



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 344 017**

51 Int. Cl.:
A61K 31/202 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06250162 .2**
96 Fecha de presentación : **13.01.2006**
97 Número de publicación de la solicitud: **1685834**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **02.08.2006**

54 Título: **Uso del ácido pinolénico para el tratamiento de la obesidad.**

30 Prioridad: **31.01.2005 EP 05250517**
14.07.2005 GB 0514463

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2010

73 Titular/es: **Lipid Nutrition B.V.**
Hogeweg 1
1521 AZ Wormerveer, NL

72 Inventor/es: **Stam, Wiro Bartholomeus;**
Einerhand, Alexandra Wilhelmina Carla;
Schmid, Ulrike;
Heimerikx, Jos y
Gambelli, Luisa

74 Agente: **Urizar Anasagasti, José Antonio**

ES 2 344 017 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

Uso del ácido pinolénico para el tratamiento de la obesidad.

5 Esta invención trata de composiciones en forma de suplemento alimenticio o compuesto alimenticio que podría ser usado para la gestión de peso, para controlar la toma de alimento y el apetito y para controlar y/o reducir el peso corporal en humanos. Los compuestos contienen ácido pinolénico y derivados del mismo.

10 La obesidad esta llegando a ser bastante común en individuos en sociedades desarrolladas. Generalmente una condición de sobrepeso y obesidad resulta de un desequilibrio en consumo de energía y utilización. La causa del desequilibrio de energía para cada individuo puede deberse a una combinación de múltiples factores como genéticos y medioambientales. La obesidad puede ser un factor que contribuye en la creciente incidencia de varias enfermedades incluyendo enfermedad arterial coronaria, hipertensión, infarto, diabetes y ciertos cánceres.

15 La reducción de peso es a menudo recomendada como el primer paso en el recorrido de dicha acción para pacientes que sufren esta enfermedad de obesidad mencionada. En un intento de control total del peso corporal, un individuo puede asumir el control de peso, los objetivos de los cuales pueden cambiar dependiendo de las necesidades del individuo. Por ejemplo, mientras que los individuos con obesidad o sobrepeso desearían perder peso, otros individuos desearían mantener su peso corporal en un nivel constante. Una vez que la persona ha perdido peso, para mantener el peso, se requiere que la persona lo prevenga ya que puede recuperar su peso anteriormente perdido. Los programas más efectivos para la pérdida de peso típicamente incluyen una reducción de calorías en la dieta y/o aumentar el gasto de energía. A menudo, mucha gente asume la experiencia de control de peso aumentando los niveles de hambre y/o las ansias en alimentos altos en azúcar. Esto puede llevar a los individuos a alejarse del régimen de control de peso. Hay, además, una necesidad de desarrollar nuevas y efectivas vías para soportar el control de peso y ayudar a los individuos a continuar con su régimen de control de peso. Esto es un objetivo de la presente invención para proporcionar nuevos medios para proporcionar este apoyo.

30 El ácido pinolénico (por ejemplo, 5, 9, 12 C18:3 ácido graso, un ácido graso con 18 átomos de C teniendo tres dobles enlaces en las posiciones 5, 9 y 12) está presente, por ejemplo, en aceite de piñón y fracciones del mismo (J Aam Oil Chem Soc 1998, 75, p.45-50). Es sabido que el aceite de piñón, y además ácido pinolénico, pueden ser aplicados en productos de alimento, vea por ejemplo, FR-A-2756465 donde se sabe que se usa un concentrado con 15% en ácido pinolénico en aditivos en alimento. La presencia de ácido pinolénico se describe como un agente que proporciona un efecto hipolipémico a la composición.

35 WO 98/43513 revela que las limas de uñas pueden ser revestidas con ácido pinolénico y que esto inhibe la aparición de infecciones cuando se usan las limas.

40 De acuerdo con JP-A-61238729, el aceite de piñón puede ser usado como agente anticolesterante. Otros documentos donde los efectos saludables del ácido pinolénico son revelados incluido en JP-A-61058536, donde la actividad genérica es muy beneficiosa para la salud humana esta descrita. Esta actividad saludable no está desarrollado en mayor detalle. Sugano, Brit J. of Nutr 71 (1994) 775-783, revela un número de efectos saludables de dietas que contienen ácido pinolénico. Los efectos de salud mencionados son efectos hipocolesterolaemicos, efectos en la agregación plaquetaria inducida por ADP, en producción prostacíclica aortica y en presión sanguínea. EP-A-1088552 describe el uso de ácido pinolénico como un agente antiinflamatorio.

45 Matsuo *et al*, Prostaglandinas, Leucotrienas y ácidos grasos fundamentales, (1996), 55(4), 223-229 describe los efectos de ácidos γ -linoleico y pinolénico en parámetros inmunes en ratas Brown-Norway.

50 Sin embargo, ninguno de los documentos de la técnica anterior indican que el ácido pinolénico y demás derivados podrían ser usados para tratar la prevención de obesidad y/o para el control de peso.

55 US 6,429,190, US 2002/0119948 y US 2002/0119915 describen composiciones para extender la saciedad comprendiendo una fuente de calcio, proteína y un ácido graso de C12 a C18. El ácido oleico es el ácido graso descrito en los documentos.

60 WO 02/088159 revela los ésteres activos de uridina, y combinaciones que comprenden su ácido constituyente y compuesto de uridina, y su uso en una amplia variedad de aplicaciones medicas. No hay revelación del uso de ácidos grasos libres solos, no es simplemente un ejemplo dado para el tratamiento de la obesidad.

65 EP-A-1504778, publicado el 9 de Febrero 2005, describe una bomba implantable para el tratamiento de la obesidad. La bomba podría contener un ácido graso pero no hay revelación de ácido pinolénico.

CN-A-1377673 describe el uso de un aceite de piñón para tratamiento de y enfermedades vasculares cardiacas y cerebrales y adiposidad causada por hiperlipemia así como la diabetes causada por hiperlipemia.

65 De acuerdo con la presente invención, se provee el uso de ácido pinolénico o sales o ésteres según la adjunta reivindicación 1.

ES 2 344 017 T3

La presente invención proporciona el uso de ácido pinolénico y sus derivados para la fabricación de compuestos para el control de peso en humanos reduciendo la sensación de hambre y/o aumentando la saciedad. Por ello, composiciones de la invención son adecuadas para tratar o prevenir la obesidad y/o para control de peso y comprenden ácido pinolénico o un derivado del mismo. Derivados del ácido pinolénico, los cuales pueden ser usados en la presente invención incluyen sales de ácido pinolénico y alquil ésteres.

La invención también contempla el ácido pinolénico o sus derivados para el tratamiento o prevención de la obesidad y/o para el control de peso. El ácido pinolénico o sus derivados podrían ser usados solos o en un compuesto de una composición la cual comprende otros componentes farmacéuticamente aceptables y comestibles. Preferibles, la composición comprende de 10 a 60% en peso de ácido linoleico y/o de 52% en peso de ácido oleico, ya sea libre de ácidos o glicéridos (ejemplo, mono-, di- o tri-glicéridos. Adicionalmente o alternativamente, la composición podría comprender de 0.5 a 5% en peso de ácido taxoleico.

