



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 297 176**

51 Int. Cl.:

A61K 31/164 (2006.01) **A61K 31/661** (2006.01)
A61K 31/366 (2006.01) **A61K 8/00** (2006.01)
A61K 8/24 (2006.01) **A61K 8/42** (2006.01)
A23L 1/302 (2006.01) **A23L 1/30** (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) **A61P 25/28** (2006.01)
A61P 25/14 (2006.01) **A61P 35/00** (2006.01)
A61P 17/14 (2006.01) **A61P 19/10** (2006.01)
A61P 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **03739457 .4**

86 Fecha de presentación : **07.02.2003**

87 Número de publicación de la solicitud: **1482920**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.12.2004**

54 Título: **Composiciones que contienen N-acil-fosfatidil-etanolaminas y/o las mezclas de N-acil-etanolaminas con ácidos fosfatídicos o ácidos lipofosfatídicos.**

30 Prioridad: **12.02.2002 IT MI02A0270**
26.11.2002 IT MI02A2512

73 Titular/es: **Hunza di Pistolesi Elvira & C. S.A.S.**
Via Gavirate, 7
20148 Milan, IT

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

72 Inventor/es: **Pistolesi, Elvira y**
Cestaro, Benvenuto

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 297 176 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

Composiciones que contienen N-acil-fosfatidil-etanolaminas y/o las mezclas de N-acil-etanolaminas con ácidos fosfatídicos o ácidos lipofosfatídicos.

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas, cosméticas y dietéticas y alimentos funcionales, constituidos por:

A) mezclas de fosfolípidos que contienen N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPes);

y/o

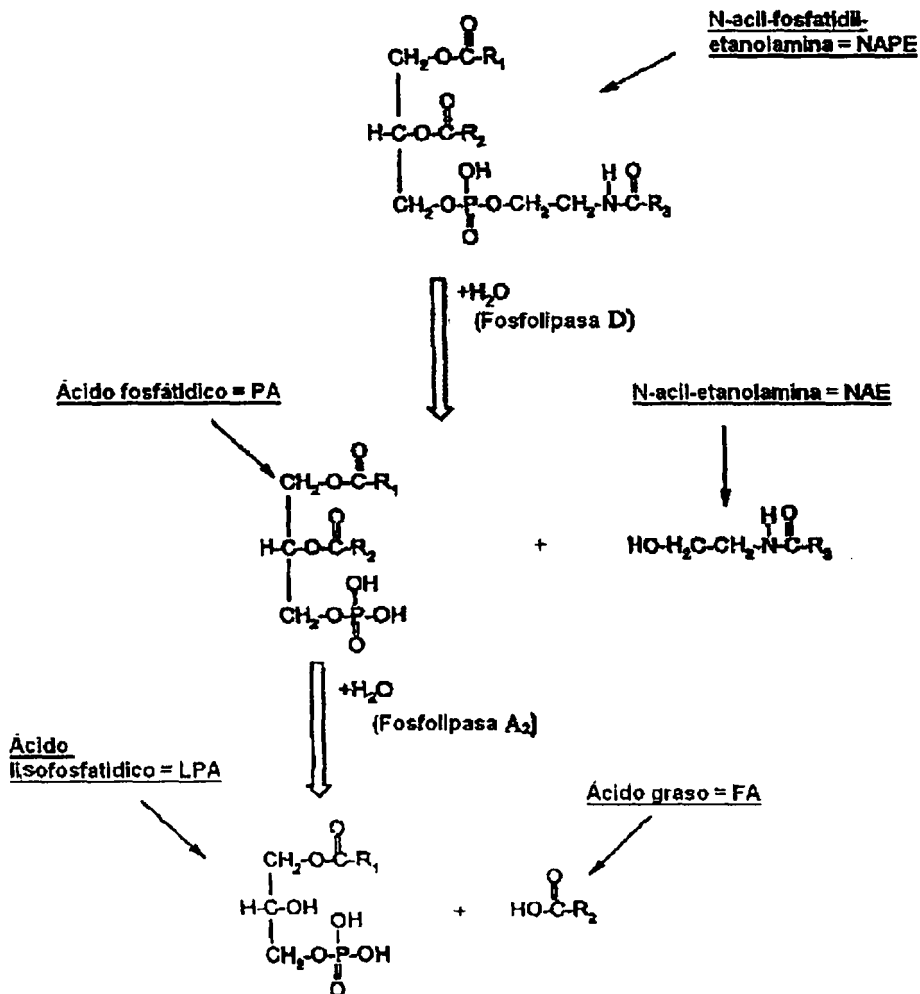
B) mezclas de fosfolípidos que contienen N-acil-etanolaminas (NAEs) conjuntamente con ácidos fosfatídicos (PAs) y/o ácidos lipofosfatídicos (LPAs), con la condición de que dichas N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPes) no incluyen N-oleoil-fosfatidil-etanolamina.

También se describen nuevos complejos fosfobioflavónicos de NAPE o NAE más PA y/o LPA, con uno o más bioflavonoides.

