

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 898 527**

51 Int. Cl.:

A61K 36/53 (2006.01)

A61K 47/44 (2007.01)

A61P 37/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.04.2017 PCT/ES2017/070263**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.11.2017 WO17187000**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.04.2017 E 17788870 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.06.2021 EP 3453399**

54 Título: **Formulaciones que comprenden sistemas lipídicos que portan compuestos bioactivos, para su uso como agentes adyuvantes o potenciadores de la inmunoterapia para pacientes con cáncer o trastornos inmunitarios**

30 Prioridad:

29.04.2016 ES 201630560

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2022

73 Titular/es:

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID (33.3%)
Ciudad Universitaria de Cantoblanco C/ Einstein
3
28049 Madrid, ES;
IMDEA ALIMENTACION (33.3%) y
HOSPITAL UNIVERSITARIO INFANTA SOFÍA
(33.3%)**

72 Inventor/es:

**TORRES OLIVARES, CARLOS;
VÁZQUEZ DE FRUTOS, LUIS;
CORZO, MARTA;
ARRANZ, PABLO;
RAMÍREZ DE MOLINA, ANA;
REGLERO RADA, GUILLERMO;
GÓMEZ DE CEDRÓN, MARTA;
LORIA KOHEN, VIVIANA;
CASADO SÁENZ, ENRIQUE;
MORENO RUBIO, JUAN y
LAPARRA LLOPIS, MOISÉS**

74 Agente/Representante:

BERTRÁN VALLS, Silvia

ES 2 898 527 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones que comprenden sistemas lipídicos que portan compuestos bioactivos, para su uso como agentes adyuvantes o potenciadores de la inmunoterapia para pacientes con cáncer o trastornos inmunitarios

Campo de la técnica

La presente invención se refiere a los sectores de la alimentación, la nutrición y la salud. Más específicamente, la presente invención se refiere al sub-campo de los alimentos de uso específico para la salud tales como alimentos funcionales y complementos nutricionales.

Estado de la técnica

En la última década han sido muchos los recursos públicos y privados dedicados en España y Europa al desarrollo de alimentos funcionales, con potencial anticancerígeno entre otros, a partir de fuentes naturales. Sin embargo, en la mayoría de los casos, no se ha alcanzado la efectividad esperada, siendo su uso clínico muy limitado. Frecuentemente los nuevos ingredientes bioactivos que se incorporan a los alimentos funcionales mostraron efectos prometedores en ensayos *in vitro* pero no ofrecen la misma eficacia *in vivo* en estudios clínicos. Esto suele deberse a la baja solubilidad en agua de estos compuestos, lo que limita la solubilización luminal y la disolución de dichos compuestos tras su ingesta y conduce a una baja estabilidad durante la digestión gástrica, pudiendo promover su precipitación y degradación. Todo ello hace que estos nuevos ingredientes bioactivos tengan una baja bioaccesibilidad (cantidad de producto que es soluble en el tracto intestinal y, por tanto, disponible para la absorción) a nivel gastrointestinal (GTI) y baja biodisponibilidad (capacidad del producto para ser absorbido por las células intestinales y pasar al torrente sanguíneo para su uso por células y órganos). La solicitud de patente publicada WO2010138902 divulga una composición terapéutica que comprende un extracto supercrítico de romero en combinación con lípidos insaturados específicos, es decir, aceite de origen marino, usado para tratar trastornos de proliferación celular.

Esto demuestra claramente la importancia de profundizar en el desarrollo de nuevas estrategias de formulación que tengan como objetivo mejorar estos dos aspectos con el fin de obtener formulaciones bioactivas que son eficaces *in vivo*.

Breve descripción de la invención

Los inventores de la presente invención resuelven el problema técnico mencionado anteriormente proporcionando un sistema lipídico que no sólo mejora la estabilidad durante la digestión y la biodisponibilidad oral de forma segura y eficaz de diversos compuestos bioactivos sino que también en muchos casos potencia los efectos de dichos compuestos.

En concreto el sistema lipídico de la presente invención es un sistema autoemulsionable que forma microemulsiones durante la digestión junto con las sales biliares y fosfolípidos, formando micelas mixtas que estabilizan los componentes bioactivos durante la digestión, evitando su precipitación o interacción con inhibidores de la absorción y aumentando, así, su bioaccesibilidad, biodisponibilidad y, consecuentemente, su bioactividad.

