

DESCRIÇÃO
DA
PATENTE DE INVENÇÃO

N.º 100 524

REQUERENTE: KABI PHARMACIA AB., sueca, industrial e comercial,
com sede em S-751 82 UPPSALA, Suécia

EPÍGRAFE: "EMULSÕES AQUOSAS DE ÓLEOS DE ORIGEM VEGETAL E/OU
MARINHA CONTENDO FOSFOLÍPIDOS E COMPOSIÇÕES QUE AS
CONTEM"

INVENTORES: CARIN LARSSON-BACKSTRÖM

Reivindicação do direito de prioridade ao abrigo do artigo 4º da Convenção de Paris
de 20 de Março de 1883.
na Suécia em 30 de Maio de 1991, sob o Nº 9101642-8.

**R E S U M O**

A invenção refere-se a uma emulsão aquosa de óleos de origem vegetal e/ou marinha contendo fosfolípidos que compreende fosfolípidos contendo ácidos gordos 3-ómega docosa-hexenóico (DHA) ou icosapentenóico (EPA) numa quantidade elevada e um óleo vegetal e/ou um óleo marinho. Ela refere-se também à utilização de fosfolípidos contendo ácidos gordos 3-ómega DHA ou EPA numa quantidade elevada; para a fabricação de uma emulsão nutritiva que origina níveis baixos de triglicérido e de colesterol no sangue, e para a fabricação de um medicamento com efeitos anti-inflamatórios e imunossupressivos. Os referidos fosfolípidos contendo os ácidos gordos 3-ómega DHA e EPA têm efeito terapêutico, como por exemplo efeito sobre as células inflamatória e imunologicamente activas, por exemplo, em artrite reumatóide e sepsia, e têm também efeito sobre o desenvolvimento e o funcionamento normal do cérebro e da retina e nas doenças cardiovasculares. Também se incluem composições farmacêuticas e nutritivas, assim como partículas de lípidos compreendendo os fosfolípidos.

Wifama

Introdução:

A presente invenção refere-se a emulsões que contêm fosfolípidos de origem marinha e/ou sintética, com uma elevada quantidade (pelo menos 30% (peso/peso) do seu teor total de ácido gordo) de ácidos gordos omega-3 (em seguida designados ácidos gordos w3) com ácido docosa-hexanóico, 22:6w3 (em seguida denominado DHA) e ácido eicosapentanóico 20:5w3 (em seguida designado por EPA) em combinação, assim como se refere à utilização dos mencionados fosfolípidos. Os fosfolípidos são utilizados como emulsionantes, substratos nutritivos, como agente farmacologicamente activo numa emulsão, como componente em composições farmacêuticas ou como componentes em partículas de um lípido.

Fundamentos da invenção:

Sabe-se que se pode administrar emulsões de lípidos por via intravenosa, para constituir uma fonte de energia calórica e densa e uma fonte de ácidos gordos essenciais para aqueles pacientes que têm dificuldades de utilização de uma nutrição administrada por via oral.

Desde os princípios da década de 1960 que estão disponíveis emulsões de gorduras destinadas à alimentação de nutrientes por via intravenosa e que revelam efeitos secundários insignificantes (Wretling, A-"Development of fat emulsions", JPEN 5: nº. 3.230-3.235, 1981).

A referida actividade de desenvolvimento tem investigado o efeito das emulsões que contêm um certo número de diferentes gorduras, tais como óleo do feijão de soja, óleo de milho, óleo de açafrão-bastardo, óleo da semente do algodão, etc., e diferentes emulsionantes, tais como fosfolípidos do feijão de soja, fosfolípidos da gema do ovo, etc..

Wifama

Emulsões para utilização nutritiva ou terapêutica estão, por exemplo, descritas na patente norte-americana US 4 168 308.

As emulsões nutritivas, que são actualmente mais utilizadas em geral, contêm um óleo vegetal como por exemplo óleo do feijão de soja e/ou óleo de açafrão-bastardo, um agente emulsionante tal como um fosfolípido da gema do ovo e água, juntamente com glicerol. Um exemplo duma emulsão desse tipo é Intralipid (marca registada), produzida desde 1962 e comercializada por Kabi Pharmacia AB. A Intralipid^(R) a 10% compreende 10% de um óleo tal como o óleo do feijão de soja e 1,2% de fosfolípidos da gema do ovo.

Os diferentes ácidos gordos nos lípidos têm diversas propriedades fisiológicas, bioquímicas e farmacológicas, e durante os últimos anos tem-se concentrado um grande interesse acerca da importância dos ácidos gordos 3w, que possuem 18 a 22 átomos de carbono.

Os ácidos gordos 3w, isto é o ácido eicosa-pentanoico (20:5w3, EPA) e o ácido docosa-hexanoico (22:6w3, DHA) são ácidos gordos fundamentais ao ser humano. Além do seu valor nutritivo, sabe-se também que têm efeitos farmacológicos. Os efeitos mais conhecidos e mais importantes são os efeitos cardiovasculares, os efeitos benéficos sobre doenças inflamatórias e de autoimunidade e a necessidade dos mencionados ácidos gordos para o desenvolvimento normal das funções cerebrais e da retina.

Os referidos efeitos têm uma importância tal que se tem desenvolvido muito trabalho para produzir boas composições nutritivas contendo uma elevada quantidade de ácidos gordos 3w. Vejam-se, por exemplo, a patente internacional WO 87/02247 (Baxter) e a patente norte-americana US 4 820 731 (New

Wifama

England Deaconess Hospital) nas quais se utilizam óleos marinhos, os quais possuem uma elevada quantidade de ácidos gordos 3w, EPA e DHA.

O paciente também precisa de ácidos gordos ómega-6 (em seguida denominados ácidos gordos w6, que são encontrados, por exemplo nos óleos vegetais. As composições nutritivas administradas a pacientes devem, portanto, compreender também um óleo vegetal apropriado. A infusão de emulsões de lípidos que possuem ácidos gordos w6, no entanto, têm como resultado um aumento do nível de colesterol e de triglicéridos em alguns pacientes; o que deve ser evitado. Até este momento, alguns pacientes que dependem da nutrição por via parentérica não têm sido capazes de evitar um certo aumento da quantidade total de glicerol e de triglicéridos quando se administra uma emulsão contendo principalmente ácidos gordos w6. Os ácidos gordos w6 também aumentam o nível de eicosanóides e leucotrienos, os quais, quando são produzidos em excessos nalguns pacientes, por exemplo com reacções inflamatórias e imunológicas hiperactivas, podem ter efeitos prejudiciais.

