



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 284 286**

51 Int. Cl.:
A61K 31/20 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
A23K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **99970319 .2**
86 Fecha de presentación : **15.10.1999**
87 Número de publicación de la solicitud: **1121115**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **08.08.2001**

54 Título: **Suplementos de PUFA.**

30 Prioridad: **15.10.1998 EP 98308403**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.11.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.11.2007

73 Titular/es: **DSM IP Assets B.V.**
Het Overloon 1
6411 TE Heerlen, NL

72 Inventor/es:
Van Waterschoot, Isabel, Antonia, Maria y
Streekstra, Hugo

74 Agente: **Lehmann Novo, María Isabel**

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

Suplementos de PUFA.

5 La invención se relaciona con el suministro de ácidos grasos poliinsaturados (PUFAs) en la dieta de mujeres lactantes. Mas específicamente se relaciona con el suministro de ácidos grasos poliinsaturados de las familias n-6 y n-3, y en particular el ácido araquidónico de ácido graso n-6 (ARA) y el ácido docosahexaenoico de ácido graso-3 (DHA), y las proporciones de los mismos en cantidades balanceadas.

10 La invención está en parte basada en el descubrimiento de que un balance óptimo de las familias de n-6 y n-3 puede jugar un papel significativo en la salud y la prevención de enfermedades crónicas. La razón principal para esto es que las dos familias compiten por la misma enzima(s) para la formación de los miembros de cadena larga a partir de sus precursores C18. Como consecuencia, y esto ocurre en las composiciones del arte anterior, un excedente de miembros de una familia tiende a deprimir la cantidad de la otra familia. Además, los miembros de las dos familias pueden en
15 algunas circunstancias tener efectos adversos en las funciones esenciales en el cuerpo, tal como la coagulación de la sangre y la respuesta inmune.

Introducción

20 Tecnológicamente es relativamente fácil suministrar el ácido linoleico de ácido graso n-6 de C18 en la dieta, ya que este ácido graso está abundantemente presente en los aceites vegetales comunes, tal como el aceite de maíz y el aceite de soya. Existen aceites de plantas disponibles que contienen el ácido α -linoleico de ácido graso n-6 de C18, por ejemplo aceite de semilla de colza, pero estos son mucho menos fácilmente usados debido a su baja estabilidad. Esto usualmente conduce a un exceso de la familia n-6 sobre la familia n-3 en la dieta moderna.

25 Ha sido por lo tanto argumentado que los ácidos grasos n-3 deben ser suplementados en muchos casos cuando se sospecha una disminución relativa. Generalmente esto no puede ser logrado suministrando los precursores C-18, ya que la eficiencia de su conversión a los derivados C20 y C22 es baja. Por lo tanto, el consenso es que los ácidos grasos n-3 de C20 y C22 (EPA y DHA) deben ser suministrados por sí mismos.

30 En muchos casos el respaldo racional de esta suplementación es atenuar la acción del ácido graso n-6 de cadena larga ARA. Ha sido mostrado que la adición de los PUFAs n-3, derivados tanto del aceite de pescado o de aceites microbianos (algas) efectivamente conducen a disminuir los niveles de ARA. En el caso del aceite de pescado esto ocurre a pesar del hecho de que el aceite de pescado contiene bajas cantidades de ARA.

35 Esta disminución del contenido de ARA no es siempre deseable. La invención apunta así a proporcionar preparaciones que pueden aumentar el estado de DHA y/o de EPA de los animales, sin afectar de manera adversa los niveles de ARA, o, contrariamente, aumentar el ARA sin afectar el estado de DHA y/o EPA.

40 El uso de preparaciones que contienen el ARA y los PUFAs n-3 ha sido descrito antes en el suministro de PUFAs en fórmulas infantiles. El respaldo racional a esto es que la leche de pecho humana contiene cantidades apreciables de ARA y DHA los cuales son considerados útiles para el desarrollo del infante.

45 En contraste, para la nutrición de los adultos no existe fuente natural de PUFAs, aunque tanto el ARA como el DHA pueden ser encontrados como componentes de la dieta humana. Sin embargo, por un número de razones estos niveles de PUFA parecen estar por debajo del óptimo. Además, diferentes poblaciones tienen diferentes niveles de esos PUFAs y esto puede afectar la dosis conveniente. Como no existe un modelo a partir de la naturaleza, las cantidades relativas de los PUFAs a ser usados necesita ser determinada y la presente invención apunta a encaminar este problema y suministrar varias formulaciones y proporciones de los PUFAs para ciertas aplicaciones.

Arte previo

55 M. Makrides y otros, European Journal of Chemical Nutrition 50:352-357 (1996) se refiere a un estudio para estimar el efecto de variar la administración interna de DHA (de 0 a 1.3 g de DHA/día) sobre los ácidos grasos de la leche de pecho. El DHA en la dieta alimentada a las madres lactantes tuvo un efecto específico fuerte y dependiente de la dosis sobre el DHA de la leche de pecho pero no afecta los niveles de ARA. Este estudio usó aceites de algas disponibles de Martek Corporation, USA, bajo la denominación comercial NEUROMINS™.

60 WO-A-92/12711 (Martek) se refiere a mezclas de aceites que contienen ARA y DHA, por ejemplo una proporción ARA:DHA de 3:1 a 2:1, en particular suministrar niveles de esos PUFAs en la fórmula infantil en cantidades comparables a la leche de pecho humana (la cual tiene un nivel de ARA de 0.5 a 0.6%).

