

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 946 109**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/06** (2006.01)  
**A61K 36/02** (2006.01)  
**A61K 35/60** (2006.01)  
**A61K 35/618** (2015.01)  
**A61K 35/612** (2015.01)  
**A61P 29/00** (2006.01)  
**A61K 31/557** (2006.01)  
**A61K 31/202** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.05.2013** **PCT/US2013/040314**  
87 Fecha y número de publicación internacional: **14.11.2013** **WO13170006**  
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.05.2013** **E 13788058 (9)**  
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.04.2023** **EP 2858496**

54 Título: **Aceites con actividad antiinflamatoria que contienen mediadores pro-resolutivos especializados naturales y sus precursores**

30 Prioridad:

**10.05.2012 US 201261645281 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.07.2023**

73 Titular/es:

**SOLUTEX NA LLC (100.0%)**  
**495 Brickell Avenue, Suite 1705**  
**Miami, Florida 33131, US**

72 Inventor/es:

**BANNENBERG, GERHARDUS LUCAS;**  
**SERHAN, CHARLES NICHOLAS y**  
**MORENO EGEA, FERNANDO**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

ES 2 946 109 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

Aceites con actividad antiinflamatoria que contienen mediadores pro-resolutivos especializados naturales y sus precursores

5

## CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere, en general, a los campos de los productos naturales, la inflamación, la patología y la medicina. Más particularmente, la invención se refiere a mediadores pro-resolutivos especializados (SPMs) y a precursores de SPMs obtenidos a partir de fuentes naturales, y su uso en suplementos nutricionales y formulaciones farmacéuticas y cosméticas para mejorar la inflamación y las enfermedades que tienen un componente inflamatorio.

10

## ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La inflamación es una respuesta biológica compleja que los animales llevan a cabo en un intento de eliminar o neutralizar patógenos, irritantes o daños celulares, y de iniciar la curación de los tejidos lesionados. Los síntomas físicos clásicos de inflamación incluyen dolencia (dolor), calor (ardor), rubor (enrojecimiento), tumor (hinchazón) y función laesa (pérdida de función). El inicio de una respuesta inflamatoria está asociado con la activación de leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos), monocitos y macrófagos tisulares. La activación de estas células desencadena una cascada de eventos de señalización proinflamatorios mediados por varias moléculas pequeñas y péptidos, entre los que se incluyen prostaglandinas, leucotrienos, quimiocinas y citocinas, y factores del complemento activados. Estos eventos de señalización estimulan la quimiotaxis celular, la permeabilidad endotelial, la vasodilatación, la estimulación de los nervios sensoriales y la activación de la coagulación que, a su vez, conducen a los síntomas físicos de la inflamación. De importancia, ahora se entiende que también la terminación de la inflamación, la resolución, es una parte activamente regulada de la respuesta inflamatoria que implica un conjunto coordinado de eventos celulares y moleculares con el fin de restaurar la estructura y la función del tejido.

25

Si bien la inflamación es beneficiosa y, de hecho, necesaria para una buena salud, también puede ir mal y provocar enfermedades. Por ejemplo, la lesión por reperusión después de una isquemia (por ejemplo, en un infarto de miocardio o un accidente cerebrovascular) estimula una respuesta inflamatoria aguda que puede dañar el tejido. Y cuando una respuesta inflamatoria normal no puede terminar (resolverse) tras la eliminación del estímulo original, puede producirse una inflamación crónica. La inflamación crónica daña el tejido sano y puede provocar o agravar varias enfermedades diferentes entre las que se incluyen, por ejemplo, aterosclerosis y otras enfermedades del sistema vascular, asma, acné, psoriasis, artritis reumatoide, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, enfermedad inflamatoria intestinal y diferentes tipos de enfermedades autoinmunitarias. La inflamación crónica también se ha asociado con la diabetes tipo 2, la obesidad, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer.

30

35

Se reconoce ahora que la resolución de la inflamación constituye un proceso fisiológico activo que forma una parte integral de la respuesta inflamatoria. La resolución como la desaparición del exudado inflamatorio, y la restauración de la estructura y función tisular adecuada, está mediada por varios mecanismos moleculares y celulares diferentes. Estos incluyen la depuración y destrucción metabólica de citocinas inflamatorias; formación de mediadores antiinflamatorios tales como factor de crecimiento transformante-beta, interleucina-10, anexina A1 y lipoxina A4; apoptosis de neutrófilos proinflamatorios; reclutamiento activo de monocitos/macrófagos inmunorreguladores y eosinófilos; y eferocitosis y salida de leucocitos inflamatorios. De particular relevancia, se ha descubierto que una familia de sustancias denominadas colectivamente mediadores pro-resolutivos especializados (SPMs) son reguladores centrales de la resolución. Los SPMs tienen potentes actividades antiinflamatorias (a saber, reducen la infiltración de neutrófilos), estimulan activamente la eliminación y desaparición del exudado inflamatorio, aceleran la depuración de la infección y estimulan la cicatrización de heridas. Los SPMs son un género de mediadores lipídicos recientemente caracterizados identificados en la resolución de exudados de lesiones inflamatorias, y comprenden derivados enzimáticamente oxigenados de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga tales como los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 (PUFA  $\omega$ -3) ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Los SPMs tienen potentes actividades agonistas sobre receptores acoplados a la proteína G específicos, activando de este modo diferentes aspectos de la resolución de la inflamación. Los SPMs consisten en varias familias diferentes de mediadores lipídicos derivados de PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga: resolvinas, protectinas y maresinas - miembros de cada una de las cuales controlan la duración y la magnitud de la inflamación mediante la estimulación de mecanismos de resolución endógenos (**Bannenberg y Serhan, 2010**).

40

45

50

55

La biosíntesis de SPMs implica la incorporación posicional y estereoespecífica de una o dos moléculas de oxígeno molecular en un ácido graso poliinsaturado, catalizado por oxigenasas de ácido graso selectivas de sustrato y de posición tales como lipoxigenasas, ciclooxigenasa tipo 2 cuando se acetilan por aspirina, y varias citocromo P450 oxidasas. Los PUFAs de los que actualmente se sabe mejor que actúan como sustrato para la formación de SPMs son EPA y DHA.

60

La primera etapa en la formación endógena de SPMs implica la oxigenación enzimática de un PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga de una manera estereoquímicamente definida que conduce a la formación de hidroperóxidos de ácidos grasos específicos. Los hidroperóxidos de ácidos grasos pueden transformarse en SPMs a través de varias rutas biosintéticas.

65

La primera es una reducción del grupo hidropéroxilo para formar el correspondiente ácido graso monohidroxiado. Algunos de estos productos monohidroxiados funcionan como precursores intermedios para una oxigenación enzimática posterior para formar SPMs dihidroxilados y trihidroxilados. Por ejemplo, el ácido 17-hidroxidocosahexaenoico (17-HDHA), el producto de una oxigenación catalizada por 15-lipoxigenasa con DHA, es el sustrato para la formación de cuatro resolvinas trihidroxiladas distintas RvD1, RvD2, RvD3 y RvD4. De esta manera, el 17-HDHA puede considerarse un precursor de SPMs. En una ruta biosintética diferente, el primer hidropéroxido de ácido graso formado puede reorganizarse enzimáticamente para formar un epóxido y, posteriormente, hidrolizarse enzimáticamente, para formar un producto dihidroxilado. Los ejemplos de tales mediadores lipídicos dihidroxilados son la protectina D1 y la maresina 1.

Por lo tanto, EPA y DHA constituyen sustratos endógenos en los cuerpos de animales y seres humanos a partir de los cuales la formación *in vivo* procede a formar resolvinas derivadas de EPA y DHA (las llamadas resolvinas de la serie E y de la serie D, respectivamente), y protectinas y maresinas derivadas de DHA, que son derivados de EPA y DHA dihidroxilados y trihidroxilados con potente actividad antiinflamatoria y activadora de la resolución *in vivo* (**Bannenbergy Serhan, 2010**). Las resolvinas, protectinas y maresinas son SPMs y actúan como ligandos de receptores endógenos o moduladores alostéricos para activar de manera potente las respuestas celulares que activan de manera coordinada las acciones antiinflamatorias y aceleran, estimulan y desencadenan la resolución de la inflamación. Por otra parte, ahora también se sabe que varios derivados de epóxido de EPA y DHA formados enzimáticamente también poseen una potente actividad antiinflamatoria (**Wagner, 2011**) y se consideran SPMs en este caso. La bibliografía anterior también ha descrito la presencia de varios mediadores lipídicos derivados de PUFAs en su forma de ácido carboxílico libre en células y tejidos de trucha y anchoa (**Pettitt, 1989; Hong, 2005; Oh, 2011; Raatz, 2011**). La formación de SPMs se produce endógenamente dentro de los cuerpos de los organismos, en varios tejidos y tipos de células, y se produce intracelularmente. El sustrato para la formación de SPMs son las formas de ácidos carboxílicos libres de EPA y DHA; estos ácidos grasos libres han sido liberados por una fosfolipasa de los fosfolípidos de membrana que contienen EPA y DHA. No existe una descripción previa de que los SPMs que se forman naturalmente dentro de las células o tejidos de organismos vivos se puedan encontrar fuera del cuerpo de un animal o ser humano.

Se han sintetizado ahora varios SPMs por procedimientos de síntesis química. Los SPMs sintéticos han sido fundamentales en la delineación de las estructuras químicas y la actividad de los SPMs formados por las células en los cuerpos de los animales. Asimismo, se han sintetizado análogos estructurales de SPMs mediante procedimientos de síntesis química. La ventaja de las formas sintéticas de SPMs es su pureza bien controlada. Sin embargo, la síntesis química de SPMs es un proceso técnicamente desafiante y costoso, ya que es difícil obtener la estereoquímica precisa y las geometrías de doble enlace que son importantes para la bioactividad. Por lo tanto, es de gran interés tener acceso y obtener grandes cantidades de las formas naturalmente bioactivas de los SPMs.

De particular relevancia para la presente invención, algunos de los derivados monohidroxiados y epoxigenados constituyen productos intermedios biosintéticos con una actividad antiinflamatoria más potente que EPA y DHA, ya que son productos intermedios más cercanos a la biosíntesis de varios SPMs que EPA y DHA en sí mismos. Por lo tanto, estos precursores intermedios se consideran precursores de SPMs.

Es interesante observar que varios otros PUFAs omega-3 de cadena larga, como el ácido docosapentaenoico ( $\omega$ -3), también pueden transformarse en derivados oxigenados por las mismas oxigenasas, con algunos derivados teniendo una marcada actividad antiinflamatoria. También hay mediadores lipídicos de cadena larga derivados de PUFAs omega-6 antiinflamatorios y estimulantes de la resolución (pro-resolutivos), tales como lipoxina A4 formada a través de dos etapas de oxigenación enzimática a partir de ácido araquidónico, prostaglandina D2 formada a partir de ácido araquidónico por ciclooxigenasas que da lugar a productos de deshidratación con potente actividad antiinflamatoria, y mediadores lipídicos derivados de ácido docosapentaenoico ( $\omega$ -6) con actividades antiinflamatorias. A este respecto, es importante entender que también el ácido araquidónico es un PUFA esencial de cadena larga, como EPA y DHA, y generalmente está presente en todos los organismos que también contienen ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga.

A pesar de que las estructuras químicas de varios SPMs se conocen ahora y sus actividades antiinflamatorias y pro-resolutivas se han estudiado con cierto detalle en diferentes modelos experimentales de inflamación, no se ha desarrollado ningún suplemento nutricional, formulación cosmética o formulación farmacéutica aprobada que contenga un SPM para la inhibición o resolución de la inflamación.

Debido a que el aumento de los niveles sanguíneos de EPA y DHA se asocia con una menor incidencia y propensión a desarrollar enfermedades cardiovasculares, la complementación oral de aceites que contienen PUFAs omega-3 se usa cada vez más para mejorar la inflamación con cierto grado de éxito. Se cree ampliamente que el potencial antiinflamatorio de los PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga dietéticos está relacionado con el aumento en los niveles tisulares de EPA y DHA. Se cree habitualmente que el aumento de los niveles endógenos de EPA y DHA favorece un estado antiinflamatorio a través de la competición por la formación endógena de los eicosanoides activadores de la inflamación derivados del PUFA omega-6 ácido araquidónico (AA), la formación de prostaglandinas y tromboxanos de las series 3 derivados de EPA y DHA con una potencia y eficacia inflamatorias mucho más bajas, y cambios biofísicos dentro de los dominios de membrana y las proteínas de membrana que modulan la función celular inmunitaria. Sin embargo, investigaciones recientes han demostrado que los PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga sirven como sustratos endógenos para la formación enzimática de SPMs endógenos que actúan como autacoides para antagonizar

funcionalmente la inflamación y que aceleran activamente la resolución. Este reciente reconocimiento de que el EPA y el DHA actúan como el sustrato fisiológico para la formación de autacoides que estimulan la resolución de la inflamación, permite una comprensión renovada de la naturaleza esencial de los PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga para la salud humana. Actualmente está bien establecido que un mayor consumo de alimentos que contienen EPA y DHA aumenta los niveles tisulares de estos PUFAs  $\omega$ -3. Más recientemente, se ha demostrado que la complementación dietética con EPA y DHA permite, de hecho, un aumento medible en la formación endógena de algunos mediadores lipídicos oxigenados derivados de EPA y DHA en seres humanos (**Anta, 2005; Shearer, 2010; Mas, 2012**).

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga que contienen un doble enlace omega-3 están formados naturalmente por algas y otros microorganismos que forman la base de la cadena biotrófica de transferencia de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga como EPA y DHA (**Gladyshev, 2013**). Los mamíferos dependen del suministro adecuado de EPA y especialmente de DHA a través de fuentes dietéticas, principalmente a través del consumo de pescado que contiene niveles en los tejidos significativos de EPA y DHA que, a su vez, han obtenido estos PUFA esenciales de la cadena alimentaria. Los mamíferos, incluido el hombre, pueden sintetizar endógenamente EPA y DHA a partir de ácido alfa-linolénico, sin embargo, la eficiencia de esta conversión es muy limitada y no es adecuada para los requisitos de EPA y DHA. La ingesta dietética de alimentos que contienen EPA y DHA, y la complementación dietética con aceites que contienen niveles significativos de EPA y DHA, se consideran actualmente como medios apropiados para obtener una ingesta diaria que puede aumentar significativamente los niveles de PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga y alcanzar así una mayor capacidad para reducir la intensidad y la duración de las reacciones inflamatorias y la enfermedad.

Los requisitos dietéticos varían con la edad y la etapa de la vida, y la naturaleza esencial de EPA y DHA para la salud humana es, por lo tanto, condicional. Eludiendo la dependencia de la importante necesidad humana de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga de la cadena alimentaria natural y las crecientes demandas humanas mundiales de suficiencia de PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga, los recientes avances en biotecnología han permitido crear, por ejemplo, plantas y microorganismos transgénicos dotados de la capacidad biosintética para formar PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga como EPA y DHA (**Petrie, 2012**).

