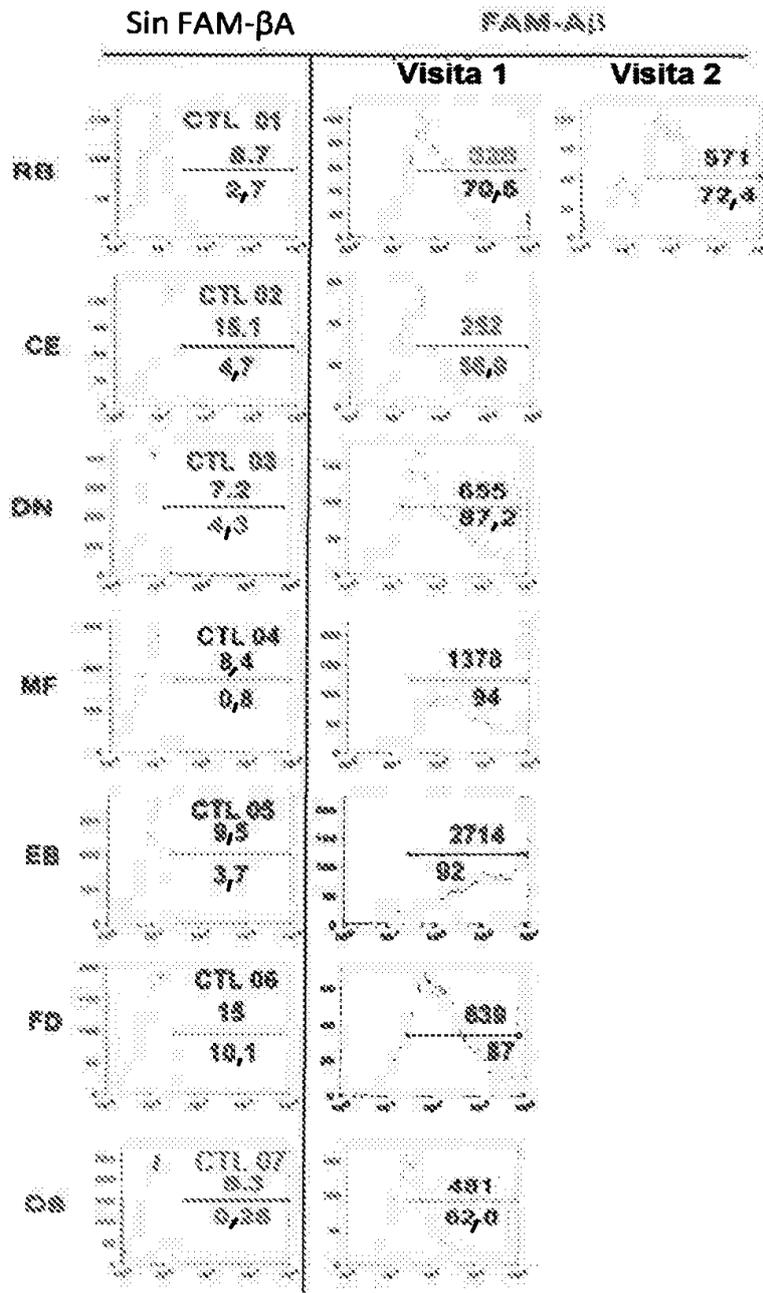


Fig. 10 B

Pacientes con deterioro cognitivo con MMSE  $\geq 19$  al inicio que reciben complementos con la formulación de la bebida de la presente invención después de la primera visita