Se ha encontrado sorprendentemente que los ácidos grasos de aceite de piñón, y demás ácidos pinolénicos, pueden ser usados para estimular la liberación de colecistokina (CCK). CCK es un péptido que se libera después del consumo de alimento. Cuando la alimento es consumida, CCK libera la proteína (CCKRP) y es liberada en el intestino delgado. CCKRP simula la liberación CCK desde las células intestinales. La liberación de CCK genera síntomas de comportamiento asociados con la saciedad. Además, el incremento de los niveles de CCK puede aumentar los niveles de IgA en el tracto intestinal y podría ofrecer un incremento de la protección contra microorganismo invasores.

El control de peso podría comprender una reducción de la sensación de hambre y/o incrementando la saciedad.

Las composiciones de la invención están en forma de suplemento de alimento o composición de alimento. El término composición significa que el ácido pinolénico o derivados podrían estar presentes en uno o más de un componente (por ejemplo como están presentes en aceite de piñón). El único o más de un componente podrían estar presentes en una mezcla con ácido pinolénico o derivados o ellos podrían formar parte del encapsulamiento del producto (por ejemplo, la cápsula en la cual el ácido pinolénico o derivado está encapsulado).

Las composiciones de la invención típicamente comprenden de 0.3 a 100% en peso, preferible de 5 a 80%, más preferible 10 a 50% en peso (tal como 10 a 30% en peso o 20 a 30% en peso) de ácido pinolénico o unos de sus derivados. La persona con destreza apreciará que el porcentaje de ácido pinolénico o sus derivados en una composición de la invención dependerá de la naturaleza de la composición. Por ejemplo, el ácido pinolénico o sus derivados es ideal para representar un mayor porcentaje del peso total del compuesto farmacéutico o como una suplemento alimenticio que la composición de la alimento.

Cuando la composición de la invención está en forma de suplemento de alimento, el ácido pinolénico o sus derivados o una mezcla que contiene uno de estos compuestos, podrían estar encapsulados en cápsulas de alimento. Materiales adecuados para la encapsulación son bien conocidos, por ejemplo gelatina o glicerol.

El ácido pinolénico usado en la presente invención podría estar en la forma de ácido graso libre, un derivado de ácido pinolénico o mezclas del mismo, incluyendo mezclas de diferentes derivados. Los derivados no son tóxicos y son comestibles y son sales y ésteres. Sales adecuadas incluyen sales como sales catiónicas para las alimentos como sales sódicas. Ésteres adecuados incluyen alquil ésteres teniendo de uno a seis átomos de carbono. Preferibles ésteres mono-, di- y tri-glicéridos.

Preferiblemente, las composiciones de la invención están libres de (o casi libre de por ejemplo contenido menor que 0.1 mg de) ésteres de uridina, y/o nucleosidos y/o nucleotidos seleccionados del grupo consistente en uridina, deoxiuridina, monofosfato de uridina, monofosfato de deoxiuridina y/o demás sales farmacéuticamente aceptables.

Una fuente adecuada para el ácido pinolénico usado en la presente invención es aceite de piñón o concentrados del mismo. Por ejemplo, glicéridos de ácido pinolénico pueden ser obtenidos del aceite de piñón o concentrados del mismo. Preferibles, un aceite o concentrado con un contenido de ácido pinolénico o derivados del mismo más de 15% en peso o mas de 28% en peso es usado.

Las composiciones de la invención pueden comprender uno o más de un ácido graso (por ejemplo ácidos carboxílicos de cadena lineal conteniendo de 12 a 24 átomos de carbono). Ejemplos de otros ácidos grasos adecuados para el uso de la presente invención incluyen ácido linoleico, ácido oleico, taxoleico, juiperonico, sciadonico, ácidos grasos saturados, conjugados de ácido linoleico (opcionalmente como una mezcla enriquecida de isómeros) y EPA (eicosapentanoico) y DHA (docosahexaenoico) (opcionalmente como mezcla enriquecida de isómeros de EPA y DHA). El enriquecimiento incluye una alteración de la mezcla del isómero normalmente presente (por ejemplo en un producto natural), tal que una alteración en la cantidad relativa de diferentes isómeros. En estas composiciones, el otro ácido graso o cada uno de los otros ácidos grasos pueden estar independientemente presente como un ácido graso libre o como derivado del mismo (incluyendo un mono-, di-, o triglicérido y sales), o como una mezcla del mismo.

El ácido pinolénico o derivados del mismo están opcionalmente mezclados con estos ácidos grasos adicionales o glicéridos antes de ser usados para preparar una composición acorde a la presente invención. Cuando las composiciones de la invención contienen uno o mas ácidos grasos y/o glicéridos, además del ácido pinolénico o sus derivados, el adicional ácido(s) graso y/o glicéridos son preferentemente seleccionados de aceites líquidos, tal como aceite de soja,

ES 2 344 017 T3

aceite de girasol, aceite de semilla de colza, aceite de semilla de algodón, mantequilla de cacao y mantequillas de cacao equivalentes, aceite de palmera y fracciones del mismo, enzimáticamente hecho de grasas; aceites de pescado y fracciones del mismo, conjugados de ácido linoleico y mezclas enriquecidas de isómeros, ácido linoleico gamma y mezclas enriquecidas de la misma, aceites líquidos normales; y mezclas de los mismos.

5 Mezclas que contienen uno o más ácidos adicionales grasos o glicéridos preferibles que contienen grasas sólidas moderadas por impulso RMN o grasas no estabilizadas de:

N20 = 1-80, preferible 5-45

10 N35 menos que 20, preferible menos de 10, más preferible menos que 5.

Estos valores fueron obtenidos derritiendo la grasa a 80°C, enfriando a 0°C durante 30 minutos, con lo cual la grasa fue calentada para la medida de la temperatura N y mantener la temperatura durante 30 minutos antes de la medida de N valor.

20 Mezclas de ácidos grasos que son usados para producir las composiciones de la invención preferibles comprenden desde 1.5 a 60% en peso, preferible de 28 a 60% en peso de ácido pinolénico, de 10 a 60% en peso de ácido linoleico y de 5 a 52% en peso de ácido oleico, por ejemplo 25 a 85% peso (linoleico más ácido oleico), de 0 a 70%, por ejemplo 25 a 65% en peso (trans más ácido graso saturado). El contenido de los ácidos grasos trans es preferible menor que 10% en peso. Un ejemplo de mezcla adecuada es una la cual el contenido en ácido graso saturado trans es menor que 10% en peso.

25 Alternativamente, las composiciones de la invención podrían estar libres o parcialmente libres de ácidos grasos como el ácido pinolénico (por ejemplo podría contener menos del 1% en peso, más preferible menos que 0.1% en peso, tal que menos que 0.01% en peso de otros ácidos grasos de C12 a C24).

30 Las composiciones de la invención podrían comprender fuentes de calcio y/o magnesio. Además, las composiciones podrían contener proteínas (incluyendo proteínas hidrolizadas). La combinación de ácido pinolénico y calcio y/o magnesio y/o proteína en las composiciones de la presente invención podrían aumentar la liberación de CCK desde las células intestinales.

35 En otras fabricaciones, las composiciones de la invención podrían estar libres o casi libres de iones calcio y/o proteínas (por ejemplo, cada uno de los compuestos esta presente en la composiciones en una cantidad inferior a 1% en peso, más preferible menos de 0.1% en peso, como menor a 0.01% en peso).