Un número de composiciones que contienen PUFA están actualmente en el mercado.

65 EFANATAL™ son cápsulas, dos cápsulas a ser tomadas por día para obtener una administración diaria de DHA (125 mg), ARA (8.6 mg) y GLA (40 mg). Las cápsulas contienen un aceite que está primariamente basado en el aceite de pescado. El Solicitante ha encontrado que esto disminuye los niveles de ARA *in vivo*, debido a que el contenido de DHA con relación al contenido de ARA en las cápsulas es demasiado alta. Así este producto es de hecho una

composición que disminuye el ARA, más bien que aumentar el ARA, no obstante el hecho de que este contiene ARA. Una comparación entre este producto y aquellos de la invención es proporcionada más adelante

EFAMARINE™ es también en cápsulas, que contienen primariamente aceites de pescado y de onagra, de los cuales dos son a ser tomados por día para dar una administración diaria de EPA (34 mg), DHA (22 mg) y GLA (68 mg).

EFALEX™ es una mezcla de aceites, donde se pretende que una cucharadita (5 ml) sea tomada dos veces al día, cada cucharadita dando DHA (100 mg), GLA (21 mg), ARA (8 mg) aceite de tomillo (6 mg).

Sumario de la invención

Un primer aspecto de la presente invención se relaciona con una formulación comestible que comprende ARA en una cantidad adaptada para entregar una dosis (de ARA) de 150 mg a 700 mg por día a la mujer lactante.

Preferiblemente la formulación está adaptada para entregar desde 200 a 700 mg por día, óptimamente desde 250 a 400 mg o 500 mg por día.

Las formulaciones comestibles incluyen suplementos en la dieta y formulaciones (farmacéuticas) y preparaciones, tales como tabletas, píldoras y cápsulas. Las mismas adicionalmente incluyen comestibles (sólidos o líquidos), por ejemplo productos lácteos (margarina, mantequilla, leche, yogurt), pan, pasteles; bebidas tales como infusiones (te, café, cacao, bebidas de chocolate), jugos de frutas, bebidas ligeras (por ejemplo gaseosa); confitería; alimentos grasos (bocadillos, aliño para ensaladas, mayonesa), sopas, salsas, alimentos ricos en carbohidratos (arroz, fideos, pasta), alimentos que contienen pescado, alimentos para bebés (tal como fórmula infantil, tanto como un líquido o en polvo), alimentos para mascotas, alimentos para cocinar en el microondas o ya preparados.

Los ARA pueden provenir de cualquier fuente. Los mismos pueden provenir de una fuente natural (por ejemplo vegetal o marina), o pueden provenir de una fuente microbiana o de un microorganismo, tal como hongos, bacterias o una levadura.

Hongos apropiados son aquellos del orden de los *Mucorales*, por ejemplo *Mortierella*, *Pythium* o *Entomophthora*. La fuente preferida de ARA es a partir de *Mortierella alpina* o *Pythium insidiosum*. Aceites ARA apropiados comercialmente disponibles incluyen aquellos de DSM/Gist-brocades, Wateringseweg, P.O. Box 1, 2600 MA, Delft, Holanda bajo la marca comercial OPTIMAR™ y de Martek Corporation, 6480 Dobbin Road, Columbia, MD 21045, USA, bajo la marca comercial ARASCO™.

En adición al ARA, uno o más PUFAs adicionales pueden ser suministrados. Este puede ser otro PUFA n-6 en adición al ARA (tal como un ácido graso C18, C20 o C22) o este puede un ácido graso n-3 (por ejemplo, un ácido graso C18, C20 o C22) y en particular EPA y/o DHA. Cada PUFA que puede ser usado en la invención puede estar en forma de un ácido graso libre, éster de ácido graso (por ejemplo metil o etil éster) como un fosfolípido o como un triglicérido.

Si la formulación comprende un ácido graso n-3, es preferido que este sea EPA o DHA. Si es DHA, entonces la formulación está preferiblemente adaptada para entregar la misma dosis que se especificó para ARA, tal como desde 400 a 600 mg por día de DHA. Alternativamente, o en adición, si la formulación comprende EPA, entonces está preferiblemente adaptada para entregar una dosis de desde 150 mg a 1 g por día de EPA, tal como desde 250 a 500 mg de EPA por día.

Si la formulación es para ser tomada (comida o ingerida) una vez al día entonces la misma puede contener desde 150 mg a 1 g de ARA. Si se toma dos veces al día entonces la formulación puede tener 75 mg a 0.5 g de ARA, para tres veces al día un contenido de 50 mg a 330 g de ARA, y así sucesivamente, pro rata, para administraciones más frecuentes. Los mismos cálculos pueden ser aplicables para otros PUFAs que pueden estar presentes, tal como el DHA.

Si la formulación comprende más de un PUFA entonces la cantidad de cada PUFA puede ser expresada relativamente, como una proporción. Por ejemplo, si un PUFA n-3 es adicionalmente suministrado, entonces la proporción de ARA: PUFA n-3 (tal como DHA o EPA) puede estar desde 1:5 a 5:1, preferiblemente desde 2:1 a 1:3, de manera óptima desde 1:1 a 1:2. Las cantidades relativas de los PUFAs puede estar balanceada de manera que los niveles de PUFA sean suplementados, aumentados (o al menos no disminuidos significativamente) teniendo en cuenta la condición del individuo.