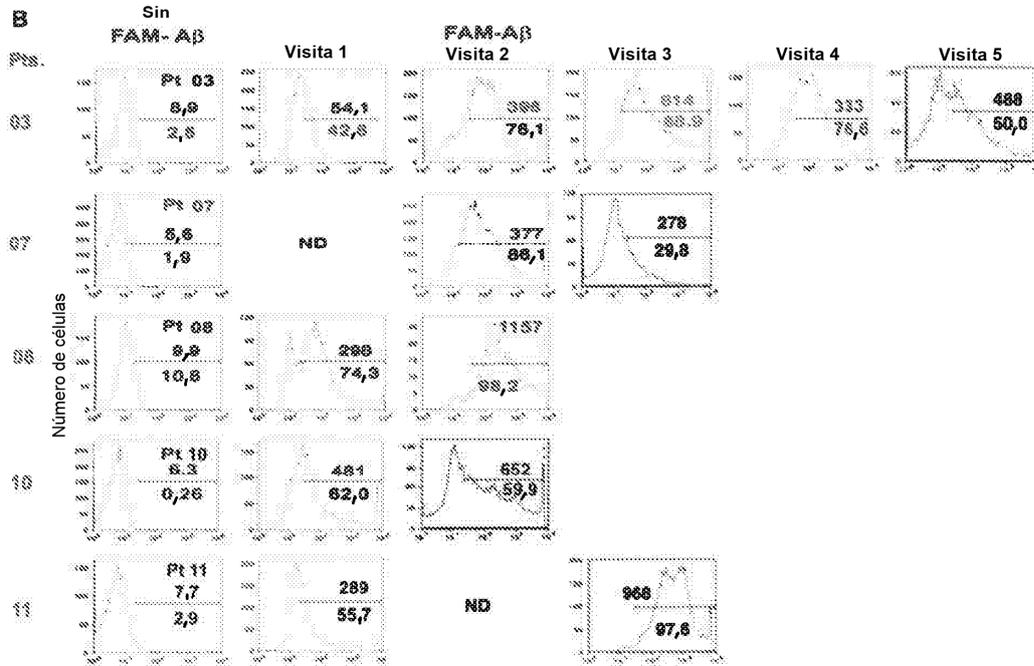


Fig. 10 C

Pacientes con enfermedad de Alzheimer (MMSE <19) que reciben complemento con la formulación de la presente invención después de la primera visita.

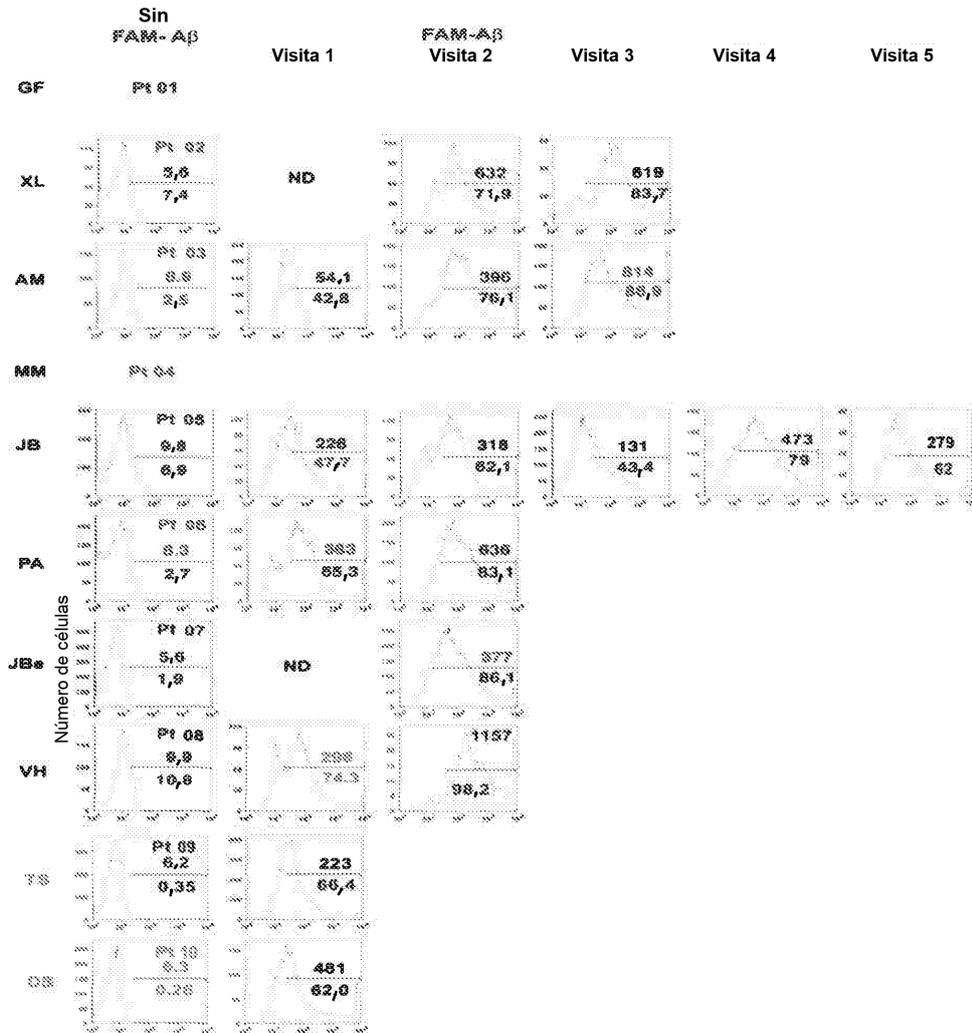
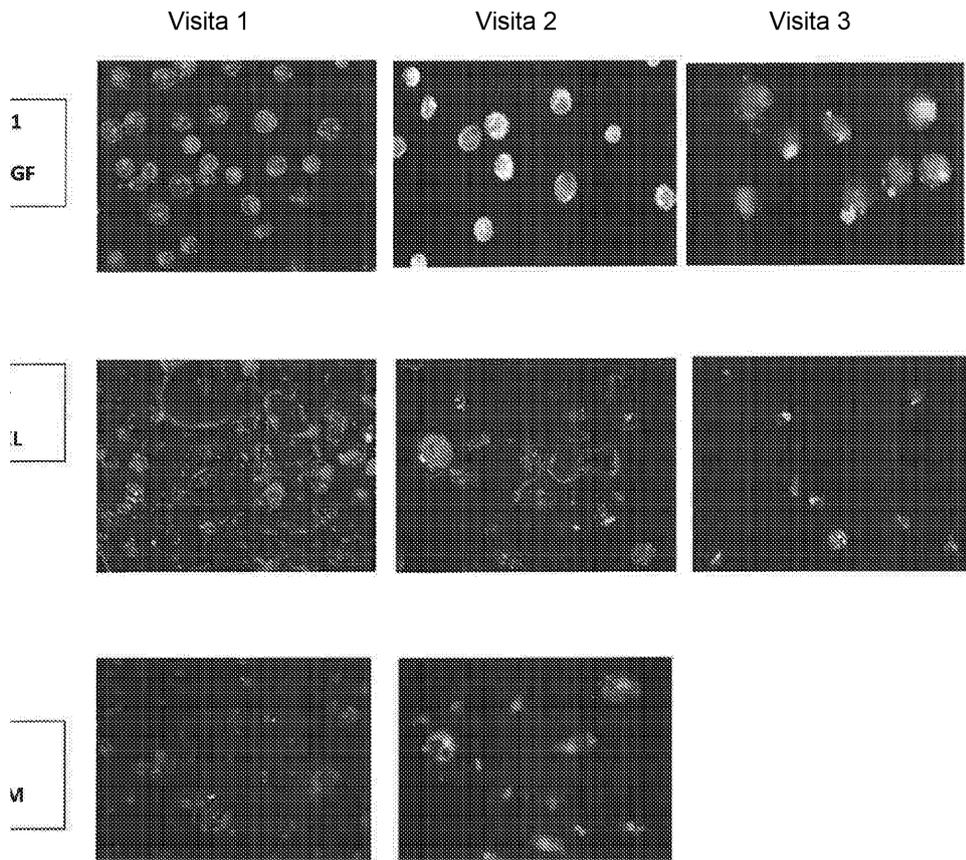
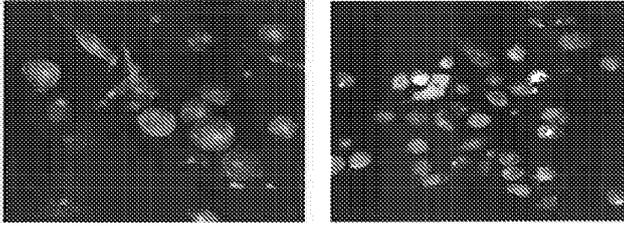