Típicamente, las composiciones de la invención contienen ácido pinolénico y /o derivados del mismo como un componente activo exclusivo.

40 Las composiciones de la presente invención pueden ser usados para ayudar a controlar el peso corporal, por ejemplo ayudar el mantener el peso corporal en un nivel constante o ayudar a reducir el peso corporal. En otras palabras, el uso de los componentes puede hacer adelgazar el cuerpo, por ejemplo, ayudando a la pérdida de grasas.

45 El uso de las composiciones de esta invención puede ayudar a reducir la ingesta de calorías. Esto podría ayudar a mantener el peso del cuerpo a un nivel constante y/o ayudar a adelgazar. La reducción en el peso corporal puede aumentar los niveles de energía.

50 El uso de las composiciones de la invención puede reducir el sentimiento de hambre y/o aumentar la saciedad y/o reducir el deseo por las alimentos altas en calorías, por ejemplo permitiendo menos espacio en el estómago para alimentos ricos en calorías. En particular, el uso de las composiciones de la invención puede aumentar y/o extender la saciedad durante y/o después de una alimento.

55 El uso de las composiciones de la invención puede reducir el sentimiento de hambre durante la dieta y además incrementar el éxito del ritmo de la dieta.

El consumo de los compuestos de la invención pueden estimular la liberación de CCK y/o IgA.

60 El uso de los compuestos de la invención puede ayudar a reducir el apetito, por ejemplo aumentado la saciedad y su sentimiento y la plenitud.

También se describe aquí un método de control de peso. En este método una cantidad efectiva de una compuesto como se describe arriba, es administrada a un mamífero, por ejemplo a un humano. Dicha administración necesita ser llevada por un físico o bajo supervisión médica y puede implicar que el mamífero ingeste la composición, por ejemplo, en la forma de alimento o como suplemento alimentario. Preferible, las composiciones de la invención son administradas (o tomadas) 2 horas a 3 minutos, más preferible 1 hora a 15 minutos e incluso más preferible de 35 a 25 minutos antes de comer.

La invención es aplicable a los humanos.

ES 2 344 017 T3

Cuando se produce un producto alimentario, el ácido pinolénico o sus derivados pueden ser primeramente mezclados con componentes estructurales para el uso de productos alimentarios. Sin embargo, esto no es fundamental. Estas mezclas pueden, por ejemplo, ser aplicadas beneficiosamente en productos de alimento como compuestos de grasas saludables.

5

El aceite de piñón puede ser usado en las composiciones de la invención. Sin embargo, el aceite de piñón puede contener el 26% del ácido pinolénico, ello podría ser ventajoso (en particular para el uso de suplemento alimentario y como dosis en forma de tamaño pequeño) si los concentrados son obtenidos con altos niveles de ácido pinolénico. Concentrados de ácidos pinolénico o uno de sus derivados son usados en la presente invención para preparar un proceso adecuado. Un adecuado proceso es descrito en EP-A-1088552.

10

En un proceso adecuado, una hidrólisis enzimática o glicerosis es desarrollada usando una enzima que puede discriminar entre ácidos grasos con 5 dobles enlaces y otros ácidos grasos. Este proceso comprende:

15

i) reacción de un material glicérido conteniendo al menos 2% en peso de ácido graso con cis 5 doble enlace con agua o glicerol en presencia de una encima capaz de discriminar ácidos grasos conteniendo dobles enlaces delta 5 y otros ácidos grasos;

20

ii) dividir la mezcla de reacción en un componente rico en glicérido y otro componente rico en un ácido graso;

iii) opcionalmente convertir los glicéridos parciales del paso ii) para liberar ácidos grasos en presencia de una encima adecuada

25

iv) opcionalmente convertir el ácido graso del paso ii) a triglicéridos por reacción con glicerol en presencia de una adecuada catálisis por una enzima adecuada;

30

v) opcionalmente dividir el material parcial rico en glicérido del paso ii) en los componentes que son a) ricos en monoglicéridos, b) ricos en diglicéridos y c) ricos en triglicéridos y entonces opcionalmente convertir los glicéridos parciales a) y b) en triglicéridos por reacción con ácidos grasos en presencia de una enzima adecuada.

Es preferible el uso de un material glicérido con ácido pinolénico con un contenido de 5 a 50%, preferible 10 a 35% en peso en paso i). Ejemplos de tales materiales son aceites pinolénicos y concentrados del mismo. Este proceso produce un concentrado que contiene al menos 28% en peso de ácido pinolénico.

35

Enzimas adecuadas para su uso en los pasos i), iii), iv), y v) son las lipasas. Las lipasas adecuadas incluyen *Candida rugosa* lipasa; Lipasa QL; Lipasa SL, Lipasa OF; *Rhizopus deleamar*, lipasa; *Rhizopus oryzae* lipasa; *Geotrichum candidum* B lipasa; y *Rhizomucor miehei* lipasa. Enzimas preferibles para el paso step i) son *Candida rugosa* lipase and *Geotrichum candidum* B lipase.

40

Lipasas adecuadas tambien estan incluidas Lipozima IM (uan enzima comercial). La enzima preferible para usarla en el paso iv) es Lipozima M (proveniente de *Rhizomucor miehei*).

45

Las composiciones de la invención pueden ser productos alimenticios. Los productos alimenticios en los cuales el ácido pinolénico o derivados del mismo o mezclas que contienen estos compuestos pueden usarse incluyen, pero no están limitados a: margarinas, untables bajas en grasas, untables muy bajas en grasas, untables bicontinuas, untables acuosas continuas, productos de confitería, tales como chocolates, rellenos o cubiertos, helados, recubrimientos de helados, inclusiones de helados, aliños, mayonesas, salsas, bollería industrial, manteca, queso, grasas, barritas energéticas, barritas de muesli, bebidas, productos lácteos, productos bajos en carbohidratos, productos bajos en calorías, sopas, cereales y batidos de leche.

50

La adición de ácido pinolénico o derivados del mismo o mezclas que contienen al menos uno de los componentes de productos de alimento pueden tener un efecto positivo en la textura, dureza, apariencia, reología, olor, impacto del sabor, estabilidad, microestructura (tamaño de cristal, tamaño de gota), propiedades de aireación o facilidad de procesamiento de estos productos alimenticios. El uso de un glicérido de ácido pinolénico es particularmente ventajoso en este respecto.

55

Ejemplos de productos que forman la composición de suplemento alimenticio (los cuales incluyen productos nutricionales), tal que en forma de un gel débil o cápsula dura comprendiendo un material de encapsulamiento seleccionado del grupo que consiste en gelatina, glicerol, almidón, almidón modificado, derivados del almidón tales como glucosa, sucrosa, lactosa y fructosa. El material de encapsulamiento puede contener opcionalmente agentes de polimerización o cross-linking, estabilizadores, antioxidantes, agentes absorbentes de luz para proteger rellenos sensibles a la luz, y preservativos. Preferible, la dosis de ácido pinolénico en los suplementos de alimento es de 1 mg a 1000 mg (preferentemente de 100 mg a 750 mg). La cantidad de aceite de piñón que se usa como forma de dosis es preferible de 100 mg a 2000 mg, por ejemplo de 250 mg a 1500 mg (750 mg), por ejemplo tomandola 4 veces al día.

