(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 324 526**

(51) Int. Cl.:
A61K 9/107 (2006.01)
A61K 31/23 (2006.01)
A61K 31/232 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Número de solicitud europea: **02748862 .6**
(96) Fecha de presentación : **20.07.2002**
(97) Número de publicación de la solicitud: **1408931**
(97) Fecha de publicación de la solicitud: **21.04.2004**

(54) Título: **Emulsiones isotónicas de lípidos.**

(30) Prioridad: **25.07.2001 EP 01117991**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
10.08.2009

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
10.08.2009

(73) Titular/es: **Target Hit S.A.**
avenue J. Wybran, 40
1070 Bruxelles, BE

(72) Inventor/es: **Carpentier, Yvon y**
Dupont, Isabelle

(74) Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

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).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. Pº de la Castellana, 75 – 28071 Madrid

DESCRIPCIÓN

Emulsiones isotónicas de lípidos.

La presente invención se refiere a una composición y método para modificar rápidamente la composición de ácidos grasos de membranas celulares en órganos y tejidos, en particular para aumentar la cantidad de ácidos grasos omega-3 en membranas celulares de órganos y tejidos por medio de la administración parenteral en el cuerpo de un ser humano o un animal de una reserva apropiada de ácidos grasos en forma de una emulsión isotónica de lípidos que comprende triglicéridos de ácidos grasos seleccionados.

Las emulsiones de lípidos se conocen como un componente esencial de la nutrición parenteral y actualmente se están considerando para otros usos. Las emulsiones de lípidos para nutrición parenteral sirven para suministrar grasas al cuerpo en una forma de dosificación aceptable por vía intravenosa en casos en los que es imposible la nutrición normal (oral), está comprometida o está contraindicada médicamente o cuando es necesario modificar inmediatamente el patrón de ácidos grasos de las células. Las emulsiones de lípidos disponibles actualmente se preparan a partir de aceites vegetales (por ejemplo, aceite de cártamo o de soja). En algunos casos, también contienen triglicéridos de cadena media (MCT, por sus siglas en inglés) y/o aceites de origen marino (aceites de pescado).

Los triglicéridos de cadena larga de origen vegetal o marino sirven como fuente de energía y, cuando contienen ácidos grasos poliinsaturados ("PUFA", por sus siglas en inglés), como proveedores de ácidos grasos esenciales. La clasificación de estos ácidos grasos poliinsaturados en las series omega-6 (ω-6; algunas veces denominado en la técnica PUFA "n-6") u omega-3 (ω-3, algunas veces denominado PUFA "n-3") se basa en características estructurales químicas, de manera más exacta en la distancia del primer enlace insaturado desde el extremo metilo (extremo omega) de la molécula de ácido graso. En la presente descripción, por ejemplo, preferiblemente se ha usado "omega-3".

Los aceites vegetales, por ejemplo, de soja y cártamo, se caracterizan por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-6 (predominantemente ácido linoleico, 18:2 omega-6), mientras que su contenido de ácidos grasos omega-3 (casi exclusivamente en forma de ácido α-linolénico, 18:3 omega-3) es bajo.

Los aceites de pescado ("FO", por sus siglas en inglés) obtenidos a partir de peces de agua fría se caracterizan por un alto contenido de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-3 (predominantemente ácido cis-5,8,11,14,17-eicosapentaenoico, "EPA", 20:5 omega-3, ácido docosapentaenoico, "DPA", 22:5 omega-3 y ácido cis 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico, "DHA", 22:6 omega-3), mientras que su contenido de ácidos grasos omega-6 es bajo.

Los triglicéridos de cadena media ("MCT") administrados con las emulsiones de lípidos sirven principalmente como fuente de energía. Los triglicéridos de cadena media contienen ácidos grasos saturados y, por lo tanto, no contienen ácidos grasos esenciales omega-6 ni omega-3. Debido a su rápida hidrólisis así como a otras propiedades (mejor unión de las partículas a las células), los MCT pueden tener influencias interesantes sobre el metabolismo de las partículas en emulsión.

El cuerpo humano es incapaz por sí mismo de producir los ácidos grasos de cadena larga poliinsaturados vitales de las series omega-6 u omega-3, es decir, tienen que administrarse por vía oral, entérica o parenteral. El cuerpo sólo puede sintetizar ácidos grasos insaturados de cadena más larga a partir de ácidos grasos insaturados de cadena más corta. Las dos series compiten por el mismo sistema enzimático de elongación-desaturación. Sin embargo, es imposible la formación de ácidos grasos omega-6 a partir de precursores de la serie omega-3 o viceversa.

Para que los ácidos grasos libres exógenos estén disponibles para el cuerpo, tienen que liberarse hidrolíticamente de los triglicéridos infundidos por medio de la enzima lipoproteína lipasa (LPL) o absorberse junto con partículas en emulsión o sus restos directamente al interior de las células. Esta etapa inicial de hidrólisis de lípidos se ha considerado durante mucho tiempo la etapa determinante de la velocidad del metabolismo de los lípidos. Estas limitaciones se deben a la actividad relativamente limitada de la lipoproteína lipasa en la escisión de triglicéridos. De esta manera, la máxima velocidad de metabolización para emulsiones de aceite vegetal es de aproximadamente 3,8 g de lípido/kg de peso corporal al día (Hallberg *et al*., Acta Physiol. Scand. (1965) Vol. 65, Suppl. 254, páginas 2-23).

Durante la infusión de triglicéridos, es deseable conseguir concentraciones de triglicéridos en suero que se mantengan en un nivel tan bajo como sea posible, por ejemplo, correspondiente a una baja carga del sistema retículo-endotelial (RES) por lípidos exógenos.

Típicamente, las condiciones postoperatorias y postraumáticas, así como los episodios sépticos graves se caracterizan por una estimulación sustancial del sistema inmune. La respuesta inmune implica la liberación de citoquinas (por ejemplo, factor de necrosis tumoral e interleuquinas) que, a altos niveles, pueden producir lesiones tisulares graves. Además, las altas concentraciones de citoquinas también afectan negativamente a la hidrólisis de triglicéridos circulantes por LPL.