Sabe-se que os fosfolípidos contendo EPA ou DHA são úteis em diversos sectores técnicos, tais como alimentos, cosméticos, agricultura, etc. e têm sido revelados diferentes processos para a sua produção. Veja-se, por exemplo, as patentes japonesas Y 02097393 e Y 01050890.

A utilização de fosfolípidos contendo EPA ou DHA como emulsionante para uma emulsão de EPA-triglicérido e uma emulsão de triglicérido-DHA, respectivamente, tem sido investigada por Hamazaki T. et al., in "Biochem. and Biophys. Res. Comm.", volume 151, nº. 3, 1386-1394, 1988, em "LIPIDS", volume 22, nº. 12, 1031-1034, 1987 e em "Thrombosis Research", volume 44, 1986 (673-682). Hamazaki constatou, por exemplo,

Wifama

que os dois níveis EPA e DHA nas plaquetas e nas membranas RBC (células sanguíneas vermelhas) aumentam de forma significativa quando uma das duas emulsões, a de EPA ou a de DHA, respectivamente, era administrada por via intravenosa durante um curto período de tempo. Os lípidos sanguíneos permaneciam inalterados, excepto no caso dos ácidos gordos livres, que diminuíam. A agregação das plaquetas e a adesão dos leucócitos foram reduzidos, principalmente depois da administração da emulsão que continha o EPA.

O pedido de patente sueca SE 8 705 122-3 refere-se a um processo para a produção de emulsões gordas com fosfolípidos a partir dos ovos, como agente emulsionante, constituídas por pelo menos 10% (em peso/peso) de ácidos gordos w3, em que os fosfolípidos derivam dos ovos de animais alimentados com uma dieta rica em óleos marinhos.

O mencionado processo de incorporação de ácidos gordos w3 nos fosfolípidos é, no entanto, oferecido com as limitações naturais. Não tem sido possível exceder cerca de 15% (em peso/peso) de ácidos gordos w3 nos fosfolípidos derivados pelo citado processo, sendo o nível de EPA de cerca de 2% (em peso/peso), o qual, nas emulsões de lípidos convencionais, deve ser considerado como estando abaixo do nível para efeitos terapêuticos.

Os fosfolípidos dos ovos descritos no pedido de patente sueca acima mencionada não têm, necessariamente, os supostos efeitos terapêuticos.

Dado que existe uma prova que sugere que o EPA em dieta pode proporcionar algum benefício clínico no tratamento das doenças inflamatórias (Salmon, n-3 "News", volume II (3) 1987), é importante ter uma quantidade elevada de DHA, assim como de EPA nos fosfolípidos.

Wifama

A patente alemã DE 3 347 269 descreve um processo sobre a maneira como produzir sinteticamente lecitina e liso-
-lecitina contendo EPA e/ou DHA, mas não revela nada em rela-
ção à quantidade total de ácidos gordos w3 incorporados ou à
utilização terapêutica do produto.

Todavia, ninguém investigou acerca dos efeitos bio-
lógicos e a potência dos fosfolípidos e os comparou com os
efeitos dos triglicéridos contendo os ácidos gordos w3, EPA
e DHA, em elevada quantidade, em combinação.

Descrição da invenção:

Constatámos agora que, quando se utiliza os ácidos
gordos w3, DHA e EPA, em quantidade elevada, em combinação
nos fosfolípidos de origem marinha ou sintética, em vez de os
utilizar como triglicéridos, mas em conjunto com um óleo ve-
getal contendo ácidos gordos w6 numa emulsão nutritiva de lí-
pidos, as quantidades de colesterol do soro e de triglicéri-
dos são surpreendentemente inferiores às quantidades obtidas
com o mesmo teor de ácidos gordos administrados como óleo de
peixe. Mediante a utilização desta origem dos ácidos gordos
w3 nos fosfolípidos, a quantidade de todos os importantes áci-
dos gordos w3, em conjunto com todos os ácidos gordos w6 im-
portantes e essenciais foi aumentada nas membranas biológicas.
Além disso, a incorporação dos ácidos gordos w3 nas membranas
biológicas aumenta duma forma inesperada.

De máxima surpresa e importante é a constatação de
que o DHA é especificamente aumentado nos fosfolípidos da mem-
brana. Isto é muitíssimo importante, visto que o DHA, sendo
o ácido gordo w3 mais importante nos fosfolípidos nas membra-
nas biológicas, não compete com e não diminui o nível do áci-
do araquidónico, o mais importante dos ácidos gordos w6 nos

Wifama

fosfolípidos nas membranas biológicas, tanto quanto o faz o ácido EPA. Nos ésteres do colesterol também são aumentados o nível do EPA e do ácido alfa-linoleico.

Em todas as fracções dos lípidos, o nível do ácido araquidónico, que é o ácido gordo w6 importante nas membranas biológicas, mantém-se constante. Isto é contrário à redução do ácido araquidónico nas membranas biológicas, que se observa quando se utilizam as dosagens terapêuticas de óleos marinhos contendo uma elevada quantidade de EPA. Após a administração de fosfolípidos de peixe (de acordo com a invenção), no entanto, até mesmo os níveis de triglicéridos dos ácidos gordos w6 são aumentados.

Isto indica que o metabolismo do ácido araquidónico para os eicosanóides é reduzido e, assim, os ácidos gordos w6 ficam em bom equilíbrio com os ácidos gordos w3 e são poupados como componentes importantes nas membranas biológicas.

As constatações são de interesse máximo para as emulsões nutritivas, dado que a quantidade total de colesterol do soro e de triglicéridos deve ser mantida tão reduzida quanto possível e os níveis dos ácidos gordos w6 e ácidos gordos w3 nas membranas biológicas devem ser mantidos em equilíbrio.

De interesse máximo são também as verificações para se obter níveis bem equilibrados e normais de ácidos gordos essenciais, ou seja os ácidos gordos w3 e também os ácidos gordos w6, para as emulsões nutritivas destinadas a bebés prematuras e bebés recém-nascidos, que necessitam de ácidos gordos w3, assim como ácidos gordos w6, para um desenvolvimento normal do cérebro e da retina.

Love et al., "Annals of the Rheumatic Diseases", 1990, 49, páginas 611-614 demonstrou que os fosfolípidos de ovos são acumulados nas células imunologicamente activas.