Además, este sistema permite la lipofilización de las moléculas con escasa solubilidad en agua, facilitando su aplicación como ingredientes en distintos alimentos.

Es más, el sistema lipídico de la presente invención comprende una proporción de éteres de glicerol adecuada para dar lugar a alquilglicerol libres o no esterificados (AKG) capaces de aumentar la bioactividad del compuesto suministrado, incluso de forma sinérgica, pero sin afectar significativamente a la digestibilidad del mismo. En este sentido, los inventores han demostrado la actividad antiproliferativa *in vitro* de dicho sistema lipídico sobre células humanas de cáncer de colon, debido a su elevado contenido en alquilglicerol (AKG) bioactivos, observándose un efecto sinérgico entre la actividad antiproliferativa del vehículo lipídico bioactivo y la del compuesto suministrado.

Adicionalmente, los autores de la presente invención proporcionan formulaciones o composiciones que comprenden sistemas lipídicos que portan compuestos bioactivos para su uso como agentes adyuvantes o potenciadores de la inmunoterapia con cáncer o de trastornos inmunitarios.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra el perfil cromatográfico obtenido usando LC-ELSD de la mezcla de glicéridos y alquilglicerol obtenida mediante un procedimiento de glicerolisis bajo condiciones de reacción que dan lugar a un contenido en MAG superior al 25% (p/p). 1 = DAGE; 2 = 2-MAGE + 1,3-DAG; 3 = 1,2-DAG; 4 = MAG

La figura 2 muestra la composición de la mezcla lipídica de los productos finales de la digestión del RLO original (A), RLO+MO (B), y PG (C) determinada por LC-ELSD.

La figura 3 muestra la distribución del total de los productos lipídicos presentes en los productos finales de digestión del RLO original (A), RLO + MO (B) y PG (C) entre la fase oleosa (FO), la fase micelar (FM) y la fase de precipitado (FP).

- 5 La figura 4 muestra la composición lipídica de las diferentes fases (FO, FM y FP) obtenidas tras centrifugación de los productos finales de la digestión del RLO original (A), RLO + MO (B) y PG (C).

La figura 5 muestra el análisis de componentes principales (PCA) considerando las variaciones relativas de los valores medios en biomarcadores de la función inmunitaria. Ambos componentes muestran diferencias en contribución con valores propios: PCA1, 1,21 y PCA2, 0,79. donde los parámetros con mayor relevancia en la segregación de la respuesta diferencial entre grupo tratado y control son: IL4 (que disminuye con la intervención con ESR-RLO), IL10 e IFNg (que aumentan con la intervención con ESR-RLO)

La figura 6 muestra el análisis comparativo de poblaciones leucocitarias en individuos sanos tras el periodo de intervención con el ESR (n=7). Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon para poblaciones CD56+CD4- y CD4+CD3+. La tendencia resultante en las variables analizadas muestra una polarización del sistema inmunitario innato hacia unas condiciones antiinflamatorias que son favorables para un desarrollo y maduración potenciales adecuados de células efectoras (monocitos y linfocitos citolíticos naturales) y la ausencia de expansión de T CD4+CD3+ (Th) que, junto al perfil de citocinas observado, sugiere una mayor maduración funcional.

La figura 7 muestra un panel de genes analizados en relación con la inflamación, inmunomodulación, estrés oxidativo, metabolismo de lípidos y dianas moleculares del romero en cáncer colorrectal.

La figura 8 muestra la validación *in vitro* de los genes regulados por la intervención en el estudio clínico en la línea tumoral DLD1 de cáncer de colon.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

En la presente invención por "bioaccesibilidad" se entiende la cantidad de producto que es soluble en el tracto intestinal y, por tanto, disponible para la absorción.

En la presente invención por "biodisponibilidad" se entiende la capacidad del producto para ser absorbido por las células intestinales y pasar al torrente sanguíneo para su uso por células y órganos.

En la presente invención el término "ESR suministrado" se refiere al extracto supercrítico de romero que se combina con o se incorporado en alguno de los sistemas lipídicos de la invención.