En estas situaciones clínicas, tiene una importancia particular el uso de triglicéridos exógenos que se hidrolizan y se eliminan rápidamente (para evitar aumentos excesivos de la concentración plasmática de triglicéridos) y que suministran ácidos grasos (por ejemplo, ácidos grasos omega-3) capaces de reducir la producción de citoquinas

así como la toxicidad de las citoquinas sobre los tejidos. Este efecto se obtiene cuando se escinden ácidos grasos de las moléculas de triglicéridos y se incorporan (en forma libre o como componentes de fosfolípidos) en membranas celulares, influyendo en la estructura (y la función) de la membrana y sirviendo como mensajeros secundarios y precursores de eicosanoides. De esta manera, es deseable que este proceso tenga lugar tan rápido como sea posible.

Los triglicéridos típicos de los aceites de pescado se hidrolizan mucho más lentamente que los triglicéridos de los aceites vegetales (por ejemplo, aceite de soja), que a su vez se hidrolizan más lentamente que los triglicéridos de cadena media. La adición de una emulsión de aceite de pescado a una emulsión de triglicéridos de cadena larga incluso puede inhibir la hidrólisis de triglicéridos de cadena larga (por ejemplo, procedentes de aceite de soja) por LPL.

La publicación de la solicitud de patente europea EP-A-0311091 describe una emulsión de lípidos que comprende triglicéridos de cadena media y una alta cantidad de aceite de pescado para nutrición parenteral.

La publicación de la solicitud de patente internacional WO-A-90/08544 describe emulsiones grasas que comprenden, como fuente de ácidos grasos omega-3, aceite de pescado y de un 0 a un 90%, con respecto al contenido total de lípidos, de triglicéridos de cadena media, y su aplicación intraperitoneal para el tratamiento de la afección séptica de la cavidad abdominal.

La publicación de la solicitud de patente internacional WO-A-97/19683 describe emulsiones de lípidos que comprenden triglicéridos de cadena media, aceites vegetales y aceites de pescado para nutrición parenteral. El documento WO-A-97/19683 también describe la utilidad de dichas emulsiones de lípidos para el tratamiento postoperatorio, postraumático, de sepsis, de enfermedades inflamatorias o debilitantes, de un mayor riesgo de trombosis vascular y de arritmia cardiaca grave.

La publicación de la solicitud de patente europea EP-A-0687418 proporciona una emulsión de lípidos para limitar la respuesta perjudicial en pacientes que padecen traumatismo, quemaduras y/o sepsis, pudiendo administrarse dicha emulsión de lípidos por vía entérica o parenteral.

Simoens, C. *et al* en Clinical Nutrition (1995), 14, 177-185 describe los efectos de la composición de ácidos grasos en diversos tejidos de cuatro emulsiones diferentes de lípidos que contienen aceites vegetales. Sato, M. *et al* en Journal of Parenteral and Enteral Nutrition (1994), 18, 112-118, describe la hidrólisis de emulsiones mixtas de lípidos que contienen triglicéridos de cadena media y triglicéridos de cadena larga con lipoproteína lipasa en un medio parecido al plasma.

La publicación de la solicitud de patente alemana DE-A-3721137 describe la utilidad de una emulsión de lípidos que comprende aceite de pescado solo o aceite de pescado en combinación con aceite vegetal y opcionalmente triglicéridos de cadena media, para la nutrición parenteral y la reducción del crecimiento de tumores.

La publicación de la solicitud de patente alemana DE-A-3409793 describe una emulsión de lípidos para infusión que comprende ácidos grasos que contienen de 20 a 22 átomos de carbono, ésteres de los mismos, o una mezcla de 2 o más de dichos ácidos grasos o ésteres, así como un aceite vegetal, un emulsionante y agua. Los ácidos grasos son ácidos grasos de ésteres de origen marino (aceites de pescado), en particular ácidos grasos omega-3. Dichos aceites vegetales son aceite de soja y/o aceite de cártamo purificados.

Se compararon la eliminación del plasma y la dirección a tejidos concretos de diferentes emulsiones de lípidos intravenosas (aceite de pescado; MCT/aceite vegetal/aceite de pescado; aceite vegetal y MCT/aceite vegetal) en un modelo de ratón por Treskova, E. *et al* en Journal of Parenteral and Enteral Nutrition (2000), 23, 253-257. Billman, G. E., *et al* en Circulation (1999), 99, 2454-2457 demuestra de forma convincente que los ácidos grasos omega-3 administrados por vía intravenosa en forma de su ácido graso libre puro pueden prevenir arritmias ventriculares inducidas por isquemia en perros.

Por lo anterior, puede deducirse que los papeles principales bien reconocidos de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 son:

(i) reducir las reacciones inflamatorias y trombóticas,

(ii) reducir la reactividad celular a diferentes estímulos (como ejemplo, reducir arritmias cardiacas, particularmente durante un infarto de miocardio o isquemia, y reducir la caquexia en respuesta a mediadores tales como TNFα, en condiciones de cáncer e inflamación),

(iii) mejorar la microperfusión de tejidos (por ejemplo, durante un shock o después de isquemia-reperfusión),

(iv) mejorar el estado antioxidante intracelular (a pesar de la sensibilidad bien conocida de los PUFA a la peroxidación, que puede controlarse por cantidades adecuadas de antioxidantes liposolubles), y

(v) limitar la acumulación de grasa intracelular.

Además, los PUFA omega-3 son esenciales para la maduración del sistema nervioso central (SNC) y la retina en el feto y en recién nacidos prematuros. Sin embargo, la velocidad de enriquecimiento en ácidos grasos omega-3 después del suplemento oral varía sustancialmente entre diferentes tejidos y es particularmente baja en algunas regiones del cerebro y en la retina.

