

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la
Propiedad Intelectual
Oficina internacional



(10) Número de Publicación Internacional
WO 2012/175780 A1

(43) Fecha de publicación internacional
27 de diciembre de 2012 (27.12.2012) **WIPO | PCT**

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
A23L 1/30 (2006.01)

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2012/070463

(22) Fecha de presentación internacional:
21 de junio de 2012 (21.06.2012)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
201131058 22 de junio de 2011 (22.06.2011) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US):
SERVICIO ANDALUZ DE SALUD [ES/ES]; Avda. de la Constitución, 18, E-41071 Sevilla (ES). **UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA** [—/ES]; Avenida Medina Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES). **CIBER FISIOLOGÍA DE LA OBESIDAD Y NUTRICIÓN (CIBERObn)** [—/ES]; Hospital Clínico Universitario Santiago de Compostela, Edificio D 1º planta Choupana s/n, E-15706 Santiago de Compostela (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): **DELGADO LISTA, Francisco Javier** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES). **PÉREZ MARTÍNEZ, Pablo** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES). **LÓPEZ SEGURA, Fernando** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93, E-4102 Sevilla (ES). **LÓPEZ MIRANDA, José** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES). **PÉREZ JIMÉNEZ, Francisco** [ES/ES]; Fundación Pública Andaluza Progreso

Y Salud, Avda. Américo Vespucio 5, Bloque 2, 2º Planta Izq., Parque Científico y Tecnológico Cartuja 93, E-41092 Sevilla (ES). **RANGEL ZÚÑIGA ORIOL, Alberto** [ES/ES]; Universidad De Córdoba, Avenida Medina Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES). **LUQUE DE CASTRO, María Dolores** [ES/ES]; Universidad De Córdoba, Avenida Medina Azahara, 5, E-14071 Córdoba (ES).

(74) Mandatario: **ILLESCAS TABOADA, Manuel**; C/ Recoletos, 13 5º Izda, E-28001 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), europea (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional (Art. 21(3))
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivindicaciones y para ser republicada si se reciben modificaciones (Regla 48.2(h))

(54) Title: PHENOLIC COMPOSITIONS OF OLIVE OIL IN A DETERMINED CONCENTRATION AND USES THEREOF

(54) Título : COMPUESTOS FENÓLICOS DEL ACEITE DE OLIVA EN UNA DETERMINADA CONCENTRACIÓN Y SUS USOS

(57) Abstract: The invention relates to the use of phenolic compositions of olive oil in a determined concentration, for developing a medicament or pharmaceutical or food composition for the prevention or treatment of arteriosclerosis in humans.

(57) Resumen: Uso de compuestos fenólicos del aceite de oliva en una determinada concentración, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica o alimentaria, para la prevención o el tratamiento de la arteriosclerosis en humanos.



WO 2012/175780 A1

Compuestos fenólicos del aceite de oliva en una determinada concentración y sus usos

La presente invención se encuentra dentro del campo de la nutrición, la medicina y la farmacología, y se refiere al uso de compuestos fenólicos del aceite de oliva en una determinada concentración, para la elaboración de un medicamento o composición farmacéutica o alimentaria, para la prevención o el tratamiento de la arteriosclerosis en humanos.

10 ESTADO DE LA TÉCNICA ANTERIOR

Uno de los métodos de cocina más usuales para preparar comida es la fritura. Este proceso puede afectar significativamente la cantidad y calidad de la ingesta de grasas, afectando a la salud del consumidor. Durante la fritura, la grasa sufre importantes cambios en su composición. En la fritura profunda, se producen reacciones químicas, como son los procesos de hidrólisis y oxidación, que afectan tanto a las cualidades nutricionales y sensoriales del alimento consumido como a la seguridad del consumidor. Además, el calentamiento del aceite reduce el contenido natural de los antioxidantes y genera compuestos tóxicos tales como polímeros y compuestos polares. En la generación de estos compuestos tóxicos, durante el proceso de calentamiento, influyen características intrínsecas del aceite, como el grado de insaturación de su contenido graso o su riqueza en agentes antioxidantes, y factores relacionados con la técnica del calentamiento, como la duración, temperatura y número de calentamientos. Los aceites de semillas tienen menor contenido de antioxidantes que el aceite de oliva, en especial que el aceite de oliva virgen y extravirgen, haciéndolo más vulnerables al calentamiento y generando tras su ingesta un incremento en la oxidación de lipoproteínas. Algunas opciones para mejorar la estabilidad de los aceites fritos incluyen la composición modificada en ácidos grasos, como el de girasol alto y medio oleico o el de canola alto oleico y bajo linolénico. Sin embargo, los aditivos son una alternativa potencial

para prevenir la oxidación del aceite de fritura, siendo capaz de mejorar su rendimiento.

Pocos estudios se han centrado en las consecuencias biológicas del consumo de aceites de fritura. Los estudios en modelos animales han demostrado que su ingesta aumenta los niveles de lipoproteínas aterogénicas (LDL). En el ser humano, incrementa ciertos productos proaterogénicos, como la fracción oxidada de los quilomicrones y LDL. Además se ha demostrado que el contenido de compuestos polares (sustancias prooxidantes que se generan al someter al aceite a altas temperaturas) en aceites de fritura son predictivos de la hipertensión arterial. Por su parte, otros estudios han asociado el consumo de compuestos polares con la disfunción endotelial, la hipertensión, y la arteriosclerosis, y por tanto con el riesgo cardiovascular.

Las consecuencias biológicas de la ingesta de aceites fritos son particularmente importantes en las personas obesas. En el medio interno de estas personas existe una inflamación sistémica crónica, de bajo grado, caracterizada por una producción anormal de citoquinas (moléculas de señalización celulares) que tienen propiedades inflamatorias y, además, se activan vías de señalización más complejas que favorecen el desarrollo de la arteriosclerosis. Esta inflamación de bajo grado se relaciona con la activación del factor NF- κ B, que es el principal mediador de la respuesta inflamatoria. Su incremento refleja la activación de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y se asocia con la expresión de una variedad de citoquinas relacionadas con la inflamación y la respuesta inmune, fenómenos que contribuyen al desarrollo de la arteriosclerosis.