Las N-acil-etanolaminas (NAEs) y las N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPes) se conoce que están presentes en muchos alimentos de origen animal y vegetal (H.H. Schmid *et al.*, 1990, Prog. Lipid Res., 29 1 - 43), y son particularmente abundantes en alimentos tales como soja, huevos y chocolate (K.D. Chapman *et al.*, 1993, Arch. Biochem. Biophys, 301, 21 - 23; E. Di Tomaso *et al.*, 1996, Nature, 382, 677 - 678).

Las NAEs se forman *in vivo* mediante hidrólisis de una molécula de NAPE que da lugar a una mezcla de NAE y una molécula de ácido fosfatídico (PA) que, a su vez, se pueden hidrolizar a lisoácido fosfatídico (LPA) de acuerdo con el siguiente esquema 1.

Esquema 1



ES 2 297 176 T3

El documento GB 2051069 describe la actividad anti-lipémica y anti-aterosclerótica de N-oleoil-fosfatidiletanolamina (NOPE) y excluye cualquier actividad significativa de otros derivados N-acilo.

5 El documento EP 604806 describe composiciones farmacéuticas, cosméticas y dietéticas que contienen fosfatidilcolina, N-acil-fosfatidil-etanolamina (NAPE) y fosfatidil-etanolamina.

Las NAEs también se han conocido durante algún tiempo por sus interesantes propiedades farmacológicas: la N-araquidonoil-etanolamina se ha demostrado *in vitro* que es un agonista del del receptor de cannabinoides (L. Hanus, 1993, J. Med. Chem., 36, 3032 - 3034); la N-palmitoil-etanolamina, cuando se administra por vía intraperitoneal a ratas, posee actividad antiinflamatoria y antianafiláctica (L. Facci *et al.*, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 3376 - 3380); la N-palmitoil-etanolamina y N-estearoil-etanolamina han probado que son útiles en el tratamiento farmacológico o trastornos inflamatorios que se producen por la desgranulación de los mastocitos (documento EP-A-0550006); también inhiben la peroxidación de las membranas mitocondriales *in vitro* (N. M. Gulaya *et al.*, 1998, Chem. Phys. Lipids, 97, 49 - 54); N-oleoil-etanolamina (NOE) tiene un efecto significativo anoréxico en la rata, cuando se administra por la vía intraperitoneal (F. Rodriguez de Fonseca *et al.*, 2001, Nature, 414, 209 - 212). Ya que se sabe bien que las NAEs se hidrolizan fácilmente a ácidos grasos libres y etanolamina en el tracto gastrointestinal, no se espera su actividad por la vía oral.

La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas y dietéticas y alimentos funcionales, constituidas por:

A) mezclas de fosfolípidos que contienen N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPEs);

y/o

B) mezclas de fosfolípidos que contienen N-acil-etanolaminas (NAEs) conjuntamente con ácidos fosfatídicos (PAs) y/o

lisoácidos fosfatídicos (LPAs),

con la condición de que dichas N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPEs) no incluyen N-oleoil-fosfatidil-etanolamina.

Las formulas estructurales de NAE, PA y LPA se muestran en el esquema 2, en el que R₁, R₂ y R₄ son restos acilo de ácidos grasos de cadena larga, en particular restos de ácidos palmítico, esteárico, oleico, linoleico, linoleico conjugado, linolénico, gammalinolénico, eicosapentaenoico y docosahexanoico.

Las mezclas de fosfolípidos pueden estar presentes en las composiciones de la invención en la forma de sus complejos con bioflavonoides. Dichos complejos, de aquí en adelante llamados “complejos fosfobioflavónicos”, son un objeto adicional de la invención.

Se han descrito los complejos de fosfolípidos tales como lecitinas, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilserina con un número de extractos de plantas (documentos US 4963527, US 4895839, EP 283713). Dichos complejos se reseñan que incrementan la biodisponibilidad del extracto de plantas. En los complejos fosfobioflavónicos de la invención, NAPE o NAE más PA y/o LPA proporcionan un sinergismo no esperado para las aplicaciones consideradas y no actúan solamente como vehículos de las bioflavonas.

Dichos complejos, constituidos por la agregación de los componentes activos de fosfolípidos (NAPE y/o NAE más PA y/o NAE más LPA) con uno o más tipos de bioflavonoides, se pueden obtener suspendiendo un resto fosfolípido seco en agitación fuerte durante unos pocos minutos a una temperatura preferiblemente entre 40° y 65°C en una solución hidroalcohólica (alcohol preferiblemente entre 70 y 90%), tamponada hasta un pH ácido (pH preferiblemente entre 3 y 5), que contiene una fracción de uno o más tipos de bioflavonoides, preferiblemente en un porcentaje de entre 0,5 y 15% en peso de la solución hidroalcohólica. Cuando se interrumpe la agitación, se evapora parcialmente el etanol de la emulsión resultante a vacío y después se deshidrata mediante secado por pulverización, para producir un resto granular seco de complejos fosfobioflavónicos.