Aunque los ácidos grasos omega-3 desempeñan funciones esenciales en todos estos diferentes niveles, la evolución de la ingesta de alimentos en el género humano se caracteriza por una importante reducción en el consumo de ácidos grasos omega-3 y una elevación de la ingesta de ácidos grasos omega-6, especialmente en poblaciones occidentales.

Además, se han confirmado los efectos beneficiosos del suplemento con ácidos grasos omega-3 en varias situaciones clínicas con una fuerte correlación con la concentración de ácidos grasos omega-3 en fosfolípidos de la membrana celular.

Un objeto de la presente invención ha sido proporcionar un método y composición que permita una captación/enriquecimiento muy rápido y eficaz de ácidos grasos omega-3 en membranas celulares de órganos y tejidos. Una captación eficaz de ácidos grasos omega-3 en membranas celulares de órganos y tejidos significa que sólo se oxida una fracción (o ninguno) de los ácidos grasos omega-3 administrados o sus precursores y que la mayor parte de ellos (o todos) se incorporan en órganos y tejidos y particularmente en las membranas celulares. El enriquecimiento de la membrana celular y sus fosfolípidos con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga omega-3, bajo ciertas circunstancias, es necesario para restaurar (al menos parcialmente) un equilibrio adecuado entre los ácidos grasos omega-3 y omega-6. Conseguir estos efectos no sólo es esencial en pacientes en situaciones agudas, sino en todos los pacientes con una mayor necesidad de ácidos grasos omega-3 en fosfolípidos de la membrana celular y cuando la vía intravenosa ofrece ventajas, tal como en el caso de bebés prematuros y pacientes con enfermedades caquécticas (debilitantes) y los que no pueden absorber grandes cantidades de ácidos grasos omega-3.

Una primera opción sería la infusión de PUFA omega-3 puro. Sin embargo, como los ácidos grasos no unidos tienen un alto grado de citotoxicidad, la única forma posible de infundir PUFA omega-3 puros es unirlos a albúmina (como están en el plasma). La velocidad de infusión debe ser muy lenta para evitar elevaciones acusadas de la concentración plasmática. La presencia de albúmina aumentaría el tamaño del compartimento del plasma y también aumenta notablemente los costes.

Una segunda opción sería la infusión de una emulsión de aceite de pescado puro. Sin embargo, las partículas de emulsión de aceite de pescado puro tienen una velocidad de eliminación muy lenta y la incorporación de ácido graso omega-3 en los fosfolípidos de la membrana celular obtenida con emulsiones de aceite de pescado puro es bastante ineficaz cuando se considera su alto contenido de PUFA omega-3. Esto puede explicarse por el hecho de que una proporción sustancial se metaboliza en otras rutas tales como la oxidación.

Una tercera opción sería la infusión de MLF 541, una emulsión de lípidos que se conoce por la publicación de la solicitud de patente internacional WO-A-97/19683. Dicha emulsión de lípidos comprende 50% de MCT ("M"), aceite vegetal ("L") y 10% de aceite de pescado ("F"), con respecto a la cantidad total de lípidos. Sin embargo, se ha descubierto que esta emulsión mantiene el equilibrio entre ácidos grasos omega-3 y omega-6 en fosfolípidos de la membrana, pero no induce un enriquecimiento específico de ácidos grasos omega-3.

Como es evidente por lo anterior, la presente invención se dirige a la administración parenteral pero no se refiere a un suministro equilibrado de ácidos grasos para los fines de soporte nutricional/nutrición.

Éste y otros objetos de la invención se han solucionado por medio de una emulsión isotónica de lípidos que comprende triglicéridos de cadena media (MCT) y aceite de pescado. Las emulsiones de la invención no contienen aceites vegetales.

En particular, la presente invención se refiere a una emulsión isotónica de lípidos que puede inyectarse por vía intravenosa que comprende

(i) de 78 a 95% en peso de triglicéridos de cadena media (MCT) y

(ii) de 5 a 22% en peso de aceite de pescado, donde el aceite de pescado tiene un contenido de ácido eicosapentaenoico de 20 a 40%, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del aceite de pescado,

con respecto a la cantidad total de lípidos en la emulsión, con la condición de que la emulsión no contenga aceites vegetales.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de una emulsión isotónica de lípidos que se puede inyectar por vía intravenosa, que comprende:

(i) de 78 a 95% en peso de triglicéridos de cadena media (MCT) y

(ii) de 5 a 22% en peso de aceite de pescado, donde el aceite de pescado tiene un contenido de ácido eicosapentaenoico de 20 a 40%, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del aceite de pescado,

con respecto a la cantidad total de lípidos en la emulsión, para la fabricación de un medicamento para aumentar el contenido de ácidos grasos omega-3 de las membranas celulares de órganos y tejidos clave, con la condición de que la emulsión no contenga aceites vegetales. La emulsión isotónica de lípidos puede usarse para el tratamiento de revascularización quirúrgica o percutánea, isquemia o infarto de miocardio, angina inestable, isquemia cerebral transitoria o ictus, inflamación, enfermedades autoinmunes y trombóticas, trasplante de órganos, procedimientos angiográficos, hemodiálisis, bebés prematuros, reacciones de fase aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, isquemia intestinal, complicaciones cardiovasculares de la diabetes mellitus, quemaduras graves, caquexia grave, enfermedad de Raynaud y deficiencia de ácidos grasos omega-3 en las membranas celulares.

En un tercer aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende una emulsión isotónica de lípidos que se puede inyectar por vía intravenosa, que comprende

(i) de 78 a 95% en peso de triglicéridos de cadena media (MCT), y

(ii) de 5 a 22% en peso de aceite de pescado, donde el aceite de pescado tiene un contenido de ácido eicosapentaenoico de 20 a 40%, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del aceite de pescado,

con respecto a la cantidad total de lípidos en la emulsión, con la condición de que la emulsión no contenga aceites vegetales.