La complementación dietética con aceites que contienen PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga se logra actualmente mediante el consumo de formulaciones que abarcan muchas presentaciones diferentes. Los aceites empleados actualmente consisten en la mayor parte (en volúmenes consumidos) de aceites que contienen EPA y DHA extraídos de peces, de los cuales la anchoa peruana constituye una parte sustancial. Otros aceites incluyen los extraídos, por ejemplo, de salmón y atún. Existe una gran variedad de aceites de diferentes calidades, desde aceites prensados en frío que han sido sometidos a muy pocas etapas para limpiar el aceite de sustancias colorantes u olorosas presentes en el aceite, hasta aceites que han sido concentrados selectivamente para obtener un ácido graso  $\omega$ -3 de cadena larga específico. Los aceites de pescado que contienen modestas concentraciones de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga (generalmente hasta aproximadamente el 30 %), o con concentraciones aumentadas por destilación a aproximadamente el 55 %, se usan ampliamente en suplementos nutritivos para el tratamiento, por ejemplo, de la hipertrigliceridemia y para la salud vascular y ocular. Un buen ejemplo de un concentrado de PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga hecho a partir de aceite de pescado que actualmente se puede producir a escala industrial para el sector farmacéutico contiene un 97 % de EPA en forma de un éster etílico.

Los procedimientos generales que implican química de lípidos, procesos industriales relacionados con aceites y ácidos grasos, y ciencias farmacéuticas convencionales, se describen en: (**Remington, 2005; Martinez, 2007; Gunstone y Padley, 1997; Shahidi, 2005**).

La industria del aceite de pescado actualmente fabrica un intervalo de diferentes calidades de aceite que contienen EPA y DHA. Los aceites que contienen EPA y DHA también se extraen de otros organismos como el krill, el calamar, las algas, las levaduras, los protozoos y de plantas transgénicas dotadas de genes que codifican enzimas que permiten la biosíntesis de EPA y DHA y otros PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga como el ácido estearidónico (SDA). Las formulaciones disponibles en el mercado para consumo humano varían de aceites como tales, aceites encapsulados, emulsiones y polvos estabilizados. En todos los casos, el objetivo es proporcionar suplementos dietéticos e ingredientes farmacéuticos que tengan como objetivo proporcionar dosis suficientemente altas a los seres humanos para ayudar a aumentar los niveles de EPA y DHA en los tejidos endógenos. Aunque se puede medir la absorción y redistribución relativamente rápidas de EPA y DHA en tipos celulares específicos, plaquetas y lipoproteínas en la circulación (dentro de las 24 horas), en general se acepta que las acciones beneficiosas para la salud de EPA y DHA tras su consumo oral necesitan un tiempo considerable debido al supuesto requisito de que se acumulen mayores niveles de EPA y DHA en el tejido y con lo cual se tarda de varias semanas a meses en tomar dosis de al menos varios cientos de miligramos de EPA y DHA cada día.

Una característica de la necesidad de proporcionar EPA y DHA como nutrientes esenciales para reducir las reacciones inflamatorias, y prevenir y tratar las afecciones inflamatorias, es que la conversión enzimática endógena de EPA y DHA, alcanzada por la ingesta de alimentos dietéticos y la complementación específica, a SPM es un proceso enzimático de múltiples etapas que implica la liberación de EPA y DHA unidos a fosfolípidos por fosfolipasas, seguido de una o más reacciones de oxigenación enzimática catalizadas por oxigenasas de ácidos grasos específicos para formar los SPM activos. Estos procesos funcionan adecuadamente en condiciones saludables, sin embargo, se

considera que los niveles bajos de EPA y DHA en los tejidos, así como la conversión limitada o inadecuada en los tejidos del cuerpo de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga a SPM contribuyen, predisponen o subyacen a afecciones inflamatorias y a reacciones inflamatorias exageradas.

El documento WO2006/055965 describe oxilipinas, también denominadas docosanoides, que se derivan de ácidos grasos poliinsaturados C22, y un procedimiento de preparación y uso de dichas oxilipinas. Serhan y col.: "Resolvins and Protectins in Inflammation-Resolution". Chem. Rev., Vol. 11, N.º 10, 12 de octubre de 2011, describen la introducción e investigación sistemática de una serie de SPMs derivados de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs), que incluyen lipoxinas, resolvinas de la serie E, resolvinas de la serie D, protectinas/neuroprotectinas y maresinas.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La invención se basa en el sorprendente descubrimiento de que los mediadores pro-resolutivos especializados (SPMs) y los precursores de SPMs están presentes en aceites extraídos de organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga. Los aceites que contienen al menos un SPM o precursor de SPM y que tienen actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución (pro-resolutiva) se pueden producir usando un procedimiento que comprende las etapas de medir la presencia o el nivel de SPMs o precursores de SPMs en un aceite que contiene PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga (tal como un aceite que contiene ácido graso  $\omega$ -3 de cadena larga crudo, refinado o concentrado), fraccionar el aceite en una pluralidad de fracciones, medir la actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución de las fracciones de aceite, y repetir opcionalmente estas tres etapas, para obtener un aceite que contiene o está enriquecido con al menos un SPM o precursor de SPM y tiene actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución. Los SPMs y los precursores de SPMs se pueden encontrar en forma de sustancias saponificables. Por otra parte, los aceites pueden contener PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga, tal como EPA y DHA.

Las tecnologías que se pueden emplear para tal fraccionamiento incluyen procedimientos de extracción y separación. Las tecnologías que son de particular interés para obtener aceites que contienen o están enriquecidos con SPMs y precursores de SPMs son la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) que emplean dióxido de carbono como disolvente. La administración a sujetos de una cantidad eficaz de estos aceites constituye un procedimiento de reducción de la inflamación o estimulación de la resolución de la inflamación. Los aceites se pueden usar para la fabricación de suplementos nutritivos, formulaciones farmacéuticas y formulaciones cosméticas, que comprenden una cantidad eficaz de un aceite con actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución. Estos suplementos y formulaciones constituyen, por tanto, composiciones antiinflamatorias y de pro-resolución que se pueden fabricar en grandes cantidades y no requieren la adición de SPMs costosos y sintetizados químicamente.

Aunque se pueden usar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en esta invención en la práctica o ensayo de la presente invención, a continuación se describen procedimientos y materiales adecuados. Adicionalmente, las realizaciones y ejemplos particulares analizados a continuación son únicamente ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Otros aspectos de la presente invención serán evidentes para un experto en la materia en vista de la descripción de la invención.

La presente invención proporciona: una fracción de aceite que tiene actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución como se define en la reivindicación independiente 1; un procedimiento de producción de un elemento fraccionado antiinflamatorio o estimulante de la resolución como se define en la reivindicación 11. La invención también proporciona fracciones de aceite para su uso en: reducir la inflamación o estimularla resolución de la inflamación, como se define en la reivindicación 15; reducir los signos macroscópicos y físicos de la inflamación, como se define en la reivindicación 17; y en el tratamiento de una afección inflamatoria, como se define en la reivindicación 18. La invención también proporciona usos de fracciones de aceite para preparar suplementos nutricionales, formulaciones farmacéuticas y formulaciones cosméticas, como se define en las reivindicaciones 23 a 25.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Lo anterior y otros objetos, características y ventajas de las realizaciones de la invención se entenderán más claramente a partir de la siguiente descripción detallada en conjunto con los dibujos que la acompañan, en los cuales:

La FIG. 1A-H muestra el efecto después de una administración oral de una serie de fracciones de aceite eluidas consecutivamente (número 1-8, respectivamente), obtenidas por fraccionamiento por SFC a escala industrial de un concentrado intermedio de éster etílico de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga (que contiene un 70 % de éster etílico de EPA (EE) y DHA-EE combinados), sobre los cambios inflamatorios agudos que se producen por vía subcutánea en ratones a los que se le induce por administración subcutánea (s.c.) lipopolisacárido (LPS).

La FIG. 2 muestra la abundancia relativa de las formas esterificadas con etilo y saponificables de diversos derivados monohidroxilados de los ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA, en fracciones de aceite eluidas consecutivamente de un fraccionamiento por SFC a escala industrial de un concentrado intermedio de éster etílico de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga (que contiene un 70 % de EPA-EE y DHA-EE combinados). Las fracciones numeradas 1-8 son las mismas que las sometidas a ensayo para la actividad antiinflamatoria como se muestra en la Figura 1.

La FIG. 3A muestra la concentración del éster etílico del precursor de resolvina de la serie D 17-HDHA en varias fracciones de aceite eluidas consecutivamente por SFC a escala industrial de un concentrado intermedio de éster etílico de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga (que contiene un 70 % de EPA-EE y DHA-EE combinados), correspondiente a las mismas fracciones que se muestran en las Figuras 1 y 2.

La FIG. 3B muestra los resultados de un análisis de cromatografía líquida de alta resolución quiral-espectrometría de masas de triple cuadrupolo del éster etílico de 17-HDHA que se encuentra enriquecido en la fracción 1, llevado a cabo con el fin de determinar la abundancia relativa de los estereoisómeros 17S-HDHA y 17R-HDHA en las fracciones de aceite de éster etílico 1-8, obtenidas después de la hidrólisis alcalina (panel superior).

La FIG. 4 muestra el efecto antiinflamatorio de la fracción de aceite 1 y 17S-HDHA administrados por sonda en un modelo murino de inflamación peritoneal inducida por administración intraperitoneal del extracto de membrana de levadura zymosan A.

Las FIG. 5A-C muestran la presencia de varios SPMs y precursores de SPMs específicos en diferentes fracciones de aceite.

Las FIG. 6A-B muestran que un enriquecimiento selectivo de SPMs y precursores de SPMs específicos se puede lograr mediante un fraccionamiento por SFC de un concentrado de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga.

La FIG. 7 muestra la resolución de la inflamación estimulada por un aceite que contiene un precursor de SPM.

#### DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se ha descubierto que los SPMs y los precursores de SPMs están contenidos en aceites derivados de fuentes naturales que incluyen peces, crustáceos (krill), algas (algas productoras de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga), moluscos y otros organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga. Esto permite la producción de aceites con actividad antiinflamatoria y estimulante de la resolución que contienen o están enriquecidos a propósito con uno o más mediadores pro-resolutivos especializados (SPMs) y precursores de SPMs de fuentes naturales, así como suplementos nutricionales, formulaciones farmacéuticas y formulaciones cosméticas que contienen estos aceites, y procedimientos de uso de dichos suplementos y formulaciones para tratar o prevenir afecciones inflamatorias y enfermedades asociadas con la inflamación, inhibiendo la inflamación o estimulando la resolución de la inflamación. Las realizaciones y ejemplos descritos a continuación ilustran ejemplos representativos de estos procedimientos y composiciones. No obstante, a partir de la descripción de estas realizaciones, se pueden realizar y/o poner en práctica otros aspectos de la invención basándose en la descripción proporcionada a continuación. A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos usados en esta invención tienen el mismo significado que entienden normalmente los expertos en la materia a los que pertenece esta invención.

Los aceites que tienen actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución pueden contener o pueden estar enriquecidos con al menos un SPM o precursor de SPM, donde el SPM o precursor de SPM procede de un aceite obtenido de organismos que contienen ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga.

Como se usa en la presente invención, el término "enriquecido" se refiere a un aceite que contiene mediadores de pro-resolutivos especializados (SPMs) y/o precursores de SPMs cuando contiene un nivel más alto de SPMs y/o precursores de SPMs que la fuente a partir de la cual se preparó.

Como se usa en la presente invención, la expresión "mediador pro-resolutivo especializado (SPM)" se refiere a un derivado enzimáticamente oxigenado derivado de PUFA que tiene una potente actividad antiinflamatoria y activadora de la resolución y que actúa como regulador endógeno de la respuesta inflamatoria para devolver un tejido inflamado a su estado no inflamado y saludable. Los SPMs actúan como ligandos de receptores endógenos o moduladores alostéricos para activar potentemente las respuestas celulares que activan de manera coordinada las acciones antiinflamatorias y aceleran, estimulan y desencadenan la resolución de la inflamación.

Como se usa en la presente invención, la expresión "precursor de SPM" se refiere a un derivado enzimáticamente oxigenado de un PUFA que requiere una reacción enzimática adicional para convertirlo en un SPM. Un precursor de SPM es un sustrato más próximo para la formación endógena de un SPM que el propio sustrato de PUFA correspondiente.

Estos aceites contienen o están enriquecidos con al menos un SPM o precursor de SPM que procede de un aceite extraído de organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga, preferentemente peces, crustáceos, algas y moluscos, u otros organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga, tales como otros organismos marinos, plantas, organismos microbianos y organismos transgénicos dotados de la capacidad para formar ácidos grasos  $\omega$ -3 poliinsaturados de cadena larga.

Los SPMs que pueden estar presentes en los aceites extraídos de fuentes naturales incluyen los siguientes:

resolvina E1 (RvE1; ácido 5S,12R,18R-trihidroxi-eicosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico),  
18S-resolvina E1 (18S-RvE1; ácido 5S,12R,18S-trihidroxi-eicosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico),  
20-hidroxi-RvE1 (ácido 5S,12R,18R,20-tetrahidroxi-eicosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico),  
resolvina E2 (RvE2; ácido 5S,18-dihidroxi-eicosa-6E,8Z,11Z,14Z,16E-pentaenoico), resolvina E3 (RvE3;  
ácido 17,18R-dihidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico), 18S-resolvina E3 (18S-RvE3; ácido 17,18S-

- dihidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico),  
 ácido 17,18-epoxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico,  
 lipoxina A5 (LXA5; ácido 5S,6R,15S-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E,17Z-pentaenoico), 15-epi-lipoxina A5 (LXA5;  
 ácido 5S,6R,15R-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E,17Z-pentaenoico),  
 5 maresina 1 (MaR1; ácido 7R,14S-docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoico), 7S-maresina 1 (7S-MaR1; ácido  
 7S,14S-docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoico), 7S,14S-diHDHA (ácido 7S,14S-dihidroxi-docosa-  
 4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 protectina D1 (PD1; ácido 10R,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoico),  
 10 10S,17S-HDHA (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 14S,21S-diHDHA (ácido 14S,21S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico), 14S,21R-DiHDHA  
 (ácido 14S,21R-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 14R,21S-diHDHA (ácido 14R,21S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 14R,21R-diHDHA (ácido 14R,21R-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 13S,14S-epoxi-DHA (ácido 13S,14S-epoxi-docosa-4Z,7Z,9E,11E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 15 16,17S-diHDHA (ácido 16,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico),  
 16,17-epoxi-DHA (ácido 16,17-epoxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico), resolvina D1 (RvD1; ácido  
 7S,8R,17S-trihidroxi-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D2 (RvD2; ácido 7S,16R,17S-trihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D3 (RvD3; ácido 4S,11R,17S-trihidroxi-docosa-5Z,7E,9E,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 20 resolvina D4 (RvD4; ácido 4S,5,17S-trihidroxi-docosa-6E,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D5 (RvD5; ácido 7S,17S-dihidroxi-docosa-5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico), resolvina D6 (RvD6;  
 ácido 4S,17S-dihidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,14Z,16E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D1 desencadenada por aspirina (AT-RvD1; ácido 7S,8R,17R-trihidroxi-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-  
 hexaenoico),  
 25 resolvina D2 desencadenada por aspirina (AT-RvD2; ácido 7S,16R,17R-trihidroxi-docosa-  
 4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D3 desencadenada por aspirina (AT-RvD3; ácido 4S,11,17R-trihidroxi-docosa-5Z,7E,9E,13Z,15E,19Z-  
 hexaenoico),  
 30 resolvina D4 desencadenada por aspirina (AT-RvD4; ácido 4S,5,17R-trihidroxi-docosa-6E,8E,10Z,13Z,15E,19Z-  
 hexaenoico),  
 resolvina D5 desencadenada por aspirina (AT-RvD5; ácido 7S,17R-dihidroxi-docosa-5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-  
 hexaenoico),  
 resolvina D6 desencadenada por aspirina (AT-RvD6; ácido 4S,17R-dihidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,14Z,16E,19Z-  
 hexaenoico),  
 35 7S,17S-diHDPA n-3 (ácido 7S,17S-dihidroxi-docosa-8E,10Z,13Z,15Z,19Z-pentaenoico ( $\omega$ -3))  
 lipoxina A4 (LXA4; ácido 5S,6R,15S-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E-tetraenoico), 15-epi-lipoxina A4 (15-epi-  
 LXA4; ácido 5S,6R,15R-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E-tetraenoico),  
 delta-12-prostaglandina J2 (delta-12-PGJ2; ácido 11-oxo-15S-hidroxi-prosta-5Z,9,12E-trienoico)  
 15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J2 (15-desoxi-delta-12,14-PGJ2; ácido 11-oxo-prosta-5Z,9,12E,14E-  
 40 tetraenoico)  
 ácido 11(12)-epoxi-eicosatetraenoico (11(12)-EpETE; ácido 11(12)-epoxi-eicosa-5Z,8Z,14Z,17Z-tetraenoico)  
 ácido 17(18)-epoxi-eicosatetraenoico (17(18)-EpETE; ácido 17(18)-epoxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraenoico)  
 ácido 19(20)-epoxi-docosapentaenoico (19(20)-EpDPE; ácido 19(20)-epoxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-  
 pentaenoico)  
 45 10S,17S-HDPA n-6 (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E-pentaenoico),  
 7,17 ROPA n-6 (ácido 7,17-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,13Z,15E-pentaenoico), 7,14-HDPA n-6 (ácido 7,14-  
 dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12Z,16Z-pentaenoico),  
 10S,17S-HDPA n-6 (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-7Z,11E,13Z,15E,19Z-pentaenoico), y  
 7,17 HDPA n-6 (ácido 7,17-dihidroxi-docosa-8E,10Z,13Z,15E,19Z-pentaenoico). Los ejemplos de la  
 50 presencia de estos compuestos en aceites y fracciones de aceite se muestran en los Ejemplos 1-3.

Los precursores de SPMs que están enriquecidos en aceites extraídos de fuentes naturales incluyen los siguientes.  
 Los ejemplos de la presencia de estos compuestos en aceites y fracciones de aceite se muestran en los Ejemplos 1-  
 3.

- 55 5S-HEPE (ácido 5S-hidroxi-eicosa-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaenoico);  
 11S-HEPE (ácido 11S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,12E,14Z,17Z-pentaenoico);  
 12S-HEPE (ácido 12S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-pentaenoico);  
 12R-HEPE (ácido 12R-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-pentaenoico);  
 60 15S-HEPE (ácido 15S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-pentaenoico);  
 18S-HEPE (ácido 18S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-pentaenoico);  
 18R-HEPE (ácido 18R-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-pentaenoico);  
 4S-HDHA (ácido 4S-hidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);  
 7S-HDHA (ácido 7S-hidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);  
 65 10S-HDHA (ácido 10S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);  
 11S-HDHA (ácido 11S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,9E,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);

- 14S-HDHA (ácido 14S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico);  
 14R-HDHA (ácido 14R-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico);  
 17S-HDHA (ácido 17S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico);  
 17R-HDHA (ácido 17R-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico);  
 5 20S-HDHA (ácido 20S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);  
 17S-HDPAn-6 (ácido 17S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E-pentaenoico);  
 14S-HDPAn-6 (ácido 14S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z-pentaenoico);  
 10S-HDPAn-6 (ácido 10S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,16Z-pentaenoico);  
 17S-HDPAn-3 (ácido 17S-hidroxi-docosa-7Z,10Z,13Z,15E,19Z-pentaenoico);  
 10 14S-HDPAn-3 (ácido 14S-hidroxi-docosa-7Z,10Z,12E,16Z,19Z-pentaenoico);  
 10S-HDPAn-6 (ácido 10S-hidroxi-docosa-7Z,11E,13Z,16Z,19Z-pentaenoico);  
 15S-HETE (ácido 15S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E-tetraenoico); y/o  
 15R-HETE (ácido 15R-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E-tetraenoico).
- 15 Además de lo anterior, los SPMs y los precursores de SPMs derivados de cualquiera de los siguientes PUFAs omega-3 o PUFAs omega-6 pueden estar presentes o enriquecidos en aceites extraídos de fuentes naturales. Estos ácidos grasos pueden dar lugar a precursores de SPMs y SPMs a través de la oxigenación enzimática.

Tabla 1

Nombre del ácido graso	Nombre químico
Ácido hexadecatrienoico (HTA)	16:3 (n-3) <i>ácido all-cis-7,10,13-hexadecatrienoico</i>
Ácido a-linolénico (ALA)	18:3 (n-3) <i>ácido all-cis-9,12,15-octadecatrienoico</i>
Ácido estearidónico (SDA)	18:4 (n-3) <i>ácido all-cis-6,9,12,15-octadecatetraenoico</i>
Ácido nonadecatetraenoico	19:4 (n-3) <i>ácido all-cis-7,10,13,16-nonadecatetraenoico</i>
Ácido eicosatrienoico	20:3 (n-3) <i>ácido all-cis-11,14,17-eicosatrienoico</i>
Ácido eicosatetraenoico	20:4 (n-3) <i>ácido all-cis-8,11,14,17-eicosatetraenoico</i>
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 (n-3) <i>ácido all-cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico</i>
Ácido heneicosapentaenoico	21:5 (n-3) <i>ácido all-cis-6,9,12,15,18-heneicosapentaenoico</i>
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 (n-3) <i>ácido all-cis-7,10,13,16,19-docosapentaenoico</i>
Ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 (n-3) <i>ácido all-cis-4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico</i>
Ácido tetracosapentaenoico	24:5 (n-3) <i>ácido all-cis-9,12,15,18,21-tetracosapentaenoico</i>
Ácido tetracosahexaenoico	24:6 (n-3) <i>ácido all-cis-6,9,12,15,18,21-tetracosahexaenoico</i>

- 20 Además de los ejemplos enumerados de SPMs y precursores de SPMs, se puede prever que otros derivados mono-, di- y trihidroxilados y epoxigenados de los ácidos grasos poliinsaturados mencionados anteriormente puedan poseer actividades antiinflamatorias y de pro-resolución y puedan encontrarse presentes y enriquecidos en aceites obtenidos de organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga incluyendo peces, crustáceos, algas, moluscos y
- 25 organismos marinos, plantas, organismos microbianos, así como organismos transgénicos dotados de la capacidad enzimática para formar PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga. Del mismo modo, pueden identificarse precursores adicionales de SPMs conocidos y SPMs novedosos y enriquecerse en dichos aceites. Adicionalmente, los SPMs y los precursores de SPMs pueden estar presentes como ésteres y amidas. Los ésteres pueden ser ésteres naturales tales como triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos y fosfolípidos, así como ésteres preparados durante los procesos industriales
- 30 habitualmente empleados en la industria del aceite de pescado que permiten la concentración de EPA y DHA a partir de aceites de pescado crudos y refinados, en particular, la forma de ésteres etílicos.

- Cualquier SPM, precursor de SPM o mezclas de SPMs y precursores de SPMs que se encuentren en aceites obtenidos de organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga se pueden enriquecer o concentrar empleando
- 35 procedimientos de extracción y separación, por ejemplo, tecnologías de destilación y tecnologías de fraccionamiento y separación cromatográfica.

- La presente invención ha descubierto y anticipado al estado de la técnica conocido, que los SPMs y precursores de SPMs se pueden encontrar como sustancias saponificables en aceites crudos, en aceites refinados derivados
- 40 posteriormente y en aceites en los que los niveles de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga, tales como EPA y DHA, se han concentrado en forma de ésteres etílicos. Por ejemplo, se muestra en el Ejemplo 2 (Fig. 5A) que un aceite crudo ampliamente empleado extraído de anchoa, que se considera un buen material de partida para la industria del omega-3, ya que es relativamente rico en EPA y DHA, contiene las resolvinas de la serie D RvD1 y RvD2 (ambas en forma acilada). La forma saponificable de los SPMs o precursores de SPMs también puede estar presente como ésteres
- 45 etílicos como resultado de la transesterificación de aceites que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga con etanol para obtener aceites de ésteres etílicos de ácidos grasos que pueden concentrarse y fraccionarse empleando procedimientos industriales específicos de destilación, extracción y cromatografía empleados para la concentración y purificación de ésteres etílicos de PUFAs  $\omega$ -3. Por ejemplo, muchos mediadores lipídicos monohidroxilados que pueden funcionar como precursores de SPMs se encuentran en forma saponificable en los concentrados de omega-3 esterificados con etilo fabricados a partir de aceite de anchoa, aceite de hígado de atún y en concentrado de omega-3 de éster etílico fabricado a partir de una mezcla de moluscos y pescado (Fig. 2, 3A, Fig. 3B, 5C, 6A y 6B). La
- 50

presencia de las formas esterificadas de los precursores de SPMs y los propios SPMs presentes en los concentrados de éster etílico de aceites de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga demuestra que estos precursores de SPMs y los SPMs estaban originalmente presentes en forma acilada en los aceites marinos crudos y los organismos de los que se extrajo el aceite crudo. En el proceso de transesterificación de un aceite refinado con etanol, estos precursores de SPMs y SPMs acilados también se transesterifican a los ésteres etílicos correspondientes. Este hallazgo es de naturaleza altamente significativa e imprevista, ya que no se sabe que los SPMs y los precursores de SPMs se encuentran en forma acilada en las células y tejidos de organismos que se usan para la preparación de aceites que contienen PUFAs  $\omega$ -3 fabricados para su uso como, por ejemplo, suplementos nutricionales e ingredientes farmacéuticos. Este aspecto de la invención no excluye la presencia o enriquecimiento en aceites que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga de SPMs y precursores de SPMs como ácidos carboxílicos libres, que son la forma química de los SPMs y precursores de SPMs descritos previamente en la bibliografía que se formarán dentro de células y organismos a partir de sustratos de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga. Adicionalmente, los aceites que contienen SPMs o precursores de SPMs pueden contener PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga, como EPA y DHA.

Un procedimiento para la producción de aceites con actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución y que contienen niveles medibles de SPMs y/o precursores de SPMs puede incluir las siguientes etapas; i) medir la presencia o concentración de SPMs o precursores de SPMs en un aceite que contiene PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga. Este puede ser, por ejemplo, un aceite que contiene PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga crudo, refinado o concentrado; ii) fraccionar el aceite en una pluralidad de fracciones; iii) medir la actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución de las fracciones; iv) y, opcionalmente, repetir las tres etapas, con el fin de obtener un aceite con actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución, y que contiene o está enriquecido con al menos un SPM o precursor de SPM.

Medir la presencia de SPMs y precursores de SPMs en un aceite permite evaluar o calibrar la idoneidad de un aceite a fraccionar con el fin de obtener un aceite que contiene al menos un SPM o precursor de SPM, tiene una combinación deseable de SPMs y precursores de SPMs, o que tiene un enriquecimiento con al menos un SPM o precursor de SPM. La presencia y los niveles absolutos de SPMs y precursores de SPMs en una muestra o fracción dada se pueden determinar mediante técnicas de química analítica tales como cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem de ionización por electropulverización (LC/ESI-MS/MS) y cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS) (*Yang, 2011*). Otras técnicas para detectar y/o cuantificar SPMs y precursores de SPMs que podrían usarse incluyen inmunoensayos tales como el ensayo ELISA para resolvina D1 comercializado por Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI), y los kits de ensayo de LXA4 y AT-LXA4 de Neogen Corporation.

El fraccionamiento de un aceite que contiene PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga crudo, refinado o concentrado en una pluralidad de fracciones, permite la producción de aceites que contienen concentraciones más altas del al menos un SPM o precursor de SPM que otras fracciones, o contienen una combinación deseada de SPMs o precursores de SPMs. El fraccionamiento de aceites se puede lograr con procedimientos de separación y extracción. Debido a que los SPMs y/o los precursores de SPMs presentes en los aceites de fuentes naturales diferirán de acuerdo con la fuente natural de la que se obtuvo el aceite crudo, diferentes metodologías conducirán a diversas composiciones de SPMs y precursores de SPMs en los diversos aceites empleados para la preparación del producto terminado.

Hay disponibles varias tecnologías de extracción y separación para obtener aceites que contienen o están enriquecidos en al menos un SPM o precursor de SPM. Dichas tecnologías pueden operar en la forma molecular en la que se aislaron los SPMs y/o precursores de SPMs, tales como triglicéridos en aceites de pescado y vegetales, o fosfolípidos y triglicéridos presentes en aceites de krill, o después de la transformación en una forma química diferente, en particular, ésteres etílicos de ácidos grasos. Los aceites compuestos de ésteres etílicos de ácidos grasos pueden emplearse posteriormente para fabricar triglicéridos remodelados o composiciones que contienen altos niveles de ácidos grasos libres. Los aceites que contienen SPMs y/o precursores de SPMs se pueden obtener a partir de los aceites crudos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga mencionados en este caso como materiales de partida mediante una o una combinación de varias tecnologías. Las metodologías adecuadas se explicarán en lo sucesivo.

El proceso de extracción implica calentar la materia prima que contiene PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga (por ejemplo, pescado, krill, calamar o algas) a temperaturas de hasta 95 °C. La etapa de tratamiento térmico produce un líquido de "prensado previo" que contiene tanto agua como grasa. El prensado posterior (del material sólido sobrante obtenido en el tratamiento térmico) a presiones de 130 a 170 bar y el prensado concomitante con una prensa de tornillo produce un líquido de prensado. El líquido de prensado previo y el líquido de prensado pueden combinarse ("agua de prensado") y luego alimentarse en un decantador de 2 fases para eliminar los sólidos y obtener "agua de prensado" clarificada. El agua de prensado se "desaceita" por centrifugación en un separador, produciendo un aceite turbio. El aceite turbio puede entonces "pulirse" por medio de una etapa de centrifugación adicional con un separador para obtener un aceite "crudo". Un proceso alternativo emplea un decantador de dos fases en lugar de una prensa de tornillo que simplifica el proceso separando directamente el sólido del fluido que contiene aceite, del que se separa el aceite mediante un separador de aceite (pulido). En un tercer proceso, se usa un decantador para separar la materia prima coagulada térmicamente directamente en sólido, agua y aceite. A continuación, el aceite se puede pulir con un separador para eliminar las trazas de agua. Las temperaturas durante los procesos de separación se mantienen entre 95 °C y 98 °C. Preferentemente, la aplicación de calor se limita al tiempo más corto requerido para separar la grasa de la proteína coagulada térmicamente y el agua. La mayoría de los SPMs y/o precursores de SPMs en el aceite crudo obtenido por cualquiera de estos procedimientos de extracción están en forma acilada como ésteres dentro de

glicéridos y fosfolípidos, y como amidas.