Los ejemplos de bioflavonoides que se pueden usar para producir estos complejos fosfobioflavónicos incluyen:

a) polifenoles sencillos tales como ácidos cinnámico, cumárico, cafeico y ferúlico;

b) flavonas tales como hesperidina, naringenina y taxifolina;

c) flavonoles tales como kaempferol glicósido, quercetina, quercetina glicósido, miricetin y miricetina glicósido;

d) isoflavonas tales como genisteina y daidzeina;

e) proantocianidinas tales como procianidina B1, procianidina B2, procianidina B3 y procianidina C-1;

ES 2 297 176 T3

f) antocianidinas tales como pelargonidina, delphinidina, malvidina y petunidina;

g) catequinas tales como epicatequina, epicatequina galato, epigallocatequina, catequinas y galocatequinas;

5 h) taninos.

Como se ha mencionada, las moléculas de NAPE, NAE, PA y LPA están presentes de forma natural en las fracciones lipídicas de muchos alimentos que se usan normalmente en la dieta humana (lecitinas de soja, huevos, cacao, carne, extractos oleosos de diversas semillas, etc.), y se pueden extraer y aislar fácilmente y a varios grados de pureza de acuerdo con procedimientos convencionales. Como alternativa, las moléculas de NAPE y NAE se pueden obtener mediante la síntesis de acuerdo con procedimientos químicos que se han conocido durante algún tiempo.

Las NAE se pueden preparar a partir de etanolamina y el correspondiente ácido graso, por ejemplo de acuerdo con los procedimientos descritos en:

15 - Roc E. T. *et al.* (1952), J. Am. Chem. Soc., 74, 3442

- Chandrakumar N. S. *et al.* (1982), Biochim. Biophys Acta, 711, 357.

20 Las NAPE se pueden preparar a partir de fosfatidiletanolamina y el correspondiente cloruro o anhídrido de ácidos grasos, de acuerdo con los procedimientos descritos en:

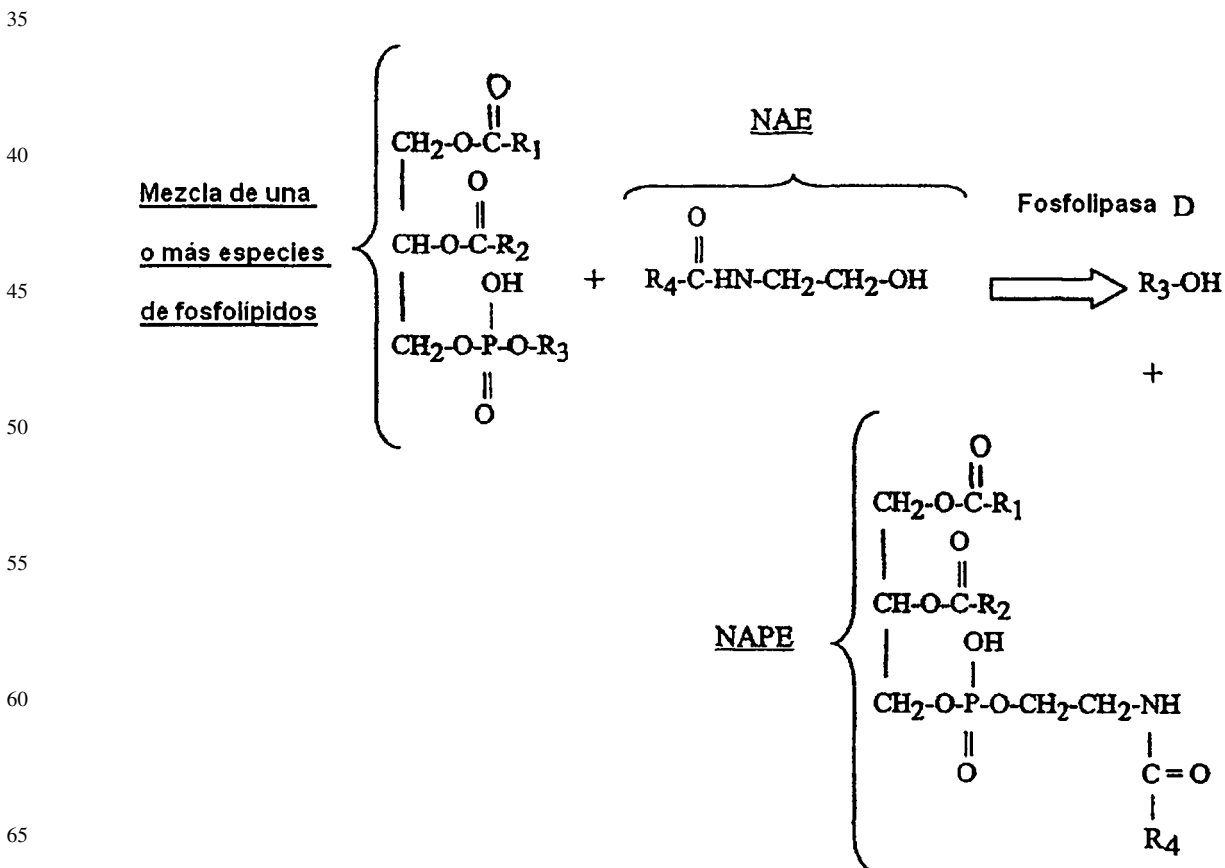
- Schmid P. C. *et al.* (1988), J. Biol. Chem., 288 (6), 9802

25 - Epps D. E. *et al.* (1980), Biochim. Biophys Acta, 618, 420

- Documento GB 2051069 B.