Preferiblemente el PUFA está presente en un aceite. Este puede ser un aceite puro, un aceite procesado (por ejemplo tratado químicamente y/o enzimáticamente) o aceite concentrado. Este aceite puede comprender desde 10 a 100% del PUFA, pero el contenido puede ser desde 20 a 45%, óptimamente desde 30 a 45% del PUFA deseado, por ejemplo el ARA, si es un aceite microbiano. Por supuesto, este aceite puede contener uno o más PUFAs dentro de estos por cientos de concentraciones. El aceite puede ser un aceite simple derivado de una célula simple o una fuente microbiana, o puede ser una mezcla de dos o más aceites de estas u otras fuentes (por ejemplo vegetal o marina). El aceite puede contener uno o más antioxidantes (por ejemplo tocoferol, vitamina E, palmitato) por ejemplo a una concentración

ES 2 284 286 T3

de desde 50 a 800 ppm, tal como 100 a 700 ppm. Procedimientos apropiados para preparar PUFAs son descritos en las Solicitudes de Patente Internacionales números PCT/EP97/01446 (WO-A-97/36996), PCT/EP97/01448 (WO-A-97/37032), y PCT/US92/00517 (WO-A-92/13086).

Un segundo aspecto de la invención se relaciona el uso de una composición que comprende ARA y DHA en una proporción de ARA:DHA de desde 1:1 a 1:2. Esta proporción de PUFAs ha sido encontrada para suministrar un buen balance, y puede aumentar los niveles de DHA *in vivo* sin que los niveles de ARA sean suprimidos debido a un contenido de DHA demasiado alto. El DHA puede ser de una fuente natural (por ejemplo marina) o de una fuente microbiana (por ejemplo de un alga).

Las formulaciones apropiadas pueden incluir aceites, por ejemplo a ser tomados de manera oral. El aceite puede ser tomado como tal, o puede ser encapsulado, por ejemplo en una concha, y puede así estar en forma de cápsula. La concha o cápsulas pueden comprender gelatina y/o glicerol. La formulación puede contener otros ingredientes, por ejemplo saborizantes (por ejemplo sabor a limón o lima).

La invención ha encontrado uso en mejorar los niveles de PUFA en individuos normales, saludables, bien alimentados (quienes normalmente no esperarían beneficiarse con una dieta adecuada).

Así, la invención se relaciona con el uso de ARA (por ejemplo como un suplemento dietético o nutricional o para la fabricación de un medicamento) para una mujer que está:

a. tratando de quedar embarazada;

b. lactando, para aumentar el nivel de ARA o EPA en la leche de pecho de la mujer.

El ARA es preferiblemente ingerido desde 150 a 700 mg por día, óptimamente desde 250 a 500 mg por día.

Un noveno aspecto de la presente invención se relaciona con el uso de ARA y DHA (en una formulación comestible) y una proporción ARA:DHA que aumenta el nivel de ARA en la sangre.

Preferiblemente la proporción de ARA:DHA es desde 1:5 a 5:1, tal como desde 1:1 a 1:2.

La dosis o cantidad de ARA (y DHA, si está presente) es preferiblemente tal que la misma aumenta un índice de suficiencia de un ácido graso esencial (EFA) (definido como el nivel de (ARA) n-6 20:4 dividido por el nivel de ácido graso 20:3 n-9 (ácido Mead)) y/o un índice de balance EFA (definido como el nivel de (DHA) 22:6 n-3 dividido por el nivel de 22:5 n-6). Aquí, los niveles incluyen aquellos en la sangre (por ejemplo en las células rojas de la sangre), cerebro, placenta, hígado, intestino, plasma o feto.

Ejemplos Comparativos 1 a 3

Preparación de una composición que contiene proporciones balanceadas de PUFAs

Este ejemplo describe la mezcla de los aceites n-6 y n-3 de manera que los mismos puedan ser incluidos en una cápsula única.

La composición fue preparada combinando un aceite rico en PUFA n-6 con tres aceites ricos en PUFA n-3 diferentes. El aceite rico en PUFA n-6 fue derivado de la fermentación de los hongos filamentosos *Mortierella alpina*, y contenían aproximadamente 40% de ARA como el mayor ácido graso. Para el aceite rico en PUFA n-3 las tres fuentes diferentes fueron: un aceite de pescado alto en EPA (por encima de 45%) bajo en DHA (alrededor de 10%) (de Pronova, Noruega bajo la denominación comercial EPAXTM, producto no. EPAX4510TG), un aceite de pescado alto en DHA (por encima de 50%) bajo en EPA (alrededor de 20%) (también de Pronova bajo la misma denominación comercial, producto no. EPAX2050TG), y un aceite derivado de la fermentación del alga unicelular *Cryptocodinium cohnii* la cual contiene 40% de DHA como el mayor ácido graso pero está virtualmente desprovista de EPA (de Martek Corporation, Columbia, Estados Unidos de América bajo la denominación comercial DHASCOTM).

Los aceites fueron mezclados en cantidades apropiadas para dar las cantidades deseadas y proporciones de los PUFAs n-3 y n-6. Aquí la proporción ARA:DHA para las tres mezclas (Ejemplos 1 a 3) fue 1:1. Durante este procedimiento, los aceites sensibles a la oxidación fueron protegidos del oxígeno ambiental por una capa de gas nitrógeno libre de oxígeno. Subsiguientemente, los aceites fueron usados para preparar cápsulas de gelatina en gel blandas, donde cada cápsula tenía 400 mg de ARA y 400 mg de DHA.