Un aceite crudo se puede limpiar mediante un proceso de "refinación" química. Esta etapa implica lavado del aceite con soluciones alcalinas y ácidas con el fin de neutralizar el aceite, separación con un separador para eliminar el lavado acuoso del aceite, lavado con agua caliente, un tratamiento de "blanqueo" del aceite con tierras de diatomeas, carbón activado o sílice, seguido de filtración con el fin de eliminar (como carotenoides coloreados, metales, contaminantes) impurezas por adsorción y secado al vacío. Generalmente, las temperaturas entre 95 °C y 98 °C se mantienen durante los procesos de refinado. Se puede aplicar una etapa de desodorización adicional que implica calentar el aceite hasta 200 °C para eliminar las sustancias volátiles.

Alternativamente, se podrían usar técnicas de extracción en frío para obtener aceites que contienen SPMs y/o precursores de SPMs.

La invernización de un aceite es un proceso mediante el cual el aceite se enfría a una velocidad controlada que permite la cristalización diferencial de distintos lípidos en función de las diferencias en los puntos de fusión, lo que permite la separación de diferentes clases de lípidos. Esta técnica de separación puede ser útil en la separación de ceras y lípidos ricos en ácidos grasos saturados de una fracción lipídica (normalmente triglicéridos) que contiene un mayor contenido de SPMs y/o precursores de SPMs o formas aciladas de los mismos.

También se podrían usar una o más técnicas de destilación molecular para este propósito. Los procedimientos de destilación molecular incluyen destilación de película fina, destilación de película limpiada y destilación de trayectoria corta. En la evaporación y destilación de película fina, se crea una película del aceite girando los ventiladores o rodillos dentro de un recipiente cerrado. Mediante la aplicación combinada de condiciones de baja presión y calentamiento, se logra la evaporación diferencial de distintos componentes lipídicos, permitiendo el enriquecimiento relativo de una fracción lipídica de interés (es decir, aquellas fracciones que contienen niveles más altos de SPMs y/o precursores de SPMs). En la destilación de película limpiada, el aceite se limpia activamente en una película sobre una superficie calentada mediante un cilindro giratorio.

La destilación y evaporación de trayectoria corta es una técnica de destilación molecular que es particularmente útil para el fraccionamiento de compuestos sensibles a la oxidación por aire a través de la introducción de un condensador interno dentro del recipiente donde tiene lugar la evaporación o la destilación. Al igual que con la evaporación y destilación de película fina, el fraccionamiento se lleva a cabo a presión reducida y calentamiento. Las pérdidas de presión disminuyen en esta configuración y se pueden lograr tiempos de calentamiento más bajos o más cortos mediante esta técnica. Una planta de destilación de trayectoria corta comprende un tanque de suministro, un evaporador, una bomba de vacío, un desgasificador, rodillos, intercambiadores de calor, un condensador, un tanque acondicionado térmicamente y un circuito continuo y cerrado.

Las etapas de destilación molecular se pueden realizar en orden secuencial para concentrar un intervalo de ácidos grasos estructuralmente similares a partir de un aceite para obtener una fracción de aceite de interés.

Otra técnica complementaria a la destilación molecular es la rectificación al vacío, que incorpora un proceso de reflujo externo que permite niveles más altos de concentración con el inconveniente de tiempos de contacto más altos. Los ácidos grasos en aceites se pueden concentrar adicionalmente mediante una etapa de precipitación selectiva mediante la adición de urea, que compleja selectivamente ácidos grasos saturados y monoinsaturados. Las tecnologías de concentración adicionales abarcan el intercambio iónico que emplea resinas de intercambio catiónico y aniónico. Otra tecnología que puede permitir la concentración selectiva basada en el tamaño molecular y el peso es la ultrafiltración.

Una tecnología de extracción que es de particular utilidad para la extracción de SPMs y precursores de SPMs es la extracción con fluidos supercríticos (SFE). Una planta de extracción con fluidos supercríticos comprende un tanque de suministro, bombas, un tanque de disolvente, un circuito continuo y cerrado, una columna de extracción, tanques atmosféricos y separadores. Al lograr una combinación específica de presión y temperatura, la fase móvil puede alcanzar su punto supercrítico. La SFE se emplea habitualmente en condiciones de contracorriente mediante las cuales se logra un estado estacionario que permite el enriquecimiento selectivo de un componente que eluye la parte superior o inferior de la columna de extracción. La SFE permite el enriquecimiento selectivo. Por lo tanto, la SFE permite la fabricación de aceites que son materiales de partida adecuados para tecnologías de separación posteriores empleadas para separar y purificar selectivamente ácidos grasos individuales, por ejemplo, como su éster etílico correspondiente, permitiendo la concentración hasta niveles que pueden acercarse casi a la pureza.

Las técnicas cromatográficas son útiles para lograr niveles significativos de separación de ácidos grasos esterificados con etilo individuales, y son adecuadas para obtener aceites que se enriquecen selectivamente con SPMs y precursores de SPMs. Estas incluyen cromatografía convencional mediante operación a alta presión, cromatografía de banda móvil, cromatografía a contracorriente y cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). Una cromatografía de alta presión emplea mezclas de disolventes acuosos y orgánicos bombeados a presión elevada a través de una columna que contiene una fase estacionaria. La fase estacionaria puede tener diferentes polaridades y tamaño de partículas y geometrías. Mediante la elección de combinaciones óptimas de fase móvil, fase estacionaria, se puede

lograr una separación aceptable de temperatura de ésteres etílicos de ácidos grasos.

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) emplea un fluido supercrítico (normalmente dióxido de carbono) como disolvente y fase móvil. Mediante la modulación cuidadosa de la densidad del fluido supercrítico a través de la presión y la temperatura, se pueden optimizar las condiciones de elución para la separación de lípidos individuales dentro de una muestra. La ventaja de esta técnica es el empleo de temperaturas cercanas a la ambiente y la exclusión de oxígeno durante el procedimiento cromatográfico para eliminar el riesgo de oxidación inadvertida. Las instalaciones abarcan un recipiente de suministro, bombas, un tanque de fase móvil, un circuito continuo y cerrado, una columna de cromatografía, tanques atmosféricos y separadores. La SFC permite la separación cromatográfica de ésteres etílicos de ácidos grasos. La fase móvil, al ser un gas a presión y estar a temperatura ambiente, se elimina fácilmente de la fracción final de aceite.

Las técnicas preferidas para obtener SPMs y/o aceites que contienen precursores de SPMs mediante el fraccionamiento de aceites que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga son la extracción con fluidos supercríticos (SFE) y la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC). Estas técnicas pueden complementarse opcionalmente mediante una o más etapas de fraccionamiento adicionales que permiten el enriquecimiento de uno o más SPMs y/o precursores de SPMs definidos. A continuación se describen ejemplos. Se pueden emplear los siguientes intervalos de condiciones de SFE y SFC: intervalo de temperatura entre 27-60 °C, intervalo de presión entre 80-180 bar, con sílice, sílice modificada, fase inversa, fases estacionarias quirales y argentadas, y relaciones de disolvente/carga de 10-800 (Kg/Kg).

La combinación de SFE y SFC permite el enriquecimiento de uno o varios SPMs y/o precursores de SPMs específicos. La capacidad para separar SPMs y/o precursores de SPMs permite además recombinar fracciones de aceite específicas para obtener un intervalo versátil de relaciones y combinaciones.

Se pueden realizar etapas cromatográficas adicionales empleando tecnologías de enriquecimiento muy especializadas, tales como separaciones quirales, y cromatografía de afinidad de metales, tal como cromatografía de argentación con sales de plata inmovilizadas.

Como resultado de la tecnología empleada para la preparación de los aceites que contienen o están enriquecidos para SPMs y/o precursores de SPMs, las formas químicas de estas moléculas son habitualmente una de las siguientes; ésteres etílicos cuando están presentes en concentrados de omega-3, aciladas dentro de glicéridos y fosfolípidos típicos para aceites crudos y refinados, o se encuentran como ácidos carboxílicos libres disueltos dentro de los aceites. Otras formas químicas de los SPMs y precursores de SPMs pueden encontrarse en aceites crudos y refinados, tales como amidas. En una realización adicional, los SPMs y las moléculas precursoras de SPMs pueden transformarse adicionalmente de acuerdo con procedimientos conocidos. Por ejemplo, los aceites que contienen éster etílico de SPMs se pueden transesterificar nuevamente (ya sea química o enzimáticamente) con un triglicérido o fosfolípido para formar un triglicérido o fosfolípido remodelado, respectivamente.

Los SPMs y los precursores de SPMs esterificados también se pueden hidrolizar para obtener la forma de ácido graso libre correspondiente, como una sal o el ácido conjugado.

En una realización particular, esta invención además puede permitir en última instancia que los SPMs y/o los precursores de SPMs de origen natural se purifiquen hasta homogeneidad o casi homogeneidad (por ejemplo, más de 80, 90, 95, 96, 97, 98 o 99 % de pureza en peso).

Por otra parte, los aceites crudos procedentes del mismo organismo o de diferentes organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga pueden combinarse y usarse como material de partida para procedimientos de enriquecimiento posteriores para obtener aceites que contienen SPMs y precursores de SPMs.

La determinación de la actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución de las fracciones que contienen concentraciones más altas del al menos un SPM o precursor de SPM que otras fracciones, o que contienen una combinación deseada de SPMs o precursores de SPMs, establecerá la utilidad del aceite para fabricar una composición terapéutica antiinflamatoria o estimulante de la resolución. Esto se puede realizar preferentemente *in vivo*, en modelos experimentales de inflamación que permiten la evaluación de la eficacia y potencia antiinflamatoria, o la medición de la actividad activadora de la resolución de la fracción de aceite (**Bannenberg, 2005**). Se pueden emplear modelos *in vitro* y celulares para este propósito con el fin de medir un aspecto celular o molecular particular de las actividades antiinflamatorias o de pro-resolución en la respuesta inflamatoria *in vivo*.

La fabricación a propósito de aceites enriquecidos o que contienen SPMs y precursores de SPMs con actividades antiinflamatorias y potenciadoras de la resolución, se puede usar para reducir la inflamación o estimular la resolución de la inflamación en un sujeto, comprendiendo el procedimiento la etapa de administrar una cantidad eficaz de un aceite. Los aceites se pueden usar para tratar la inflamación o enfermedades asociadas con la inflamación, o prevenir la inflamación o enfermedades asociadas con la inflamación. El fraccionamiento de aceites permite obtener aceites con actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución específica. Se puede lograr una diferenciación funcional mediante fraccionamiento, con algunas fracciones de aceite que tienen actividad antiinflamatoria y/o actividad

estimulante de la resolución (pro-resolutiva), otras fracciones de aceite que no tienen actividad antiinflamatoria significativa, y/o incluso se pueden obtener fracciones de aceite que tienen una actividad promotora de la inflamación. Por lo tanto, los aceites específicos obtenidos a través del fraccionamiento tienen la capacidad de modular claramente la respuesta inflamatoria.

5 Los aceites y fracciones de aceite específicos que contienen SPMs naturales, precursores de SPMs o mezclas de SPMs y/o precursores de SPMs pueden ser particularmente adecuados para tratar o prevenir una afección inflamatoria específica. Por ejemplo, un aceite que contiene o está enriquecido con un SPM y/o precursores de SPMs particulares, o una combinación de más de un SPM o precursor de SPM, podría seleccionarse para tratar la artritis reumatoide, basándose en la investigación que muestra que estas moléculas particulares son más beneficiosas para tratar la artritis reumatoide que cualquiera de los aceites que contienen PUFAs  $\omega$ -3 usados actualmente, u otros SPMs, precursores de SPMs, o mezclas de SPMs y/o precursores de SPMs, o fármacos antiinflamatorios conocidos. Pueden seleccionarse otros aceites que contienen SPMs y/o precursores de SPMs para preparar una composición para tratar una afección inflamatoria diferente, por ejemplo, asma, basándose en la investigación. Este procedimiento incluye la etapa de administrar al sujeto una cantidad eficaz de un aceite que contiene o está enriquecido para al menos un SPM o precursor de SPM y que tiene actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución.

Los aceites que contienen SPMs y/o precursores de SPMs pueden comprender además un vehículo o un excipiente.

20 Como se usa en la presente invención, los términos "sujeto" o "paciente" se refieren a animales, incluyendo mamíferos, preferentemente seres humanos.

Como se usan en la presente invención, los términos "administrar", "administrar" o "administración", tal como se usan en esta invención, se refieren a administrar directamente un aceite o composición que contiene aceite a un sujeto o paciente, que suministrará una cantidad eficaz del compuesto o sustancia activa al cuerpo del sujeto o paciente.

Como se usa en la presente invención, la expresión una "cantidad eficaz" o "una cantidad eficaz para" significa una cantidad adecuada para curar o al menos mejorar parcialmente los síntomas de una afección, enfermedad o sus complicaciones.

30 Los aceites antiinflamatorios o estimulantes de la resolución que contienen SPMs o precursores de SPMs también pueden contener PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga. Estos pueden ser EPA y DHA, pero también otros PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga como el ácido estearidónico o el ácido docosapentaenoico.

35 Se pueden preparar suplementos nutricionales, formulaciones farmacéuticas y formulaciones cosméticas que comprenden una cantidad eficaz de aceites enriquecidos o que contienen SPMs y precursores de SPMs con actividad antiinflamatoria o potenciadora de la resolución obtenidos de organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga. Después de obtener un aceite o fracción de aceite que contiene o está enriquecido en uno o más SPMs y/o precursores de SPMs presentes de forma natural y que tiene actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución, el aceite se puede usar para preparar un suplemento nutricional, una formulación farmacéutica o una formulación cosmética.

Como se usa en la presente invención, la expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a aquellos compuestos, materiales, composiciones, suplementos, formulaciones y/o formas de dosificación que, dentro del alcance del buen criterio médico, son adecuados para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

Además del aceite que contiene SPMs y/o precursores de SPMs, los suplementos nutricionales y las formulaciones farmacéuticas y cosméticas podrían contener otros ingredientes. Por ejemplo, en realizaciones preferidas, los aceites que contienen SPMs y/o precursores de SPMs se mezclan, disuelven, emulsionan (por ejemplo, en aceite/agua, agua/aceite, o emulsiones dobles), o se suspenden en una matriz o base. La matriz o base puede ser, por ejemplo, un aceite comestible tal como aceites que contienen PUFAs  $\omega$ -3, un concentrado de PUFAs  $\omega$ -3 que contiene altos niveles de EPA, o DHA, o mezclas de EPA y DHA, u otro aceite comestible adecuado para su consumo o administración. La matriz o base también podría ser agua o un tampón acuoso. Los aceites que contienen SPMs y/o precursores de SPMs también se pueden preparar en liposomas, nanopartículas o micropartículas.