65

Las composiciones de la invención podrían contener otros aditivos como los que hay en ciertos alimentos, incluidos productos farmacéuticos, pero no limitan a ingredientes condimentos, agentes colorantes, edulcorantes y emulsionadores.

ES 2 344 017 T3

Los siguientes ejemplos no limitantes muestran la invención y no limitan el alcance de ninguna manera. En los ejemplos y las siguientes especificaciones, todos los porcentajes, partes y proporciones son al menos en peso indicados.

5 Ejemplo 1

En un proceso *in vitro* que fue llevado para la medida del efecto de varios ácidos grasos libres en la liberación de CCK desde las células del intestino. El estudio mostró el efecto de los ácidos grasos libres de aceite de piñón y además ácido pinolénico como un ingrediente saciador (vea los datos debajo).

10

Cultura de la célula

La línea celular STCI-1 fue cultivada a 37°C en un 5% de CO₂, 95% aire atmosférico en RPMI 1640 suplementado con 5% FCS, 2 mM glutamina, 100 U/ml de penicilina y 50 μm estreptomycin. Las células eran pasadas rutinariamente al alcanzar una confluencia del 70-80% mediante lavado de la capas celulares con PBS e incubando en una solución de tripsina-EDTA. Se usó una densidad de preparación de cultivo en placas de 2x10⁶ células por 75 cm² para el subcultivo de rutina.

15

Protocolo Experimental

20

24 horas antes de los experimentos, las células STCI fueron cultivadas en 6 placas de cultivo. Un día del experimento, las células fueron lavadas en 1 ml de Krebs- exactamente en una disolución buffer de bicarbonato (pH 7,4) conteniendo 0.2% (peso/volumen BSA (KRBB). Las células STCI fueron pre-incubadas durante 15 min en 2 ml de KRBB, antes siendo incubadas en una cantidad de 2 ml de KRBB, con o sin los agentes testados, durante una hora. Al final de la incubación fue recogido el sobrenadante, centrifugado a 1000 rpm e inmediatamente enfriado a -20°C para RIA. El ADN contenido fue medido por fluorometría después de la extracción del contenido del cultivo celular.

25

Análisis RLA

La inmunoreactividad CCK fue medida usando un antisuero 39 A (1/300,000) que reacciona un 100% con CCK-33 y CCK-8, 12% con gastrina sulfatada-17, 5% con gastrina no sulfatada-17, y menos que 0.1% con CCK-8 no sulfatada y gastrina-34. La CCK-8 es usada como estándar. El Bolton-Hunter (Thr, Nle)-CCK-9 fue etiquetado con yodina 25 por el método de T-cloramina y purificado por una fase inversa de HPLC. El tampón de ensayo era 0.05 M fosfato sódico de pH 7.5. Las alícuotas de 1 μl a 200 μl de sobrenadante eran testadas en duplicado (día 0). La etiqueta era añadida al día 1 y el carboncillo precipitado es desarrollado 48 h después.

35

La figura 1 es un cuadro mostrando los niveles de CCK producidos usando ácidos grasos libres (Agl) de los piñones y otros Agls.

La figura 1 muestra que el aceite de piñón producían un alto nivel marcado de CCK que otros materiales testados. Cada ejemplo tenía un nivel de CCK determinado en tres diferentes concentraciones, las cuales eran 100 μM, 500 μM y 1 mM basado en un peso molecular de AGL de 300 g/mol. Marinol es un aceite de pescado concentrado de Loders Croklaan BV (Wormerveer, Holanda) conteniendo EPA y DHA. Clarinol es un producto de Loders Croklaan BV (Wormerveer, Holanda) conteniendo un 80% de ácido linoleico conjugado. Los otros ejemplos de AGL están en el rango de diferentes productos naturales.

45

Ejemplo 2

El siguiente es un ejemplo de una cápsula de gelatina en acorde a la invención. Una composición que comprende ácido pinolénico es encapsulado en cápsula de gelatina acorde a los métodos bien conocidos. El resultado final del producto encapsulado contiene 500 mg de ácido pinolénico y una cápsula que puede ser tomada 4 veces diariamente por un adulto humano.

55

Ejemplo 3

Las siguientes figuras de los dibujos están referidos al ejemplo 3 y resumidas como sigue:

Figura 2 muestra los niveles de CCK en sangre (pmol/L) después de la ingesta de 3 g de ácido pinolénico AGL (dibujo superior, línea discontinua) o placebo (dibujo inferior; línea llena);

60

Figura 3 muestra los niveles de GLP1 en sangre (pmol/L) después de la ingesta de 3 g de ácido pinolénico AGL (dibujo superior, línea discontinua) o placebo (dibujo inferior; línea llena);

65

Figura 4 muestra el deseo de comer durante 4 horas después de la toma de 3 g de ácido pinolénico AGL (dibujo inferior, línea discontinua) o placebo (dibujo superior; línea llena);

ES 2 344 017 T3

La figura muestra la toma de alimento durante 4 horas después de la toma de 3 g de ácido pinolénico AGL (dibujo inferior, línea discontinua) o placebo (dibujo superior; línea llena);

Figura 6 muestra los niveles en sangre de CCK (pmol/L) después de la toma de 3 g de ácido pinolénico del ejemplo 3 (ii) TG (dibujo superior, línea discontinua) o placebo (dibujo inferior; línea llena);

Figura 7 muestra el deseo de comer durante 4 horas después de la ingesta de 3 g de ácido pinolénico TG (dibujo inferior, línea discontinua) o placebo (dibujo superior; línea llena); y

Figura 8 muestra la toma de alimento durante 4 horas después de la ingesta de 3 g de ácido pinolénico TG (dibujo inferior, línea discontinua) o placebo (dibujo superior; línea llena).

En las figuras, un asterisco indica una diferencia significativa.

Dos composiciones que contienen ácido pinolénico fueron ensayados: Ejemplo 3 (i) una composición que contiene ácido pinolénico en forma ácido libre graso (AGL); un ejemplo 3 (ii) una composición que contiene ácido pinolénico en forma de triglicérido (TG). El análisis de ácido graso metil ester (AGME) de dos composiciones es como sigue:

Nombre trivial	Nombre químico	Abreviación	Piñón de crudo	Ejemplo 3(ii) TG	Ejemplo 3(i) FFA
Ácido palmitico	Ácido hexadecanoico	C16:0	4.3	4.1	4.4
Ácido palmitico	Ácido hexadecenoico cis-9	C16:0	0.2	0.2	0.2
Ácido margárico	Ácido heptadecanoico	C17:0	0.1	0.1	0.1
Ácido esteárico	Ácido octadecanoico	C18:0	2.1	2.1	2.1
Ácido oleico	Ácido octadecenoico cis-9	C18:1	24.4	24.5	24.9
Ácido linoleico	Ácido octadecanoico cis-9,12	C18:2	44.3	45.5	45.9
Ácido taxoleico	Ácido octadecadienoico cis-5,9	5,9-C18:2	2.1	2.2	2.1
Ácido linoleico	Ácido octadecatrienoico cis-9,12,15	9,12,15-C18:3	0.3	0.2	0.2
Ácido pinolenoico	Ácido octadecatrienoico cis-5,9,12-C18:3	5,9,12-C18:3	15.6	15.9	15.8

Un estudio aleatorio doble ciego, cruzado de un placebo fue llevado con 18 mujeres con sobrepeso (IMC= 25-30) recibiendo cápsulas de 3 g de composición de ejemplo 3 (i) AGL, 3 g de composición ejemplo 3 (ii) TG o 3 g placebo (aceite de oliva) en combinación con un ligero desayuno bajo en grasas consistente en dos rebanadas de pan blanco y mermelada. A 0, 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos fueron tomadas muestras de sangre para los análisis de CCK, GLP-1, glucosa, insulina, ácidos grasos libres, y triglicéridos. Los sentimientos subjetivos de saciedad eran evaluados por escalas visuales análogas (EVA) para el deseo de comer, y consumo prospectivo de alimento. Cada sujeto recibió los tres tratamientos en orden aleatorio dentro de un periodo de 2 semanas con un periodo de descanso de una semana, según un diseño cuadrado latino.