En la presente invención el término "fórmula o formulación" se refiere a la combinación de un sistema lipídico de la invención con un compuesto bioactivo, ya sea un ingrediente alimenticio o un fármaco.

En la presente invención el término "ESR no suministrado digerido" hace referencia al extracto supercrítico de romero sin combinar con o incorporar a ninguno de los sistemas lipídicos de la invención, y se somete a la digestión gastrointestinal *in vitro* antes del estudio de su bioaccesibilidad y actividad antiproliferativa.

En la presente invención el término "ERS no suministrado no digerido" se refiere al extracto supercrítico de romero que no se combina con o se incorpora a ninguno de los sistemas lipídicos de la invención y no se somete a digestión gastrointestinal *in vitro* antes de estudiar su actividad antiproliferativa.

En la presente invención el término "triglicérido (TAG)" se refiere a una molécula de fórmula general $\text{CH}_2\text{OR}_1\text{-CHOR}_2\text{-CH}_2\text{OR}_3$ en la que R_1 , R_2 y R_3 representan independientemente entre sí un grupo acilo $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ saturado o insaturado, lineal o ramificado, con o sin dobles enlaces conjugado o no conjugado.

En la presente invención el término "diacilglicerol (DAG)" se refiere a una molécula de fórmula general $\text{CH}_2\text{OR}_1\text{-CHOR}_2\text{-CH}_2\text{OR}_3$ en la que R_1 , R_2 y R_3 representan independientemente entre sí un hidrógeno o un grupo acilo $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ saturado o insaturado, lineal o ramificado, con o sin dobles enlaces conjugado o no conjugado, en la que al menos uno de entre R_1 , R_2 o R_3 representa un hidrógeno.

En la presente invención el término "monoacilglicerol (MAG)" se refiere a una molécula de fórmula general $\text{CH}_2\text{OR}_1\text{-CHOR}_2\text{-CH}_2\text{OR}_3$ en la que uno de R_1 , R_2 o R_3 representa un grupo acilo $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ saturado o insaturado, lineal o ramificado, con o sin dobles enlaces conjugado o no conjugado, y los otros dos de R_1 , R_2 o R_3 un hidrógeno.

En la presente invención el término "éter de diacilglicerol (DAGE)" se refiere a una molécula de fórmula general $\text{CH}_2\text{OR}_1\text{-CHOR}_2\text{-CH}_2\text{OR}_3$ en la que R_1 , R_2 y R_3 representan independientemente entre sí un grupo alquilo $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ saturado o insaturado, lineal o ramificado, con o sin dobles enlaces; o un grupo acilo $\text{C}_1\text{-C}_{24}$ saturado o insaturado,

lineal o ramificado, con o sin dobles enlaces conjugado o no conjugado, en la que al menos uno de R₁ o R₃ representa un grupo alquilo.

5 En la presente invención el término “éter de monoacilglicerol (MAGE)” se refiere a una molécula de fórmula general CH₂OR₁-CHOR₂-CH₂OR₃ en la que R₁, R₂ y R₃ representan independientemente entre sí un hidrógeno; un grupo alquilo C₁-C₂₄ saturado o insaturado, lineal o ramificado, con o sin dobles enlaces; o un grupo acilo C₁-C₂₄ saturado o insaturado, lineal o ramificado, con o sin dobles enlaces conjugado o no conjugado, en la que al menos uno de R₁ o R₃ representa un grupo alquilo y otro de R₁, R₂ o R₃ es un hidrógeno.

10 En la presente invención el término “alquilglicerol libre o no esterificado (AKG)” se refiere a una molécula de fórmula general CH₂OR₁-CHOR₂-CH₂OR₃ en la que uno de R₁ o R₃ representa un grupo alquilo C₁-C₂₄ saturado o insaturado, lineal o ramificado, con o sin dobles enlaces conjugado o no conjugado, y los otros dos de R₁, R₂ o R₃ un hidrógeno.

15 En la presente invención el término “glicerina” se refiere a una molécula de fórmula general CH₂OR₁-CHOR₂-CH₂OR₃ en la que R₁, R₂ y R₃ representan independientemente entre sí un hidrógeno.