Para mejorar la vida útil, los suplementos y formulaciones también podrían contener uno o más estabilizadores que incluyen antioxidantes tales como uno o varios tocoferoles, ácido ascórbico y derivados de ácido graso de ascorbilo, y otros antioxidantes que se usan habitualmente en la estabilización de aceites dietéticos, tales como extracto de romero. Los aceites podrían envasarse además en recipientes que minimizan la exposición al oxígeno, al calor y a la luz incidente. Estas condiciones aumentarán específicamente la estabilidad de los SPMs y precursores de SPMs previniendo o limitando la oxidación e isomerización de dobles enlaces. La estabilidad del aceite a granel o el aceite formulado también se beneficiará de estas condiciones, ya que los SPMs y los precursores de SPMs se disuelven en aceites con un nivel significativo de PUFAs que son sensibles a la oxidación.

Los suplementos y formulaciones también podrían incluir uno o más principios activos tales como aspirina, otros

fármacos antiinflamatorios no esteroideos, vitaminas, antioxidantes, flavonoides, minerales, oligoelementos, ácidos grasos, licopeno, S-adenosilmetionina, oleocantal, resveratrol, pterostilbeno, proteínas bioactivas y péptidos tales como bromelaina, oligosacáridos, glucosinolatos y extractos vegetales tales como extracto de *Boswellia serrata*, mangostán, cápsico, cúrcuma, jengibre, té, neem y/o corteza de sauce. Los ingredientes no se limitan a los ejemplos mencionados en este caso.

Se pueden preparar suplementos nutricionales específicos para apoyar condiciones de salud específicas que incluyen un aceite de pescado, un aceite de krill o un concentrado de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga complementado con un aceite que contiene SPMs o precursores de SPMs, junto con glucosamina y condroitina para la artritis, o con zinc, luteína y zeaxantina para la salud ocular.

Otros suplementos nutritivos que contienen aceites con SPMs y precursores de SPMs son preparaciones multivitamínicas, nutrición deportiva, cápsulas de aceite de pescado fortificadas, productos para la salud bucodental como pasta de dientes y enjuague bucal, y aceites específicos usados como alimentos como productos para untar, aderezos, aceites para cocinar, snacks, bebidas nutritivas, geles blandos, gomas de mascar y en fórmulas infantiles.

Los aceites descritos en esta invención pueden incluirse junto con uno o más vehículos o excipientes farmacéuticamente aceptables para preparar formulaciones farmacéuticas que pueden administrarse por una variedad de rutas que incluyen administración oral, rectal, vaginal, tópica, transdérmica, sublingual, subcutánea, intravenosa, intramuscular, insuflación, intratecal e intranasal. Formulaciones adecuadas para su uso en la presente invención se encuentran en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Philadelphia, PA, 17<sup>a</sup> edición, 1985.

El o los principios activos pueden mezclarse con un excipiente, diluirse con un excipiente y/o encerrarse dentro de un vehículo que puede tener la forma de una cápsula, bolsita, papel u otro recipiente. Cuando el excipiente sirve como diluyente, puede ser un material sólido, semisólido o líquido, que actúa como vehículo, portador o medio para el principio activo. Las formulaciones pueden estar en forma de comprimidos, píldoras, polvos, trociscos, bolsitas, sellos, elixires, suspensiones, emulsiones, soluciones, jarabes, aerosoles (como un sólido o en un medio líquido), pomadas, cápsulas de gelatina blanda y dura, supositorios, soluciones inyectables estériles, líquidos estériles para administración intranasal (por ejemplo, un dispositivo de pulverización) o polvos envasados estériles. Las formulaciones pueden incluir adicionalmente: agentes lubricantes tales como talco, estearato de magnesio y aceite mineral; agentes humectantes; agentes emulsionantes y de suspensión; agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxibenzoatos; agentes edulcorantes; y agentes aromatizantes. Los suplementos y las formulaciones de la invención pueden formularse para proporcionar una liberación rápida, sostenida o retardada de los principios activos después de la administración al paciente empleando procedimientos conocidos en la materia.

Para preparar formulaciones sólidas tales como comprimidos, el aceite se mezcla con un excipiente farmacéutico para formar una composición de preformulación sólida que contiene una mezcla homogénea de un compuesto. Los comprimidos o píldoras pueden recubrirse o componerse de otro modo para proporcionar una forma de dosificación que proporcione la ventaja de una acción prolongada. Por ejemplo, el comprimido o píldora puede comprender un componente de dosificación interno y un componente de dosificación externo, estando este último en forma de una envoltura sobre el primero. Los dos componentes pueden estar separados por una capa entérica que sirve para resistir la desintegración en el estómago y permitir que el componente interno pase intacto al duodeno o se retrase en la liberación. Se puede usar una variedad de materiales para tales capas o recubrimientos entéricos, incluyendo tales materiales una serie de ácidos poliméricos y mezclas de ácidos poliméricos con materiales tales como goma laca, alcohol acetílico y acetato de celulosa.

Las formas líquidas de las formulaciones incluyen suspensiones y emulsiones. Las formulaciones se pueden encapsular, preparar como un coloide, introducirse en el lumen de los liposomas, o incorporarse en las capas de los liposomas. Una formulación líquida también puede consistir en el propio aceite, que puede encapsularse.

Los aceites se formulan preferentemente en una forma de dosificación unitaria del aceite activo y su(s) ingrediente(s). La cantidad administrada al sujeto o paciente variará dependiendo de lo que se esté administrando, el propósito de la administración, tal como profilaxis o terapia, el estado del sujeto o paciente, la forma de administración y similares, todos los cuales están dentro de la habilidad de médicos, dietistas y farmacéuticos calificados. En aplicaciones terapéuticas, las formulaciones se administran a un paciente que ya padece una enfermedad en una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente los síntomas de la enfermedad y sus complicaciones. Las cantidades eficaces para este uso dependerán del estado de la enfermedad que se esté tratando, así como del juicio del médico tratante, dependiendo de factores tales como la gravedad de los síntomas, la edad, el peso y el estado general del paciente, y similares.

Las formulaciones farmacéuticas específicas podrían ser aceites encapsulados que se tomarán por vía oral para el tratamiento de enfermedades con un componente inflamatorio, fórmulas de liberación sostenida, formulaciones tópicas para el tratamiento del acné, psoriasis, eccema, rosácea, etc., formulaciones intravenosas basadas en aceites emulsionados que son útiles como nutrición clínica y fármacos parenterales, preparaciones liposómicas y sistemas de administración dirigidos a los tejidos, formulaciones de inhalación y formulaciones que se pueden inyectar en el sistema nervioso central.

Una realización adicional es la formulación de aceites que contienen SPMs y precursores de SPMs y que tienen actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución como cosméticos, productos de belleza y cosméticos nutritivos. Estas formulaciones incluyen maquillaje, cremas hidratantes para la piel y cremas tópicas específicas, como pomadas para quemaduras solares y bronceadores. En particular, los aceites que son antiinflamatorios y estimulantes de la resolución y que contienen SPMs y precursores de SPMs, podrían constituir cosméticos que contrarrestan la irritación y la inflamación en el sitio de aplicación.

Los procedimientos para tratar a un sujeto (por ejemplo, un ser humano, perro, gato, caballo, vaca, cabra, cerdo, pez y otros animales) que tiene una afección inflamatoria o una enfermedad con un componente inflamatorio pueden incluir administrar al sujeto uno o más de los aceites, suplementos y formulaciones descritos en esta invención, en una cantidad y régimen de dosificación eficaz para curar, tratar y/o reducir la inflamación en un sujeto. El uso terapéutico de los aceites que contienen SPMs y/o precursores de SPMs se dirigirá principalmente para tratar o prevenir cualquiera de muchas posibles dolencias, trastornos y enfermedades que incluyen un aspecto de la inflamación en su etiología o síntomas. El uso puede abarcar además afecciones y enfermedades, que según se ha informado, mejoran por el aumento de la ingestión de EPA/DHA o aceites de pescado (por ejemplo, hipertrigliceridemia, arritmias o depresión). Los ejemplos de afecciones inflamatorias incluyen enfermedad cardiovascular (por ejemplo, aterosclerosis, presión arterial alta, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiporreactividad endotelial, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular), aspectos del síndrome metabólico (por ejemplo, pérdida de sensibilidad a la insulina, obesidad, esteatosis hepática, colestasis), enfermedades neurodegenerativas (enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple, apraxia), reacciones atópicas/alérgicas, cáncer, osteoartritis, artritis reumatoide, dolor inflamatorio, acné, psoriasis, rosácea, asma, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, sepsis, rinitis alérgica, sinusitis, periodontitis, enfermedad intestinal inflamatoria, enfermedad de Crohn, degeneración macular, síndrome del ojo seco, ulceración gástrica, cáncer y trastornos auto-inflamatorios. Los aceites descritos en esta invención también pueden ser adecuados para tratar distintas formas de dolor agudo y crónico e hipersensibilidad a estímulos físicos y químicos. Los aceites descritos en esta invención también podrían ser útiles para tratar afecciones provocadas por la desregulación de la angiogénesis, la agregación y coagulación de plaquetas, el crecimiento óseo, la curación de tejidos, la regulación de la presión arterial, la hematopoyesis y la homeostasis lipídica. Los aceites descritos en esta invención también podrían ser útiles para reducir los signos macroscópicos y físicos de inflamación tales como hinchazón, edema, enrojecimiento, fiebre, dolor y enfermedad inflamatoria.

Los aceites descritos en esta invención, dado que contienen mediadores lipídicos derivados de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga con actividad antiinflamatoria y pro-resolutiva, pueden obviar además la necesidad de aumentar los niveles tisulares de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga a partir de los cuales se pueden formar estas sustancias dentro del cuerpo de un sujeto después de la complementación dietética.

Los aceites descritos en esta invención también podrían administrarse a sujetos que tienen niveles aumentados o anormales de marcadores inflamatorios tales como proteína C reactiva de alta sensibilidad (hs-CRP), amiloide A en suero, velocidad de sedimentación de eritrocitos, moléculas de adhesión solubles (por ejemplo, E-selectina, P-selectina, molécula de adhesión intracelular-1, molécula de adhesión de células vasculares-1), citocinas (por ejemplo, interleucina-1 $\beta$ , -6, -8 y -10 y factor de necrosis tumoral- $\alpha$ ), fibrinógeno y/o glóbulos blancos activados (por ejemplo, leucocitos con velocidades mejoradas de producción de especies de oxígeno y nitrógeno reducidas; neutrófilos no esféricos y monocitos con vacuolización aumentada). A este respecto, los suplementos y formulaciones de la invención podrían usarse para reducir los niveles de uno o más de estos marcadores inflamatorios en al menos 99, 95, 90, 80, 70, 60 o 50 %; o para reducir estos niveles dentro de los intervalos considerados normales.

Los suplementos y formulaciones también se pueden administrar a un sujeto para prevenir la inflamación.

## Ejemplos

### **EJEMPLO 1: El fraccionamiento de un aceite de éster etílico de PUFAs omega-3 mediante cromatografía de fluidos supercríticos a escala industrial permite el enriquecimiento de precursores de SPMs esterificados y la fabricación de fracciones de aceite distintas con diferente actividad antiinflamatoria.**

Para evaluar la actividad antiinflamatoria de distintas fracciones de aceite de éster etílico de ácido graso obtenidas durante la cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) para la fabricación a escala industrial de concentrados de éster etílico de EPA y éster etílico de DHA, se estableció un modelo murino de inflamación estéril subcutánea que permitió medir los efectos de las fracciones de aceite administradas por vía oral en la fase proinflamatoria de la respuesta inflamatoria. Se produjeron ocho fracciones de aceite eluidas consecutivamente por SFC a escala industrial por fraccionamiento de un concentrado intermedio de éster etílico de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga que contenía un 70 % de EPA-EE y DHA-EE combinados que, a su vez, se había obtenido por extracción con fluidos supercríticos a escala industrial (SFE). El fraccionamiento por SFC se lleva a cabo de la siguiente manera. Un tanque de materia prima, previamente cubierto con nitrógeno, se carga con el concentrado de éster etílico de PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga. El contenido del tanque se calienta si es necesario y la temperatura se estabiliza aproximadamente entre 20-40 °C. El aceite se procesa por lotes haciéndolo pasar a través de una columna cromatográfica. Los volúmenes de aceite que

pesan entre 7,5 y 9,5 kg se bombean ajustando la presión y la temperatura a aproximadamente 110-135 bar y 20-40 °C. El dióxido de carbono se bombea al mismo tiempo a 110-130 bar y entre 43,5-45,5 °C. Ambos flujos (concentrado de omega-3 y dióxido de carbono) se inyectan en la cabeza de la columna cromatográfica que fluye en el interior a una presión entre 98-102 bar y con una temperatura entre 43,5-45,5 °C. Aprovechando las diferencias en la retención de los componentes que componen el aceite a separar a través de la columna cromatográfica, rellena con fase estacionaria de sílice modificada, se recogen diferentes fracciones. Los tiempos de elución totales de las operaciones de fraccionamiento individuales están entre 40-85 minutos. El material eluido se recoge en fracciones eluidas consecutivamente que duran entre 2-20 minutos. La relación entre la fase móvil (dióxido de carbono supercrítico) y la carga (concentrado de omega-3) está entre 600-850 kg de disolvente/kg de carga.

Con el fin de iniciar la inflamación, se inyectó por vía subcutánea lipopolisacárido de *Escherichia coli* (LPS; serotipo 127:B8, purificado por extracción con ácido tricloroacético, Sigma-Aldrich) como una dosis única (5 miligramos por kilogramo en un volumen de 200 microlitros de saliva estéril) en el flanco posterior dorsal de un ratón (ratones CD1 de 9 semanas de edad y con un peso de aproximadamente 30 gramos, adquiridos en la compañía Charles River). La infiltración de neutrófilos en el sitio de inflamación se midió de manera no invasiva por la bioluminiscencia emitida por la conversión de luminol por medio de la enzima de neutrófilos mieloperoxidasa (**Gross, 2009**), lo que permite la evaluación de los cambios inflamatorios durante un período de tiempo de 6 horas. El empleo de un modelo subcutáneo de inflamación permitió mediciones de bioluminiscencia reproducibles de la actividad de neutrófilos con el fin de poder medir cambios estadísticamente significativos en la actividad de neutrófilos tras la administración de sustancias de ensayo. Treinta minutos antes de la administración de LPS, se administraron 100 microlitros de control de vehículo (saliva estéril), indometacina (dosis; 10 miligramos por kilogramo), o una de las ocho fracciones de aceite obtenidas por SFC, mediante sonda, reflejando la vía oral (*per os*, (p.o.)) de administración. Se usó el compuesto antiinflamatorio no esteroideo indometacina como control positivo para confirmar que se podía inhibir la respuesta inflamatoria inducida por LPS. Las Figuras 1A-H muestran el efecto de una serie de fracciones de aceite eluidas consecutivamente (número 1-8, respectivamente), obtenidas por fraccionamiento por SFC a escala industrial del concentrado intermedio de éster etílico de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga (que contiene un 70 % de EPA-EE y DHA-EE combinados), sobre cambios inflamatorios agudos que se producen por vía subcutánea en ratones inducidos por administración subcutánea (s.c) de lipopolisacárido (LPS). *Círculos abiertos*; inflamación inducida por LPS s.c. (n= 40). *Cuadrados abiertos*; indometacina 10 mg/kg p.o. 30 minutos antes de LPS s.c. (n= 6). *Triángulos abiertos*; 100 microlitros de cada fracción de aceite número 1-8 representada en el panel A-H, respectivamente, cada una administrada una vez por sonda 30 minutos antes de LPS (n=6 por fracción de aceite sometida a ensayo). Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias estadísticamente significativas (prueba de la t de Student;  $P < 0,05$ ) en la inflamación se indican por: \* (fracciones de aceite dadas antes de LPS en comparación con el vehículo dado antes de LPS), # (indometacina dada antes de LPS en comparación con el vehículo dado antes de LPS), y t (fracciones de aceite dadas antes de LPS en comparación con la indometacina dada antes de LPS).