Ejemplo Comparativo 4

Suministro de PUFAs balanceados a mujeres embarazadas durante en las etapas temprana o tardía de embarazo

Este Ejemplo concierne al ensayo de mujeres embarazadas que son suplementadas con ARA y DHA tanto entre las semanas 6 y 15 o entre las semanas 20 y 25 durante el embarazo hasta el parto (nacimiento). La fuente de ARA fue un aceite triglicérido que contiene 38% de ARA disponible de DSM/Gist-brocades, Delft, Holanda, bajo la denominación

comercial OPTIMAR™. Este es un aceite producido por el hongo *Mortierella alpina*. Para el DHA fue empleado un aceite de pescado rico en DHA de grado comestible o un aceite derivado de un alga obtenido de Martek Corporation bajo la denominación comercial DHASCO™.

La suplementación materna de ARA y DHA durante el embarazo fue por lo tanto estudiada para ver el estado del ácido graso de la madre medido al nacer y subsiguientemente durante la lactancia comparado con el grupo controlado que no recibió suplementación. Las mediciones incluyeron los valores de ARA y DHA en los eritrocitos maternos, el contenido de ARA y DHA de las arterias umbilicales y la pared de los vasos venosos, el contenido de ARA y DHA de la leche de pecho.

El estudio fue un estudio controlado del caso incluyendo 10 mujeres embarazadas. Un grupo experimental (de cinco mujeres) recibieron uno o más aceites en cápsulas de gelatina (cada una de 250 mg de ARA) por día (conteniendo 38% de ARA) y un aceite en cápsula (cada una de 500 mg de DHA) por día (conteniendo 25% de DHA). El grupo control recibió la misma cantidad de cápsulas de gelatina placebo para superar las diferencias en la administración de calorías diarias. La administración de vitamina E de los grupos experimental y el controlado fue igual, y las cápsulas fueron tomadas durante el desayuno.

Las muestras de sangre fueron tomadas al principio del ensayo y al final de la gestación. Los ácidos grasos de las células sanguíneas fueron medidos (como fosfolípidos) usando cromatografía de gas capilar con ionización de llama.

Se encontró que las mujeres suplementadas tenían niveles significativamente más altos de DHA y ARA en las células rojas de la sangre durante el embarazo y al momento del parto. De manera remarcable, estos niveles más altos persistieron durante el período de lactancia, siendo aparente tanto en las células rojas de la sangre de las madres y su leche de pecho. Se encontró que el nivel de ARA en la leche de pecho se había elevado desde 0.8 a 1.0% de ARA. En adición se encontró que los niveles de ARA en la sangre de los niños recién nacidos fue mayor que los del grupo de control. Este descubrimiento es de una significación mayor para las madres y sus hijos bajo condiciones de nutrición marginales.

Ejemplo Comparativo 5

Suministro de PUFAs balanceado a la población de avanzada edad

El solicitante percibe una necesidad de mejorar el estado del PUFA n-3 de la población, no solo en la población de avanzada edad, donde se ha encontrado que las enfermedades tales como el Parkinson y Alzheimer están asociadas con un bajo estado de PUFA. Se piensa que esto se debe parcialmente a la ineficiencia o deficiencia de la enzima $\Delta 6$ -desaturasa. Sin embargo se necesita atención, especialmente en la población más vieja, ya que una disminución en los niveles de ARA podría ejercer un efecto negativo sobre el sistema inmune.

Fue preparada una formulación de acuerdo al Ejemplo 1, que contiene PUFAs n-3 y n-6 en una proporción de DHA:ARA de 2:1. Las cápsulas fueron dadas a un grupo de mujeres y hombres saludables, de avanzada (al menos de 65 años de edad), en una dosis de 1 g de PUFAs n-3 por día.

Después de un mes el estado de PUFA de las células rojas de la sangre de los sujetos fue estimado.

Se encontró que en todos los casos los niveles de DHA habían aumentado, mientras que los niveles de ARA se mantuvieron constantes, o mostraron un ligero aumento en algunos casos. Así fue posible mejorar el estado del PUFA n-3 de los pacientes, sin comprometer el estado de ARA, mediante el uso de una formulación balanceada.

Ejemplo Comparativo 6

Suministro de PUFAs a mujeres embarazadas

Fueron preparados dos tipos de cápsulas conteniendo PUFA. La primera contenía ARA, a 500 mg por cápsula. Esas eran para tomar una vez al día. El ARA fue suministrado como un aceite microbiano, obtenido de DSM/Gist-brocades, Delft, Holanda, bajo la denominación comercial OPTIMAR™. Estas cápsulas tenían un recubrimiento de gelatina, y contenían 20 mg de vitamina E. Cápsulas similares fueron también preparadas teniendo la misma cantidad (500 mg) de DHA, estando presente como un aceite microbiano obtenido de Martek Corporation, Columbia, Estados Unidos de América (bajo la denominación comercial DHASCO™). Estas cápsulas fueron también diseñadas para ser tomadas una vez por día.

Los ensayos fueron conducidos con mujeres embarazadas que ingirieron tanto una cápsula de ARA por día, o una cápsula de ARA y una de DHA por día. Las mujeres seleccionadas para el estudio fueron aquellas en las que se encontró que tenían niveles de ARA relativamente bajos en la sangre. Un número de mujeres que estaban embarazadas fueron por lo tanto examinadas para los niveles de ARA en sangre *in vivo* y se obtuvo permiso para tomar parte en este estudio. El primer grupo de mujeres eran jóvenes de desde 15 a 20 años de edad. Para todas esas mujeres, ese era su primer embarazo. Debido a la temprana maduración se encontró que las mismas se beneficiaron de la suplementación con ARA y ARA más DHA en su dieta. Ambos regímenes aumentaron *in vivo* los niveles de ARA.