Descripción

20 La bioactividad de una sustancia administrada por vía oral está determinada por su bioaccesibilidad a nivel gastrointestinal tras su ingesta (medida como la cantidad de producto que es soluble en el intestino y disponible para la absorción), así como por su biodisponibilidad (capacidad para ser absorbido por las células intestinales). Este aspecto es importante hasta el punto de que compuestos específicos que han mostrado efectos prometedores en ensayos *in vitro*, presentan falta de cualquier efecto bioactivo en estudios clínicos debido normalmente a su baja solubilidad en el medio acuoso del estómago, lo que limita, su bioaccesibilidad a nivel intestinal y su biodisponibilidad.

25 En este sentido, uno de los problemas que resuelve la presente invención es la utilización de un sistema lipídico bioactivo como vehículo de ingredientes alimenticios de uso para la salud con el fin de obtener formulaciones altamente bioaccesibles y bioactivas.

30 Este sistema lipídico consiste en el producto de un procedimiento de glicerolisis química o glicerolisis enzimática escalable a planta piloto basado en aceite de hígado de tiburón quimera (*Ratfish Liver Oil*, RLO). Atendiendo a la caracterización realizada por LC-ELSD, este producto (denominado a partir de ahora producto de glicerolisis, PG) está compuesto, entre otros componentes, por diferentes proporciones de monoacilglicerol (MAG), diacilglicerol (DAG), éteres de diacilglicerol (DAGE) y éteres de monoacilglicerol (MAGE). Estos compuestos presentan una mayor polaridad y mejores propiedades emulsionantes que el triglicérido (TAG) y éter de diacilglicerol (DAGE) de partida, de modo que la composición de la mezcla final va a determinar la capacidad del PG para actuar eficientemente como lípido portador, siendo particularmente importante el contenido en MAG. La capacidad de suministro del PG se comparó, tal y como se describe en detalle en los ejemplos de la presente invención, con la capacidad de suministro de otros dos sistemas lipídicos de obtención más sencilla, consistentes en RLO original y RLO con monooleína (MO) de calidad alimentaria, como agente emulsionante, en una razón molar 1:1 (denominada a partir de ahora RLO+MO). A diferencia del PG, estos sistemas están constituidos mayoritariamente por DAG (80%, p/p) y TAG (20%, p/p), y por DAG (57%, p/p), TAG (15%, p/p) y MO (28%, p/p), respectivamente.

45 El material de partida elegido para la obtención de los sistemas lipídicos de la invención fue el aceite de hígado de tiburón quimera (*Hydrolagus colliei*), debido a su contenido excepcionalmente alto en alquilglicerol (AKG), que tienen diversos efectos beneficiosos para la salud en humanos, destacando la potente actividad antiproliferativa del mismo.

50 Tal y como se ilustra a lo largo de la presente invención, los sistemas lipídicos de la invención constituyen una alternativa muy interesante a los aceites vegetales comúnmente empleados como lípidos portadores. Este interés se debe principalmente a su elevado contenido en AKG bioactivos, ya que puede alcanzarse una actividad sinérgica entre el lípido portador y el compuesto bioactivo suministrado. Además, también constituyen una nueva alternativa, ya que no existen estudios previos sobre el uso de este tipo de sistemas lipídicos autoemulsionables ricos en AKG como lípidos portadores bioactivos.

55 Debido a su naturaleza lipófila, los sistemas lipídicos de la invención pueden actuar como vehículos de fármacos o ingredientes alimenticios bioactivos, especialmente de aquellos con una solubilidad en agua limitada. Entre los ingredientes alimenticios, los extractos naturales derivados de plantas de las familias *Lamiaceae* y *Asteraceae* destacan por sus prometedoras propiedades anticancerígenas. En la presente invención, un extracto supercrítico de romero (*Rosmarinus officinalis* de la familia *Lamiaceae*) (ESR), con actividad anticancerígena y ampliamente caracterizado en estudios anteriores, se ha combinado en diferentes proporciones con el PG (formulación denominada a partir de ahora PG+ESR) y el sistema RLO+MO (formulación denominada a partir de ahora RLO+MO+ESR) mediante homogenización a altas presiones (3 pases a 500 bares) con el único objetivo de ilustrar la presente invención, ya que, tal como se ha indicado, los sistemas lipídicos de la invención pueden usarse como vehículo de diferentes fármacos y compuestos bioactivos.