Se ha descubierto que, sorprendentemente, el contenido de ácidos grasos omega-3 de las membranas celulares de ciertos órganos y tejidos clave puede aumentarse significativamente por medio de la administración de la emulsión de lípidos de la presente invención. En comparación con una emulsión similar que comprende aceite de pescado como única fuente de triglicéridos o una combinación de aceite de pescado, aceite vegetal y triglicéridos de cadena media, la emulsión de lípidos anterior de la presente invención es mucho más eficaz aunque se emplea menos aceite de pescado en comparación con la emulsión de aceite de pescado puro y aunque la emulsión carece de aceite vegetal. Además, se ha descubierto que la relación entre MCT y aceite de pescado tiene un impacto significativo sobre los efectos conseguidos.

De acuerdo con la invención, los triglicéridos de cadena media contienen ácidos grasos que tienen de 6 a 14 átomos de carbono. Preferiblemente, al menos 90% en peso de los MCT son triglicéridos de ácido caprílico (C_8) y ácido cáprico (C_{10}). La fracción de triglicéridos de cadena media en la emulsión de lípidos de la invención preferiblemente es de 70% a 90%, más preferiblemente de 78% a 85% en peso, con respecto al contenido total de lípidos de la emulsión de lípidos.

Se sabe que los aceites de pescado contienen ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5 omega-3) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6 omega-3) incorporados en triglicéridos que, al denominarse ácidos grasos omega-3 muy insaturados, son bloques de construcción esenciales que tienen que suministrarse al cuerpo y que son biológicamente importantes, por ejemplo, como precursores de eicosanoides y como elementos estructurales de lípidos de la membrana. A estos ácidos se les atribuyen además acciones antitrombóticas y reductoras de lípidos. Como su aislamiento a partir de productos naturales y su síntesis química son caros, los aceites de pescado, al ser relativamente baratos, son los proveedores elegidos para estos ácidos grasos esenciales. Como se usa en la invención, la expresión “aceites de pescado” pretende comprender aceites de pescado naturales, aceites de pescado procesados, concentrados de aceite de pescado muy purificado o aceites de pescado (re-) esterificados (sintéticos). En la publicación de la solicitud de patente europea EP-A-0298293 se describen aceites de pescado procesados.

Los aceites de pescado ilustrativos adecuados son aceites que se obtienen a partir de peces de agua fría en una escala técnicamente significativa. Los peces de agua fría típicos se seleccionan entre salmón, sardina, caballa, arenque, boquerón, eperlano y pez espada. De forma similar, se entiende que la expresión aceite de pescado comprende aceites que se pueden obtener sintéticamente por (re-) esterificación de ácidos grasos omega-3 obtenidos a partir de aceite de pescado de los peces de agua fría anteriores por hidrólisis de los triglicéridos y posterior purificación y concentración de los ácidos grasos omega-3 resultantes con glicerol. Los aceites de pescado generalmente contienen glicéridos de ácidos grasos que tienen longitudes de cadena de 12 a 22 átomos de carbono. Se prefieren particularmente concentrados de aceite de pescado muy purificados que se obtienen, por ejemplo, a partir de aceites de sardina, salmón, arenque y/o caballa. Tienen un contenido de ácido eicosapentaenoico de 20 a 40%, preferiblemente de al menos 25% con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del concentrado de aceite de pescado, como se determina por cromatografía de gases (porcentaje en área). Además, tienen un contenido de ácido docosahexaenoico de 10 a 20%, preferiblemente de al menos 12%, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del concentrado de aceite de pescado, como se determina por cromatografía de gases (porcentaje en área). En el caso de los aceites de pescado que se pueden obtener por síntesis por medio de la re-esterificación de los ácidos grasos omega-3, la concentración total de ácido eicosapentaenoico y docosahexaenoico puede elevarse al menos a 45%, con respecto a la cantidad total de triglicéridos. La Patente de Estados Unidos 6.159.523 describe un método para obtener concentrados de aceite de pescado. En general, la cantidad de ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-6 (por ejemplo, ácido

linoleico, 18:2 omega-6) en los aceites de pescado naturales es baja y generalmente menor de 10%, preferiblemente menor de 5%.

Se prefiere particularmente usar un aceite de pescado rico en EPA cuando se desea influir en procesos inflamatorios. En pacientes pediátricos, se prefiere particularmente un aceite de pescado rico en DHA en el caso de deficiencia de ácidos grasos omega-3 para influir en el crecimiento y maduración del sistema nervioso central.

Preferiblemente el contenido de aceite de pescado en la emulsión de acuerdo con la invención es de 5% a 30%, más preferiblemente de 15% a 22% en peso, con respecto al contenido total de lípidos de la emulsión de lípidos.

El contenido total de lípidos (MCT + aceite de pescado) de la emulsión de lípidos es de 5% a 30%, preferiblemente de 10% a 25% en peso, con respecto al peso total de la emulsión acuosa de lípidos.

A lo largo de toda la descripción, la indicación de "% en peso" junto con la concentración de lípidos en la emulsión puede usarse indistintamente con "g de lípido por 100 ml de emulsión".

Además de agua destilada, la emulsión isotónica de lípidos puede contener agentes auxiliares convencionales y/o aditivos, tales como emulsionantes, coadyuvantes de emulsión (co-emulsionantes), estabilizantes, antioxidantes y aditivos de isotonicidad.

Como emulsionantes se usan emulsionantes (tensioactivos) fisiológicamente aceptables tales como fosfolípidos de origen animal o vegetal. Se prefieren particularmente lecitinas purificadas, especialmente lecitina de soja, lecitina de huevo o fracciones de la misma, o los fosfátidos correspondientes. El contenido de emulsionante puede variar de 0,02 a 2,5% en peso, preferiblemente de 0,6% a 1,5% y más preferiblemente es de 1,2% en peso, con respecto a la emulsión total.

Además, como coadyuvantes de emulsión (co-emulsionantes) pueden usarse sales de metales alcalinos de ácidos grasos C_{16} a C_{20} de cadena larga. Se prefieren especialmente sus sales de sodio. Los co-emulsionantes se emplean en concentraciones de 0,005% a 0,1%, preferiblemente de 0,02% a 0,04% en peso, con respecto a la emulsión total. Además puede emplearse colesterol, un éster de colesterol solo o en combinación con otros co-emulsionantes, en una concentración de 0,005% a 0,11%, preferiblemente de 0,02% a 0,04% en peso, con respeto a la emulsión.