Un segundo grupo de mujeres, también embarazadas, fueron estudiadas, estas estando entre 40 a 50 años de edad. Durante el embarazo se encontró también que sus niveles de sangre *in vivo* aumentaron bajo ambos regímenes de suplementación. La mitad de las mujeres seleccionadas en este estudio habían tenido su cuarto hijo.

Tres mujeres cada una embarazada con gemelos fueron seleccionadas para suplementación con una cápsula de ARA y una de DHA por día. Se encontró que sus niveles de ARA *in vivo* eran relativamente bajos, probablemente debido a que el ARA de la sangre de la madre estuvo siendo absorbida y consumida por los dos fetos. Estas mujeres fueron complementadas con las cápsulas de ARA y DHA y se encontró que los niveles de ARA en la sangre aumentaron.

Ejemplo Comparativo 7

Suministro de ARA y DHA a sujetos con bajo contenido de PUFA

Las mismas cápsulas fueron usadas como se describió en el Ejemplo 6, excepto que esta vez las cápsulas de ARA contenían solamente 250 mg de ARA. Estas cápsulas pueden ser tomadas una o dos veces al día, de acuerdo al sujeto y su condición.

Un número de personas fueron seleccionadas para este estudio debido a su contenido de PUFA relativamente bajo en la sangre. La razón para el bajo contenido de PUFA no siempre fue inmediatamente evidente. Sin embargo, se encontró que un número de enfermedades o condiciones adversas conducen a bajos niveles de PUFA, y fue por lo tanto postulado que al suministrar tanto una dosis correcta de ARA, como un balance de ARA:DHA, los niveles de ARA *in vivo* podrían ser aumentados, los cuales pudieran moderar algunos de los síntomas de la condición. Se piensa que algunas de las condiciones resultan en una pobre eficiencia en la conversión de un precursor a ARA propiamente, por ejemplo un defecto o deficiencia con la enzima $\Delta 6$ -desaturasa. Aquellas condiciones que fueron encontradas por el Solicitante que a menudo provocan bajos niveles de PUFA incluyeron fibrosis cística, esclerosis múltiple, celiaquía y osteoporosis. En adición, los pacientes que estuvieron siendo tratados por alcoholismo, adicción a las drogas o que estaban inmuno comprometidos (pacientes con SIDA) se encontró también que tenían bajos niveles de PUFAs.

Se realizó un estudio en el cual una o dos cápsulas de ARA fueron tomadas diariamente, para dar un contenido de ARA:DHA de 1:1 o 1:2. En casi todos los casos se encontró que aquellos sujetos que estuvieron tomando esas cápsulas (por al menos 3 semanas) habían aumentado, al final del ensayo, los niveles de ARA en sangre *in vivo*.

Ejemplo Comparativo 8

Suministro de PUFAs en la fórmula infantil

Un alimento para bebés en formula infantil tanto sólido (polvo) como líquido fue preparado conteniendo 0.5% de ARA y 0.5% DHA. Esta fórmula fue alimentada a los bebés regularmente en sus primeros tres meses por las madres que habían decidido no alimentar con leche de pecho a sus hijos. Como control, los niveles de ARA en sangre *in vivo* de estos niños fueron comparados con aquellos que habían sido alimentados con leche de pecho en el mismo período de tiempo. Se encontró que en los infantes que eran alimentados con biberón sus niveles de ARA eran comparables con aquellos que eran alimentados con leche de pecho.

Ejemplo Comparativo 9 y Ejemplo 10

Un número de mujeres alimentando con leche de pecho fueron seleccionadas para un ensayo comparativo. Un grupo de mujeres fueron alimentadas con dos cápsulas de EFANATALTM por día (para dar una administración diaria de DHA 125 mg, ARA 8.6 mg y GLA 40 mg). Por comparación, a un segundo grupo de mujeres le fueron dadas cápsulas similarmente preparadas (con una concha de gelatina/glicerol) conteniendo 150 mg de ARA por cápsulas (para dar una administración de ARA diaria de 300 mg de ARA, 2 cápsulas por día). En este segundo grupo una tercera cápsula fue también tomada, una por día, la que contenía DHA a 500 mg por cápsula.

Los niveles de ARA en las mujeres lactantes en ambos grupos, después del nacimiento del niño, fueron comparados. También se comparó el nivel de ARA en la leche de pecho de las madres.

En el primer grupo EFANATALTM se encontró que los niveles de ARA disminuyeron marcadamente en la sangre, y en una extensión menor en la leche de pecho, solamente dos semanas después que el ensayo incluyendo el consumo de EFANATALTM había comenzado. En contraste se encontró que aquellas mujeres que tomaron dos cápsulas de ARA y una cápsula de DHA por día tenían aumentado los niveles de ARA en su sangre, y los niveles en la leche de pecho también aumentaron por encima de 0.7%.

Ejemplo Comparativo 11

Mejora de la deficiencia en ácido graso en el embarazo de ratón a través de la suplementación con ARA y DHA

Un serio problema durante el embarazo de mamíferos humanos y no humanos es la ocurrencia de retardo en el crecimiento intra-uterino. Esta condición está asociada con significativos riesgos de salud para que el infante después del nacimiento pueda continuar en la vida adulta. La condición puede desarrollarse incluso durante el embarazo de una mujer aparentemente saludable y es difícil de predecir. Se asume generalmente que esto es provocado por un pobre funcionamiento del intercambio de la placenta, por ejemplo debido a que la placenta es demasiado pequeña o está en una condición fisiológica pobre.