ES 2 344 017 T3

Las escalas EVA consistían en líneas horizontales de 150 mm con frases ancladas en cada extremo que expresaban la sensación máxima positiva o negativa. Los sujetos dibujaban una línea vertical en el punto de línea horizontal donde correspondía con su sensación de hambre. Las distancias en las escalas de EVA eran convertidas en resultados entre 0 y 100.

Las concentraciones de CCK y GLP-1 fueron medidas en las tomas de sangre usando kits RIA comerciales y validados para humanos. Los tratamientos eran evaluados con ANOVA y se consideraba significativo con un $P < 0.05$.

Eventos secundarios (ESs) fueron monitorizados.

La toma de 3 g de compuesto del ejemplo 3 (i) de AGL inducía en el pico una liberación de CCK después de 30 minutos la cual era significativamente mayor que la liberación de CCK en respuesta al placebo (Figura 2). La liberación de GLP-1 alcanzó a los 60 minutos después de la toma la composición del ejemplo 3 (i) AGL y también era significativamente mayor que el nivel de GLP-1 en respuesta al placebo (figura 3). Después de un periodo de 4 horas, la cantidad total de CCK liberada en la corriente de sangre en respuesta a la composición del ejemplo 3(i) la toma de AGL era 60% más alta y para niveles de GLP-1 eran de 25% más altas que el placebo, medidas en las áreas debajo de la curva. La composición de AGL del ejemplo 3(i) también decreció el “deseo de comer” y la “posterior toma” resulta durante 4 horas después de la toma (figuras 4 y 5). Estos resultados eran menores a los 30 minutos después de la composición del AGL del ejemplo 3 (i) y las diferencias con el placebo eran significantes. La composición de TG del ejemplo 3(ii) afectaron a las sensaciones de apetito y la liberación de CCK era similar a la composición de AGL del ejemplo 3(i) (figuras 6 a 8).

En resumen, los datos mostrados de CCK y GLP-1 muestran una clara y significantes efectos en el tratamientos. Las composiciones de AGL y TG incrementaron los niveles de saciedad induciendo las hormonas, CCK y GLP-1, en sangre dentro de 30-60 minutos y los niveles continuaron altos después de cuatro horas después de la toma. Además, el deseo de comer y la siguiente toma eran menores en 30 minutos y da como resultado que después de la toma de las composiciones de placebo de AGL del ejemplo 3 (i) y TG del ejemplo 3(ii).

Efectos secundarios o serios efectos secundarios no fueron informados. Más adelante, los niveles de glucosa en la sangre, insulina, ácidos grasos libres y niveles de triglicéridos se midieron de 0-4 horas después de la toma de las cápsulas determinadas y mostradas en el que los niveles de triglicéridos y ácidos grasos no eran significativamente diferentes en cualquier punto entre los grupos. Los niveles de glucosa e insulina crecieron en ambos grupos debido la toma de azúcar ligera en el desayuno en el que tomaron todos los sujetos. En todos los grupos, la respuesta de glucosa e insulina era similar a la indicada al ejemplo 3 (i) AGL y ejemplo 3(ii) TG totalmente toleradas.

Sin embargo, los niveles de glucosa no incrementaron tanto la composición de AGL del ejemplo 3 (i) como la composición de TG del ejemplo 3(ii) y el placebo y más gradualmente decrece la composición de AGL del ejemplo 3 (i) y la composición de TG del ejemplo 3 (ii) que el placebo de aceite de oliva. Como resultado, el nivel de insulina aumentó lentamente y a continuación decreció rápidamente tras la composición de AGL del ejemplo 3(i) que después del placebo y después de la composición de TG del ejemplo 3(ii). Por lo que, la composición de AGL del ejemplo 3(i) causó cambios más moderados en los niveles de glucosa e insulina en sangre que el placebo con composición de TG del ejemplo 3(ii) estando entre ambos.

Ejemplo 4

La relativa liberación de CCK por un numero de diferentes componentes fue determinado in vitro y in vitro fue medido los efectos de varios de los ácidos grasos libres en la liberación de CCK de las células del intestino. El estudio mostró el efecto de los ácidos grasos libres del aceite de piñón y del ácido pinolénico como un ingrediente saciador (vea los datos debajo). Otros ácidos grasos presentes en alta y baja cantidad en aceite de piñón (como el ácido oleico, ácido linoleico, ácido taxoleico, ácido esciadonico y ácido juniperonico) no son capaces de inducir grandes cantidades de CCK. Un composición con 27% de ácido pinolénico induce ligeramente a grandes cantidades de CCK una con 16% de ácido pinolénico.

Cultivo celular

La línea celular enteroendocrina STC1-1 fue cultivada a 37°C en 5% CO₂, 95% aire atmosférico en medio de cultivo estándar (DMEM). Las células eran pasadas al alcanzar 70-80% de confluencia mediante lavado de la capa celular con PBS e incubación con una solución de tripsina-EDTA. Una densidad de preparación de cultivo en placas de 2x10⁶ células en 75 cm² se usó para subcultivo de rutina.

Protocolo experimental

Las células STC1 eran cultivadas en 6 placas de cultivo e incubas con un control medio, con o sin agentes testadores, durante 1 hora. Todos los agentes eran testados a una concentración de 100 μ M en forma de ácido graso libre. Desde que los ácidos grasos eran diluidos en etanol, el efecto del etanol era testado e indicado en los niveles de vaselina de CCK. Ácido caprico era usado como un control negativo de ácido graso, porque en realidad es sabido que

ES 2 344 017 T3

el ácido caprico no induce CCK. Se usaron efectos de bombesina como control positivo. Al final de la incubación el sobrenadante era recogido, centrifugado e inmediatamente enfriado a -20°C por RIA.

La viabilidad de la célula era chequeada por análisis microscópico, analizando ADN que era medido por fluorometría después de la extracción de los contenidos de la célula y además se midió la liberación de LDH.

Análisis RIA

La liberación de CCK era medida usando un estándar RIA CCK y los efectos de los ácidos grasos eran medidos en 6 ocasiones.