La emulsión de lípidos de acuerdo con la invención puede contener una cantidad eficaz de un antioxidante, tal como vitamina E, en particular α-tocoferol (que es el isómero más activo de la vitamina E en el ser humano) así como β- y γ-tocoferol y/o palmitato de ascorbilo como antioxidantes y, de esta manera, para la protección de la formación de peróxido. La cantidad total de dicho antioxidante puede ser de hasta 5000 mg. En una realización preferida, la cantidad total de dicho antioxidante puede variar de 10 mg a 2000 mg, más preferiblemente de 25 mg a 1000 mg, y aún más preferiblemente de 100 a 500 mg, con respecto a 100 g de lípido.

Para la estabilización e isotonización, la emulsión de acuerdo con la invención puede contener de 2% a 5% en peso, con respecto a la emulsión, de un aditivo de estabilización o de isotonización, por ejemplo, un alcohol polihidroxílico. Se prefieren el glicerol, sorbitol, xilitol o glucosa, siendo particularmente preferido el glicerol. La emulsión isotónica de lípidos se suministra al sujeto en una cantidad farmacéuticamente eficaz necesaria para el tratamiento respectivo. La administración puede ser continua o en forma de una o varias dosis al día. Por cantidad farmacéuticamente eficaz se entiende de 0,1 a 1,0 g de TG (triglicérido) por un kg de peso corporal al día, preferiblemente de 0,2 g a 0,5 g de TG por un kg de peso corporal al día, y más preferiblemente de 0,25 g a 0,33 g de TG por un kg de peso corporal al día.

Los tejidos clave se seleccionan entre endotelio, glóbulos blancos, plaquetas y células inmunes. Los órganos se seleccionan entre corazón, cerebro, riñón, pulmón, hígado y grasa.

La emulsión isotónica de lípidos y el método de la presente invención pueden usarse para el tratamiento de pacientes con una deficiencia global de ácidos grasos omega-3 o una deficiencia relativa en las membranas celulares de ciertos órganos y tejidos. En particular, la emulsión y el método de la presente invención tienen un gran valor para el tratamiento de revascularización quirúrgica o percutánea, tal como en arterias coronarias u otras arterias "periféricas", isquemia o infarto de miocardio, angina inestable, isquemia cerebral transitoria o ictus, inflamación, enfermedades autoinmunes y trombóticas, tales como enfermedades venosos o arteriales, trasplante de órganos (infusión tanto en donantes como en receptores), procedimientos angiográficos, hemodiálisis, bebés prematuros, reacciones de fase aguda, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, isquemia intestinal, complicaciones cardiovasculares de la diabetes mellitus, quemaduras graves, caquexia grave, enfermedad de Raynaud y deficiencia de ácidos grasos omega-3 en membranas celulares.

Las emulsiones isotónicas de lípidos de la invención pueden utilizarse para la fabricación de medicamentos/composiciones farmacéuticas para el tratamiento de las enfermedades mencionadas anteriormente.

Las emulsiones de lípidos de acuerdo con la invención son invariablemente emulsiones de aceite en agua (o/w) en las que la fase continua externa consiste en agua destilada purificada para fines parenterales. Dicha emulsión de aceite en agua (o/w) se obtiene mezclando el MCT y el aceite de pescado seguido de emulsión y esterilización. El

valor de pH de la emulsión de lípidos se ajusta a un valor fisiológicamente aceptable, preferiblemente a un valor de pH de 6,0 a 9,0, más preferiblemente de 6,5 a 8,5. Como es evidente por el método de preparación descrito, la emulsión de la invención es una emulsión de una mezcla de los triglicéridos. Los agentes auxiliares y aditivos pueden añadirse a la mezcla de MCT/aceite de pescado antes del proceso de emulsión o pueden añadirse a la emulsión antes de la esterilización.

Las emulsiones isotónicas de lípidos de acuerdo con la invención pueden prepararse por procedimientos convencionales conocidos con inertización. La estrategia habitual es primero mezclar los lípidos, el emulsionante y otros agentes auxiliares y aditivos y después rellenar con agua con dispersión. El agua puede contener opcionalmente otros componentes solubles en agua (por ejemplo, glicerol). La emulsión obtenida de esta manera también contiene partículas de lípidos que tienen un diámetro de 10 μm. El tamaño medio de las gotas de la emulsión después tiene que reducirse adicionalmente por medio de una homogeneización adicional, por ejemplo, usando un homogeneizador de alta presión. Para la aplicación parenteral, se prefieren tamaños medios de gotas de lípido menores de 1,0 μm, en particular menores de 0,8 μm y, más preferiblemente, menores de 0,5 μm. Preferiblemente, las emulsiones de lípidos de la invención se puede inyectar por vía intravenosa. De esta manera, la presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende la emulsión isotónica de lípidos como se ha descrito anteriormente, preferiblemente por inyección en el cuerpo de un ser humano o un animal.

Las emulsiones de lípidos de acuerdo con la invención pueden usarse para administración parenteral en pacientes con una perfusión de tejidos u órganos reducida o un mayor riesgo de arritmia cardiaca grave (por ejemplo, fibrilación ventricular) o trombosis vascular o arritmia cardiaca grave o respuestas inflamatorias exageradas, síndrome de insuficiencia respiratoria aguda, o durante la diálisis en pacientes tratados con hemodiálisis o para elevar inmediatamente el contenido de ácidos grasos omega-3 en el cerebro y la retina de bebés prematuros. La invención puede usarse en pacientes en situaciones preoperatorias antes de un procedimiento de revascularización o en condiciones postoperatorias o con enfermedades inflamatorias; además, en la respuesta metabólica grave o persistente postagresión después de operaciones, tales como operaciones abdominales o trasplantes de órganos, y traumatismo múltiple, enfermedades inflamatorias, quemaduras, infecciones, sepsis inminente o manifiesta, o enfermedades debilitantes.