30 Otro procedimiento para la preparación de las NAPE por medio de la enzima fosfolipasa D, descrita en el documento US 4783402, se ilustra en el esquema dado a continuación:

Esquema 2



ES 2 297 176 T3

en las que

R₁, R₂ y R₄ representan la cadena de alquilo de ácidos grasos mono- o polinsaturados con 12-22 átomos de C;

R₃ representa un resto de colina, etanolamina, inositol, glicerol, serina.

Las dosis terapéuticamente eficaces de preparaciones basadas en NAPE y/o NAE más PA y/o LPA varían:

a) en el caso de las NAPE entre 0,5 y 50 mg, y preferiblemente entre 1 y 10 mg/día por kg de peso corporal;

b) en el caso de NAE más PA y/o LPA entre 0,5 y 100 mg, y preferiblemente entre 2 y 20 mg/día/kg de peso corporal.

En esta mezcla de NAE + PA y/o LPA, el porcentaje de NAE puede variar entre 1 y 70%, y preferiblemente entre 25 y 50% del total de los lípidos co-mezclados.

Las composiciones de la invención también pueden contener otros componentes nutricionales que implementan adicionalmente las propiedades terapéuticas y beneficios de las NAPE y/o las mezclas de las NAE + PA y/o LPA. Los ejemplos de estos componentes son:

a) vitaminas y factores de tipo vitamina tales como vitamina E, vitamina C, β -carotenos, vitamina A, vitamina D, ácido lipoico y CoQ;

b) extractos de vegetales y/o plantas medicinales basados en mono- y diterpenos, saponinas, y fitoesteroles;

c) proteínas, péptidos o aminoácidos y sus derivados tales como glutatión, carnosina, arginina, glutamina, carnitina, creatina y taurina;

d) oligo elementos y sales minerales tales como Ca, Mg, Cr, Se, Va, Zn y Cu;

e) mezclas de detergentes anfífilos naturales tales como fosfolípidos y lisofosfolípidos; glicolípidos; proteínas anfífilas; mono- y diglicéridos; ácidos o sales biliares o sales capaces de incorporar NAPE y/o las mezclas de las NAE + PA y/o LPA en emulsiones lipídicas de diversos tipos que ayudan a incrementar su absorción y biodisponibilidad *in vivo*.

Los componentes activos, almacenados como granulados o polvos deshidratados, se pueden usar como tales o en la forma de soluciones acuosas u oleosas para preparar diversas preparaciones galénicas tales como cápsulas de gelatina, comprimidos, grageas, bolsitas, sellos efervescentes y no efervescentes, chicles masticables, etc.

Dichos componentes activos en la forma de gránulos o polvos deshidratados también se pueden usar para preparar diversos alimentos funcionales:

a) mezclados con aceites para preparar aderezos diversos, salsas, cremas, mayonesa, etc;

b) mezclados con harina para preparar pan, pasta, galletas, biscuits y otros productos horneados;

c) añadidos a jugos y zumos de frutas y, aguas minerales, refrescos y otras bebidas;

d) añadidos a leche y derivados de los mismos (yogurt, flanes, ricota y queso).

Las composiciones farmacéuticas o dietéticas de la invención se han probado de manera sorprendente activos en:

a) control de exceso de peso y reducción por consiguiente de los riesgos relacionados con el exceso de peso y obesidad;

b) mejorar la funcionalidad de las mitocondrias y la producción de la energía celular;

c) incremento de las defensas antioxidantes en los diversos tejidos;

d) mejora de la "fluidez" de las membranas celulares y por consiguiente la funcionalidad de las proteínas de membrana (enzimas, receptores, vehículos de nutrientes esenciales y oligoelementos, etc.).

Las preparaciones de la invención se pueden usar por lo tanto como adyuvantes en el tratamiento de envejecimiento y muchos trastornos metabólicos relacionados con él (obesidad y exceso de peso; diabetes; trastornos degenerativos del cerebro tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson' y demencia senil; es-

ES 2 297 176 T3

trés, depresión; tumores; síndromes de la menopausia; osteoporosis; hipertrofia de próstata; envejecimiento de la piel; panniculopatía (celulitis); y alopecia), posiblemente en combinación con fármacos conocidos o suplementos de dieta.