La modulación de la respuesta inflamatoria por la dieta es uno de los principales campos de investigación actuales en nutrición y su relación con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares. El sistema inmune sufre, a lo largo del día, numerosos episodios de activación, en relación con las distintas ingestas diarias. Tras una comida, llegan al medio interno vascular ciertos

componentes potencialmente patógenos procedentes de la flora bacteriana intestinal, y/o de los alimentos ingeridos. Entre éstos destaca el lipopolisacárido (LPS), estructura común a la pared celular de múltiples bacterias y que tiene capacidad para estimular el sistema inmune y despertar una respuesta inflamatoria. Se ha demostrado que, en presencia elevada de ácidos grasos saturados en la ingesta, la cantidad de LPS y la activación subsecuente del sistema inflamatorio es mayor. Además, independientemente del tipo de grasa consumido, en las horas siguientes a una comida aumentan en sangre productos de glicación avanzada y se produce un incremento del estrés oxidativo. Todo esto puede resultar en una inflamación crónica de bajo nivel, debido a los continuos estímulos proinflamatorios derivados de la alimentación. Hallazgos recientes vinculan también la grasa de la dieta con la capacidad de absorción de los LPS procedentes de la flora bacteriana habitual del tubo digestivo (denominada microbiota), lo que, como hemos anteriormente, puede condicionar diferencias en el estado inflamatorio, en un mecanismo dependiente de NF-kB, a través de unos mediadores denominados receptores tipo Toll-4 (TLR4).

En definitiva, y a pesar de que el periodo postprandial provoca una situación proinflamatoria, existen datos que demuestran que hay determinados condicionantes, como el tipo de grasa consumida o la existencia de obesidad, que provocan un aumento de este estado inflamatorio. En el caso que nos ocupa, y resumiendo también las evidencias indicadas anteriormente, la ingesta de aceite previamente frito provoca un ambiente proaterogénico, ya que produce tanto un aumento de la inflamación postprandial, debido a la existencia en ese aceite de productos proinflamatorios y prooxidantes y, además, provoca la aparición de un perfil de lipoproteínas aterogénicas en plasma.

DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Los autores de la presente invención han realizado un estudio para conocer si se produce una activación de NF-kB postprandial en PBMCs de personas
5 obesas, como expresión de actividad inflamatoria, tras la ingesta aguda de cuatro diferentes aceites de fritura, con distinta composición y grasa y diferente contenido de antioxidantes, después de un proceso estandarizado de fritura. El conocimiento de las posibles diferencias de activación de NF-kB les ha permitido definir una determinada concentración de compuestos fenólicos del
10 aceite de oliva virgen que puede prevenir la activación de los mecanismos implicados en el desarrollo de arterioesclerosis en seres humanos, y que pueden administrarse en combinación con otros aceites previamente fritos, de forma que su adición artificial en los alimentos puede reproducir los efectos biológicos presentes en el aceite que los que posee de forma natural.

15 Por tanto, el uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen en una concentración de al menos 300 ppm, y preferiblemente de 400 ppm, así como sus composiciones farmacéuticas y alimentarias, son útiles para la prevención y el tratamiento de arteriosclerosis en humanos.

20 Así pues, un primer aspecto de la invención se refiere al uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen en una concentración de al menos 300 ppm, en la elaboración de una composición para la prevención o el tratamiento de la aterosclerosis en humanos, o alternativamente, a una composición que
25 comprende compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen en una concentración de al menos 300 ppm para la prevención o el tratamiento de la arteriosclerosis en humanos.

En una realización preferida de la presente invención, los compuestos fenólicos
30 del aceite de oliva virgen se encuentran en una concentración de al menos 350 ppm, y más preferiblemente, se encuentran en una concentración de al menos 400 ppm.

En otra realización preferida, los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen se obtienen del alperujo. En otra realización preferida, el humano presenta un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 24 kg/m².

- 5 El término “compuestos fenólicos” del aceite de oliva virgen, se refiere a un conjunto de fenoles entre los que se encuentran, pero sin limitarse a ellos, tirosol, apigenina, luteolina ácido vainilínico, ácido *p*-cumárico, oleuropeína y oleuropeína aglicona.
- 10 En otra realización preferida, la composición es una composición farmacéutica o medicamento. Más preferiblemente, la composición farmacéutica comprende además un vehículo farmacéuticamente aceptable, y aún más preferiblemente, la composición farmacéutica comprende, además, otro principio activo.
- 15 El término “medicamento”, tal y como se usa en esta memoria, hace referencia a cualquier sustancia usada para prevención, diagnóstico, alivio, tratamiento o curación de enfermedades en el hombre y los animales. En el contexto de la presente invención, la enfermedad es la arteriosclerosis.
- 20 Como se emplea aquí, el término “principio activo”, “sustancia activa”, “sustancia farmacéuticamente activa”, “ingrediente activo” o “ingrediente farmacéuticamente activo” significa cualquier componente que potencialmente proporcione una actividad farmacológica u otro efecto diferente en el diagnóstico, cura, mitigación, tratamiento, o prevención de una enfermedad, o
25 que afecte a la estructura o función del cuerpo del hombre u otros animales. El término incluye aquellos componentes que promueven un cambio químico en la elaboración del fármaco y están presentes en el mismo de una forma modificada prevista que proporciona la actividad específica o el efecto.
- 30 Las composiciones de la presente invención pueden formularse para su administración a un animal, y más preferiblemente a un mamífero, incluyendo al hombre, en una variedad de formas conocidas en el estado de la técnica.