La invención se ilustrará adicionalmente por medio de los siguientes ejemplos, pero no debe considerarse limitada a estos ejemplos.

Ejemplos

La siguiente Tabla muestra la composición de ácidos grasos (% aproximado) de diversos aceites usados en las emulsiones de lípidos de los siguientes ejemplos:

(Tabla pasa a página siguiente)

TABLA

Ácido graso	Aceite MCT[1)]	Aceite de soja[2)]	Aceite de cártamo[3)]	Aceite de pescado[4)]
6:0	< 2	--	--	--
8:0	64	--	--	--
10:0	34	--	--	--
12:0	< 3	--	--	< 1
14:0	< 1	--	--	5
16:0	--	11	7	10
16:1	--	--	--	7
16:2	--	--	--	1
16:3	--	--	--	1
16:4	--	--	--	3
18:0	--	4	3	1
18:1	--	22	14	10
18:2 omega-6	--	55	75	2
18:3 omega-3	--	8	< 1	1
18:4 omega-3	--	--	--	4
20:0	--	< 1	< 1	--
20:1	--	< 1	< 1	2
20:4 omega-6	--	--	--	2
20:5 omega-3	--	--	--	28
22:1	--	--	--	1
22:4	--	--	--	< 1
22:5	--	--	--	3
22:6 omega-3	--	--	--	13
Σ omega-6	--	55	75	4
Σ omega-3	--	8	< 1	46
relación entre omega-6 y omega-3	--	7:1	≥ 75:1	1:12

1) triglicéridos de cadena media, por ejemplo, Captex 355, producto comercial de Karlshamns.

2) aceite de soja, por ejemplo, "Sojaöl", producto comercial de Croda.

3) aceite de cártamo, por ejemplo, "Safloröl", producto comercial de Gustav Heess.

4) aceite de pescado muy purificado, por ejemplo, Sanomega S28GA, producto comercial de Nippon Oil and Fats.

Las emulsiones de lípidos de los ejemplos que comprenden MCT, aceite de pescado y emulsionante (aproximadamente 1,2 g por 100 ml de fosfolípidos fraccionados de emulsión procedentes de yema de huevo de gallina) y opcionalmente el aceite vegetal se obtienen usando métodos industriales convencionales para la producción de emulsiones terapéuticas en agua por dispersión de los ingredientes por medio de un Ultra-Turrax y relleno con el componente

acuoso con agitación. El valor de pH se ajusta a un pH 8,0 a 9,0 usando una solución acuosa de hidróxido sódico y/u oleato sódico. La posterior homogeneización se realiza en un homogeneizador de alta presión a 400 kg/cm^2. Después de distribuir en frascos de vidrio de la calidad apropiada, se realiza una esterilización térmica por métodos conocidos. Las emulsiones ensayadas tenían un contenido total de lípidos de 20 g por 100 ml de emulsión, con respecto a la emulsión total, correspondiente a aproximadamente 20% en peso. El tamaño medio de partículas de las partículas de la emulsión es de aproximadamente 300 nm y puede variar ±20%. Todas las emulsiones tienen aproximadamente el mismo diámetro de partículas de emulsión. Las emulsiones de MLF 541, de aceite de pescado al 100% y de MCT/aceite de pescado 5:5 no están de acuerdo con la invención y sólo se proporcionan con fines comparativos.

Materiales y métodos

Antes de la adición al cultivo celular, las preparaciones de lípidos se incubaron en plasma durante 45 min a 25ºC, a una concentración final de 250 mg de TG/dl (TG = triglicéridos) y las partículas ricas en triglicéridos de la emulsión (TGRP) se separaron por ultracentrifugación a corto plazo (30 min; 20.000 g). Además, se incubaron HUVEC (células de endotelio de vena umbilical humana) con lipoproteína lipasa bovina (8 μg/ml en DMEM) durante 30 min a temperatura ambiente y después se lavaron (una vez con DMEM que contenía BSA al 3% (Gibco) y dos veces con DMEM).

Después se añadieron TGRP al medio de cultivo celular (que contenía BSA al 3%) a una concentración final de 500 μg de TG/ml (50 mg/dl). Las incubaciones se realizaron a 37ºC durante 4 horas. Las células endoteliales se lavaron una vez con DMEM que contenía BSA al 0,02% y dos veces con DMEM antes de separarse por medio de una solución de tripsina-EDTA.

El patrón de ácidos grasos se determinó por cromatografía gas-líquido en componentes lipídicos (TG, CE [= ésteres de colesterilo], PL) previamente separados por cromatografía de capa fina (Lepage G. y Roy C.C., J. Lipid Res. (1986), 27: 114-120).

Resultados

Experimentos preliminares

En una primera serie de experimentos, se ensayó la reproducibilidad del modelo *in vitro* de los presentes solicitantes con respecto al crecimiento de células endoteliales en cultivo. De hecho, es esencial desarrollar condiciones que garanticen una monocapa muy estable y confluente (y evitar un exceso de confluencia) en las placas antes de las incubaciones y ensayar las variaciones de la composición de ácidos grasos durante el crecimiento de las células endoteliales. Esta serie de experimentos ha demostrado que las HUVEC tienen que cultivarse en medio que contiene suero al 10% durante 5 días para alcanzar la confluencia y que el crecimiento después puede inhibirse por un cultivo de 2 días en medio deficiente en suero, que garantiza una composición estable de ácidos grasos.

Se diseñó una segunda serie de experimentos para optimizar el tiempo de incubación para alcanzar una incorporación significativa de PUFA omega-3. Estos experimentos han demostrado que, considerando una concentración de triglicéridos de 50 mg/dl (que es menor que la elevación media de los triglicéridos plasmáticos durante la infusión de lípidos) en el medio, la incubación durante 4 h conduce a cambios sustanciales y casi máximos en los fosfolípidos de las células endoteliales. De hecho, las incubaciones durante 20 h no mostraron modificaciones adicionales importantes en comparación con las de 4 h, pero condujeron a un aumento del contenido de triglicéridos intracelulares e indujeron parcialmente la muerte celular.