5 La invención por lo tanto también se refiere al uso de mezclas de fosfolípidos que contienen

A) N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPEs); y/o

10 B) mezclas de fosfolípidos que contienen N-acil-etanolaminas (NAEs) conjuntamente con ácidos fosfatídicos (PAs) y/o lisoácidos fosfatídicos (LPAs)

15 para la preparación de medicamentos que tienen actividad anoréxica o de medicamentos o alimentos para el tratamiento de envejecimiento, obesidad exceso de peso; diabetes; trastornos degenerativos del cerebro tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y demencia senil; estrés, depresión; tumores; síndromes de la menopausia; osteoporosis; hipertrofia de próstata; envejecimiento de la piel; panniculopatía (celulitis); y alopecia.

La invención se ilustra en mayor detalle en los siguientes ejemplos.

20

Ejemplo 1

98 g de N-linoleoil-fosfatidiletanolamina

25 + 1 g de d- α -tocoferol

+

1 g de ácido lipoico.

30

35 Los diversos compuestos se disuelven y se mezclan en 10 volúmenes de cloroformo: metanol (2:1, vol/vol). El disolvente se evapora a vacío, y el residuo seco resultante se vuelve a suspender en una solución acuosa tamponada hasta pH fisiológico para formar una mezcla acuosa de una emulsión de fosfolípidos que contiene el componente activo (N-linoleoilfosfatidiletanolamina). Las mezclas acuosas se pueden congelar y deshidratar para obtener un residuo seco del componente activo fosfolípido.

Ejemplo 2

40 20 g de N-eicosapentaenoil-etanolamina

+

60 g de ácido fosfatídico

45

+

80 g de fosfatidilcolina de soja

50

+

1 g de d- α -tocoferol

+

55

1 g de ácido lipoico.

60 Se disuelven los diversos compuestos en cloroformo-metanol y se tratan como se ha descrito en el ejemplo 1 obteniendo una mezcla acuosa de una emulsión de fosfolípidos que contiene los componentes activos (N-eicosapentaenoil-etanolamina y ácido fosfatídico). La mezcla acuosa de puede congelar y deshidratar obteniendo un residuo de fosfolípidos seco de los componentes activos como se describe en el ejemplo 1.

65

ES 2 297 176 T3

Ejemplo 3

20 g de N-linolenoil-etanolamina

5 +

40 g de lisoácido fosfatídico

+

10

1 g de d- α -tocoferol

+

15

1 g de ácido lipoico.

Se disuelven los diversos compuestos en cloroformo-metanol y se tratan como se ha descrito en el ejemplo 1 obteniendo una mezcla acuosa de emulsión de fosfolípidos que contiene los componentes activos (N-linolenoil-etanolamina y ácido fosfatídico). La mezcla acuosa de puede congelar y deshidratar obteniendo un residuo de fosfolípidos seco de los componentes activos como se describe en el ejemplo 1.

Ejemplo 4

25 20 g de N-gamma-linolenoil-fosfatidiletanolamina

+

30 80 g de una mezcla de lisofosfolípidos (45% lisofosfatidilcolina + 35% lisofosfatidiletanolamina + 20% lisofosfatidilinositol)

+

35 1 g de d- α -tocoferol

+

1 g de ácido lipoico.

40 Se disuelven los diversos compuestos en cloroformo-metanol y se tratan como se ha descrito en el ejemplo 1 obteniendo una mezcla acuosa de emulsión de fosfolípidos que contiene el constituyente activo (N-gamma-linolenoil-fosfatidiletanolamina). La mezcla acuosa de puede congelar y deshidratar obteniendo un residuo de fosfolípidos seco de los componentes activos como se describe en el ejemplo 1.

45

Ejemplo 5

20 g de un residuo seco de fosfolípidos obtenido como se ha descrito en los ejemplos 1 - 4, anteriores

50 +

200 g de una solución oleosa (aceite de oliva, soja, maíz, girasol, borraja, grosella negra, aceites de pescado o de algas, o las mezclas de las mismas).

55 20 g de residuos de fosfolípidos secos se disuelven lentamente en 200 g de solución oleosa formando una organización de micelas dispersada en aceite que contiene los componentes activos.

Ejemplo 6

60

100 g de un residuo de fosfolípidos secos de N-docosahexanoil- fosfatidiletanolamina, obtenido como se ha descrito en el ejemplo 1, se vuelve a suspender en condiciones de agitación durante 5 minutos a 45°C en 900 ml de una solución hidroalcohólica (75% de alcohol), tamponados hasta pH 4,5, que contiene 5% en peso de catequizas de té verde y epicatequinas. La emulsión resultante después se enfría hasta temperatura ambiente y se deshidrató mediante secado por pulverización formando un residuo granular seco de complejos fosfobioflavónicos N-docosahexanoil-fosfatidiletanolamina y catequizas de té verde.

65

ES 2 297 176 T3

Ejemplo 7

50 g de N-linoleoil-etanolamina y 50 g de lisoácido fosfatídico (CLPA) se añaden lentamente en agitación fuerte a 60°C y se emulsionó durante 10 minutos en 900 ml de una solución hidrolcohólica (85% de alcohol) tamponados hasta pH 4,0, que contiene un 10% en peso de una mezcla de catequinas, epicatequinas y proantocianidinas extraídas de semillas de uvas.