Este carácter impredecible ha obstruido el desarrollo de un modelo animal confiable para esta condición. En principio uno puede simular una pobre función de la placenta disminuyendo el flujo de sangre a través del cordón umbilical, por ejemplo disminuyendo su diámetro con una grapa. El problema con este método es que requiere la cirugía del animal embarazado, lo que puede afectar adversamente tanto al feto como a la madre, y es difícil alcanzar una disminución uniforme del flujo de sangre de esta manera. Por lo tanto han sido desarrollados diferentes modelos. Una pobre función de la placenta se traduce en un suministro disminuido de los ácidos grasos esenciales (EFAs) al feto. En la condición "natural" esto es provocado por una disminución del flujo de sangre, en otras circunstancias a una concentración fisiológica normal en la sangre de la madre saludable. En el presente ejemplo se simuló esta condición disminuyendo la concentración de los ácidos grasos esenciales en la sangre de la madre, pero manteniendo un flujo normal a través de la placenta. Para este propósito fue inducida una fase temprana de deficiencia del ácido graso en ratones embarazados. En esta fase la deficiencia fue expresada en parámetros bioquímicos, pero los defectos funcionales no fueron aparentes. Así se aseguró que mientras el embarazo procedía en la forma normal el suministro de ácidos grasos esenciales al feto era restringido.

En el ensayo 40 ratones hembra, 8-10 semanas de edad, fueron alimentados con una dieta regular de comida para ratón durante 1 semana. Subsiguientemente fueron divididos en 8 grupos experimentales: RD 1 a 4 y EFAD 1 a 4. Los grupos de RD continuaron recibiendo una dieta de comida regular, conteniendo 6.5% de grasa. Los grupos EFAD recibieron una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales. Los números 1 a 4 indican varios suplementos de lípido, de acuerdo a la Tabla 1. El ARA era de DSM, Delft, y el DHA de Pronova (aceite de pescado) como se describió en los Ejemplos previos.

TABLA 1

Cantidades de complementos de lípido como porcentaje de los lípidos de la dieta total. Las dietas contenían entre 3.8% de 5.6% (g/g) lípidos

RD o EFAD	MCT (Triglicéridos cadena Media)	ARA (Aceite de Ácido Araquidónico)	DHA (Aceite de Ácido Docosahexanoico)
1	19	0	0
2	15	4	0
3	4	0	15
4	0	4	15

La composición de ácido graso de las dietas RD (dieta regular) y EFAD (deficiencia en ácidos graso esenciales) así como los complementos en aceite son dados en la Tabla 2.

ES 2 284 286 T3

TABLA 2

Composición de ácido graso de las fracciones de lípidos, expresadas en % g del total de ácidos grasos

5	Ácido graso	Lípido RD	Lípido EFAD	MCT	Aceite ARA	Aceite DHA
10	8:0-12:0			100.00		
	14:0	0.10			1.90	3.60
	16:0	10.00	44.78		16.14	19.50
15	17:0	0.10				
	18:0	4.00	54.73		12.10	5.11
20	20:0	0.30			0.85	0.34
	22:0	0.30			1.48	0.29
	24:0	0.20			1.55	0.18
25	18:3 ω 3	7.50				0.58
	18:4 ω 3					0.96
30	20:4 ω 3					0.39
	20:5 ω 3					6.52
	22:5 ω 3					1.33
35	22:6 ω 3 (DHA)					25.08
	18:2 ω 6	55.00			7.01	1.74
40	18:3 ω 6				3.24	0.20
	20:2 ω 6				0.38	0.30
45	20:3 ω 6				3.85	0.11
	20:4 ω 6 (ARA)				37.64	2.15
	22:4 ω 6					0.41
50	22:5 ω 6					8.32
	16:1 ω 7					6.00
55	18:1 ω 7				0.45	2.77
	18:1 ω 9	22.50	0.50		13.01	12.60
60	20:1 ω 9				0.36	0.96
	22:1 ω 9					0.12
65	20:3 ω 9				0.04	
	24:1 ω 9					0.46

ES 2 284 286 T3

Dos grupos de control adicionales fueron incluidos. Un grupo (RD 0) no recibió ningún complemento de lípido. El segundo grupo recibió la misma dieta que RD 0, pero sirvió como un grupo no preñado (NP). Los animales tuvieron acceso sin restricción a las dietas.

Los grupos experimentales fueron tratados de acuerdo al listado de tiempo mostrado a continuación.

TABLA 3

Listado de tiempo de los tratamientos

Día	Tratamiento
día - 3	Inyección Intraperitoneal de 5 IU Folligonan (FSH) IP (todos los grupos excepto NP). Dieta regular reemplazada por dietas experimentales
día - 1	Inyección Intraperitoneal de 5 IU chorulon (hHCG) IP (todos los grupos excepto NP). Ratones machos introducidos en las jaulas (todos los grupos excepto NP).
día 0	Machos eliminados
día 15	Animales muertos por pinchazo al corazón bajo anestesia de halotano (4-6% en N ₂ O/O ₂)

El tratamiento hormonal con FolligonanTM y ChorulonTM (de Organon, Holanda) indujeron la super-ovulación en las hembras. Este procedimiento, combinado con la corta exposición a los machos, dio una probabilidad razonable de preñez, pero no garantizada. La composición del ácido graso de diferentes tejidos o secciones de los ratones preñados y sus fetos fue determinada por cromatografía gaseosa. El fraccionamiento, homogenización y extracción de los diferentes tejidos fue realizado por métodos conocidos en el arte.