Fig.11

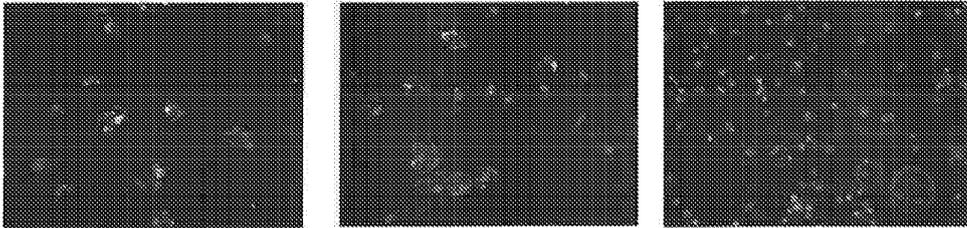
Fagocitosis de FAM- $\beta$ A por macrófagos de pacientes con EA tras la administración de complementos con la formulación de la presente invención (visita 1= antes de la ingesta de la formulación; visitas 2, 3 después de la ingesta de la formulación)



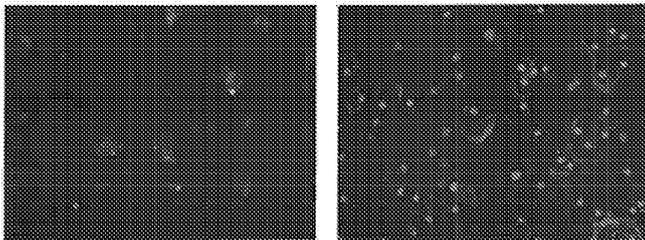
4  
MM



B



6  
PA



7  
JBe

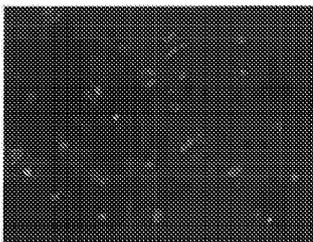


Fig.12

Efecto in vitro de curcumina y resveratrol en la formulación de bebida en la fagocitosis  $A\beta$  por macrófagos del paciente con EA N.º 2. Obsérvese un aumento en la intensidad de fluorescencia media (MFI) (MFI inicial = 563) además de la formulación sin resveratrol (MFI = 752), dicha formulación con curcumina (MFI = 660), y la formulación de la presente invención (MFI = 890)