65 Una vez que se ha obtenido el producto de la glicerolisis (PG) indicado anteriormente éste fue debidamente

caracterizado, tal y como se describe en los ejemplos, proporcionando la siguiente composición cualitativa y cuantitativa:

- aproximadamente un 30% (p/p) de monoglicéridos;
- aproximadamente un 1% (p/p) de triglicéridos;
- aproximadamente un 20% de éteres de diacilglicerol (DAGE);
- aproximadamente un 2% de glicerina; y
- aproximadamente un 47% de una mezcla de diacilglicerol y éter de monoacilglicerol (MAGE).

Dicha composición se utilizó para llevar a cabo los experimentos que se describen en los ejemplos y que tienen como objetivo comprobar la idoneidad de este sistema lipídico como vehículo de sustancias bioactivas y el impacto en su bioaccesibilidad y biodisponibilidad. De acuerdo con los resultados obtenidos del estudio de digestibilidad, ésta es particularmente abundante en el producto final de digestión de PG, en el que casi un 98,5% (p/p) de la fracción lipídica se encuentra en forma de micelas mixtas o vesículas, indicando que prácticamente todos los productos liberados de la hidrólisis del sistema lipídico PG son potencialmente bioaccesibles. Por el contrario, los sistemas RLO+MO (RLO + monooleína) y, particularmente, el RLO original (véanse los ejemplos) son significativamente menos bioaccesibles que el sistema lipídico arriba indicado anteriormente (de aquí en adelante PG), ya que sólo aproximadamente el 75 y el 54% (p/p), respectivamente, de la fracción lipídica se encuentra en FM, mientras que aproximadamente el 22 y el 41% (p/p), respectivamente, forma parte de la fase oleosa, fundamentalmente constituida por DAGE y MAGE no digeridos. Cabe destacar que en el PG digerido, el MAGE se encuentra mayoritariamente en forma micelar y, por tanto, bioaccesible. Asimismo, es también importante resaltar el elevado porcentaje de AKG libre (aproximadamente el 7,5%, p/p) en la FM del PG digerido en comparación con el de la FM del sistema RLO+MO (aproximadamente el 1%, p/p) y RLO original (aproximadamente el 0,7%, p/p) (figura 4). Ambos, el MAGE y, especialmente, el AKG libre, son potencialmente más bioactivos que el DAGE, de acuerdo con diversos estudios llevados a cabo previamente con cultivos de células de cáncer de colon.

En base a los resultados de digestibilidad y bioaccesibilidad, se decidió descartar el RLO original como vehículo potencialmente eficaz de sustancias bioactivas, tales como el ESR (extracto supercrítico de romero). Esta es la razón por la que en la presente invención sólo se obtienen formulaciones de ESR con los sistemas lipídicos PG (PG+ESR) y RLO + MO (RLO+MO+ESR). La incorporación de un 4% (p/p) y un 9% (p/p) de ESR no afecta significativamente a la bioaccesibilidad de la fracción lipídica, observándose una distribución de fases (FO, FM y FP) y una composición lipídica de cada una de dichas fases similar a la de los sistemas PG y RLO+MO sin ESR (figura 4).

En base a esto, los resultados que se han obtenido indican que el suministro de un 9% de ESR con el sistema RLO+MO y, particularmente, el sistema PG, aumenta eficientemente la estabilidad del ESR durante la digestión y, consecuentemente, su bioaccesibilidad a nivel intestinal y su efecto antiproliferativo.

Además, en el caso de la formulación PG+9% de ESR, el contenido en principios bioactivos (AKG y ESR) de la FM a la concentración necesaria para alcanzar la CI50 (AKG_t 50,23 µM y 3,14 µg/ml de ESR) es menor que para el PG (AKG_t 124,54 µM) y el ESR no digerido y no suministrado (CI50 ~ 40 µg/ml) por separado, indicando un efecto sinérgico entre el vehículo lipídico y el ESR suministrado.

Por tanto, el sistema lipídico de la invención presenta una composición cualitativa y cuantitativa determinada que es especialmente útil para suministrar formulaciones bioactivas y mejorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de dichas formulaciones *in vivo*.