Así, pueden estar, sin limitarse, en disolución acuosa estéril o en fluidos biológicos, tal como suero. Las disoluciones acuosas pueden estar tamponadas o no tamponadas y contener componentes activos o inactivos adicionales. Los componentes adicionales incluyen sales para modular la fuerza iónica, conservantes incluyendo, pero sin limitarse, agentes antimicrobianos, antioxidantes, quelantes y similares, así como nutrientes incluyendo glucosa, dextrosa, vitaminas y minerales. Alternativamente, las composiciones pueden prepararse para su administración en forma sólida. Las composiciones pueden combinarse con varios vehículos o excipientes inertes, incluyendo pero sin limitarse a; aglutinantes tales como celulosa microcristalina, goma tragacanto, o gelatina; excipientes tales como almidón o lactosa; agentes dispersantes tales como ácido algínico o almidón de maíz; lubricantes tales como estearato de magnesio, deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; o agentes aromatizantes tales como menta o salicilato de metilo.

Tales composiciones y/o sus formulaciones pueden administrarse a un animal, incluyendo un mamífero y, por tanto, al hombre, en una variedad de formas, incluyendo, pero sin limitarse a, intraperitoneal, intravenoso, intramuscular, subcutáneo, intracecal, intraventricular, oral, enteral, parenteral, intranasal o dérmico. Preferiblemente, la vía de administración es oral.

La dosificación para obtener una cantidad terapéuticamente efectiva depende de una variedad de factores, como, por ejemplo, la edad, peso, sexo o tolerancia, del mamífero. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen que produzcan el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias del aceite de oliva virgen, así como del resto de los componentes de la composición, y el efecto terapéutico a conseguir. Los "adyuvantes" y "vehículos farmacéuticamente aceptables" que pueden ser

utilizados en dichas composiciones son los vehículos conocidos por los técnicos en la materia.

El término “excipiente” hace referencia a una sustancia que ayuda a la absorción, distribución o acción de cualquiera de los principios activos de la presente invención, estabiliza dicha sustancia activa o ayuda a la preparación del medicamento en el sentido de darle consistencia o aportar sabores que lo hagan más agradable. Así pues, los excipientes podrían tener la función de mantener los ingredientes unidos, como, por ejemplo, almidones, azúcares o celulosas, función de endulzar, función de colorante, función de protección del medicamento, como, por ejemplo, para aislarlo del aire y/o la humedad, función de relleno de una pastilla, cápsula o cualquier otra forma de presentación como por ejemplo el fosfato de calcio dibásico, función desintegradora para facilitar la disolución de los componentes y su absorción en el intestino, sin excluir otro tipo de excipientes no mencionados en este párrafo.

El término excipiente “farmacéuticamente aceptable” hace referencia a que el excipiente esté permitido y evaluado de modo que no cause daño a los organismos a los que se administra.

Además, el excipiente debe ser farmacéuticamente adecuado, es decir, un excipiente que permita la actividad del principio activo o de los principios activos, es decir, que sea compatible con el principio activo, en este caso, el principio activo es cualquiera de los compuestos de la presente invención.

Un “vehículo farmacéuticamente aceptable” se refiere a aquellas sustancias, o combinación de sustancias, conocidas en el sector farmacéutico, utilizadas en la elaboración de formas farmacéuticas de administración e incluye, pero sin limitarse, sólidos, líquidos, disolventes o tensioactivos.

El vehículo, al igual que el excipiente, es una sustancia que se emplea en el medicamento para diluir cualquiera de los compuestos de la presente invención

hasta un volumen o peso determinado. El vehículo farmacéuticamente aceptable es una sustancia inerte o de acción análoga a cualquiera de las células de la presente invención. La función del vehículo es facilitar la incorporación de otros compuestos, permitir una mejor dosificación y administración o dar consistencia y forma a la composición farmacéutica. Cuando la forma de presentación es líquida, el vehículo farmacéuticamente aceptable es el diluyente.

En otra realización preferida la composición es una composición alimentaria. Más preferiblemente, la composición alimentaria comprende un suplemento nutricional. Aún más preferiblemente, la composición comprende una matriz alimentaria. En otra realización preferida, la matriz alimentaria se selecciona de la lista que comprende: leche, yogurt, queso, leche fermentada, leche de soja, cereales precocinados, galletas, pan, bollos, mantequilla, margarina, salchichas, aceites de freír, aceites vegetales, condimentos, zumos de frutas, siropes, helados, productos congelado, gomas de mascar y alimentos intermedios.

En otra realización preferida la matriz alimentaria es un aceite vegetal o una mezcla de aceites vegetales. Más preferiblemente, el aceite vegetal es aceite de girasol. La mezcla de aceites vegetales comprende: aceite de girasol alto oleico y aceite de colza. En otra realización más preferida la mezcla de aceites vegetales comprende: aceite de girasol alto oleico y aceite de colza.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de una composición de la invención (la composición alimentaria o la composición farmacéutica), para prevenir la generación de un ambiente proaterogénico en el endotelio.

Otro aspecto de la invención se refiere al uso de la composición alimentaria de la invención en la elaboración de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la arterioesclerosis, preferentemente en humanos.

A lo largo de la descripción y las reivindicaciones la palabra "comprende" y sus variantes no pretenden excluir otras características técnicas, aditivos, componentes o pasos. Para los expertos en la materia, otros objetos, ventajas y características de la invención se desprenderán en parte de la descripción y en parte de la práctica de la invención. Los siguientes ejemplos y dibujos se proporcionan a modo de ilustración, y no se pretende que sean limitativos de la presente invención.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

10

Figura 1 A: Análisis cuantitativo de la activación postprandial de NF- κ B, en células mononucleares de sangre periférica, de las personas que recibieron cuatro modelos de desayuno, con productos de bollería elaborados con distintos tipos de aceites. Puede verse que solo los aceites con polifenoles VOO (Aceite de oliva virgen) y SOP (Aceite vegetal añadido con polifenoles) redujeron la expresión del NF- κ B, reflejando que evitaron el estado proinflamatorio inducido por los otros aceites (SFO (Aceite de girasol) y SOD (Aceite de semilla con Dimetilpolisiloxano).