Wifama

Billiar T. R. et al., ("Fatty acid intake and Kupffer cell function; Fish oil alters eicosanoid and monokine production to endotoxin stimulation", Surgery, 104, 343-349, 1988) demonstrou que os ácidos gordos $\omega 3$ são incorporados nas células Kupffer e têm efeitos anti-inflamatórios nas referidas células, quando o óleo de peixe com os ácidos gordos $\omega 3$ foi administrado oralmente. Verificámos agora que o ácido gordo $\omega 3$ contendo fosfolípidos marinhos se acumulam nas células Kupffer e que o ácido DHA proveniente dos fosfolípidos marinhos é incorporado nos fosfolípidos das membranas com uma especificidade e potência inesperadamente elevadas. Também os outros ácidos gordos $\omega 3$ essenciais, o EPA e o ácido alfa-linoleico, que são aumentados nos ésteres de colesterol, assim como os ácidos gordos $\omega 6$ essenciais são aumentados nos lípidos neutros. O aumento nos lípidos das membranas dos ácidos gordos $\omega 3$, assim como dos ácidos gordos $\omega 6$ mostra que a potência do ácido gordo $\omega 3$ é significativamente maior após a administração do ácido gordo $\omega 3$ contendo fosfolípidos marinhos em conjunto com um óleo vegetal em emulsão (a presente invenção) do que após a administração de quantidades comparáveis de ácidos gordos $\omega 3$ e ácidos gordos $\omega 6$ em óleo vegetal e óleo de peixe, respectivamente, numa emulsão.

Os fosfolípidos de acordo com a invenção acumulam-se nas células de Kupffer e, assim, podem ser utilizados para reduzir a proporção de ácidos gordos $\omega 6$ e ácidos gordos $\omega 3$ em células imunologicamente activas estimuladas para o tratamento de doenças com maiores reacções inflamatórias e imunológicas, por exemplo, sepsia, artrite reumatóide ou outras doenças da autoimunização ou inflamatórias.

A invenção refere-se assim a uma emulsão que compreende um óleo vegetal e/ou um óleo de peixe, o qual contém fosfolípidos com ácidos gordos $\omega 3$ DHA e EPA, em quanti-

Wifama

dade elevada, e em combinação, a qual emulsão pode ser utilizada como uma emulsão nutritiva para satisfazer a exigência de ácidos gordos essenciais, por exemplo em TPN de longo prazo e para bebés prematuros ou recém-nascidos. A referida emulsão também pode ser utilizada para fins terapêuticos para um melhor equilíbrio entre ácido gordo w3 e ácido gordo w6, com um abaixamento dos lípidos de soro, efeitos hemostáticos e anti-inflamatórios e, em dosagens mais elevadas, com efeito immunossuppressivos.

Ela refere-se também à utilização de fosfolípidos contendo ácidos gordos w3 para a produção de um medicamento com efeitos anti-inflamatórios e immunossuppressivos, e ao emprego de fosfolípidos com os ácidos gordos 3-ómega DHA e EPA, em combinação, para a preparação de uma emulsão nutritiva que proporciona níveis reduzidos de triglicéridos de soro e de colesterol e uma proporção mais equilibrada de ácidos gordos w-6 para ácido gordo w-3 e com efeitos hemostáticos, anti-inflamatórios e immunossuppressivos.

A invenção refere-se também aos fosfolípidos que contêm os ácidos gordos 3-ómega DHA e EPA com efeito terapêutico sobre doenças com um excesso de produção de eicosanóides nas células que são activas de forma anti-inflamatória e imunológica, na artrite reumatóide, nas situações de inflamação e no desenvolvimento e funcionamento do cérebro e da retina. Um outro aspecto da invenção consiste na utilização de fosfolípidos com EPA e DHA numa quantidade elevada, em combinação com medicamentos que têm efeitos semelhantes, ou são utilizados para fins de diagnóstico.

A emulsão poderia compreender 0,5 a 40% (em peso/volume total de emulsão) de óleo, preferivelmente entre 5% e 30% (em peso/volume), tal como um óleo de feijão de soja,

Wifama

óleo de côco, óleo das sementes do algodão, óleo de açabão-bastardo, óleo das sementes de girassol, óleo de linhaça, óleo de borragem, óleo das sementes de groselha preta, óleo de canola, óleo marinho ou uma mistura dos mencionados óleos. A quantidade de fosfolípidos de acordo com a invenção poderia ser compreendida entre 0,1 e 30% (em peso/volume da emulsão total), preferivelmente entre 0,1 e 5% (em peso/volume). Os fosfolípidos contendo ácidos gordos w3 poderiam ser de origem marinha ou sintética.

Outros fosfolípidos, tais como a gema do ovo ou os fosfolípidos do feijão de soja e/ou agentes emulsionantes sintéticos podem também ser incluídos como complementos na emulsão. A quantidade total de emulsionante está preferencialmente compreendida no intervalo entre 0,1 e 30% (em peso/volume da totalidade da emulsão).

A emulsão pode também compreender outros componentes, os quais são normalmente incorporados em emulsões, por exemplo: monoglicéridos de ácidos gordos, componentes para regular as propriedades isotónicas tais como glicerol; agentes anti-oxidantes, tais como alfa-tocoferol; componentes para regular a estabilidade, tais como os aminoácidos e hidratos de carbono, tais como frutose e glicose, etc..

A preparação da emulsão decorre de maneira convencional. Assim, misturam-se os lípidos com a fase aquosa, os fosfolípidos de acordo com a invenção e, opcionalmente, outros emulsionantes e agentes auxiliares num dispositivo misturador apropriado ("Thurrax-mixer"). A mistura é em seguida homogeneizada num homogeneizador "Moulin-Gaulin", até se obter o tamanho de partículas pretendido, de preferência inferior a 1 micron. Os modos de ajustamento da emulsão para um tamanho de partículas apropriado são bem conhecidos dos especia-

Wifama

listas nesta técnica.

Os fosfolípidos de acordo com a invenção podem também ser incluídos em emulsões que compreendem óleos de peixe. Quando tiver de ser incluída uma emulsão de óleo de peixe numa mistura de TNP, poderão ocorrer alguns problemas no processo da formação da mistura, os quais parecem ser evitados quando o agente emulsionante utilizado é constituído pelos fosfolípidos com ácidos gordos ω_3 DHA e EPA em combinação.

As nossas constatações são de máximo interesse para que as emulsões nutritivas mantenham a quantidade total de colesterol e de triglicéridos tão reduzida quanto possível para o paciente, e o seja óptimo equilíbrio da proporção entre ácidos gordos ω_6 e ácidos gordos ω_3 nas membranas biológicas, por exemplo para as crianças recém-nascidas ou prematuras, em TPN de longo prazo e em situações com reacções anti-inflamatórias e imunológicas estimuladas.

Os fosfolípidos de acordo com a invenção são também concebíveis como componentes em partículas de lípidos, tais como lipossomas ou qualquer outra vesícula com uma só camada, duas camadas ou várias camadas.