Cuando se detiene la agitación, la emulsión resultante enfría hasta temperatura ambiente y se deshidrató mediante secado por pulverización formando un residuo granular seco de complejos fosfobioflavónicos de N-linoleoil-etanolamina y bioflavonoides de semillas de uva.

Ensayos farmacológicos y/o dietéticos

Se ha llevado a cabo una serie de ensayos experimentales sobre ratas y ensayos clínicos en hombres para estudiar las características farmacológicas y/o dietéticas de la composición de la invención.

En los ensayos experimentales, a las ratas se les proporcionó una dieta alta en calorías, con alto contenido en triglicéridos, con alto contenido en colesterol. Se evaluaron los siguientes parámetros después de veinte días de tratamiento:

- 1) el efecto de las composiciones en los niveles de lipoperoxido en el plasma, hígado, cerebro y corazón;
- 2) el efecto de las composiciones sobre la variación del peso corporal;
- 3) el efecto de las composiciones sobre las variaciones en la fluidez de membrana de eritrocitos fantasma y plaquetas de plasma;
- 4) el efecto de las composiciones sobre la funcionalidad de las mitocondrias hepáticas, evaluadas mediante la medición: a) consumo de O₂; b) glutatión reducido; c) el potencial de las membranas mitocondriales;
- 5) el efecto de las composiciones sobre los niveles en plasma de colesterol y HDL-colesterol;
- 6) el efecto de las composiciones sobre los niveles en plasma de triglicéridos totales.

Se usaron 80 ratas macho que pesan entre 150 - 200 g cada una. Los animales se dividieron en 8 grupos de 10 animales:

Primer grupo: *control* (C); se usaron 10 animales (control en el momento 0) como están, y a 10 se les proporcionó una dieta estándar alta en calorías, alta en grasas, alto contenido en colesterol durante 20 días, que constaba de caseína: 20%; mezcla de oligoelementos y sales minerales: 3,5%; mezcla de vitaminas: 0,1%; bitartrato de colina: 0,2%; celulosa: 2%; colesterol: 0,5%; colato de sodio: 0,25%; sacarosa: 58,44%, manteca: 10,0% y aceite de oliva: 4,9%.

Segundo grupo: *tratado con N-oleoil-etanolamina tal como (NOE)*; a los animales se les proporcionó la misma dieta que los controles durante 20 días, excepto que 50 mg de NOE reemplazaron a la misma cantidad de aceite de oliva (aceite de oliva usado: 4,85%).

Tercer grupo: *tratado con N-oleoil-fosfatidiletanolamina preparada como se ha descrito en el ejemplo 1 (NOPE)*; a los animales se les proporcionó la misma dieta que los controles durante 20 días, excepto que 50 mg de NOPE (preparado como se ha descrito en el ejemplo 1) reemplazaron al aceite de oliva (aceite de oliva usado: 4,85%).

Cuarto grupo: *tratado con N-oleoil-etanolamina + ácido fosfatídico preparados como se ha descrito en el ejemplo 2: (NOE + PA)*; a los animales se les proporcionó la misma dieta que los controles durante 20 días, excepto que 400 mg de la preparación descrita en el ejemplo 2 (que contenía ~ 50 mg de NOE y 150 mg de PA) reemplazaron a la misma cantidad de aceite de oliva (aceite de oliva usado: 4,50%).

Quinto grupo: *tratado con N-oleoil-etanolamina + lisoácido fosfatídico preparados como se ha descrito en el ejemplo 3: (NOE + LPA)*; a los animales se les proporcionó la misma dieta que los controles durante 20 días, excepto que 150 mg de la preparación descrita en el ejemplo 3 (que contiene - 50 mg de NOE y 100 mg de LPA) reemplazó la misma cantidad de aceite de oliva (aceite de oliva usado: 4,75%).

Sexto grupo: *tratado con "complejos fosfobioflavónicos" de N-oleoil-fosfatidiletanolamina y bioflavonas (B.F.) de té verde* preparados como se describe en el ejemplo 6 (NOPE + B.F.). A los animales se les proporcionó la misma dieta que los controles durante 20 días, excepto que 50 mg de NOPE y 25 mg de B.F. (correspondiente a ~ 75 mg de la preparación descrita en el ejemplo 6) reemplazaron a la misma de aceite de oliva (aceite de oliva usado: 4,825%).

ES 2 297 176 T3

Séptimo grupo: *tratado con bioflavonas de té verde (B.F.)*. A los animales se les proporcionó la misma dieta que los controles durante 20 días, excepto que 25 mg de B.F. reemplazaron a la misma cantidad de aceite de oliva (aceite de oliva usado: 4,875%).