Como se muestra en la Figura 1, la indometacina inhibió la inflamación inducida por LPS en un 26 % después de 3 horas y un 44 % después de 6 horas (número de observaciones independientes n=40), en comparación con ratones que habían recibido saliva en lugar de indometacina (n=40). De interés, el fraccionamiento por SFC de un aceite de éster etílico que contiene altos niveles de ésteres etílicos de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga permitió la producción de diferentes fracciones de aceite que tenían actividades marcadamente distintas sobre la inflamación después de la administración oral (n=5 para cada fracción de aceite sometida a ensayo). Tres fracciones de aceite indujeron una acción antiinflamatoria después de la administración por vía oral. La fracción de aceite 1 redujo significativamente la inflamación en un 61 % tres horas después del inicio de la inflamación inducida por LPS, y en un 82 % a las seis horas (Fig. 1 A). La fracción de aceite 7 redujo significativamente la inflamación en un 49 % después de tres horas (Fig. 1 G). La fracción de aceite 8 redujo significativamente la inflamación en un 66 % después de 90 minutos (Fig. 1 H). Las fracciones de aceite 2, 3, 4 y 6 no cambiaron significativamente la respuesta inflamatoria estimulada por LPS (Fig. 1, paneles B, C, D y F, respectivamente). De interés es que las acciones antiinflamatorias de varias fracciones de aceite tuvieron una eficacia significativamente mayor que el compuesto antiinflamatorio ampliamente usado indometacina en sí, concretamente las fracciones de aceite 1 y 8. Por otra parte, la marcada actividad antiinflamatoria de la fracción de aceite 1 también apunta a una actividad estimulante de la resolución que, ya después de 6 horas, ha llevado activamente la respuesta inflamatoria neutrófila casi al estado no inflamado. El fraccionamiento por SFC a escala industrial permitió obtener una diferenciación funcional suficiente para que una fracción de aceite, la 3, potenciara la inflamación en el punto temporal más temprano, a saber, más del doble de la actividad de los neutrófilos a los 90 minutos, tras lo cual, el alcance de la respuesta neutrófila se normalizó con respecto a la respuesta observada en los animales tratados con vehículo. Esto apunta a que este aceite podría facilitar una respuesta inflamatoria más rápida frente a un estímulo infeccioso bacteriano. En resumen, los resultados demuestran que a través del fraccionamiento de un aceite rico en PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga es posible lograr fracciones de aceite que tienen actividades distintas sobre la respuesta inflamatoria, y que las fracciones de aceite se obtienen con actividad antiinflamatoria significativa después de la administración oral.

Las mismas fracciones de aceite que se habían evaluado para determinar su actividad antiinflamatoria se analizaron para determinar sus niveles relativos o absolutos de precursores para la biosíntesis de SPMs, así como los propios SPMs. Todos los aceites se estabilizaron mediante la adición de hidroxitolueno butilado con el fin de evitar la oxidación inadvertida. Las extracciones líquido-líquido de las fracciones de aceite para aislar los SPMs y sus precursores no revelaron la presencia de niveles medibles de ningún derivado mono-, di- y trihidroxilado de PUFAs, tal como EPA,

DHA o AA. Sin embargo, cuando los aceites se hidrolizaron por hidrólisis alcalina (NaOH 10 M, agitación, 3 horas, a 20 °C), se detectó un número significativo de mediadores lipídicos derivados de EPA, DHA y AA. LA FIG. 2 muestra la abundancia relativa de las formas esterificadas con etilo y saponificables de diversos derivados monohidroxilados de los ácidos grasos poliinsaturados EPA y DHA, en fracciones de aceite eluidas consecutivamente de un fraccionamiento por SFC a escala industrial del concentrado intermedio de éster etílico de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga (que contiene un 70 % de EPA-EE y DHA-EE combinados). Las fracciones numeradas 1-8 son las mismas que las sometidas a ensayo para la actividad antiinflamatoria como se muestra en la Figura 1. Los valores son medias de mediciones duplicadas de áreas de pico de registros espectrométricos de masas de transiciones iónicas correspondientes a cada derivado de PUFA. No se pudieron encontrar niveles medibles de las formas de ácidos grasos libres correspondientes de los mismos derivados de PUFA en estas fracciones de aceite. (*Abreviaturas; HEPE, ácido hidroxi-eicosapentaenoico; HDHA, ácido hidroxi-docosahexaenoico*). Dado que estas fracciones de aceite se derivan de aceite esterificado con etilo empleado en la concentración a escala industrial y la purificación de EPA-EE y DHA-EE, los mediadores lipídicos medidos son los propios ésteres etílicos. Se conocen varios de los compuestos medidos como precursores intermedios para la formación de SPMs, tales como ácido 4-hidroxi-docosahexaenoico (4-HDHA; ácido 4-hidroxi-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-docosahexaenoico) y ácido 18-hidroxi-eicosapentaenoico (18-HEPE; ácido 18S-hidroxi-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-eicosapentaenoico). El 18-HEPE es un precursor para la formación de resolvinas de la serie E, y se sabe que el 4-HDHA tiene acciones antiinflamatorias y protectoras de los tejidos en la retinopatía vasoproliferativa, y puede actuar como precursor de los SPMs derivados de 4-HDHA. Los diversos precursores de SPMs medidos se distribuyeron diferencialmente en las diversas fracciones de aceite obtenidas por SFC. Esta observación indica que el fraccionamiento de aceites que contienen PUFA  $\omega$ -3 habitualmente empleados puede permitir la fabricación de aceites que contienen presencia definida, combinaciones y niveles de mediadores lipídicos derivados de PUFA distintos.

Un derivado de DHA, ácido 17-hidroxi-docosahexaenoico (17-HDHA; ácido 17-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico), es de interés como precursor para la biosíntesis de SPMs, concretamente, como precursor central para la formación de las resolvinas de la serie D RvD1, RvD2, RvD3 y RvD4 con potente bioactividad antiinflamatoria y de resolución de inflamación. La FIG. 3A muestra la concentración del éster etílico de 17-HDHA en varias fracciones de aceite eluidas consecutivamente de SFC a escala industrial del concentrado de éster etílico de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga intermedio (que contiene un 70 % de EPA-EE y DHA-EE combinados), correspondiente a las mismas fracciones que se muestran en las Figuras 1 y 2. La cuantificación de éster etílico de 17-HDHA como una sustancia saponificable en las fracciones de aceite de SFC de elución consecutiva se llevó a cabo usando estándares internos y LC-espectrometría de masas triple cuadrupolo. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media (n=3 separaciones cromatográficas individuales, medidas por duplicado). Los resultados muestran que el éster etílico de 17-HDHA está enriquecido en la primera fracción de elución, alcanzando concentraciones de aproximadamente 110 mg/l (0,01 % p/v). No se pudieron encontrar niveles medibles de la forma de ácido graso libre correspondiente de 17-HDHA en estas fracciones. La medición de los niveles de 17-HDHA en la primera fracción de aceite de varios lotes fraccionados con SFC de este concentrado intermedio de éster etílico de ácidos grasos  $\omega$ -3 de cadena larga, que se produce mediante extracción con fluidos supercríticos (SFE) a escala industrial, ha indicado que el intervalo de concentraciones de 17-HDHA en esta fracción se encuentra en el intervalo de 30-110 mg/l. Esto muestra que se pueden idear etapas de fraccionamiento a escala industrial específicas para enriquecer SPMs y precursores de SPMs específicos en fracciones de aceite definidas.

Fue interesante determinar que estos precursores de SPMs que se encuentran en un aceite rico en PUFA  $\omega$ -3 son de origen natural como los propios ésteres etílicos de PUFA en los que se disuelven estas sustancias. Con ese fin, se llevó a cabo un análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento quiral-espectrometría de masas de triple cuadrupolo del éster etílico de 17-HDHA encontrado enriquecido en la fracción número 1 con el fin de determinar la abundancia relativa de los estereoisómeros 17S-HDHA y 17R-HDHA (panel superior). La fracción de aceite número 1 analizada en este caso es la misma que la fracción de aceite número 1 mostrada en las Figuras 1, 2 y 3A. La evaluación de la comigración de los mediadores lipídicos observados con estándares sintéticos auténticos (panel inferior) de los estereoisómeros y la monitorización de iones seleccionados de las transiciones de masa específicas mediante espectrometría de masas de triple cuadrupolo indican que el éster etílico de 17-HDHA en la fracción 1 es el estereoisómero S natural. El panel inferior muestra los tiempos de retención de patrones sintéticos auténticos de los estereoisómeros de 17-HDHA, 14-HDHA, 7-HDHA y 4-HDHA. También se muestra en este caso que el 4-HDHA está presente predominantemente como el estereoisómero S natural. La oxidación química no es responsable del 17-HDHA y 4-HDHA presentes en la fracción de aceite 1, ya que los productos no son racémicos. Dado que el estereoisómero S de PUFA monohidroxilado es el isómero formado naturalmente por la mayoría de las lipoxigenasas, la presencia de este estereoisómero en esta fracción de aceite indica que 17-HDHA y 4-HDHA tienen un origen natural y se coextraen y copurifican con PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga a lo largo del proceso industrial hasta la etapa en la que se llevó a cabo el fraccionamiento por SFC. El fraccionamiento mediante una tecnología de separación dedicada, tal como la cromatografía de fluidos supercríticos que se muestra en este caso, permite además el fraccionamiento de SPMs y precursores de SPMs seleccionados de origen natural en fracciones de aceite específicas.

Con respecto a 17-HDHA, es posible que la actividad antiinflamatoria de la fracción de aceite 1 (mostrada en la Fig. 1 A) se pueda explicar, por lo tanto, al menos en parte, debido al enriquecimiento selectivo de este precursor de SPM antiinflamatorio en esta fracción de aceite. Con el fin de determinar la acción antiinflamatoria y la contribución de 17-HDHA, se determinó el efecto antiinflamatorio de la fracción 1 en un modelo bien conocido de inflamación estéril. La

Figura 4 muestra el efecto antiinflamatorio de la fracción de aceite número 1 administrada por sonda en un modelo murino de inflamación peritoneal inducida por la administración intraperitoneal del extracto de membrana de levadura zymosan A. Se determinaron los cambios selectivos en las poblaciones de células inflamatorias específicas en el exudado inflamatorio 4 horas después del inicio de la inflamación. Se administró un vehículo (100 microlitros de saliva estéril), 100 microlitros de fracción de aceite 1 o 1 microgramo de 17S-HDHA sintético (Cayman Chemicals) en saliva estéril mediante sonda 30 minutos antes de la inyección intraperitoneal de 0,1 mg de zymosan A. La fracción de aceite 1 analizada en este caso es la misma que la fracción número 1 que se muestra en las figuras 1, 2 y 3. Después de 4 horas, se recuperó el exudado inflamatorio y se determinaron los cambios en el número y tipos de células inflamatorias mediante clasificación de células activadas por fluorescencia empleando anticuerpos específicos marcados con fluorescencia. Los valores son la media  $\pm$  error estándar de la media de 67 ratones individuales. Las diferencias estadísticamente significativas (prueba de la t de Student) se indican por \* ( $P < 0,05$ ) o # ( $P < 0,10$ ) para las comparaciones de los números de células de exudado inflamatorio obtenidos después del tratamiento con la fracción de aceite 1 o en comparación con los ratones tratados con vehículo. Como se muestra en la Figura 4, la administración de la fracción de aceite 1 disminuyó significativamente el número total de células exudadas y el número de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Este efecto antiinflamatorio se reprodujo mediante la administración por vía oral (sonda) de 17S-HDHA. No se midieron cambios estadísticamente significativos para monocitos, macrófagos o linfocitos.

El resultado indica que la eficacia antiinflamatoria tras la administración por vía oral de la fracción de aceite 1 que contiene aproximadamente 100 mg/l (10 microgramos en 100 microlitros) de éster etílico de 17S-HDHA, es muy similar a la acción antiinflamatoria de 17S-HDHA sintético. Los resultados muestran además que la fracción de aceite 1 tiene eficacia antiinflamatoria sistémica después de la administración oral en dos modelos distintos de inflamación aguda en ratones, a saber, peritonitis iniciada por zymosan e inflamación subcutánea inducida por lipopolisacárido.

#### **EJEMPLO 2: Presencia de SPMs y precursores de SPMs en aceites de origen natural**

La Figura 5 A muestra la presencia de dos resolvinas, resolvina D1 y resolvina D2, como materia saponificable en un aceite de pescado crudo "1812" obtenido de anchoa peruana. Este aceite es una materia prima común que contiene aproximadamente un 18 % de EPA y un 12 % de DHA. El aceite de anchoa "1812" (18/12 significa un aceite que contiene un 18 % de EPA y un 12 % de DHA) es el aceite de pescado omega-3 que actualmente se usa en mayores volúmenes en todo el mundo para la fabricación de aceites de pescado refinados y concentrados de aceite de pescado que tienen mayores niveles de PUFAs  $\omega$ -3 EPA y DHA. Este aceite está compuesto predominantemente de triglicéridos, lo que indica que RvD1 y RvD2 están muy probablemente aciladas dentro de los triglicéridos. Como alternativa, o en parte, estas resolvinas también se pueden acilar dentro de un diglicérido o monoglicérido, ácido fosfatídico, fosfolípido u otra especie de éster o amida presente en este aceite. No se encontraron niveles medibles de RvD1 o RvD2 en la forma de ácido carboxílico libre en este aceite. El cromatograma muestra que los SPM que se sabe que poseen actividades antiinflamatorias y estimulantes de la resolución extremadamente potentes, están presentes en aceites que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga que se usan ampliamente en la industria para la fabricación de aceites que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga como suplementos nutritivos e ingredientes farmacéuticos.