Os meios e processos sobre como utilizar os fosfolípidos para se preparar as mencionadas vesículas são já bem conhecidas de qualquer especialista nesta matéria, visto que têm sido publicadas numerosas revistas e emitidas diversas patentes referentes ao citado sector técnico (pode-se encontrar uma visão geral sobre a preparação dos lipossomas na publicação Drug. Dev. Ind. Pharm. 15 (19), 1523-54, 1989).

Um aspecto da invenção consiste na utilização dos fosfolípidos com um elevado teor de ácidos gordos ω_3 na preparação de várias vesículas de lípidos, quer para administrar um ou vários componentes bioactivos, ou para ser uma forma de

Wifama

administração em si mesma para os fosfolípidos, que possuem uma elevada capacidade terapêutica.

Componentes bioactivos adicionais podem ser encerrados nas vesículas ou fazerem parte das suas membranas ou podem, em certos casos, ser conjugados com as moléculas das membranas.

Estes sistemas podem ser formados individualmente para cada molécula bioactiva e dependem da carga líquida, do peso molecular e do número de grupos hidrofílicos ou hidrofóbicos nas moléculas.

Os compostos bioactivos podem ser tais que potencializam os efeitos terapêuticos dos ácidos gordos $\omega 3$ administrados, ou qualquer outro medicamento, que seja apropriado para ser administrado.

Um composto bioactivo utilizado em combinação com as vesículas pode também ser um ligando com afinidade a um receptor biológico, a fim de originar um sistema orientado para um medicamento específico.

As vesículas podem também ser utilizadas para fins de diagnóstico e o composto bioactivo pode, em tais casos, ser uma molécula rotulada ou portadora de um sinal.

As vesículas preparadas a partir dos fosfolípidos de acordo com a invenção podem ser administradas de formas convencionais em composições farmacêuticas ou para diagnóstico. Os ingredientes adicionais para adaptar as composições para uma utilização por via oral, bucal, parentérica, intraocular, nasal, pulmonar, rectal ou transdérmica são bem conhecidos do especialista nesta matéria.

Os fosfolípidos de acordo com a invenção podem também ser administrados na forma de qualquer composição para

Wifama

administração por via oral, parentérica, intraocular, nasal, pulmonar, rectal ou transdérmica, em combinação com os agentes veiculares convencionais e/ou agentes diluentes. As formas de administração podem também compreender, se for apropriado, outros agentes auxiliares e agentes promotores para aumentar ou controlar a penetração nas membranas, tais como os monoglicéridos e os compostos com propriedades activas na superfície.

Incluem-se as seguintes figuras:

Figura 1 - mostra o nível do colesterol no soro (S-CHOL) após a administração de diferentes emulsões e soluções. Ver o Exemplo 4.

Figura 2 - mostra o nível de triglicéridos do soro (S-TG) após a administração de diferentes emulsões e soluções. Ver o Exemplo 4.

Figuras 3 a 5 - mostra o nível dos fosfolípidos no fígado (PL; Figura 3); dos ésteres de colesterol no fígado (CE; Figura 4) e dos triglicéridos no fígado (TG; Figura 5) dos ácidos gordos w_3 mais importantes DHA (22:6 w_3), EPA (20:5 w_3); ácido alfa-linoleico (18:3 w_3) e os ácidos gordos w_6 , ácido di-homo-gama-linolénico (20:3 w_6) e ácido gama-linolénico (18:3 w_6) após a administração de diferentes emulsões e soluções. Ver o Exemplo 4. Aumento estatisticamente significativo ($p < 0,05$, ANOVA) após a administração da emulsão contendo fosfolípidos de peixe (F-PLem), comparada com a emulsão de óleo de peixe (FOem) e "Intralipid" (IL) e após FOem (+), comparada com os outros grupos.

Figura 6 - mostra o nível do ácido linoleico (18:2 w_6); e

Figura 7 - mostra o nível de ácido araquidónico

Wifama

(20:4w6) nos lípidos de fígado após a administração de diferentes emulsões e soluções. Ver o Exemplo 4. Para explicação das abreviaturas veja-se as Figuras 3 a 5.

Diversas modificações e equivalentes da emulsão tornar-se-ão evidentes a um técnico especialista nesta matéria, sem afastamento do espírito ou âmbito da invenção. Deve, portanto, ser entendido que a invenção não deve ser limitada aos exemplos específicos e às formas de realização nela revelados.

Os fosfolípidos de peixe podem ser produzidos de diferentes maneiras e, no texto que se segue, apresenta-se sómente um exemplo da referida produção.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Preparação de fosfolípidos de peixe

Extraiu-se, por duas vezes consecutivas, 1,5 Kg de farinha de peixe com 6 l e 3 l de etanol a 95%. Após as operações de filtração e recolha, evaporou-se o etanol do extracto (a vácuo, na temperatura de 40°C). Restaram 134 g (22% desta quantidade era matéria insolúvel). Dissolveu-se este resíduo em 1 volume de éter de petróleo, filtrou-se, precipitou-se em quatro volumes de acetona a -20°C, filtrou-se e dissolveu-se em éter de petróleo. Estas últimas operações de precipitação e de dissolução foram efectuadas duas vezes. Após a precipitação novamente em quatro volumes de acetona, filtrou-se a solução e secou-se com congelamento numa atmosfera de azoto. O rendimento foi de 27 g.

O fosfolípido de peixe que foi preparado tinha o seguinte teor de ácido gordo em %:

	%
14:0 ácido mirístico	2

Wifama

	%
16:0 ácido palmítico	26
16:1 ácido palmitoleico	2,1
18:0 ácido esteárico	3,0
18:1 ácido oleico	11,3
18:2 ácido linoleico	1,1
20:1 ácido eicosenóico	1,6
20:4 ácido araquidónico	1,2
20:5 EPA	10,6
22:6 DHA	32,4

Quantidade total de ácidos gordos: 100% (em peso/peso)

Exemplo 2: Preparação de uma emulsão de fosfolípidos de peixe de acordo com a invenção:

Utilizou-se o fosfolípido de peixe do Exemplo 1 para a produção de uma emulsão compreendendo:

- 100 g de óleo de soja;
- 12,0 g de fosfolípidos de peixe;
- 22,2 g de glicerol;
- 860 g de água para injeções;
- 3,0 ml de NaOH 1M.

Os ingredientes foram misturados num misturador do tipo "Turrax-mixer" e, em seguida, homogeneizados num homogeneizador do tipo de "Moulin-Gaulin".

O óleo de feijão de soja tinha o seguinte teor de ácido gordo em %:

	%
16:0 ácido palmítico	11

Wifama

	%
18:0 ácido esteárico	4
18:1 ácido oleico	23
18:2 ácido linoleico	55
18:3 ácido alfa-linolénico	7

Quantidade total de ácidos gordos w3 é de 12,2 g/l de emulsão e a proporção entre ácidos gordos w6 e ácidos gordos w3 é de 4,5.