Figura 1B: Análisis cuantitativo de la activación postprandial de I κ B- α , en células mononucleares de sangre periférica, de las personas que recibieron cuatro modelos de desayuno, con productos de bollería elaborados con distintos tipos de aceites. Su incremento con los aceites con polifenoles VOO (Aceite de oliva virgen) y SOP (Aceite vegetal añadido con polifenoles) se interpreta como una capacidad de estos aceites para amortiguar la respuesta inflamatoria dependiente de la activación del NF- κ B.

Figura 2: A las dos horas de la ingesta de los desayunos, con distinto contenido de aceites, se observó que con los aceites ricos en polifenoles (VOO y SOP) no se incrementan los niveles de Lipopolisacárido plasmático (LPS), señalando que no existe una absorción intestinal de dicho componente bacteriano.

EJEMPLOS

Se realizó un ensayo clínico que se describe a continuación, y que pone de manifiesto la especificidad y efectividad de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen en una determinada concentración en la prevención de la activación inflamatoria que favorece el desarrollo de la arterioesclerosis en humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población de estudio

10

El estudio se realizó en veinte obesos sanos (edad media de 56 años, rango entre 40–70). Todos ellos firmaron su consentimiento informado y se les realizó una historia médica completa, examen físico y análisis de química clínica antes de la inscripción. Tenían un índice de masa corporal (IMC) promedio de 37,3 (29,4–44,9) kg/m², perímetro de cintura de 113,7 cm (88–145), los niveles plasmáticos de colesterol total (CT) de 201.1 ± 3.8 mg/dl, los niveles plasmáticos de triglicéridos (TG) 102.9 ± 3.6 mg/dl, los niveles de colesterol de lipoproteínas de baja densidad (LDLc) de 130.2 ± 3.0 mg/dL y los niveles de colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (HDLc) de 50.8 ± 1.2 mg/dl, niveles de glucosa plasmática de 100.9 ± 0.9 mg/dL y niveles de insulina de 10.7 ± 0.5 mU/L. Ninguno de los participantes mostraron indicios de enfermedades crónicas (hepática, renal, tiroides, corazón). Todos fueron no diabéticos, no fumadores, sin manifestación clínica de enfermedad cardiovascular y sin tratamiento. Ninguno tomaba medicamentos o vitaminas que se conozca que afectan a los lípidos plasmáticos. El protocolo del estudio fue aprobado por la Comisión de Investigación del Hospital Universitario Reina Sofía, de acuerdo con el marco institucional y las Directrices de Buenas Prácticas Clínicas.

Diseño del estudio

Todos los voluntarios recibieron cuatro desayunos con magdalenas elaboradas con cuatro aceites diferentes. Cada desayuno contenía 0,45 ml de aceite y 40 equivalentes de retinol, por kilogramo de peso corporal, y una distribución de calorías de 56% de grasas, 9% de proteínas y 35% de hidratos de carbono. Los desayunos eran administrados con un diseño aleatorizado y cruzado, siguiendo un modelo de cuadrado latino, lo que aumentó el poder del estudio. Los voluntarios fueron divididos en cuatro grupos de forma aleatoria y estratificada por sexo para recibir cada desayuno con un periodo de lavado de dos semanas entre cada uno de ellos. Los aceites fueron sometidos previamente a un proceso de fritura estandarizado (20 ciclos de calentamiento a 180 °C durante 5 minutos por ciclo). Los aceites utilizados en el desayuno, así como su composición, son los siguientes:

1. Aceite de oliva virgen (VOO) con 400 ppm de antioxidantes fenólicos naturales: 70,5% ácidos grasos monoinsaturados (MONO), 11,1% de ácidos grasos poliinsaturados (POLI) y 18,4% de ácidos grasos saturados (SAT),
2. Aceite de girasol (SFO): 34,3% MONO, 58,3% de POLI y 7.3% de SAT.
3. Mezcla de aceites de semillas mixta (30% de girasol alto oleico y 70% de aceite de colza) enriquecido con 2 mg/kg de dimetilpolisiloxano antioxidante (SOD): 71,8% de MONO, 18,0% de POLI y 10,2% SAT.
4. Mezcla de aceites y semillas (30% de girasol alto oleico y 70% de aceite de colza) enriquecido con 400 ppm de compuestos fenoles extraídos del residuo de la producción de aceite de oliva-alperujo (SOP): 76,7% de MONO, 17,6% de POLI y 5,8% de SAT.

Enriquecimiento de los aceites con fenoles extraídos de alperujo.

- Se realizó con el método de Girón *et al.* (2009. *J Agric Food Chem* 57(7): p. 2797-802), basado en extracción sólido-líquido (S-L). Un volumen de extracto de alperujo se puso en contacto con 3 ml de aceite y se agitó vigorosamente

durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la fase etanol-agua se separó por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. El aceite enriquecido resultante se analizó para determinar la concentración de fenoles totales e individuales.

- 5 **Procedimiento de fritura.** Dos litros de cada aceite se colocó en una freidora inoxidable y se sometió a 20 ciclos de calentamiento (a $180^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos/ciclo).

Determinación de fenoles en los aceites

10

La concentración de fenoles en los aceites enriquecidos se determinó tanto de forma global (método de Folin–Ciocalteu), como individual (separación cromatográfica y detección mediante espectrometría de absorción molecular — HPLC–DAD) después de la extracción de los analitos seleccionados.

15

Extracción de los compuestos fenólicos del aceite. Alícuotas de aceite de 2 g se agitaron durante 30 min con 20 ml de metanol y 2 ml de hexano. La fase de metanol, que contiene los compuestos fenólicos, se separó por centrifugación, se evaporó hasta la preconcentración adecuada y se almacenó a -20°C hasta su posterior análisis.