Después de una incubación de 4 h con TGRP, se retiró el medio que contenía lípidos y se reemplazó por medio sin grasa. Después, las células se cultivaron durante 2 h o 20 h más para evaluar la estabilidad del patrón de ácidos grasos en las células endoteliales. El contenido total de ácidos grasos omega-3 en los fosfolípidos celulares se mantuvo invariable después de 2 h y 20 h. Sin embargo, se encontraron ligeros cambios de la distribución de PUFA omega-3 después de 20 h, que consistían principalmente en un aumento del contenido de DPA (ácido docosapentaenoico) (a expensas del EPA). Estas modificaciones pueden deberse a las rutas de alargamiento y de desaturación que tienen lugar en los fosfolípidos de la membrana celular.

Influencia de los triglicéridos de la emulsión sobre la incorporación de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en fosfolípidos celulares

Se cultivaron células como se ha descrito anteriormente y después se incubaron durante 4 h en ausencia (células de control) o en presencia de los dos TGRP experimentales, particularmente MCT/aceite de pescado 8:2 y MCT/aceite de pescado 5:5 por comparación con MLF 541 (de acuerdo con la publicación de la solicitud de patente internacional WO-A-97/19683, Lipoplus®, B. Braun Melsungen AG, Alemania) y una emulsión de aceite de pescado puro (FO 100%).

TABLA 1

Composición de ácidos grasos de fosfolípidos de células endoteliales después de 4 h de incubación con TGRP (valores medios ± SD, n = 4)

Patrón de ácidos grasos (% en peso)	EPA (C20:5 ω-3)	Δ	DPA (C22:5 ω-3)	Δ	DHA (C22:6 ω-3)	Δ
Células de control	0,65±0,06		3,84±0,29		2,54±0,28	
MLF 541	2,09±0,15	1,44	4,35±0,15	0,51	2,85±0,16	0,31
FO 100%	5,39±0,29	4,74	4,73±0,31	0,89	3,44±0,21	0,90
MCT/FO 8:2	4,55±0,31	3,90	5,35±0,33	1,51	3,45±0,23	0,91
MCT/FO 5:5	5,83±0,04	5,18	5,50±0,35	1,66	3,55±0,22	1,01

(FO = aceite de pescado)

La elevación de EPA en fosfolípidos celulares inducida por la incubación con MCT/aceite de pescado 8:2 representa respectivamente 75 y 82% del aumento observado con MCT/aceite de pescado 5:5 y aceite de pescado puro. MCT/aceite de pescado 8:2 fue al menos tan eficaz como las demás preparaciones para inducir un incremento de DPA (ácido docosapentaenoico, C22:5 omega-3) y DHA.

TABLA 2

Aumento de PUFA omega-3 en fosfolípidos de células endoteliales (Δ) con respecto al contenido de ácidos grasos omega-3 en preparaciones de lípidos (expresado como % en peso de enriquecimiento de ácidos grasos/proporción de aceite de pescado)

Emulsión de lípidos	EPA (C20:5 ω-3)	DPA (C22:5 ω-3)	DHA (C22:6 ω-3)
MLF 541	14,4	5,1	3,1
FO 100%	4,7	0,9	0,9
MCT/FO 8:2	19,5	7,6	4,5
MCT/FO 5:5	10,4	3,3	2,02

Teniendo en cuenta el contenido respectivo de aceite de pescado en las diferentes preparaciones ensayadas, el MCT/aceite de pescado 8:2 parecía inducir una incorporación más eficaz de EPA, DPA y DHA en los fosfolípidos celulares en comparación con todas las demás preparaciones.

MLF 541 también mostró una eficacia destacable en el enriquecimiento de las células endoteliales con ácidos grasos omega-3 mientras que el aceite de pescado puro y en una menor medida MCT/aceite de pescado 5:5 mostraron una eficacia relativamente baja por comparación con su contenido de aceite de pescado mayor.

TABLA 3

Relación de ácidos grasos omega-3/omega-6 en fosfolípidos de membrana de células endoteliales después del tratamiento con MLF 541, MCT/aceite de pescado 8:2 o aceite de pescado puro (en % en peso)

Emulsión de lípidos	Ácidos grasos Σ ω-3	Ácidos grasos Σ ω-6	Relación ω-3 / ω-6
Ninguna/Células de control	6,8	11,6	0,581
MLF 541	9,4	18,5	0,506
FO 100%	13,8	12,0	1,149
MCT/FO 8:2	13,3	12,3	1,083

Con respecto a la relación de ácidos grasos omega-3/omega-6 en los fosfolípidos celulares, el MCT/aceite de pescado 8:2 y FO 100% inducen un aumento de dos veces en el equilibrio, mientras que MLF 541 afecta tanto al contenido de ácidos grasos omega-3 como al contenido de ácidos grasos omega-6 y, por lo tanto, no modifica sustancialmente la relación.

La descripción anterior se ha dirigido a realizaciones particulares de la invención de acuerdo con los requisitos de los Estatutos de Patentes para los fines de ilustración y explicación. Se pretende que las siguientes reivindicaciones se interpreten para incluir todas estas modificaciones y cambios.

REIVINDICACIONES

1. Una emulsión isotónica de lípidos que se puede inyectar por vía intravenosa, que comprende

(i) de 78 a 95% en peso de triglicéridos de cadena media (MCT), y

(ii) de 5 a 22% en peso de aceite de pescado, donde el aceite de pescado tiene un contenido de ácido eicosapentaenoico de 20 a 40%, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del aceite de pescado,

con respecto a la cantidad total de lípidos en la emulsión, con la condición de que la emulsión no contenga aceites vegetales.

2. La emulsión isotónica de lípidos de la reivindicación 1, donde los ácidos grasos de triglicéridos de cadena media contienen entre 6 y 14 átomos de carbono.

3. La emulsión isotónica de lípidos de la reivindicación 2, donde los triglicéridos de cadena media contienen al menos 90% de triglicéridos de ácido caprílico (C_8) y ácido cáprico (C_{10}).