Exemplo 3: Preparação de uma emulsão contendo fosfolípidos de óleo de peixe e de gema de ovo:

Preparou-se a referida emulsão de acordo com o processo descrito no Exemplo 2, e contendo uma quantidade semelhante de ácidos gordos w3 e uma proporção semelhante entre ácido gordo w6 e ácido gordo w3, como no Exemplo 2.

A mencionada emulsão continha:

Óleo de peixe	10,0 g
Óleo de feijão de soja	90,0 g
Fosfolípidos de gema de ovo	12,0 g
Glicerol	22,2 g
Água para injeções	860 g
NaOH, 1M	3,0 ml

Como agente anti-oxidante, adicionou-se vitamina E (alfa-tocoferol) à emulsão.

O óleo de peixe utilizado tinha o seguinte teor de ácido gordo em %:

14:0 ácido mirístico	6,3
----------------------	-----

Wifama

16:0	ácido palmítico	14,7
16:1	ácido palmitoleico	7,3
18:0	ácido esteárico	2,6
18:1	ácido oleico	8,9
18:1	ácido vacénico	3,1
18:2	ácido linoleico	1,1
18:3	ácido linolémico	0,7
18:4	ácido estearidónico	2,6
20:1	ácido eicosenónico	1,5
20:4	ácido araquidónico	1,4
20:5	EPA	17,8
22:1	ácido docosenónico	2,2
22:5	ácido docosapentanónico	2,9
22:6	DHA	13,5

Quantidade total de ácidos gordos: 100% (em peso/peso).

Os fosfolípidos de gema de ovo utilizados tinham o seguinte de ácido gordo em %:

14:0	ácido mirístico	0,2
16:0	ácido palmítico	31,5
16:1	ácido palmitoleico	1,2
18:0	ácido esteárico	14,1
18:1	ácido oleico	28,0
18:2	ácido linoleico	12,4
20:1	ácido eicosenónico	0,2
20:4	ácido araquidónico	4,2

Wifama

22:6 DHA

5,8.

A quantidade total de ácidos gordos w3 é de 10,8 g/l de emulsão e a proporção entre ácidos gordos w6 e ácidos gordos w3 é de 4,8.

Exemplo 4: Exemplo Comparativo (Fosfolípido de peixe - óleo de peixe):

O objectivo deste exemplo era o de investigar os efeitos dum preparado de fosfolípidos de peixe numa emulsão de acordo com a invenção, e comparar esta última com diferentes emulsões tais como uma emulsão de óleo de peixe contendo a mesma quantidade de ácidos gordos w3, Intralipid (marca registada), e também compará-la com fosfolípidos de peixe em solução de água e solução de NaCl.

Ratazanas machos do tipo Dawley, com peso compreendido entre 170 e 190 gramas, foram utilizadas nestes ensaios. As ratazanas foram colocadas em gaiolas individualmente e equipadas com um pequeno revestimento de couro previamente pesado. O catéter para colocação intravenosa foi inserido 7 a 8 dias mais tarde, sob anestesia dos animais. Após a operação, os referidos animais foram colocados num recinto para infusão. Deixou-se passar mais 4 dias para uma recuperação. Após a cirurgia alimentaram-se as ratazanas com uma dieta preparada no laboratório, R3 (Ewos AB; Södertälje, Suécia) e água da torneira à vontade. Durante todo o período de ensaio forneceu-se às ratazanas a dieta R3 preparada no laboratório e água da torneira à vontade.

As ratazanas foram classificadas, usando-se uma unidade de referência, em grupos de ensaio de A a E.

Empregaram-se seis ratazanas em cada grupo experimental.

Vifama

Todos os grupos receberam 50 ml/Kg de peso corporal (p.c.)/dia.

As infusões foram administradas por via intravenosa, através de um catéter permanente, colocado na veia central, durante 20 horas por dia, normalmente entre as 13 horas e as 9 horas da manhã, por intermédio de bombas volumétricas IMED.

Registou-se o consumo de alimentos em cada 24 horas. Anotou-se o aspecto geral das ratazanas. As infusões foram administradas durante 9 dias consecutivos. No 10º. dia pararam as infusões às 7 horas da manhã e retirou-se a alimentação por via oral.

Aos grupos A até E foram administradas as seguintes infusões:

A: 10% de emulsão de gordura de acordo com o Exemplo 2 (F-Plém, a presente invenção);

B: 10% de emulsão de gordura de acordo com o Exemplo 3 (FOem);

C: 10% de Intralipid (marca registada), contendo 10% (em peso/volume) de óleo, como óleo de feijão de soja e 1,2% de fosfolípidos de gema de ovo;

D: 1,2% de uma solução de fosfolípido contendo:

Fosfolípidos de peixe	12,0 g
Glicerol	22,2 g
Água para injeção	967 g
NaOH 1M	3 ml

E: 0,9% de solução NaCl.

As quantidades de ácidos gordos w3 e ácido gordos w6 foram as seguintes:

Wifama

	g/l		
	tot w3-FA	tot w6-FA	w6/w3
A = Ex 2 (invenção)	12,2	55,2	4,5
B = Ex 3 (óleo de peixe)	10,8	51,6	4,8
C = Intralipid	7,7	56,8	7,4
D = Solução de fos folípidos de peixe	4,8	0,3	0,1

Cerca de 2 horas depois de se parar com as infusões, as ratazanas foram anestesiadas com Mebumal (60 mg/Kg). Recolheram-se as amostras de sangue para análise dos lípidos do soro.

Lípidos de soro: A partir de 1 ml de sangue extraiu-se soro para análise dos triglicéridos do soro e colesterol do soro, e congelado até à temperatura de -70°C até à análise. Mediou-se de forma enzimática o colesterol do soro. Os triglicéridos do soro foram analisados de forma enzimática após a eliminação do glicerol livre e hidrólise enzimática.

Histopatologia: fígado, rins, coração, pulmões, baço e timo foram excisados, pesados e preparados para um exame histopatológico mediante uma impregnação em parafina e corte de secções com 4 a 5 micrómetros, depois um manchamento com hematoxilina-eosina. Examinaram-se também secções congeladas de todos os tecidos coloridos com vermelho de óleo (Oil Red O) para gordura.

Perfil do ácido gordo nos lípidos do fígado: O restante teci

Wifama

do de fígado das ratazanas dos grupos A a C foi utilizado para medição do perfil dos ácidos gordos nos lípidos neutros e nos fosfolípidos (PL). As fracções de lípidos neutros examinadas foram ésteres de colesterol (CE) e triglicéridos (TG). Extraíu-se o material lípido e derivatizou-se os ácidos gordos e analisou-se (GLC) empregando-se processos convencionais.