20

Separación y cuantificación mediante HPLC–DAD. El método aplicado fue el propuesto por el Consejo Oleícola Internacional (COI) para la determinación individual de los compuestos fenólicos del aceite de oliva. La columna analítica empleada fue una Inertisil ODS-2 de fase reversa de 250×4 mm i.d., $5\text{ }\mu\text{m}$; el volumen de inyección de $10\text{ }\mu\text{l}$ y la fase móvil una mezcla de A (agua acidificada con 0,2% de ácido fosfórico) y B (acetonitrilo- metanol, 1:1 v / v) a 1 ml/min. Una elución lineal inicial en gradiente de 0 a 50% B en 40 minutos fue seguido por otros gradiente de elución lineal de 50 a 60% B en 5 minutos y un

25

30 tercer gradiente de 60 a 100% B en 10 minutos. Por último, el instrumento fue mantenido en condiciones isocráticas (100% B) durante 2 min. Es necesaria una etapa de equilibración de 5 minutos para restablecer las condiciones

iniciales y alcanzar la estabilización de la fase móvil. Los fenoles eluidos se midieron a 230, 280, 325 y 350 nm (tiempo de elución total inferior a 57 min).

Muestras de sangre y aislamiento de PMBCs

5

Se obtuvieron muestras de sangre venosa (40 ml) en tubos con EDTA tras 12 horas de ayuno y a las 4 horas después de la ingestión del desayuno. Las muestras se diluyeron 1:1 en PBS, y las células se separaron en 15 ml de gradiente de Ficoll (solución de aislamiento de linfocitos, Rafer) por
10 centrifugación 800 x g durante 25 min. La fase de PBMCs se extrajo con pipeta Pasteur, se lavó dos veces con PBS frío y se suspendió en solución tampón de lisis [10 mM de N-2 10 mM de N-2 hidroxietil piperazina ácido-N'-2-etano (HEPES), pH 7,5, 15 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 2 MgCl₂, 1 mM ditioneitol (TDT), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF).

15

Análisis de lípidos y determinaciones bioquímicas

Los parámetros lipídicos se midieron con un autoanalizador modular DDPII Hitachi (Roche, Basel, Switzerland) utilizando reactivos específicos
20 (Boehringer-Mannheim, Mannheim, Germany). Los triglicéridos (TG) y el colesterol total (CT) se midió por métodos colorimétricos enzimáticos y el colesterol HDL (C-HDL) por métodos enzimáticos. El colesterol LDL (C-LDL) se calculó por la formula de Friedewald basada en los valores de CT, TG, y C-HDL. Las concentraciones de glucosa plasmática se midieron en un analizador
25 Hitachi 917 (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) por el método de la glucosa oxidasa (GOD-PAP).

Extracción de la proteína nuclear

30 Las células se resuspendieron en tampón de lisis celular, se descongelaron y se lisaron en hielo durante 10 minutos. Los tubos se agitaron para romper las membranas celulares y se centrifugaron a 16 000 x g a 4 ° C durante 5 min.

Luego se resuspendieron en solución tampón de lisis celular (10 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM KCl, 0.1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,5% NonidetP - 40 y 0,5 mM PMSF) y se mantuvieron en hielo durante 10 minutos, siendo finalmente centrifugadas a 16 000 x g a 4 ° C durante 5 min. Los sobrenadantes se
5 almacenaron como extractos citoplasmáticos. Los pellets que contienen la fracción nuclear se resuspendieron en tampón de extracción nuclear [20 mM de HEPES (pH 7,5), 400 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 mM PMSF] y se incubaron en hielo durante 20 min. A continuación, la suspensión se centrifugó a 16 000 x g durante 15 min a 4 ° C y del sobrenadante se recogió el extracto
10 nuclear. La concentración de proteínas fue estimada utilizando el reactivo de Bradford (Bio-Rad).

Ensayos de movilidad electroforética Shift (EMSA)

15 Los extractos nucleares fueron testados mediante su capacidad de unión con NF- κ B, utilizando oligonucleótidos consenso SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 3, de Santa Cruz Biotechnology, utilizando el kit de Digoxigenina EMSA de Roche Diagnostics (Basilea, Suiza). Un total de 15 μ g de proteína nuclear fueron tratados de acuerdo con las instrucciones del kit. Los complejos se detectaron
20 con el sustrato quimioluminiscente CSPD y fueron expuestos a Hyperfilm de Amersham Biosciences, en un soporte de película de 4 – 16 horas a temperatura ambiente.

Western Blotting

25 Los extractos citoplasmáticos (70 μ g) se resuspendieron en un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) de electroforesis al 12% de dodecil sulfato sódico y posteriormente se transfirieron a membranas de nitrocelulosa en Tris 25 mM, glicina 192 mM, metanol al 20% y se sometieron a 15 V durante 1 hora usando
30 transferencia semi-seca y siguiendo los protocolos estándar. La cantidad de proteína transferida se comprobó utilizando la solución de mancha Ponceau-S en 1% de ácido acético. Los sitios de unión inespecífica se bloquearon por

incubación de la membrana en TTBS (25 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7,6), con 5% de leche en polvo. Las membranas se incubaron durante una noche a 4 °C con anticuerpos primarios policlonales anti-I κ B- α (Santa Cruz Biotechnology) (1:200 en 5% de leche descremada en polvo en TTBS). La membrana se lavó con TTBS y se incubó con el anticuerpo secundario [IgG anti-conejo, conjugado con HRP (Biotecnología Santa Cruz) (1:1000 en 5% de leche en polvo en TTBS)] durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de un lavado con TTBS, las proteínas se detectaron mediante el kit de quimioluminiscencia del reactivo Luminol Reagent detection system (Santa Cruz Biotechnology). Los niveles de proteína se cuantificaron con el densitómetro calibrado SG-800 (Bio-Rad) y fueron analizados con el Quantity One 4.6.5 software. Los resultados fueron calculados en términos de densidad óptica integrada (IOD) normalizada según el método de tinción con rojo Ponceau S y se expresaron en unidades arbitrarias (UA).