Como promedio, los animales consumieron 3,9 g de las dietas por día, sin diferencias significativas entre los diferentes grupos RD y EFAD. La dosis de ración alimenticia de PUFAs es mostrada en la Tabla 4.

(Tabla pasa a página siguiente)

ES 2 284 286 T3

TABLA 4

Dosis de ración alimenticia de ARA y DHA, expresada como porcentaje de la fracción de lípido y como mg de administración por día

No.	Dieta	ARA		DHA	
		% de lípido	mg/día	% de lípido	mg/día
0	RD	0	0	0	0
1	RD + MCT	0	0	0	0
2	RD + ARA/MCT	1.29	2.7	0	0
3	RD + DHA/MCT	0.30	0.5	3.30	5.1
4	RD + ARA/DHA	1.63	2.5	3.25	5.0
1	EFAD + MCT	0	0	0	0
2	EFAD + ARA/MCT	1.11	2.4	0	0
3	EFAD + DHA/MCT	0.34	0.5	3.73	5.9
4	EFAD + ARA/DHA	1.58	2.3	3.27	4.8

Primero fue chequeado si el EFAD efectivamente indujo a una deficiencia en ácidos grasos bioquímicamente relevante en la sangre de los ratones hembra. Hubo pocas diferencias en los niveles de la sangre de los diferentes ácidos grasos entre ratones preñados y no preñados del mismo grupo de ración alimenticia como se observa en la comparación con RD 0 y NP (información no mostrada). Por lo tanto estos dos grupos fueron comparados, para aumentar el poder estadístico de la comparación, excepto en los casos donde hubo una diferencia significativa entre los animales preñados y no preñados. En aquellos casos, los valores para los individuos preñados fueron usados. Los resultados fueron mostrados en la Tabla 5.

TABLA 5

Niveles de ácidos grasos esenciales (EFAs) en las células rojas de la sangre de ratones hembras

PUFA (proporción)	RD + MCT	EFAD + MCT
18:3 n-3	0.19 ± 0.02	0.05 ± 0.01
20:5 n-3	0.24 ± 0.02	0.09 ± 0.03
22:6 n-3 (DHA)	6.38 ± 0.25	4.53 ± 0.28
18:2 n-6	8.43 ± 0.08	3.00 ± 0.12
20:4 n-6 (ARA)	17.23 ± 0.44	18.87 ± 0.85
Índice suficiencia de EFA: 20:4 n-6/20:3 n-9	63	11
Índice balance de EFA: 22:6 n-3/22:5 n-6	11	4

La EFAD provocó un marcado decrecimiento en el nivel de ácidos grasos esenciales, con la excepción del ácido araquidónico. Sin embargo, a pesar del mantenimiento del nivel de ácido araquidónico, hubo una marcada deficiencia de ácido graso esencial (n-6). Esto es claramente observado en el índice de suficiencia de EFA, la proporción entre el nivel del ácido araquidónico (20:4 n-6) y su ácido mead análogo no-esencial (20:3 n-9). Este último ácido graso se acumula solamente si hay insuficientes ácidos grasos esenciales como sustratos para la biosíntesis normal: en ese caso el ácido oleico ácido graso no-esencial (18:1 n-9) es alargado y desaturado en cambio, conduciendo a la formación de análogos de n-9 de los PUPAs fisiológicos. Es claro a partir de la Tabla 5 que este índice de deficiencia de EFA cayó dramáticamente en los ratones alimentados con EFAD.

El otro índice indica el balance correcto de los ácidos grasos esenciales n-3 y n-6. Este índice de balance de EFA es la proporción entre DHA (22:6 n-3) y el ácido araquidónico (22:4 n-6). Este índice también disminuyó fuertemente en el grupo EFAD.

Así esta información muestra que la dieta con EFAD efectivamente indujo a una clara deficiencia bioquímica de EFA, como era pretendido.

Fue entonces chequeado si la adición de ácido araquidónico y/o DHA a la dieta puede conducir a aliviar esta deficiencia en las células rojas de la sangre de los ratones hembras. Primero la información de control de los ratones (RD) con suficiente ácido graso es presentada en la Tabla 6.

TABLA 6

Efecto de la suplementación con PUFA sobre los ácidos grasos esenciales en las células rojas de la sangre de ratones hembras con suficientes ácidos grasos. La información de los ácidos grasos expresada como porcentaje del grupo RD

	RD	RD + ARA/MCT	RD + DHA/MCT	RD + ARA/DHA
18:3 n-3	100%	93%	74%	82%
22:6 n-3 (DHA)	100%	85%	131%	132%
18:2 n-6	100%	84%	94%	100%
20:4 n-6 (ARA)	100%	107%	79%	93%
20:4 n-6/20:3 n-9	63	59	59	67
22:6 n-3/22:5 n-6	11	9	15	14

Se encontró que la adición de los suplementos con ARA o DHA disminuyó los niveles del otro PUFA. En contraste, el complemento combinado permitió la mejora del estado del PUPA, incluso en ratones con suficientes ácidos grasos. El suplemento usado provocó una ligera disminución del estado de ARA, provocando un aumento del índice de balance de EFA. Esto pudiera ser debido a la proporción seleccionada, con DHA:ARA aproximadamente a 2:1. Sorpresivamente, el índice de suficiencia de EFA fue también mejorado por el suplemento, incluso se piensa que estos ratones aparentemente no eran deficientes en ácidos grasos.