La tabla debajo muestra que las muestras con 16% y 27% de ácido pinolénico respectivamente produjeron 4 veces y 5 veces mayor nivel de CCK que el control negativo de ácido graso, ácido capricho. Un aceite derivado del *Pinus pinea* contiene menos de 1% en ácido pinolénico y es menos capaz de inducir la liberación de CCK (solo 2 veces en relación al ácido capricho). Otros ácidos grasos presentes en el aceite de piñón como el ácido oleico, ácido linoleico, ácido taxoleico y ácido juniperónico y esciandónico no eran capaces de inducir mayores cantidades de CCK (sobre 2 veces en relación al ácido capricho). En contraste con otros ácidos grasos 18:3 como el ácido punicico, gamma-linolenico, alpha-linoleico, y ácido alpha eleostearico son buenos inductores de CCK, similar al ácido pinolénico, pero no es que esos ácidos grasos son medidos en una pura forma donde el ácido pinolénico era solo testado al 16% y 27% de pureza. 95% puro de CLA (una mezcla 50:50 de isómeros c9, t1 y t10, c12) no era capaz de inducir cantidades altas de CCK similares a CLA con el ácido pinolénico. Un producto comercial consistente en una mezcla fraccionada de aceite de palma y aceite de avena no era también muy activo para inducir CCK (2 veces en relación al ácido capricho).

Compuesto	Cantidad relativa de CCK liberada
16% ácido pinolénico	188
27% ácido pinolénico	210
Aceite de <i>Pinus pinea</i> (0.35% ácido pinolénico)	101
Ácido oleico 18:1	90
Ácido linoleico 18:2	68
Ácido gamma-linolénico 18:3	140
Ácido alpha-linolénico 18:3	177
Ácido eleosteárico 18:3	212
Ácido punicico 18:3	320
Aceite de palmera/aciete de avena (comercial)	91
Mezcla CLA + 16% ácido linolénico	112
Ácido caprico	43
Etanol	53

Ejemplo 5

El ácido pinolénico TG y las composiciones de AGL pinolénico de los ejemplos 3 (i) y 3 (ii) son producidos usando el "aceite crudo de piñón" como materia prima.

Los piñones son aplastados por los proveedores en una torta de presión en la que se aplica una alta presión y temperatura. El calor generado durante la prensa es causado por el aplastamiento de las semillas en la torta de presión, y nunca alcanza más de 50°C. El extracto del aceite es filtrado pasando a través de telas. El producto obtenido es "un crudo de aceite de piñón".

El aceite crudo es procesado posteriormente para obtener composiciones de TG y AGL. El proceso consiste en las siguientes etapas: refinado, hidrólisis y destilación.

El paso del refinado es un refinado físico consistente en el paso del blanqueo usando tierra de blanqueo para eliminar los residuos de los contaminantes, seguido de la deodorización (corriente de stripping). El aceite refinado es la composición de TG.

ES 2 344 017 T3

El aceite de piñón refinado puede ser hidrolizado usando una lipasa en la comestible para obtener ácidos grasos libres, glicerol y residuos del aceite no completamente hidrolizado (di- y tri-glicéridos). Finalmente, la mezcla hidrolizada es destilada para obtener la composición de AGL.

5 Ejemplo 6

10 Las cápsulas de gel débil son producidas por un procesamiento recortador rotativo. El material para la cáscara de las cápsulas, el gel y el relleno son formulados por separado. Una vez la masa del gel y la masa de relleno estén listos, el gel es extendido en una película delgada para formar 2 lazos de gelatina los cuales serán enrollados en dos recortes por separado que determinaran el tamaño y la forma de las cápsulas. Como las películas de la gelatina se adaptan a los recortes, el relleno es cuidadosamente dosificado a niveles de 500 mg, 750 mg o 1000 mg de aceite por cápsula e inyectable entre dos lazos de gelatina los cuales son sellados inmediatamente después por aplicación de calor y presión. Las cápsulas caen desde la máquina y entonces se secan bajo una corriente de aire caliente.

15

Referencias citadas en la descripción

20 *Este listado de referencias citadas por el solicitante tiene como único fin la conveniencia del lector. No forma parte del documento de la Patente Europea. Aunque se ha puesto gran cuidado en la compilación de las referencias, no pueden excluirse errores u omisiones y la OEP rechaza cualquier responsabilidad en este sentido.*

Documentos de patentes citados en la descripción

- 25
- FR 2756465 A
 - WO 9843513 A
 - JP 61238729 A
 - JP 61058536 A
 - EP 1088552 A
 - US 6429190 B
 - US 20020119948 A
 - US 20020119915 A
 - WO 02088159 A
 - EP 1504778 A
 - CN 1377673 A
- 30
- 35

Literatura no relacionada con patentes citada en la descripción

- 40
- *J Am Oil Chem Soc*, 1998, vol. 75, 45-50
 - **SUGANO**. *Brit J. of Nutr.* 1994, vol. 72, 775-783
 - **MATSUO et al.** *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 1996, vol. 55 (4), 223-229.
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

ES 2 344 017 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de ácido pinolénico o sal o ésteres del mismo en la fabricación de una composición para el control de peso en un humano por reducción de sentimiento de hambre y/o incrementando la saciedad, donde la composición está en forma de suplemento alimenticio o composición de alimento.
2. El uso según la reivindicación 1, donde la composición consiste en una fuente de calcio.
- 10 3. El uso según la reivindicación 1 o 2, donde la composición consiste en ácido pinolénico como ácido graso libre, un mono-, di- o triglicérido, o mezcla de los mismos.
4. El uso según cualquier de las reivindicaciones 1 a 3, donde la composición es aceite de piñón o un derivado del aceite de piñón.
- 15 5. El uso reivindicado en la reivindicación 1, donde los ésteres son alquil ésteres teniendo de 1 a 6 átomos de carbono o mono-, di- o triglicéridos o mezclas de los mismos.
- 20 6. El uso según una cualquiera de las precedentes reivindicaciones, donde la composición adicional consiste en ácido graso o derivado del mismo seleccionado del grupo consistente en ácido linoleico, ácido oleico, ácido conjugado linoleico, mezclas de isómeros enriquecidos de ácido linoleico conjugado, EPA y DHA o una mezclas de los mismos.
7. El uso según la reivindicación 6 donde el ácido graso o derivado del mismo esta presente como un ácido graso libre, o mono-, di- o triglicérido o una mezcla del mismo.
- 25 8. El uso según la reivindicación 1, donde la composición posterior consiste en al menos un glicérido formado de ácido linoleico, ácido oleico, ácidos trans y ácidos grasos saturados y la composición es una composición del alimento.
- 30 9. El uso según la reivindicación 8, donde el glicérido es seleccionado de aceites líquidos de soja, girasol, semilla de colza, semilla de algodón; manteca de cacao y manteca de cacao equivalentes, aceite de palmera y fracciones del mismo, grasas fabricadas enzimáticamente, aceites de pescado y fracciones del mismo, ácido linoleico conjugado y mezcla enriquecida de isómeros del mismo, ácido gamma linoleico y meclas enriquecidas del mismo, aceites líquidos duros, y mezclas del mismo.
- 35 10. El uso según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición es un producto de alimento seleccionado del grupo consistente de: margarinas, untables bajas en grasas, untables muy bajas en grasas, untables bicontinuas, untables continuas acuosas, productos de confitería como chocolates, coberturas y rellenos, helados, coberturas de helado, inclusiones de helado; secados; mayonesas; salsas, grasas de pastelería; mantecas y queso; productos de merienda; barritas energéticas; barritas muesli; bebidas; productos lácteos, productos bajos en carbohidratos, productos bajos en calorías; sopas; cereales y batidos.
- 40 11. El uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, donde la composición es un suplemento de alimento en la forma de un gel suave o una cápsula dura que consiste en un material encapsulado seleccionado del grupo consistente en gelatina, almidón y derivados de almidón.
- 45 12. El uso en según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, donde la composición para el control de peso para ayudar a mantener el peso corporal y/o reducir el peso corporal y/o asistir al adelgazamiento del cuerpo y/o reduciendo la toma de calorías y/o permitiendo la toma de alimentos altas en calorías.
- 50 13. El ácido pinolénico o sal o ester del mismo para el uso en el control de peso en un humano por reducción de la sensación de hambre y/o aumentando la saciedad, donde el ácido pinolénico, sal o ester está en forma de un suplemento de alimento o una composición de alimento.
- 55 14. El ácido pinolénico o sal o ester del mismo como se reivindica en la reivindicación 13 donde el uso esta definido en una de las reivindicaciones de 2 a 12.
- 60
- 65