15

Determinación de LPS

La endotoxinas (LPS) se midieron mediante una prueba de lisado de amebocitos de Limulus (QCL-1000; Lonza Ibérica, SA Barcelona, España), según lo recomendado por el fabricante. Se recolectó el suero en tubos no pirogénicos y se congeló a -20 °C hasta el ensayo. Todos los procedimientos fueron realizados en condiciones no pirogénicas. El suero fue diluido al 1:5, mezclados con lisado de amebocitos de Limulus (LAL) y fue incubado a 37 °C durante 10 minutos. Una solución de sustrato se mezcló con la muestra LAL y se incubó a 37 °C durante 6 minutos. La reacción se detuvo con el reactivo de parada. Cuando la endotoxina está presente en el suero, se desarrolla un color amarillo. La absorbancia de la solución coloreada se leyó a 405 nm. La recuperación de lipopolisacárido fue de entre 50 y 200%. La sensibilidad del ensayo fue de 0,005 unidades Ehrlich/ml (0,5 pg/ml). Los coeficientes intra- e inter-ensayo de variación para la determinación de LPS fueron entre 5–10%.

30

Análisis estadístico

Todos los datos se expresan como valores medios y error típico. Se utilizó SSPS 15 para Windows (SPSS Inc., Chicago) para el análisis estadístico. Los
5 datos fueron analizados utilizando el análisis de varianza (ANOVA) para medidas repetidas. El estadístico de contraste utilizado en el supuesto de que la esfericidad no se cumpliera era de Greenhouse-Geisser. En este análisis se estudió:

1. El efecto del tipo de aceite ingerido, independiente del tiempo.
- 10 2. El punto de tiempo postprandial.
3. La interacción de ambos factores.

Estos valores indican el grado de la respuesta postprandial en cada grupo de sujetos a cada aceite $p < 0,05$ fue considerado significativo.

15 RESULTADOS

Consumo de aceites fritos y lipemia postprandial

Los niveles de TGL postprandiales en plasma se incrementaron tras el
20 consumo de los cuatro aceites ($p < 0,05$), pero no se encontró ninguna diferencia entre los aceites (datos no mostrados).

Por otro lado, no se observaron cambios significativos en los niveles de CT, C-HDL y C-LDL.

25

Determinación de fenoles en los aceites

Se determinó el contenido de compuestos fenólicos, antes y después de 20 ciclos de calentamiento a 180 °C, en los aceites que los contenían, a saber:
30 VOO (presente de forma natural) y SOP (con compuestos fenólicos añadidos), En ambos casos los ciclos de calentamiento redujeron la cantidad de algunos de los fenoles, pero la mayoría de ellos (tirosol, apigenina, luteolina, ácido

vainilínico, ácido *p*-cumárico, oleuropeína y oleuropeína aglicona dialdehído) todavía estaban presentes tras el calentamiento.

Ingestión aguda de los diferentes aceites de fritura y expresión de NF- κ B y de I κ B- α

Con el fin de examinar si la ingestión aguda en forma de desayuno de cuatro aceites diferentes de fritura con distinto perfil lipídico y contenido de compuestos antioxidantes podría influir en la respuesta inflamatoria de las células mononucleares, los extractos nucleares de PBMCs recogidos a las 12 horas de ayuno y 4 horas después de ingerir el desayuno fueron analizados por EMSA. Los resultados mostraron que la ingesta del desayuno que contenía VOO ($p = 0,029$) y el desayuno con SOP ($p = 0,009$) disminuyó la activación de NF- κ B posprandial (FIGURA 1A), aumentando la expresión de su inhibidor (FIGURA 1B), frente al resultado encontrado con los aceites carentes en compuestos fenólicos.

Cambios en suero de los niveles de LPS en respuesta a la ingesta de los diferentes aceites fritos

Se ha estudiado si la ingesta de cuatro diferentes aceites fritos afecta la absorción de LPS endógena. Se observó una disminución significativa del nivel sérico postprandial de LPS, 2 h después de la ingesta de ambos VOO ($p = 0,043$) y SOP ($p = 0,032$) en comparación con el tiempo basal. Por el contrario, no hubo cambios significativos después del consumo de los desayunos basados en SFO y SOD (FIGURA 2).

REIVINDICACIONES

- 1- El uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen en una concentración de al menos 300 ppm, en la elaboración de una
5 composición para la prevención o el tratamiento de la arteriosclerosis en humanos.
- 2- El uso según la reivindicación anterior, donde los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen se encuentran en una concentración de al
10 menos 350 pp.
- 3- El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1–2, donde los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen se encuentran en una concentración de al menos 400 ppm.
- 15 4- El uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen según cualquiera de las reivindicaciones 1–3, donde los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen se obtienen del alperujo.
- 20 5- El uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen según cualquiera de las reivindicaciones 1–4, donde el humano presenta un índice de masa corporal (IMC) mayor o igual a 24 kg/m^2 .
- 25 6- El uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen según cualquiera de las reivindicaciones 1–5, donde la composición es una composición farmacéutica o un medicamento.
- 30 7- El uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen según la reivindicación 6, donde la composición farmacéutica además comprende un vehículo farmacéuticamente aceptable.

- 8- El uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen según cualquiera de las reivindicaciones 6–7, donde la composición además comprende otro principio activo.
- 5 9- El uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen cualquiera de las reivindicaciones 1–5, donde la composición es una composición alimentaria.
- 10 10-El uso de los compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen según la reivindicación 9, donde la composición alimentaria incluye un suplemento nutricional.
- 15 11-Una composición alimentaria según se describe en cualquiera de las reivindicaciones 9–10, que comprende compuestos fenólicos del aceite de oliva virgen y una matriz alimentaria.
- 20 12-Una composición alimentaria según la reivindicación anterior, donde la matriz alimentaria se selecciona de la lista que comprende: leche, yogurt, queso, leche fermentada, leche de soja, cereales precocinados, galletas, pan, bollos, mantequilla, margarina, salchichas, aceites de freír, aceites vegetales, condimentos, zumos de frutas, siropes, helados, productos congelado, gomas de mascar y alimentos intermedios.
- 25 13-Una composición alimentaria según la reivindicación 12, donde la matriz alimentaria es un aceite vegetal o una mezcla de aceites vegetales.
- 30 14-Una composición alimentaria según la reivindicación 13, donde el aceite vegetal es aceite de girasol.
- 30 15-Una composición alimentaria según la reivindicación 13, donde la mezcla de aceites vegetales comprende: aceite de girasol alto oleico y aceite de colza.