4. La emulsión isotónica de lípidos de la reivindicación 1, donde el aceite de pescado se selecciona entre aceite de sardina, salmón, arenque, caballa y/u otros peces de agua fría o aceites de pescado que se pueden obtener por síntesis por medio de la reesterificación de glicerol con ácidos grasos omega-3 obtenidos por hidrólisis de aceites de peces de agua fría.

5. La emulsión isotónica de lípidos de la reivindicación 1, donde los triglicéridos de dicho aceite de pescado contienen al menos 25% de ácido eicosapentaenoico, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del concentrado de aceite de pescado.

6. La emulsión isotónica de lípidos de la reivindicación 1, donde los triglicéridos de dicho aceite de pescado contienen al menos 12% de ácido docosahexaenoico, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del concentrado de aceite de pescado.

7. La emulsión isotónica de lípidos de la reivindicación 1, donde el contenido total de lípidos es de 5 a 30% en peso, con respeto a la cantidad total de la emulsión de lípidos.

8. La emulsión isotónica de lípidos de la reivindicación 1, que comprende además al menos un agente auxiliar o aditivo seleccionado del grupo consistente en emulsionantes, coadyuvantes de emulsión, estabilizantes, antioxidantes y aditivos de isotonicidad.

9. La emulsión isotónica de lípidos de la reivindicación 1, donde la relación de pesos entre triglicéridos de cadena media (MCT) y aceite de pescado es 8:2.

10. Uso de una emulsión isotónica de lípidos que se puede inyectar por vía intravenosa, que comprende

(i) de 78 a 95% en peso de triglicéridos de cadena media (MCT), y

(ii) de 5 a 22% en peso de aceite de pescado, donde el aceite de pescado tiene un contenido de ácido eicosapentaenoico de 20 a 40%, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del aceite de pescado,

con respecto a la cantidad total de lípidos en la emulsión, para la fabricación de un medicamento para aumentar el contenido de ácidos grasos omega-3 de las membranas celulares de órganos y tejidos clave, con la condición de que la emulsión no contenga aceites vegetales.

11. El uso de la reivindicación 10, donde los ácidos grasos de triglicéridos de cadena media contienen entre 6 y 14 átomos de carbono.

12. El uso de la reivindicación 10, donde los triglicéridos de cadena media contienen al menos 90% de triglicéridos de ácido caprílico (C_8) y ácido cáprico (C_{10}).

13. El uso de la reivindicación 10, donde el aceite de pescado se selecciona entre aceite de sardina, salmón, arenque, caballa y/u otros peces de agua fría o aceites de pescado que se pueden obtener por síntesis por medio de la reesterificación de glicerol con ácidos grasos omega-3 obtenidos por hidrólisis de aceites de peces de agua fría.

14. El uso de la reivindicación 10, donde los triglicéridos de dicho aceite de pescado contienen al menos 25% de ácido eicosapentaenoico, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del concentrado de aceite de pescado.

15. El uso de la reivindicación 10, donde los triglicéridos de dicho aceite de pescado contienen al menos 12% de ácido docosahexaenoico, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del concentrado de aceite de pescado.

16. El uso de la reivindicación 10, donde el contenido total de lípidos es de 5 a 30% en peso, con respecto a la cantidad total de la emulsión de lípidos.

17. El uso de la reivindicación 10, que comprende además al menos un agente auxiliar o aditivo seleccionado entre el grupo consistente en emulsionantes, coadyuvantes de emulsión (co-emulsionantes), estabilizantes, antioxidantes y aditivos de isotonicidad.

18. El uso de la reivindicación 10, donde los órganos se seleccionan entre el grupo consistente en corazón, riñón, cerebro, hígado, pulmón y tejido graso.

19. El uso de la reivindicación 10, donde los tejidos se seleccionan entre el grupo consistente en endotelio, glóbulos blancos, plaquetas y células inmunes.

20. Una composición farmacéutica que comprende una emulsión isotónica de lípidos que se puede inyectar por vía intravenosa, que comprende

(i) de 78 a 95% en peso de triglicéridos de cadena media (MCT), y

(ii) de 5 a 22% en peso de aceite de pescado, donde el aceite de pescado tiene un contenido de ácido eicosapentaenoico de 20 a 40%, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del aceite de pescado,

con respecto a la cantidad total de lípidos en la emulsión, con la condición de que la emulsión no contenga aceites vegetales.

21. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde los ácidos grasos de triglicéridos de cadena media contienen entre 6 y14 átomos de carbono.

22. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde los triglicéridos de cadena media contienen al menos 90% de triglicéridos de ácido caprílico (C_8) y ácido cáprico (C_{10}).

23. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde el aceite de pescado se selecciona entre sardina, salmón, arenque, caballa y/u otros aceites de peces de agua fría o aceites de pescado que se pueden obtener por síntesis por medio de la reesterificación de glicerol con ácidos grasos omega-3 obtenidos por hidrólisis de aceites de peces de agua fría.

24. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde los triglicéridos de dicho aceite de pescado contienen al menos 25% de ácido eicosapentaenoico, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del concentrado de aceite de pescado.

25. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde los triglicéridos de dicho aceite de pescado contienen al menos 12% de ácido docosahexaenoico, con respecto a los ésteres metílicos de ácidos grasos del concentrado de aceite de pescado.

26. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde el contenido total de lípidos es de 5 a 30% en peso con respecto a la cantidad total de la emulsión de lípidos.

27. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, que comprende además al menos un agente auxiliar o aditivo seleccionando del grupo consistente en emulsionantes, coadyuvantes de emulsión (co-emulsionantes), estabilizantes, antioxidantes y aditivos de isotonicidad.

28. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, donde la relación de pesos entre triglicéridos de cadena media (MCT) y aceite de pescado es 8:2.

29. La composición farmacéutica de la reivindicación 20, para administración en aplicación parenteral.

30. La composición farmacéutica de la reivindicación 29 para inyección.