Una comparación paralela de aceites obtenidos de diferentes organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga, demuestra que el 17-HDHA está presente como sustancia saponificable en aceites de anchoa, atún, krill y algas, como se muestra en la Fig. 5B. Se muestra que dos aceites de anchoa crudos diferentes, que se emplean habitualmente como material de partida para la preparación de aceites de pescado que contienen EPA y DHA y concentrados de éster etílico de EPA y DHA, contienen 17-HDHA (18/12 significa un aceite que contiene un 18 % de EPA y un 12 % de DHA, 22/08 significa un aceite que contiene un 22 % de EPA y un 8 % de DHA). Estos dos aceites crudos ilustrativos contienen hasta un 30 % de EPA y DHA combinados, pero en este caso se muestra que dichos aceites también contienen el precursor de SPMs 17-HDHA. La medición de 17-HDHA en los aceites de atún, krill y algas, que también se usan ampliamente como suplementos dietéticos por su contenido de EPA y DHA, mostró que estos aceites también contenían niveles significativos de 17-HDHA. También, en estos aceites, el 17-HDHA medido estaba presente en forma de sustancia saponificable, lo que apunta a la naturaleza acilada del precursor de SPMs. Los aceites de atún, krill y algas son aceites disponibles comercialmente. El aceite de atún es un aceite de hígado de atún. El aceite de algas es un aceite de algas que contiene DHA obtenido de un alga dinoflagelada, Orden *Peridiniida*. En particular, estos aceites de krill y algas se extraen de organismos que se capturan o cultivan a propósito por su contenido relativamente alto de DHA, y se muestra en este caso que contienen niveles relativamente altos de 17-HDHA en comparación con los aceites de pescado medidos. La presencia de este precursor para las resolvinas de la serie D demuestra que pueden producirse aceites con niveles definidos de SPMs o precursores de SPMs, y que tales aceites pueden emplearse para la fabricación de aceites en los que estos compuestos se enriquecen adicionalmente.

Un perfil cualitativo de la presencia de varios SPMs y precursores de SPMs en aceites obtenidos de pescado, algas y krill, demostró la presencia de SPMs y precursores de SPMs específicos en los aceites (Fig. 5C). La medición de los diversos SPMs y precursores de SPMs se realizó mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas en tándem empleando transiciones de diagnóstico y co-elución con estándares de mediadores de lípidos disponibles en el mercado. Los compuestos AH detectados corresponden a sustancias saponificables presentes en los aceites, y no se pudieron medir los compuestos correspondientes en su forma de ácido carboxílico libre. Por ejemplo, tanto los precursores de SPMs monohidroxilados derivados de EPA como de DHA y los SPMs están presentes en dos aceites

de pescado tales como un aceite de anchoa "18/12" refinado (que contiene un 18 % de EPA y un 12 % de DHA) y en un aceite de hígado de atún esterificado con etilo. Por el contrario, los mediadores lipídicos derivados de DHA predominan en un aceite extraído de algas que se cultivan por sus altos niveles de DHA. Se demostró que un aceite de krill contenía mediadores lipídicos monohidroxilados derivados de EPA y DHA, pero el compuesto derivado de EPA parece más abundante que los mediadores lipídicos derivados de DHA. Esto también se reflejó en la presencia de los derivados epoxigenados, donde el SPM derivado de DHA ácido 19(20)-epoxi-docosapentaenoico (19(20)-EpDPE; ácido 19(20)-epoxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-pentaenoico) fue el derivado epoxi dominante en el aceite de algas, y el SPM derivado de EPA ácido 17(18)-epoxi-eicosatetraenoico (17(18)-EpETE; ácido 17(18)-epoxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraenoico) y el ácido 11(12)-epoxi-eicosatetraenoico (11(12)-EpETE; ácido 11(12)-epoxi-eicosa-5Z,8Z,14Z,17Z-tetraenoico) predominantes en el aceite de krill. Pueden identificarse componentes menores de interés, como se muestra en el caso del aceite de hígado de atún, en el que se encontró que estaba presente el mediador lipídico derivado del DHA doblemente hidroxilado ácido 10S,17S-dihidroxi-docosahexaenoico (10S,17S-diHDHA; ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico), así como el ácido 7,17-dihidroxi-docosapentaenoico ( $\omega$ -3) (7,17-diHDPA ( $\omega$ -3); ácido 7S,17S-dihidroxi-docosa-8E,10Z,13Z,15Z,19Z-pentaenoico ( $\omega$ -3)). También se detectó un derivado oxo del ácido docosapentaenoico ( $\omega$ -3), ácido 17-ceto-docosapentaenoico ( $\omega$ -3) (17-ceto-DPA) en todos los aceites sometidos a ensayo. Los aceites obtenidos de diferentes organismos que contienen PUFA  $\omega$ -3 de cadena larga tienen, por lo tanto, una composición notablemente diferente con respecto a los SPMs y los precursores de SPMs. Por lo tanto, es posible la diferenciación de aceites obtenidos de organismos que contienen PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga en función del contenido de mediadores lipídicos derivados de PUFAs, y constituye una base valiosa para decidir qué aceites podrían ser útiles para el fraccionamiento adicional mediante procedimientos de separación y extracción para obtener aceites con presencia definida, combinaciones y niveles enriquecidos de uno o más SPMs y precursores de SPMs.

### EJEMPLO 3: Enriquecimiento de SPMs y precursores de SPMs

La Figura 6A muestra el fraccionamiento selectivo de cuatro mediadores lipídicos oxigenados derivados de EPA, DHA y ácido docosapentaenoico (DPA  $\omega$ -3), en distintas fracciones de aceite. El material de partida que se fraccionó por SFC en ocho fracciones de aceite consecutivas fue un aceite de éster etílico de ácido graso que contenía un 56 % de EPA-EE más DHA-EE combinados. Este aceite corresponde a un concentrado de éster etílico de cadena larga  $\omega$ -3 fabricado a partir de aceite crudo extraído de una mezcla de organismos marinos, incluidos peces marinos (anchoa, sardina, arenque, sáballo, eperlano, salmón, atún y bonito) y moluscos (calamar, pulpo y sepia). El fraccionamiento por SFC se lleva a cabo de la siguiente manera. Un tanque de materia prima, previamente cubierto con nitrógeno, se carga con el concentrado de éster etílico de ácido graso omega-3. El contenido del tanque se calienta si es necesario y la temperatura se estabiliza aproximadamente entre 20-40 °C. Este aceite se procesa por lotes haciéndolo pasar a través de una columna cromatográfica. Los volúmenes de aceite que pesan entre 9,0 y 12 kg se bombean ajustando la presión y la temperatura a aproximadamente 110-135 bar y 20-40 °C. El dióxido de carbono se bombea al mismo tiempo a 110-130 bar y entre 43,5-45,5 °C. Ambos flujos (concentrado de omega-3 y dióxido de carbono) se inyectan en la cabeza de la columna cromatográfica que fluye en el interior a una presión entre 98-102 bar y con una temperatura entre 43,5-45,5 °C. Aprovechando las diferencias en la retención de los componentes que componen el aceite a separar a través de la columna cromatográfica, rellena con fase estacionaria de sílice modificada, se recogen diferentes fracciones. Los tiempos de elución totales de las operaciones de fraccionamiento individuales están entre 40-85 minutos. El material eluido se recoge en ocho fracciones eluidas consecutivamente que duran entre 2-20 minutos. La relación entre la fase móvil (dióxido de carbono supercrítico) y la carga (concentrado de omega-3) está entre 600-850 kg de disolvente/kg de carga.

Las fracciones de aceite eluidas consecutivamente contienen diferentes niveles de varios SPMs y precursores de SPMs (Fig. 6A), como se ejemplifica por el ácido 12-hidroxi-eicosapentaenoico (12-HEPE; ácido 12-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-pentaenoico), ácido 14-hidroxi-docosahexaenoico (14-HDHA; ácido 14-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico), ácido 19(20)-epoxi-docosapentaenoico (19(20)-EpDPE) y ácido 17-ceto-docosapentaenoico ( $\omega$ -3) (17-ceto-DPA ( $\omega$ -3)). Los valores son las medias de dos muestras para cada fracción de aceite de dos análisis de fraccionamiento a escala industrial independientes, medidas por duplicado. Los resultados se expresan como porcentaje de enriquecimiento en comparación con el aceite que se fraccionó. Se descubrió que el mediador lipídico monohidroxilado derivado de EPA 12-HEPE estaba predominantemente presente en la segunda fracción (Fig. 6A). El precursor de SPM derivado de DHA, 14-HDHA, se encontró predominantemente en la primera fracción. El 14-HDHA se puede oxigenar adicionalmente para formar, por ejemplo, ácido 14,21-dihidroxi-docosahexaenoico que tiene una potente actividad conocida de curación de heridas. El 14-HDHA también puede oxigenarse posteriormente en ácido 7S,14S-dihidroxi-docosahexaenoico (ácido 7S,14S-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico) que tiene actividad antiinflamatoria en la inflamación neutrófila. El mediador lipídico epoxigenado 19(20)-EpDPE, que es un derivado de citocromo P450 de DHA con propiedades antiinflamatorias, se encontró enriquecido selectivamente en fracciones de elución posteriores, especialmente en la fracción 5. Se descubrió que un derivado oxo del ácido docosapentaenoico ( $\omega$ -3), 17-ceto-DPA  $\omega$ -3, estaba enriquecido en las fracciones 3 a 7. Los resultados indican que el enriquecimiento de uno o más derivados oxigenados específicos de EPA, DHA y DPA  $\omega$ -3 se puede lograr mediante fraccionamiento por SFC de concentrados de éster etílico de PUFAs  $\omega$ -3 de cadena larga. Los compuestos corresponden a un material saponificable, y no se pudieron medir los ácidos carboxílicos libres correspondientes en las fracciones de aceite.

La Figura 6B muestra el enriquecimiento adicional de éster etílico de 17-HDHA cuando la primera fracción de SFC de un concentrado de éster etílico de ácido graso  $\omega$ -3 de cadena larga intermedio que contiene un 70 % de EPA-EE y DHA-EE combinados se fracciona adicionalmente. El aceite subfraccionado corresponde a la fracción de aceite 1 mostrada en las Figuras 1-3, y que se había encontrado previamente que contenía niveles enriquecidos del precursor de resolvina de la serie D 17S-HDHA en forma de éster etílico (Fig. 3A). El fraccionamiento adicional mediante SFC en tres subfracciones que eluyen entre 0 y 2 minutos (fracción 1A), de 2 a 7 minutos (fracción 1B) y de 7 a 12 minutos (fracción 1C), proporcionó un enriquecimiento adicional en la fracción 1B. Los valores son los niveles relativos de éster etílico de 17-HDHA (medias  $\pm$  S.D.) en las tres subfracciones. Los resultados indican que se puede lograr un enriquecimiento adicional de un precursor de SPM específico empleando procedimientos de separación específicos tales como SFC.

#### **EJEMPLO 4: Actividad estimulante de la resolución de un aceite que contiene un nivel enriquecido de un precursor de SPMs**

Con referencia a la Figura 7, que muestra la resolución de la inflamación estimulada por un aceite que contiene precursores de SPMs. La actividad estimulante de la resolución (pro-resolutiva) de la fracción de aceite 1 se determinó como un ejemplo de la capacidad de una fracción de aceite que contiene un precursor de SPM, para activar la resolución de la inflamación. La Figura 7 muestra los resultados de una evaluación en la que los cambios en los números de células inflamatorias se midieron por histoquímica de los coágulos de fibrina subcutáneos formados durante la respuesta inflamatoria iniciada por la administración subcutánea de LPS. La fracción de aceite 1 o vehículo (salina estéril) en un volumen de 100 microlitros se administró por sonda a ratones 30 minutos antes del inicio de la inflamación por administración subcutánea de LPS. La inflamación inducida por LPS empleada en este caso fue el mismo modelo que se explica en el Ejemplo 1. La fracción de aceite 1 es la primera fracción de elución de un fraccionamiento por SFC a escala industrial de un concentrado intermedio de éster etílico de PUFA de cadena larga que contiene un 70 % de EPA-EE y DHA-EE combinados, y es la misma fracción sometida a ensayo en los Ejemplos 1-3. Esta fracción de aceite 1 corresponde a la fracción 1 mostrada en las Figuras 1-3 y se descubrió previamente que contenía niveles enriquecidos del precursor de resolvina de la serie D 17S-HDHA en forma de éster etílico. Se aislaron coágulos de fibrina subcutáneos en diferentes momentos (3, 6, 24 y 48 horas) durante la respuesta inflamatoria, y se fijaron con formaldehído al 4 % durante 24 horas a 4 °C. Se prepararon portaobjetos de vidrio para microscopía con secciones de parafina de 4 micrómetros de espesor después de la deshidratación del tejido, y se tiñeron en Wright-Giemsa modificado. Las células inflamatorias se contaron por microscopía a un aumento de 400x en campos oculares completos de dos partes de al menos 3 secciones de tejido por afección. Los valores son recuentos de células inflamatorias totales promedio por campo ocular (media  $\pm$  S.D.) de 3 ratones individuales por punto de tiempo. La infiltración de células inflamatorias en ratones de control alcanzó el máximo a las 24 horas después de la administración de LPS, y posteriormente la inflamación se resolvió espontáneamente hacia las 48 horas. En ratones que habían recibido la fracción de aceite 1 por sonda, la inflamación subcutánea inducida por LPS se resuelve casi por completo (Fig. 7). La fracción de aceite enriquecida con precursores de SPMs, que ya se había demostrado que tenía una acción antiinflamatoria significativa en la fase proinflamatoria neutrófila temprana de la respuesta inflamatoria (Fig. 1, panel A), también se muestra en este caso que tiene una marcada actividad estimulante de la resolución (pro-resolución) tras la administración oral.

#### **Bibliografía**

- Arita M, Bianchini F, Aliberti J, Sher A, Chiang N, Hong S, Yang R, Petasis NA, Serhan CN. Stereochemical assignment, antiinflammatory properties, and receptor for the omega-3 lipid mediator resolvin E1. *J. Exp. Med.* 201, 5, 713-722, 2005.
- Bannenberg, G.\*, Chiang N\*, Ariel A, Anta M, Tjonahen E, Gotlinger KH, Hong S, Serhan CN. Molecular circuits of resolution: formation and actions of resolvins and protectins. *J. Immunol* 174, 7, 4345-4355, 2005. (\* *shared first authors*)
- Bannenberg, G. Serhan, C.N. Specialized pro-resolving lipid mediators in the inflammatory response: An update. *Biochim. Biophys. Acta.* 1801, 12, 1260-1273, 2010.
- Frank D. Gunstone & Fred B. Padley (Editors). *Lipid Technologies and Applications*, CRC Press, 1 st edition, 1997.
- Gladyshev MI, Sushchik NN, Makhutova ON. Production of EPA and DHA in aquatic ecosystems and their transfer to the land. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2013, Mar 14.
- Gross S, Gammon ST, Moss BL, Rauch D, Harding J, Heinecke JW, Ratner L, Piwnicka-Worms D. Bioluminescence imaging of myeloperoxidase activity in vivo. *Nat. Med.* 15, 4, 455-461, 2009.
- Hong S, Tjonahen E, Morgan EL, Lu Y, Serhan CN, Rowley AF. Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) brain cells biosynthesize novel docosahexaenoic acid-derived resolvins and protectins-Mediator lipidomic analysis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 78, 1-4, 107-116, 2005.
- Martinez, J.L. (Editor). *Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds*, CRC Press, 1 st edition, 2007.
- Mas E, Croft KD, Zahra P, Barden A, Mori TA. Resolvins D1, D2, and other mediators of self-limited resolution of inflammation in human blood following n-3 fatty acid supplementation. *Clin. Chem.* 58, 10, 1476-1484, 2012.
- Oh SF, Vickery TW, Serhan CN. Chiral lipidomics of E-series resolvins: aspirin and the biosynthesis of novel mediators. *Biochim. Biophys. Acta.* 1811, 11, 737-747, 2011.
- Petrie JR, Shrestha P, Zhou XR, Mansour MP, Liu Q, Belide S, Nichols PD, Singh SP. Metabolic engineering

plant seeds with fish oil-like levels of DHA. PLoS One 7, 11,e49165, 2012.