16-Uso de la composición alimentaria según cualquiera de las reivindicaciones 11–15, para prevenir la generación de un ambiente proaterogénico en el endotelio.

1/2

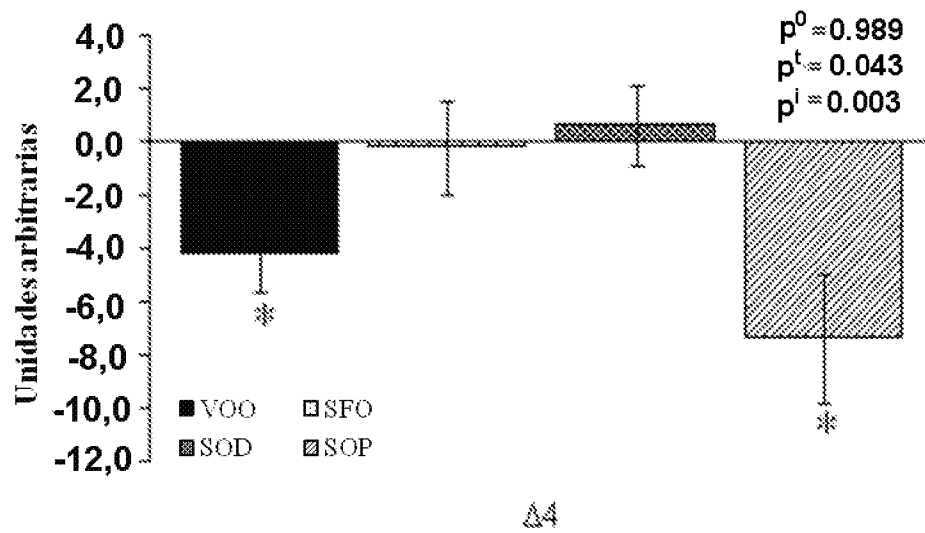


FIG. 1-A

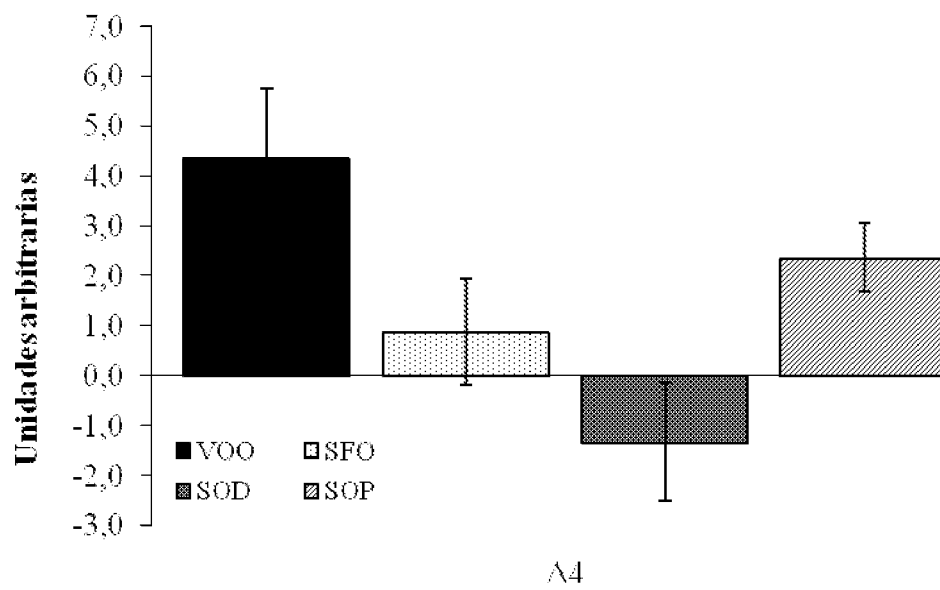


FIG. 1-B

2/2

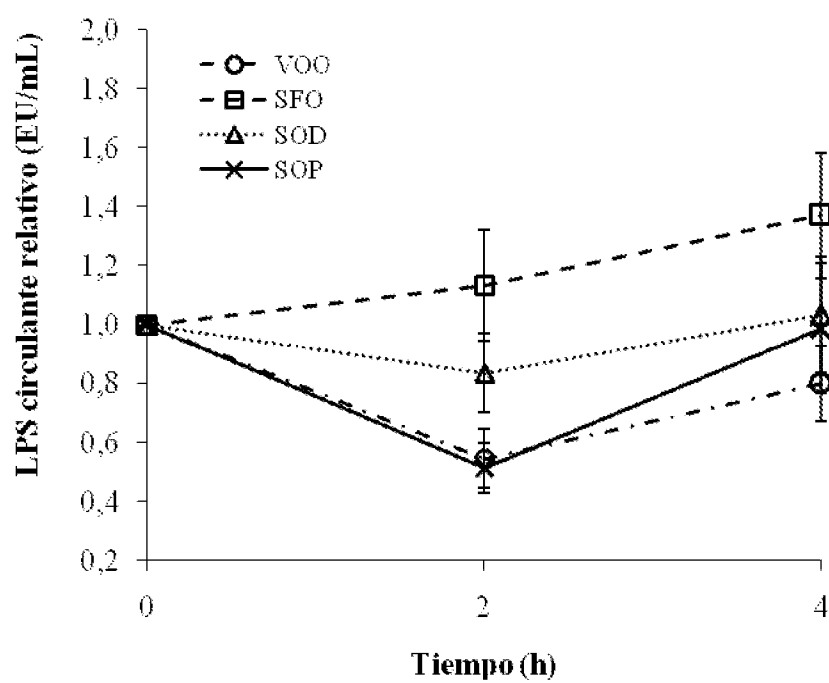


FIG. 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ES2012/070463

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L1/30 (2006.01)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	ES 2288123 A1 (FURFURAL ESPANOL S.A) 16.12.2007,	1-15 16
X	WO 0038541 A1 (UNIELVER) 06.07.2000, claims.	1-15
A	ES 2283191 A1 (ANTAS PHARMA S. A.) 16.10.2007,	1-16
A	EP 1221286 A1 (UNIELVER) 10.07.2002,	
A	US 6641850 B1 (STEWART & LYNDIA RESNICK TRUST) 04.11.2003,	1-16
P,X	Camargo A. et al. "Virgin olive oil phenolic compounds interact with cellular signalling pathways". Clinica e Investigacion in Arteriosclerosis. 2011. Vol. 23, N° 6, pages 262 – 268. ISSN 0214-9168 (print)	1-16