Os dados resultantes nos lípidos do soro estão ilustrados na Figura 1 (nível do colesterol no soro, S-CHOL) e na Figura 2 (nível de triglicéridos do soro, S-TG). Os níveis dos ácidos gordos mais importantes nos lípidos do fígado estão indicados nas Figuras 3 a 7. Os resultados são expressos como valores médios \pm SEM para as diferentes emulsões e soluções.

Resultados e conclusões:

A Figura 1 mostra claramente que o nível de colesterol no soro é muito baixo quando se utiliza a emulsão de acordo com a presente invenção (*). A < B, C; $p < 0,05$, ANOVA). O efeito mais surpreendente, no entanto, é o resultado, quando se compara os níveis de triglicéridos no soro. Veja-se a Figura 2. O citado nível é surpreendentemente baixo: (0,30 mmoles/litro) e apenas metade do valor quando foram utilizados Intralipid (marca registada), fosfolípidos de peixe numa solução aquosa ou solução de NaCl (0,60 mmoles/litro). (*). A < B, C, D, E; $p < 0,05$, ANOVA).

É absolutamente inesperado e desconhecido o facto de que uma pequena quantidade de ácidos gordos ω_3 , os quais podem derivar dos fosfolípidos numa emulsão lípida, pode exercer efeitos fisiológicos. A mesma quantidade de ácidos gordos ω_3 nos triglicéridos (grupo B) não exerce os mesmos efeitos biológicos ou efeitos sobre a incorporação do ácido gordo.

Wifama

Dado que a proporção entre fosfolípidos e triglicéridos é de cerca de 1:10 numa emulsão de lípidos a 10%, e é de 1:20 numa emulsão lípida a 20%, e o nível limiar, para os efeitos biológicos, do óleo de peixe, contendo cerca de 30% de ácidos gordos w3, é de pelo menos 10% da fase de óleo, a quantidade de ácidos gordos w3 na parte de fosfolípido de uma emulsão lípida deve ser de pelo menos 30% (em volume/volume do total dos ácidos gordos) para se esperar que exerça efeitos biológicos.

Assim, administrando uma emulsão de acordo com a invenção dá ao paciente a possibilidade de receber todos os ácidos gordos essenciais, tais como os ácidos gordos 3-ómega e todavia permanecer num nível muito reduzido de colesterol e de triglicéridos no soro. Os dados histopatológicos mostraram que as emulsões com óleo de peixe ou com fosfolípidos de peixe se acumularam principalmente nas células de Kupffer do fígado, enquanto o Intralipid (marca registada) se acumulou também nos hepatócitos. Os fosfolípidos de peixe em solução aquosa acumularam-se, no entanto, apenas nas células de Kupffer no fígado e em células semelhantes no baço. As mencionadas células são imunologicamente activas. A referida acumulação específica nas células activas de forma imunológica facilita um efeito de ácidos gordos 3-ómega sobre as reacções inflamatórias e imunológicas. Isto tem importância quando se empregam os fosfolípidos de peixe nas doenças do tipo inflamatório ou imunológico, tais como a artrite reumatóide e a sepsia (Love et al., 1990 e Billiar et al., 1988) ou para reduzir a incidência de arteroesclerose.

O tipo de ácido gordo nos ésteres de colesterol e de fosfolípidos do fígado mostra que o EPA e o DHA são incorporados após um tratamento com a emulsão preparada de acordo com a invenção, quando se compara com a emulsão de óleo de

Wifama

peixe contendo a mesma quantidade de ácidos 3-ómega.

As mudanças induzidas pela emulsão contendo fosfolípidos de peixe (F-PLem), a emulsão contendo óleo de peixe (FOem) ou Intralipid (IL) no tipo de ácido gordo existente nos fosfolípidos do fígado (PL), nos ésteres de colesterol (CE) e nos triglicéridos (TG) encontram-se ilustradas nas Figuras 3 a 7. Na fracção de fosfolípidos (Figuras 3 a 6), as únicas mudanças verificadas foram os aumentos de DHA, induzidos pela F-PLem (invenção), p 0,05, ANOVA) e no EPA, induzidas pela FOem (+) p 0,05, ANOVA). O aumento específico de DHA nos fosfolípidos, a maior reunião de DHA, é importante para o desenvolvimento do cérebro e da retina.

A absorção e o nível, nas membranas biológicas, de ácidos gordos poliinsaturados, em especial o DHA no cérebro, está bem relacionada com os do fígado (Anderson and Connor, Lipids, 1988, 23(4), 286-290) e do coração (Swanson et al., British Journal of Nutrition, 1988, 59, 535-545). Assim, espera-se um aperfeiçoamento semelhante da absorção no cérebro e no coração após a administração da emulsão de acordo com a presente invenção, em comparação com a emulsão de óleo de peixe. Consequentemente, pode-se empregar a emulsão de acordo com a invenção também para o desenvolvimento normal do cérebro e da retina e para tratamento das doenças cardiovasculares.

Na fracção de éster do colesterol no fígado (Figuras 4 e 6), a F-PLem aumentou os ácidos DHA e EPA, e o ácido linoleico (18:2w6), em comparação com os grupos FOem- e IL, e o ácido alfa-linoménico (18:3w3), em comparação com o grupo IL. Assim, os ácidos gordos 3-ómega administrados sob a forma de fosfolípidos são incorporados duma maneira mais eficiente nos lípidos das membranas (ésteres de colesterol e fosfolípidos), do que os ácidos gordos 3-ómega sob a forma

Wifama

de triglicéridos (óleo de peixe). As funções principais dos ácidos gordos essenciais e, portanto, também dos ácidos gordos 3- ω são exercidas nos lípidos das membranas.

Os mencionados resultados explicam em parte o efeito mais intenso de redução dos lípidos no soro exercido pela emulsão preparada de acordo com a presente invenção, em comparação com o da emulsão de óleo de peixe.

Nenhuma redução de qualquer dos ácidos gordos 6- ω pode ser constatada no grupo F-PLem. Pelo contrário, os ácidos gordos 6- ω : ácido linoleico (18:2 ω 6, Figura 6), ácido gama-linolénico (18:3 ω 6) e ácido di-homo-gama-linolénico (20:3 ω 6), assim como o ácido alfa-linolénico (18:3 ω 3) (Figura 5) aumentaram na fracção de triglicérido, em comparação com os grupos FOem e IL. O nível de ácido araquidónico (20:4 ω 6) permaneceu inalterado em todas as fracções de lípidos (Figura 7). Esta constatação é muito significativa devido à importância do ácido araquidónico nas membranas biológicas.