TABLA I

Porcentaje de variaciones en la fluidez de membranas de eritrocitos fantasma y plaquetas de plasma (expresado como un % de los valores de control en el momento 0) de las ratas antes y después de 20 días de tratamiento

	Fluidez de membrana (eritrocitos fantasma)	Fluidez de membrana (plaquetas en plasma)
1A) Ratas control en el momento 0	100%	100%
1B) Ratas control después de 20 días de dieta	72%	69%
2) Ratas tratadas (NOE)	72%	70%
3) Ratas tratadas (NOPE)	84%	81%
4) Ratas tratadas (NOE más PA)	86%	81%
5) Ratas tratadas (NOE + LPA)	83%	80%
6) Ratas tratadas (NOPE + B. F.)	91%	92%
7) Ratas tratadas (B. F.)	73%	70%

ES 2 297 176 T3

TABLA II

Niveles de Lipoperóxido [expresados como nmoles de malonildialdehído (MDA) por gramo de tejido o por ml de plasma] en el plasma, hígados, cerebros y corazones de las ratas antes y después de 20 días de tratamiento de dieta

	MDA PLASMA	MDA HÍGADO	MDA CEREBRO	MDA CORAZÓN
1A) Ratas control en el momento 0	2,5 ± 0,5	25,5 ± 5,9	55 ± 4	24 ± 0,5
1B) Ratas control después de 20 días de dieta	5,1 ± 0,6	44,2 ± 8,2	108 ± 6	45 ± 6
2) Ratas tratadas (NOE)	5,0 ± 0,6	44,1 ± 8,2	106 ± 7	44 ± 9
3) Ratas tratadas (NOPE)	3,8 ± 0,4	33,1 ± 6,5	85 ± 9	32 ± 7
4) Ratas tratadas (NOE + PA)	3,7 ± 0,4	311,8 ± 8,2	88 ± 7	34 ± 9
5) Ratas tratadas (NOE + LPA)	3,0 ± 0,3	33,5 ± 7,8	77 ± 5	34 ± 7
6) Ratas tratadas (NOPE + B. F.)	2,8 ± 0,3	29,7 ± 6,8	75 ± 4	30 ± 6
7) Ratas tratadas (B. F.)	5,0 ± 0,5	44,0 ± 7,1	105 ± 7	44 ± 7

ES 2 297 176 T3

TABLA III

Variación en el peso corporal de los niveles de colesterol total, HDL colesterol y triglicéridos en el plasma de las ratas antes y después de 20 días de dieta de tratamiento

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

		Colesterol total (mg dl ⁻¹)	HDL Colesterol total (mg dl ⁻¹)	Triglicéridos totales (mg dl ⁻¹)	Peso corporal (gm)
1A)	Ratas control en el momento 0	35,6 ± 1,8	26,2 ± 1,4	50,2 ± 7,7	180 ± 12
1B)	Ratas control después de 20 días de dieta	126,2 ± 13,5	29,4 ± 1,6	82,5 ± 9,5	224 ± 10
2)	Ratas tratadas (NOE)	120,4 ± 12,7	28,9 ± 2,8	80,5 ± 6,8	221 ± 16
3)	Ratas tratadas (NOPE)	110,3 ± 10,1	31,6 ± 3,9	71,4 ± 8,7	209 ± 18
4)	Ratas tratadas (NOE + PA)	103,9 ± 12,4	29,9 ± 2,0	70,4 ± 10,5	208 ± 14
5)	Ratas tratadas (NOE + LPA)	101,7 ± 8,9	32,1 ± 3,8	68,5 ± 7,9	206 ± 20
6)	Ratas tratadas (NOPE + B. F.)	80 ± 7,5	31,4 ± 3,9	60,2 ± 6,4	191 ± 14
7)	Ratas tratadas (B. F.)	123,5 ± 12,4	29,3 ± 1,5	80,7 ± 7,1	218 ± 17

ES 2 297 176 T3

TABLA IV

Variaciones en el consumo de oxígeno hepatocelular, potencial de membrana de mitocondrias y contenido de glutatión hepatocelular en ratas de control en el momento 0 y después de 20 días de tratamiento

	Consumo de O ₂ hepatocelular (u mol de O ₂ /min por 10 ⁷ células)	Glutatión reducido (n moles x 10 ⁶ células)	Potencial de membrana mitocondrial
1A) Ratas control en el momento 0	480 ± 60	48 ± 5	100%
1B) Ratas control después de 20 días de dieta	360 ± 45	36 ± 4	68%
2) Ratas tratadas (NOE)	368 ± 52	36 ± 6	70%
3) Ratas tratadas (NOPE)	408 ± 62	41 ± 5	81%
4) Ratas tratadas (NOE + PA)	412 ± 58	43 ± 6	82%
5) Ratas tratadas (NOE + LPA)	409 ± 63	43 ± 8	83%
6) Ratas tratadas (NOPE + B. F.)	421 ± 51	45 ± 5	88%
7) Ratas tratadas (B. F.)	366 ± 41	38 ± 5	71%

ES 2 297 176 T3

Cuando se mide la membrana de fluidez de los eritrocitos fantasma y plaquetas, TMA-DPH de acuerdo con el procedimiento descrito por Caimi F. *et al.*, 1999, *Thromb. Hoemost.*, 82 p. 149, se usa en la sonda de fluorescencia.