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance.	
"E" earlier document but published on or after the international filing date	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"O" document referring to an oral disclosure use, exhibition, or other means.	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
09/10/2012

Date of mailing of the international search report
(16/10/2012)

Name and mailing address of the ISA/

Authorized officer
J. Manso Tomico

OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Facsimile No.: 91 349 53 04

Telephone No. 91 3495583

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ES2012/070463

Information on patent family members

Patent document cited in the search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
ES2288123 AB	16.12.2007	WO2007141352 A EP2027783 A EP20070730462 MX2008015409 A US2010022464 A	13.12.2007 25.02.2009 13.04.2007 23.03.2009 28.01.2010
----- WO0038541 A	----- 06.07.2000	CA2355778 A AU3036100 A BR9916539 A EP1139796 AB EP19990964527 CZ20012326 A SK8992001 A HU0104810 A ZA200104534 A TR200101837 T PL349522 A AU763067 B AT291855 T DK1139796 T PT1139796 E ES2238868 T DE69924522 T US6942890 B	06.07.2000 31.07.2000 11.09.2001 10.10.2001 06.12.1999 14.11.2001 03.12.2001 29.04.2002 03.06.2002 21.06.2002 29.07.2002 10.07.2003 15.04.2005 09.05.2005 31.08.2005 01.09.2005 08.09.2005 13.09.2005
----- ES2283191 AB	----- 16.10.2007	EP1844666 A EP20060380239	17.10.2007 31.08.2006
----- EP1221286 AB	----- 10.07.2002	EP20010204537 US2002172751 A AR032201 A AT287649 T PT1221286 E ES2236130 T	26.11.2001 21.11.2002 29.10.2003 15.02.2005 31.05.2005 16.07.2005
----- US6641850 B	----- 04.11.2003	WO0056177 A AU3398200 A US6361807 B US6375993 B US6387418 B US6977089 B US2006057235 A US7645469 B US2007178180 A US7780998 B US2007184136 A US7727563 B US2010159044 A US8221806 B US2010173029 A	28.09.2000 09.10.2000 26.03.2002 23.04.2002 14.05.2002 20.12.2005 16.03.2006 12.01.2010 02.08.2007 24.08.2010 09.08.2007 01.06.2010 24.06.2010 17.07.2012 08.07.2010

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº

PCT/ES2012/070463

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD
A23L1/30 (2006.01)

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
A23L

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

EPODOC, INVENES, WPI, EMBASE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
X A	ES 2288123 A1 (FURFURAL ESPANOL S.A) 16.12.2007,	1-15 16
X	WO 0038541 A1 (UNIELVER) 06.07.2000, reivindicaciones.	1-15
A	ES 2283191 A1 (ANTAS PHARMA S. A.) 16.10.2007,	1-16
A	EP 1221286 A1 (UNIELVER) 10.07.2002,	
A	US 6641850 B1 (STEWART & LYNDIA RESNICK TRUST) 04.11.2003,	1-16
P,X	Camargo A. et al. "Virgin olive oil phenolic compounds interact with cellular signalling pathways". Clinica e Investigacion en Arteriosclerosis. 2011. Vol. 23, Nº 6, páginas 262 – 268. ISSN 0214-9168 (print)	1-16

☐ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos ☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.
09/10/2012

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional.
16 de octubre de 2012 (16/10/2012)

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional
OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS
Paseo de la Castellana, 75 - 28071 Madrid (España)
Nº de fax: 91 349 53 04

Funcionario autorizado
J. Manso Tomico
Nº de teléfono 91 3495583

INFORME DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Informaciones relativas a los miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ES2012/070463

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de Publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de Publicación
ES2288123 AB	16.12.2007	WO2007141352 A EP2027783 A EP20070730462 MX2008015409 A US2010022464 A	13.12.2007 25.02.2009 13.04.2007 23.03.2009 28.01.2010
----- WO0038541 A	----- 06.07.2000	CA2355778 A AU3036100 A BR9916539 A EP1139796 AB EP19990964527 CZ20012326 A SK8992001 A HU0104810 A ZA200104534 A TR200101837 T PL349522 A AU763067 B AT291855 T DK1139796 T PT1139796 E ES2238868 T DE69924522 T US6942890 B	06.07.2000 31.07.2000 11.09.2001 10.10.2001 06.12.1999 14.11.2001 03.12.2001 29.04.2002 03.06.2002 21.06.2002 29.07.2002 10.07.2003 15.04.2005 09.05.2005 31.08.2005 01.09.2005 08.09.2005 13.09.2005
----- ES2283191 AB	----- 16.10.2007	EP1844666 A EP20060380239	17.10.2007 31.08.2006
----- EP1221286 AB	----- 10.07.2002	EP20010204537 US2002172751 A AR032201 A AT287649 T PT1221286 E ES2236130 T	26.11.2001 21.11.2002 29.10.2003 15.02.2005 31.05.2005 16.07.2005
----- US6641850 B	----- 04.11.2003	WO0056177 A AU3398200 A US6361807 B US6375993 B US6387418 B US6977089 B US2006057235 A US7645469 B US2007178180 A US7780998 B US2007184136 A US7727563 B US2010159044 A US8221806 B US2010173029 A	28.09.2000 09.10.2000 26.03.2002 23.04.2002 14.05.2002 20.12.2005 16.03.2006 12.01.2010 02.08.2007 24.08.2010 09.08.2007 01.06.2010 24.06.2010 17.07.2012 08.07.2010