Visto que os fosfolípidos contendo o ácido gordo 3- ω são mais absorvidos nas células de Kupffer, do que nos hepatócitos, conforme se mostra na presente invenção, é de esperar que o aumento relativo de ácidos gordos 3- ω incorporados seja ainda mais elevado nas células imunologicamente activas (células de Kupffer e outros macrófagos), do que em todo o fígado. Isto é importante para os efeitos anti-inflamatórios e imunossupressivos exercidos pelos referidos ácidos gordos 3- ω . Os efeitos biológicos obtidos pelos ácidos gordos 3- ω nos fosfolípidos podem ser utilizados para fins terapêuticos, isolados ou em combinação com drogas que têm efeitos semelhantes e incluídos nas vesículas de fosfolípidos (lipossomas).

Conclusões:

Wifama

Conclusões:

Demonstrámos que os fosfolípidos de peixe numa emulsão preparada de acordo com a invenção resultavam em teores surpreendentemente mais baixos de triglicéridos e de colesterol no soro, quando comparados com os obtidos com uma emulsão de óleo de peixe contendo uma quantidade semelhante de ácidos gordos 3- ω e uma proporção semelhante de ácidos 6- ω e 3- ω . Os fosfolípidos de peixe induzem a uma incorporação mais eficiente dos ácidos gordos 3- ω nas membranas biológicas do que o óleo de peixe contendo uma quantidade similar de ácidos gordos 3- ω , numa emulsão.

Estes resultados mostram que se obtém um tipo de ácido gordo muito favorável nos lípidos das membranas, com um aumento de todos os importantes ácidos gordos 3- ω , assim como nos ácidos gordos 6- ω , o ácido linoleico, o ácido gama-linolénico e o ácido di-homo-gama-linolénico. O fosfolípido contendo ácido gordo 3- ω , de acordo com a invenção é, por conseguinte, importante em todas as situações de maior necessidade de todos os ácidos gordos essenciais, visto que torna possível aumentar os ácidos gordos 3- ω (a partir do fosfolípido consoante a presente invenção), assim como os ácidos gordos 6- ω (em óleos vegetais) num modelo bem equilibrado.

Os referidos resultados têm implicações na utilização do ácido gordo 3- ω contendo fosfolípidos em emulsões de óleo vegetal, para um emprego mais eficiente e uma melhor incorporação dos ácidos gordos 3- ω e 6- ω . O uso do ácido gordo 3- ω contendo fosfolípidos permite também uma incorporação mais específica dos ácidos gordos 3- ω nas células imunologicamente activas.

A invenção pode ter implicações especificamente nas

Vifama

situações de um teor aumentado de lípidos no soro, uma resposta inflamatória mais intensa e uma mais forte actividade imunológica, e também para o desenvolvimento normal do cérebro e da retina.

Os efeitos biológicos obtidos pelos ácidos gordos 3- ω nos fosfolípidos podem ser usados para fins terapêuticos como tais ou em combinação com drogas, com efeitos semelhantes, e incluídos nas vesículas dos fosfolípidos (liposomas).

**REIVINDICAÇÕES:**

1a. Emulsão aquosa compreendendo óleo de origem vegetal e/ou marinha, uma fase aquosa e fosfolípidos como agente emulsionante, caracterizada pelo facto de os citados fosfolípidos serem de origem marinha e/ou sintética e conterem uma quantidade de ácidos gordos, ómega-3 ácido docosa- hexenóico (22:6 w3 DHA) e ácido icosapentenóico (20:5 w3 EPA) de pelo menos igual a 30% (em peso/peso).

2a. Emulsão de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo facto de a quantidade de óleo estar compreendida entre 0,5 e 40% (em peso/volume) e a quantidade de fosfolípidos contendo os ácidos gordos 3-ómega DHA e EPA estar compreendida entre 0,1 e 30% (em peso/volume).

3a. Utilização de fosfolípidos de origem marinha e/ou sintética, contendo ácidos gordos DHA e EPA 3-ómega numa quantidade pelo menos igual a 30% (em peso/peso) para a fabricação de uma emulsão nutritiva que proporciona níveis baixos de triglicéridos e de colesterol no sangue.



4a. Utilização de fosfolípidos de origem marinha e/ou sintética contendo ácidos gordos 3-ómega numa quantidade pelo menos igual a 30% (em peso/peso) para a fabricação de uma composição farmacéutica com efeitos anti-inflamatório e/ou imunossupressor apropriada para o tratamento de perturbações inflamatórias e imunológicas como por exemplo artrite reumatóide e sepsia.

5a. Utilização de acordo com a reivindicação 4, caracterizada pelo facto de os ácidos gordos 3-ómega serem DHA (ácido docosa-hexenóico) e EPA (ácido icosapentanóico).

6a. Vesículas delípidos com uma, duas ou várias camadas, caracterizadas pelo facto de conterem fosfolípidos dos ácidos gordos 3-ómega DHA e EPA, numa quantidade superior a 30% (em peso/peso).

7a. Composição, caracterizada pelo facto de compreender as vesículas de lípidos de acordo com a reivindicação 10, agentes veiculares e/ou diluentes e, opcionalmente um ou mais compostos bioactivos, combinados com as vesículas.



8a. Composição farmacêutica, caracterizada pelo facto de compreender fosfolípidos de origem marinha e/ou sintética contendo os ácidos gordos ómega-3 DHA e EPA e agentes veiculares e/ou diluentes, apropriados para a sua administração por via oral, nasal, pulmonar, rectal, ocular, transdérmica ou parentérica, opcionalmente em combinação com um ou mais compostos bioactivos.

9a. Composição nutritiva caracterizada pelo facto de compreender fosfolípidos de origem marinha e/ou sintética, que têm um teor de ácidos gordos 3-ómega EPA e DHA pelo menos igual a 30% (em peso/peso).