Pettitt TR, Rowley AF, Secombes CJ. Lipoxins are major lipoxygenase products of rainbow trout macrophages. FEBS Lett. 259, 1, 168-170, 1989.

5 Raatz SK, Golovko MY, Brose SA, Rosenberger TA, Burr GS, Wolters WR, Picklo MJ Sr. Baking reduces prostaglandin, resolvins, and hydroxy-fatty acid content of farm-raised Atlantic salmon (*Salmo salar*). J. Agric. Food Chem. 59, 20, 11278-11286, 2011.

Remington. The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins, 21st edition, 2005.

Shahidi, F (Ed), Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Vol. 1-6, John Wiley & Sons Inc., 6th edition, 2005.

10 Shearer GC, Harris WS, Pedersen TL, Newman JW. Detection of omega-3 oxylipins in human plasma and response to treatment with omega-3 acid ethyl esters. J. Lipid Res. 51,8, 2074-2081,2010.

Wagner K, Inceoglu B, Hammock BD. Soluble epoxide hydrolase inhibition, epoxygenated fatty acids and nociception. Prostaglandins Other Lipid Mediat. 96, 1-4, 76- 83,2011.

Yang R, Chiang N, Oh SF, Serhan CN. Metabolomics-lipidomics of eicosanoids and docosanoids generated by phagocytes. Curr. Protoc. Immunol Ch. 14, Unit 14, 26, 2011.

15

## REIVINDICACIONES

1. Una fracción de aceite que tiene actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución, enriquecida con precursores de mediadores pro-resolutivos especializados (SPMs), donde los precursores de SPMs proceden de un aceite obtenido de organismos que contienen ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3, donde los precursores de SPMs son:
  - 11S-HEPE (ácido 11S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,12E,14Z,17Z-pentaenoico);
  - 12S-HEPE (ácido 12S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-pentaenoico);
  - 12R-HEPE (ácido 12R-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,10E,14Z,17Z-pentaenoico);
  - 15S-HEPE (ácido 15S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,17Z-pentaenoico);
  - 18S-HEPE (ácido 18S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-pentaenoico);
  - 18R-HEPE (ácido 18R-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z,16E-pentaenoico);
  - 4S-HDHA (ácido 4S-hidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);
  - 7S-HDHA (ácido 7S-hidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);
  - 10S-HDHA (ácido 10S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);
  - 11S-HDHA (ácido 11S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,9E,13Z,16Z,19Z-hexaenoico);
  - 14S-HDHA (ácido 14S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico);
  - 14R-HDHA (ácido 14R-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico);
  - 17S-HDHA (ácido 17S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico);
  - 17R-HDHA (ácido 17R-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico);
  - 20S-HDHA (ácido 20S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,18E-hexaenoico);
  - 17S-HDPAn-6 (ácido 17S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,15E-pentaenoico);
  - 14S-HDPAn-6 (ácido 14S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z-pentaenoico);
  - 10S-HDPAn-6 (ácido 10S-hidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,16Z-pentaenoico);
  - 17S-HDPAn-3 (ácido 17S-hidroxi-docosa-7Z,10Z,13Z,15E,19Z-pentaenoico);
  - 14S-HDPAn-3 (ácido 14S-hidroxi-docosa-7Z,10Z,12E,16Z,19Z-pentaenoico);
  - 10S-HDPAn-3 (ácido 10S-hidroxi-docosa-7Z,11E,13Z,16Z,19Z-pentaenoico);
  - 15S-HETE (ácido 15S-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E-tetraenoico); y
  - 15R-HETE (ácido 15R-hidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E-tetraenoico).
2. La fracción de aceite de la reivindicación 1, donde el aceite se deriva de un organismo marino, una planta, un organismo microbiano o un organismo transgénico dotado de la capacidad para formar ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3.
3. La fracción de aceite de la reivindicación 2, donde el organismo marino comprende peces, crustáceos, algas o moluscos.
4. La fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde los precursores de SPMs son compuestos saponificables.
5. La fracción de aceite de la reivindicación 4, donde los precursores de SPMs están en forma de éster etílico, triglicérido, diglicérido, monoglicérido y/o fosfolípido.
6. La fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende además ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga.
7. La fracción de aceite de la reivindicación 6, caracterizada porque los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga comprenden EPA y/o DHA.
8. La fracción de aceite de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que comprende además un SPM seleccionado de:
  - resolvina E1 (RvE1; ácido 5S,12R,18R-trihidroxi-eicosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico),
  - 18S-resolvina E1 (18S-RvE1; ácido 5S,12R,18S-trihidroxi-eicosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico),
  - 20-hidroxi-RvE1 (ácido 5S,12R,18R,20-tetrahidroxi-eicosa-6Z,8E,10E,14Z,16E-pentaenoico),
  - resolvina E2 (RvE2; ácido 5S,18-dihidroxi-eicosa-6E,8Z,11Z,14Z,16E-pentaenoico),
  - resolvina E3 (RvE3; ácido 17,18R-dihidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico),
  - 18S-resolvina E3 (18S-RvE3; ácido 17,18S-dihidroxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico),
  - ácido 17,18-epoxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,13E,15E-pentaenoico,
  - lipoxina A5 (LXA5; ácido 5S,6R,15S-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E,17Z-pentaenoico),
  - 15-epi-lipoxina A5 (LXA5; ácido 5S,6R,15R-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E,17Z-pentaenoico),
  - maresina 1 (MaR1; ácido 7R,14S-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoico),
  - 7S-maresina 1 (7S-MaR1; ácido 7S,14S-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10E,12Z,16Z,19Z-hexaenoico),
  - 7S,14S-diHDHA (ácido 7S,14S-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),
  - protectina D1 (PD1; ácido 10R,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13E,15Z,19Z-hexaenoico),

- 10S,17S-HDHA (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 14S,21S-diHDHA (ácido 14S,21S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 14S,21R-diHDHA (ácido 14S,21R-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 14R,21S-diHDHA (ácido 14R,21S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 5 14R,21R-diHDHA (ácido 14R,21R-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 13S,14S-epoxi-DHA (ácido 13S,14S-epoxi-docosa-4Z,7Z,9E,11E,16Z,19Z-hexaenoico),  
 16,17S-diHDHA (ácido 16,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico),  
 16,17-epoxi-DHA (ácido 16,17-epoxi-docosa-4Z,7Z,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D1 (ácido RvD1; ácido 7S,8R,17S-trihidroxi-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 10 resolvina D2 (RvD2; ácido 7S,16R,17S-trihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D3 (RvD3; ácido 4S,11R,17S-trihidroxi-docosa-5Z,7E,9E,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D4 (RvD4; ácido 4S,5,17S-trihidroxi-docosa-6E,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D5 (RvD5; ácido 7S,17S-dihidroxi-docosa-5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D6 (RvD6; ácido 4S,17S-dihidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,14Z,16E,19Z-hexaenoico),  
 15 resolvina D1 desencadenada por aspirina (AT-RvD1; ácido 7S,8R,17R-trihidroxi-docosa-4Z,9E,11E,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D2 desencadenada por aspirina (AT-RvD2; ácido 7S,16R,17R-trihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12E,14E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D3 desencadenada por aspirina (AT-RvD3; ácido 4S,11,17R-trihidroxi-docosa-5Z,7E,9E,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 20 resolvina D4 desencadenada por aspirina (AT-RvD4; ácido 4S,5,17R-trihidroxi-docosa-6E,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 resolvina D5 desencadenada por aspirina (AT-RvD5; ácido 7S,17R-dihidroxi-docosa-5Z,8E,10Z,13Z,15E,19Z-hexaenoico),  
 25 resolvina D6 desencadenada por aspirina (AT-RvD6; ácido 4S,17R-dihidroxi-docosa-5E,7Z,10Z,14Z,16E,19Z-hexaenoico),  
 7S,17S-diHDPAn-3 (ácido 7S,17S-dihidroxi-docosa-8E,10Z,13Z,15Z,19Z-pentaenoico ( $\omega$ -3)),  
 lipoxina A4 (LXA4; ácido 5S,6R,15S-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E-tetraenoico),  
 15-epi-lipoxina A4 (15-epi-LXA4; ácido 5S,6R,15R-trihidroxi-eicosa-7E,9E,11Z,13E-tetraenoico),  
 30 delta-12-prostaglandina J2 (delta-12-PGJ2; ácido 11-oxo-15S-hidroxi-prosta-5Z,9,12E-trienoico),  
 15-desoxi-delta-12,14-prostaglandina J2 (15-desoxi-delta-12,14-PGJ2; ácido 11-oxo-prosta-5Z,9,12E,14E-tetraenoico),  
 ácido 11(12)-epoxi-eicosatetraenoico (11(12)-EpETE; ácido 11(12)-epoxi-eicosa-5Z,8Z,14Z,17Z-tetraenoico),  
 ácido 17(18)-epoxi-eicosatetraenoico (17(18)-EpETE; ácido 17(18)-epoxi-eicosa-5Z,8Z,11Z,14Z-tetraenoico),  
 35 ácido 19(20)-epoxi-docosapentaenoico (19(20)-EpDPE; ácido 19(20)-epoxi-docosa-4Z,7Z,10Z,13Z,16Z-pentaenoico),  
 10S,17S-HDPA n-6 (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-4Z,7Z,11E,13Z,15E-pentaenoico),  
 7,17-HDPA n-6 (ácido 7,17-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,13Z,15E-pentaenoico),  
 7,14-HDPA n-6 (ácido 7,14-dihidroxi-docosa-4Z,8E,10Z,12Z,16Z-pentaenoico),  
 40 10S,17S-HDPA n-6 (ácido 10S,17S-dihidroxi-docosa-7Z,11E,13Z,15E,19Z-pentaenoico), y/o  
 7,17-HDPA n-6 (ácido 7,17-dihidroxi-docosa-8E,10Z,13Z,15E,19Z-pentaenoico).
9. La fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende además un vehículo o un excipiente.
- 45 10. La fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, donde los precursores de SPMs incluyen 5S-HEPE (ácido 5S-hidroxi-eicosa-6E,8Z,11Z,14Z,17Z-pentaenoico).
11. Un procedimiento de producción de un fraccionado antiinflamatorio o estimulante de la resolución que comprende las etapas de:
- 50 a) detectar cada uno de los precursores de SPMs 11S-HEPE, 12S-HEPE, 12R-HEPE, 15S-HEPE, 18S-HEPE, 18R-HEPE, 4S-HDHA, 7S-HDHA, 10S-HDHA, 11S-HDHA, 14S-HDHA, 14R-HDHA, 17S-HDHA, 17R-HDHA, 20S-HDHA, 17S-HDPAn-6, 14S-HDPAn-6, 10S-HDPAn-6, 17S-HDPAn-3, 14S-HDPAn-3, 10S-HDPAn-6, 15S-HETE; y  
 55 15R-HETE en un aceite;  
 b) fraccionar el aceite en una pluralidad de fracciones;
- c) medir la actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución de al menos una de las fracciones; y  
 d) repetir opcionalmente las etapas a, b y/o c hasta que se obtenga un elemento fraccionado que comprende  
 60 los precursores de SPM 11S-HEPE, 12S-HEPE, 12R-HEPE, 15S-HEPE, 18S-HEPE, 18R-HEPE, 4S-HDHA, 7S-HSHA, 10S-HDHA, 11S-HDHA, 14S-HDHA, 14R-HDHA, 17S-HDHA, 17R-HDHA, 20S-HDHA, 17S-HDPAn-6, 14S-HDPAn-6, 10S-HDPAn-6, 17S-HDPAn-3, 14S-HDPAn-3, 10S-HDPAn-6, 15S-HETE; y 15R-HETE y que tiene actividad antiinflamatoria o estimulante de la resolución, donde opcionalmente los precursores de SPMs son compuestos saponificables, opcionalmente en la forma de éster etílico, triglicérido, diglicérido y/o fosfolípido.
- 65 12. El procedimiento de la reivindicación 11, donde el fraccionamiento se lleva a cabo mediante

procedimientos de extracción y separación.

13. El procedimiento de la reivindicación 12, donde el procedimiento de extracción comprende la extracción por fluido supercrítico con dióxido de carbono como disolvente, llevada a cabo en condiciones supercríticas, en un intervalo de temperatura entre aproximadamente 27 y aproximadamente 60 °C, un intervalo de presión entre 80 y aproximadamente 180 bar, y una relación de disolvente/carga de aproximadamente 10 a aproximadamente 800 (Kg/Kg).
14. El procedimiento de la reivindicación 12, donde el procedimiento de separación comprende la cromatografía de fluidos supercríticos con dióxido de carbono como disolvente, llevada a cabo en condiciones supercríticas, en un intervalo de temperatura entre aproximadamente 27 y aproximadamente 60 °C, un intervalo de presión entre aproximadamente 80 y aproximadamente 180 bar, y una relación de disolvente/carga de aproximadamente 10 a aproximadamente 800 (Kg/Kg).
15. La fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en la reducción de la inflamación o la estimulación de la resolución de la inflamación.
16. La fracción de aceite para el uso de la reivindicación 15, para su uso en la estimulación de la resolución de la inflamación.
17. La fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en la reducción de signos macroscópicos y físicos de inflamación.
18. La fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para su uso en el tratamiento de una afección inflamatoria.
19. La fracción de aceite para el uso de la reivindicación 18, donde la afección inflamatoria se selecciona de: enfermedad cardiovascular, síndrome metabólico, enfermedad neurodegenerativa, reacciones atópicas/alérgicas, osteoartritis, artritis reumatoide, dolor inflamatorio, acné, psoriasis, rosácea, asma, lesión pulmonar aguda, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, sepsis, rinitis alérgica, sinusitis, periodontitis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Crohn, degeneración macular, síndrome de ojo seco, úlcera gástrica, cáncer y trastornos auto-inflamatorios.
20. La fracción de aceite para el uso de la reivindicación 19, donde la enfermedad cardiovascular se selecciona de: aterosclerosis, presión arterial alta, hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia, hiperreactividad endotelial, infarto de miocardio y accidente cerebrovascular.
21. La fracción de aceite para el uso de la reivindicación 19, donde el síndrome metabólico se caracteriza por una pérdida de sensibilidad a la insulina, obesidad, esteatosis hepática y/o colestasis.
22. La fracción de aceite para el uso de la reivindicación 19, donde la enfermedad neurodegenerativa se selecciona de: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis múltiple y apraxia.
23. Uso de una fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para preparar un suplemento nutricional.
24. Uso de una fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para preparar una formulación farmacéutica.
25. Uso de una fracción de aceite de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para preparar una formulación cosmética.