5 Se ensaya el Malonildialdehído de acuerdo con el procedimiento descrito por K. Yagi *et al.*, 1982, in "Lipid Peroxides in Biology y Medicine", Academic Press, New York, 99. 324 - 340.

El consumo de O₂ hepatocelular, potencial de membrana mitocondrial y reducción del contenido de glutatión se ensayaron d acuerdo con los procedimientos descritos por T. M. Hagen *et al.*, 1999, *FASEB J.*, 13, 99. 411.

10 Los datos establecidos en las Tablas I, II, III y IV demostraron que la administración de las composiciones que contienen los componentes activos (NOPE; NOE + PA; NOE + LPA; NOPE + B.F.):

- 1) restaura la fluidez de membrana de fantasma y plaquetas;
- 15 2) mejora las defensas antioxidantes de plasma, hígado, cerebro y corazón;
- 3) limita los incrementos excesivos en el peso corporal;
- 4) limita los incrementos excesivos de los niveles de colesterol en plasma y triglicéridos;
- 20 5) mejora la funcionalidad de las mitocondrias.

Estos efectos, que se pueden obtener mediante la administración oral de las formulaciones preparadas de acuerdo con la invención (NOPE; NOE + PA; NOE + LPA; NOPE + B.F.), son siempre significativos estadísticamente. 25 Es importante hacer notar que nos e puede obtener ningún beneficio estadísticamente significativo mediante la administración de dosis equivalentes orales de N-oleoil-etanolaminas como tales. Los datos establecidos anteriormente demuestran que la sinergia sorprendente de la acción observada entre NAPE y/o NAE + PA y las diversas moléculas de bioflavonoides; los resultados obtenibles terapéuticos mediante la administración de los "complejos fosfobioflavónicos" de NAPE (véanse los datos establecidos en las Tablas I, II, III y IV) y NAE más PA y/o LPA están siempre 30 más lejos que la suma de beneficios que se pueden obtener con las administraciones individuales separadas de dosis equivalentes de NAPE (o NAE) y bioflavonoides.

En todos los tratamientos de dieta llevados a cabo en hombres, los efectos que se pueden obtener por vía oral, las formulaciones reivindicadas por la invención (NAPE; NAE + PA; NAE + LPA; NAPE + B.F. y NAE más PA 35 y/o LPA + B.F.) siempre proporcionaron resultados y ventajas altamente significativos, tanto en la prevención de los signos biológicos de envejecimiento (mejora en la actividad de mitocondrias, mejor fluidez en membranas, mejora en las defensas de antioxidantes en plasma, y limitación del incremento del peso) y mejora de los parámetros clínicos ensayados en relación con la prevención de envejecimiento, y muchos de los trastornos metabólicos asociados a ellos. Hy que hacer mención que también en los seres humanos no se puede obtener ningún beneficio significativo mediante 40 la administración de las dosis orales de N-oleoil-etanolamina como tal.

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Las composiciones farmacéuticas, cosméticas y dietéticas, y alimentos funcionales constituidas por:

5 A) mezclas de fosfolípidos que contienen N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPEs);

y/o

10 B) mezclas de fosfolípidos que contienen N-acil-etanolaminas (NAEs) conjuntamente con ácidos fosfatídicos (PAs) y/o lisoácidos fosfatídicos (LPAs), con la condición de que dichos N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPEs) no incluyan N-oleoil-fosfatidil-etanolamina.

15 2. Las composiciones según la reivindicación 1 en las que las mezclas de fosfolípidos están constituidas por complejos de uno o más bioflavonas con NAPE o NAE más PA y/o LPA.

3. Las composiciones según la reivindicación 1 o 2, que también contienen detergentes anfifílicos.

4. Alimentos funcionales que contienen las composiciones según las reivindicaciones 1 - 3.

20 5. El uso de las mezclas de fosfolípidos que contienen

A) N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPEs);

25 y/o

30 B) mezclas de fosfolípidos que contienen N-acil-etanolaminas (NAEs) conjuntamente con ácidos fosfatídicos (PAs) y/o lisoácidos fosfatídicos (LPAS) para la preparación de los medicamentos que tienen actividad anoréxica o de medicamentos o alimentos para el tratamiento de envejecimiento, obesidad y exceso de peso; diabetes; trastornos degenerativos del cerebro tales como enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson y demencia senil; estrés, depresión; tumores; síndromes de la menopausia; osteoporosis; hipertrofia de próstata; envejecimiento de la piel; panniculopatía (celulitis); y alopecia.

35 6. Complejos fosfobioflavónicos de bioflavonoides con componentes activos fosfolípidicos seleccionados entre N-acil-fosfatidil-etanolaminas (NAPE) y/o N-acil-etanolaminas (NAE) más Ácido fosfatídico (PA) y/o N-aciletanolaminas más lisoácido fosfatídico (LPA).

40 7. Las composiciones que comprenden los complejos fosfobioflavónicos complejos de la reivindicación 6.