Lisboa,

O Agente Oficial da Propriedade Industrial



AMÉRICO DA SILVA CARVALHO
Agente Oficial de Propriedade Industrial
Rua Marquês de Fronteira, N.º 127-2.º
1000 LISBOA

FIG 1

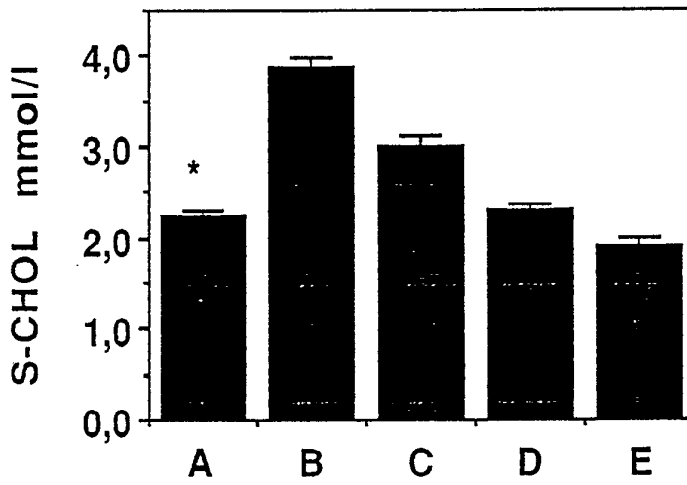


FIG 2

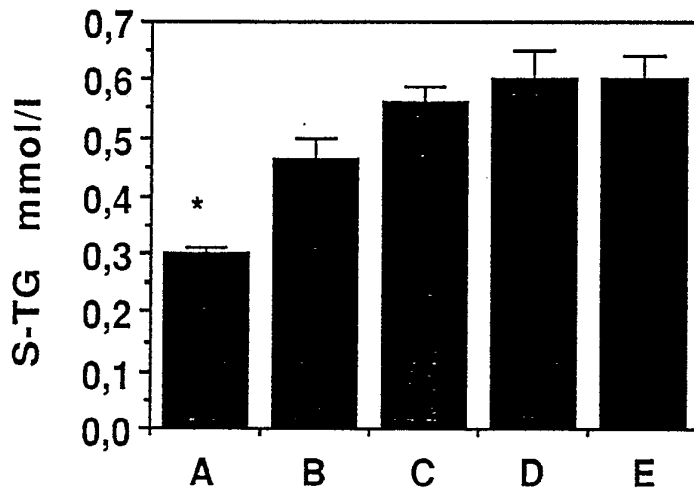


FIG 3



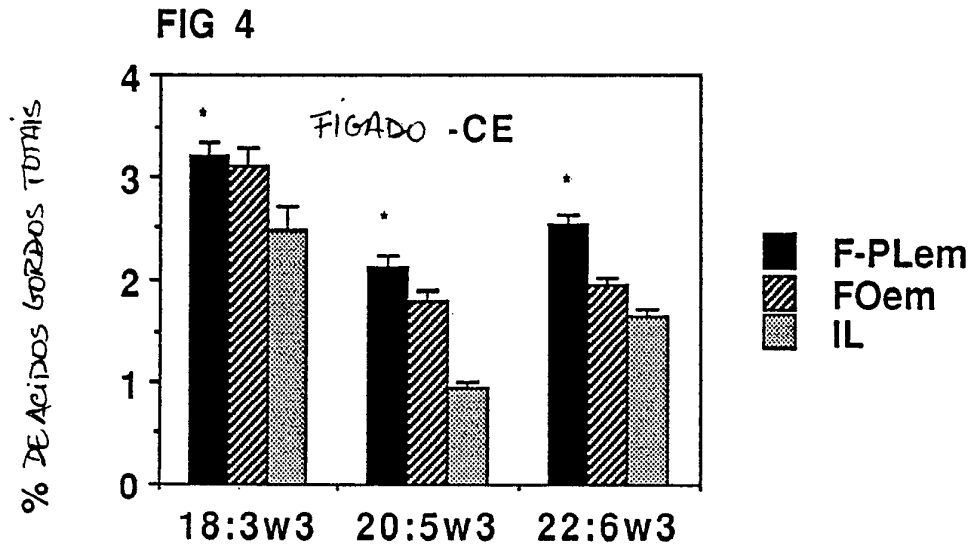
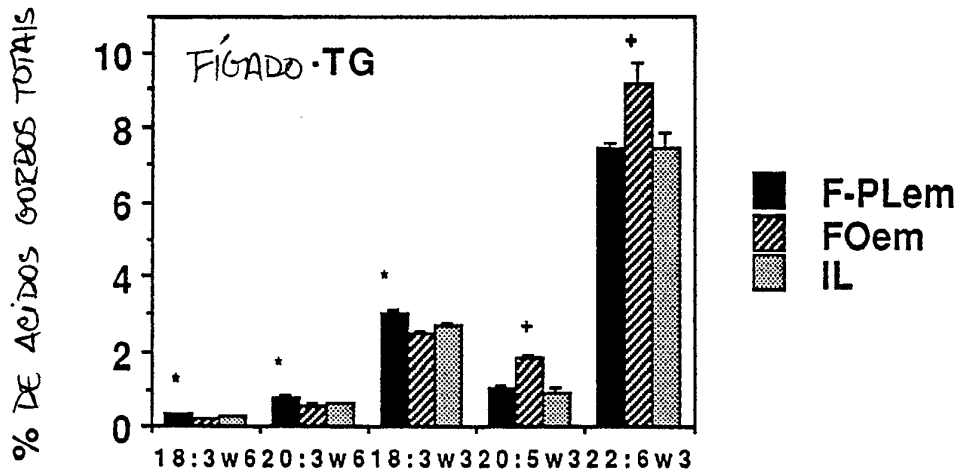
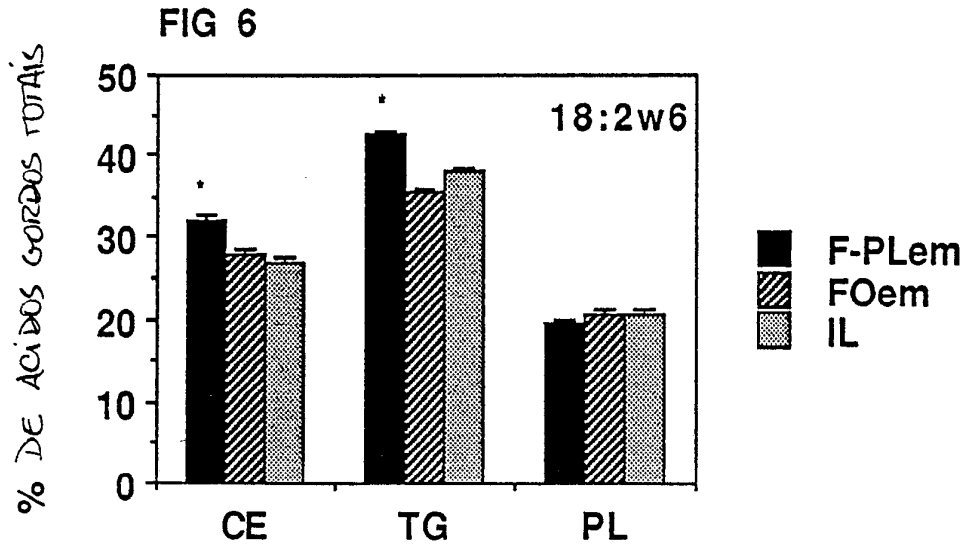


FIG 5





Vifarma