Entonces fue investigado si la suplementación con PUFAs conduce a una mejora en el estado de los ácidos grasos esenciales en las células rojas de la sangre de los animales alimentados con EFAD.

TABLA 7

Efecto de la suplementación con PUFA sobre ácidos grasos esenciales en las células rojas de la sangre de los ratones con deficientes ácidos grasos. La información de los ácidos grasos es expresada como un porcentaje del grupo RD

	EFAD	EFAD + ARA/MCT	EFAD + DHA/MCT	EFAD + ARA/DHA
18:3 n-3	24%	37%	25%	34%
22:6 n-3 (DHA)	71%	70%	174%	171%
18:2 n-6	36%	42%	49%	44%
20:4 n-6 (ARA)	109%	121%	70%	90%
20:4 n-6/20:3 n-9	11	43	43	67
22:6 n-3/22:5 n-6	4	5	16	16

La Tabla 7 muestra que los ratones EFAD respondieron muy fuertemente al complemento PUFA, especialmente en su estado DHA. Mientras que no hay indicaciones que la suplementación con ARA disminuya el estado de DHA, lo contrario es claramente cierto: la adición del complemento de DHA provocó una clara disminución del estado de ARA. Es también claro que la adición de PUFAs específicamente restableció los niveles de PUFA, siendo los niveles de los ácidos grasos C-18 mucho menos afectados. De manera interesante, el complemento combinado fue solamente uno que provocó la completa restauración del índice de suficiencia de EFA.

Finalmente fue investigado si el mejoramiento del estado de PUFA en la sangre de la madre podría conducir a un estado mejorado del feto. Con este fin se seleccionó la cabeza de los fetos como el sector más relevante: el crecimiento del cerebro (y otro tejido neural) es cuantitativamente el proceso más importante que depende del suministro de PUFAS.

La información para los fetos de las madres alimentadas con RD es mostrada en la Tabla 8.

TABLA 8

Efecto de la suplementación con PUFA a las madres con suficiente EFA sobre los ácidos grasos esenciales en las cabezas de fetos de ratones. La información de los ácidos grasos en el grupo RD es expresada como por ciento en mol. La información de los ácidos grasos en el grupo experimental es expresada como porcentaje del grupo RD

	RD	RD + ARA/MCT	RD + DHA/MCT	RD + ARA/DHA
22:6 n-3 (DHA)	5.89	101%	135%	125%
20:4 n-6 (ARA)	11.87	103%	93%	102%
20:4 n-6/20:3 n-9	27	30	28	40
22:6 n-3/22:5 n-6	8	6	18	13

La información muestra que los suplementos provocaron modestos cambios en las concentraciones de PUFAs en las cabezas de los fetos de los ratones alimentados con RD. Sorprendentemente, hubo una marcada mejora en el índice de suficiencia de EFA para el complemento combinado, de manera contraria a los complementos separados. En adición, los complementos que contienen DHA provocaron un aumento significativo en el índice de balance de EFA.

TABLA 9

Efecto de la suplementación con PUFA a las madres con deficiente EFA sobre los ácidos grasos esenciales en las cabezas de los fetos de ratones. La información de los ácidos grasos expresada como porcentaje del grupo RD. El grupo EFAD + ARA/MCT no contiene hembras preñadas

	EFAD	EFAD + ARA/MCT	EFAD + DHA/MCT	EFAD + ARA/DHA
22:6 n-3 (DHA)	61%	-	160%	146%
20:4 n-6 (ARA)	98%	-	76%	83%
20:4 n-6/20:3 n-9	9	-	14	17
20:6 n-3/22:5 n-6	2	-	33	24

La deficiencia de ácidos grasos de los fetos fue incluso más severa que aquella de las madres. Los complementos con PUFA condujeron a una marcada mejora del índice de suficiencia de EFA, al menos restablecido al nivel de RD. Esto fue probablemente debido a la relativamente baja dosificación de ácido araquidónico en el complemento, ya que el índice de balance de EFA es incluso mayor que en los fetos de las madres alimentadas con RD. Esto implica que los PUFAs son eficientemente incorporados en la cabeza de los fetos. Efectivamente la inclusión del ácido araquidónico en el suplemento aumenta su concentración, aunque no hasta el nivel de RD. Esto enfatiza la necesidad de balancear la suplementación. El balance apropiado puede entonces ser estimado experimentalmente.

ES 2 284 286 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. El uso de ARA como un complemento nutricional y dietético para una mujer lactante, donde el ARA es ingerido desde 150 a 700 mg/día.
2. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 para aumentar el nivel de ARA en la leche de pecho de la mujer.
3. El uso de acuerdo a la reivindicación 1 o 2 donde el ARA es ingerido desde 250 a 500 mg/día.
- 10 4. El uso de acuerdo a cualquier reivindicación precedente el cual incluye adicionalmente DHA.
5. El uso de acuerdo a la reivindicación 4 donde el ARA y DHA están en una formulación comestible en una proporción de ARA:DHA que aumenta el nivel de ARA en la sangre.
- 15 6. El uso de acuerdo a la reivindicación 4 o 5 donde la proporción ARA:DHA es desde 1:5 a 5:1.
7. El uso de acuerdo a la reivindicación 6 donde la proporción ARA:DHA es desde 1:1 a 1:2.

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65