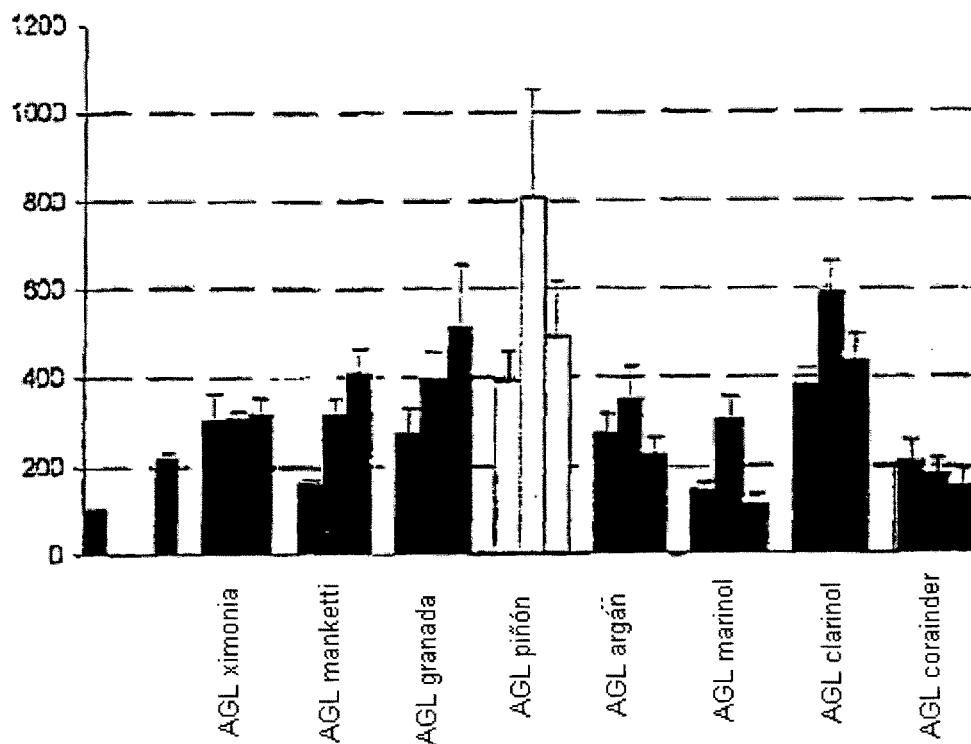


Figura 1

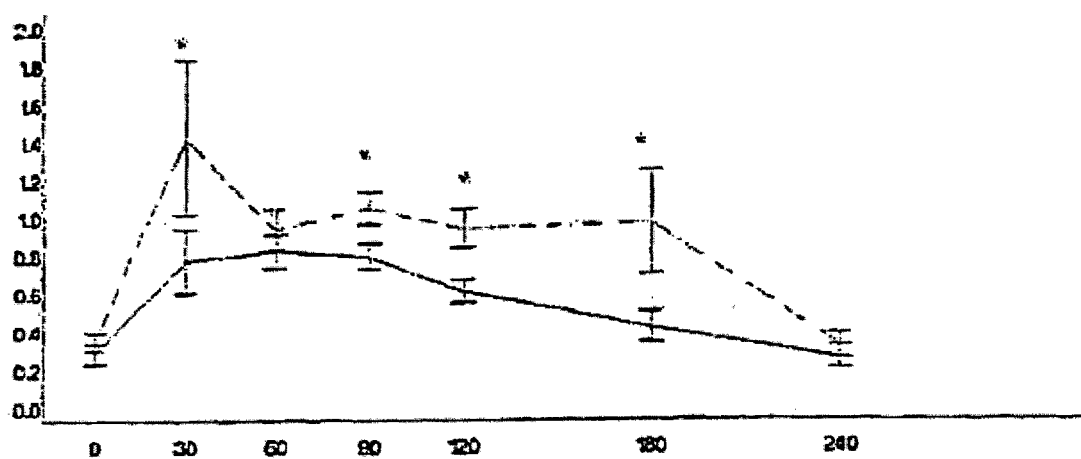


Figura 2

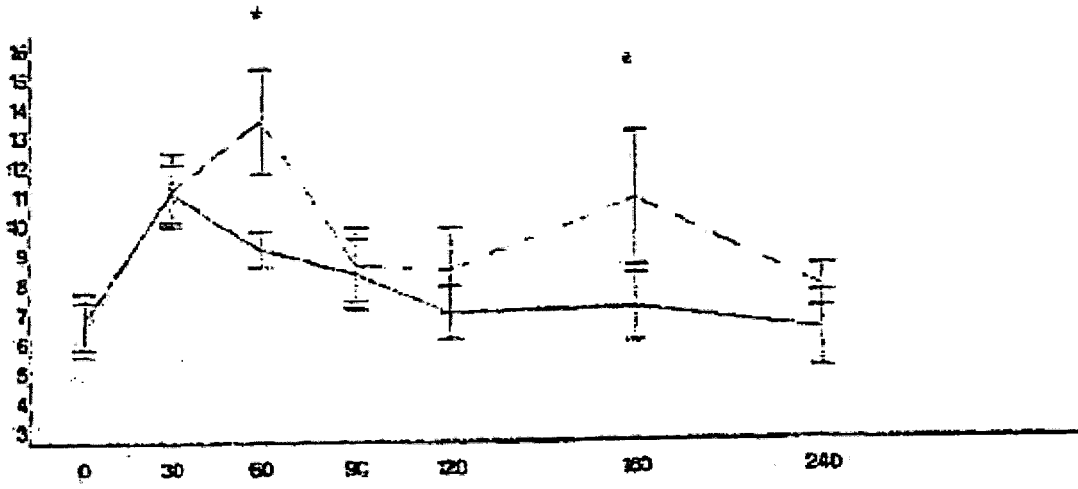


Figura 3

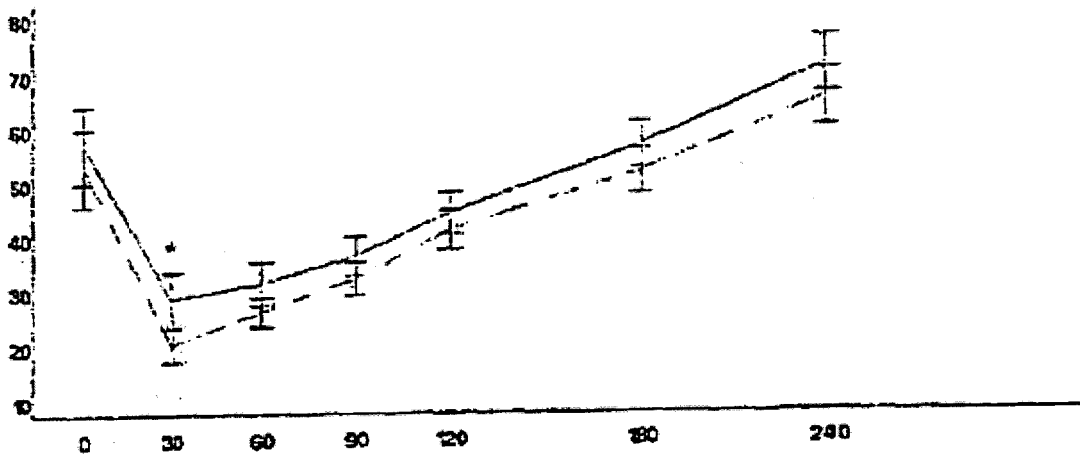


Figura 4

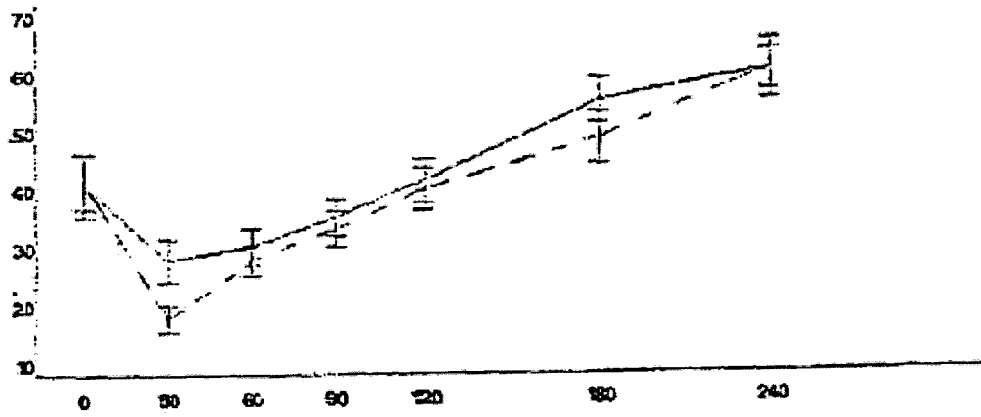


Figura 5

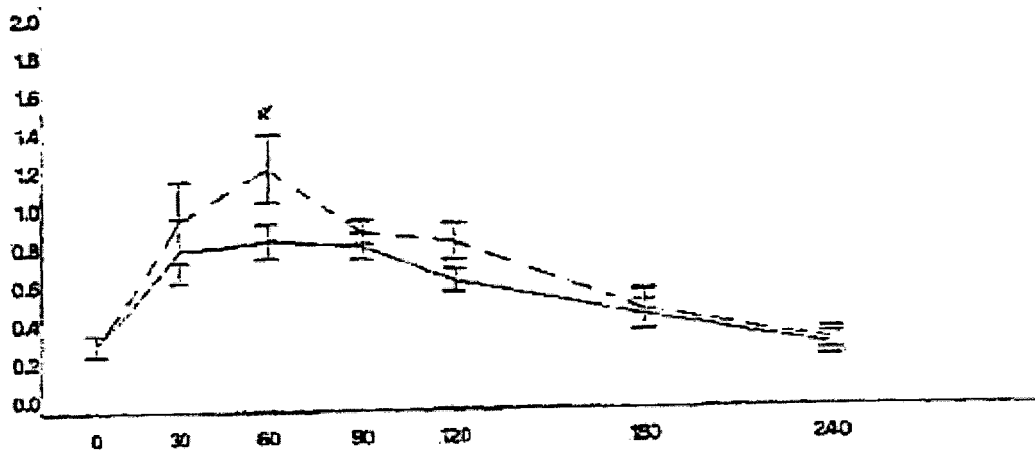


Figura 6

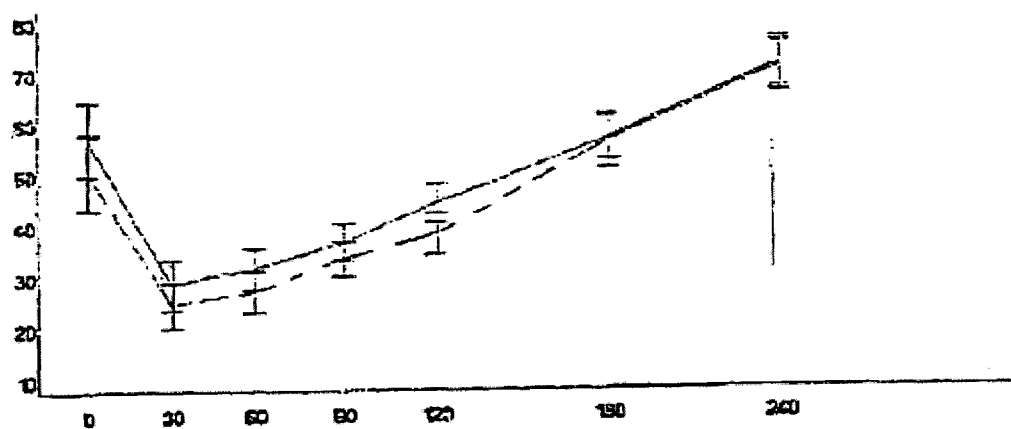


Figura 7

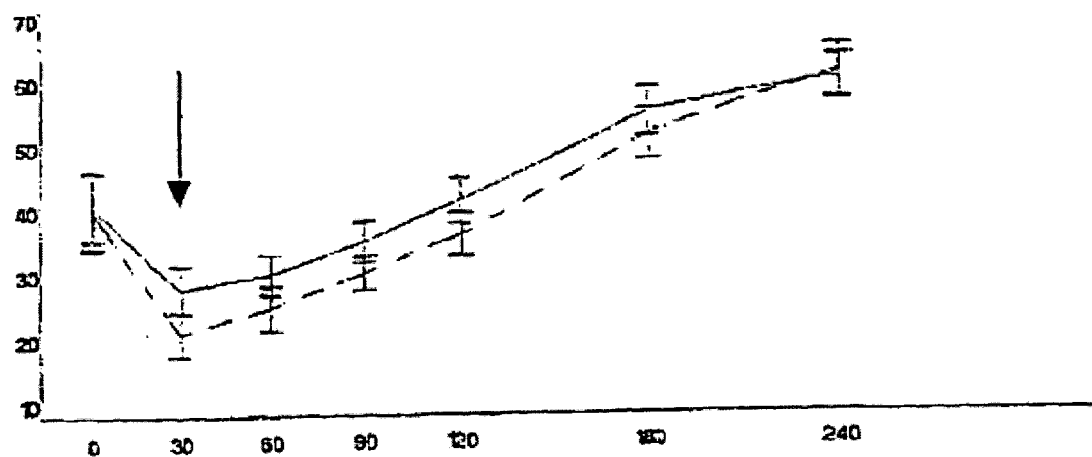


Figura 8