Por tanto, un primer aspecto de la invención se refiere a una composición o sistema lipídico que comprende:

- a. entre un 25% y un 35% (p/p) de sustancias emulsionantes tales como monoglicéridos y/o alquilglicerol libres;
- b. entre un 10% y un 25% (p/p) de éteres de diacilglicerol (DAGE); y
- c. entre un 40% y un 60% (p/p) de éteres de monoacilglicerol (MAGE) y/o diacilglicerol (DAG), donde la proporción de MAGE con respecto a la cantidad total de MAGE y DAG presentes en el sistema lipídico es de al menos el 50% (p/p), más preferiblemente de al menos el 60, 70, 80, 85, 90 o 95%.

Con respecto a la composición descrita en detalle anteriormente, es importante destacar que por debajo de un 25% de monoglicéridos o de un componente con capacidad emulsionante tal como lo es el alquilglicerol libre o no esterificado (AKG), el sistema de la invención pierde su capacidad autoemulsionante lo que afectaría gravemente a la bioaccesibilidad y digestibilidad del sistema. Por tanto, el primer componente (monoglicéridos) puede reemplazarse o suplementarse con cualquier otro agente emulsionante tal y como monoglicéridos y/o AKG siempre que la suma de

los componentes emulsionantes se mantenga en una proporción entre un 25 y un 35% (p/p) del peso total del producto final.

Además, el porcentaje establecido de DAGE en el sistema lipídico de la invención debe ser siempre igual o menor a un 25% (p/p) dado que los inventores de la presente invención han comprobado que cantidades por encima de este porcentaje afectarán negativamente a la accesibilidad y digestibilidad del producto. Por otro lado, los DAGE no deben estar presentes en cantidades menores de un 10% dado que estos componentes protegen el principio activo suministrado en la primera parte de la digestión.

Por último, la mezcla de diacilglicerol y éteres de monoacilglicerol (MAGE) de la composición debe estar en una proporción 50:50 o en una proporción > 50% de MAGE con respecto a la suma de MAGE y diglicéridos. Los MAGE son esenciales para la síntesis, accesibilidad y biodisponibilidad de los AKG en una proporción suficiente para aumentar (de forma potencialmente sinérgica) la acción del principio activo (por ejemplo extractos naturales ricos en: compuestos fenólicos, flavonoides, terpenoides, saponinas, esteroides, polifenoles, etc., o fármacos o sustancias bioactivos o cuyo log P* sea superior a 2, donde log P* es el logaritmo de la razón entre las concentraciones del soluto no ionizado en los disolventes octanol y agua y se determina de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\log P_{\text{octanol/agua}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{agua no ionizado}}} \right)$$

Por otro lado, los diglicéridos deben preferiblemente estar presentes en el sistema lipídico de la invención dado que estos ayudan en la digestibilidad de los posibles triglicéridos presentes en la composición.

En una realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición o sistema lipídico comprende:

- a. entre un 25% y un 35% (p/p) de monoglicéridos y/o alquilglicerol libres;
- b. entre un 10% y un 25% (p/p) de éteres de diacilglicerol (DAGE);
- c. entre un 0 y un 5% (p/p) de triglicéridos;
- d. entre un 0 y un 3% de glicerina; y
- e. entre un 40% y un 60% (p/p) de éteres de monoacilglicerol (MAGE) y/o diacilglicerol (DAG), donde la proporción de MAGE con respecto a la cantidad total de MAGE y DAG presentes en el sistema lipídico es de al menos el 50% (p/p).

En otra realización preferida del primer aspecto de la invención, la composición o sistema lipídico comprende:

- a. entre un 28% y un 32% (p/p) de monoglicéridos y/o alquilglicerol libres;
- b. entre un 18% y un 22% (p/p) de éteres de diacilglicerol (DAGE);
- c. entre un 0 y un 2% (p/p) de triglicéridos;
- d. entre un 1% y un 3% de glicerina; y
- e. entre un 40% y un 50% (p/p) de éteres de monoacilglicerol (MAGE) y/o diacilglicerol (DAG), donde la proporción de MAGE con respecto a la cantidad total de MAGE y DAG presentes en el sistema lipídico es de al menos el 50% (p/p).

Un segundo aspecto de la invención se refiere a un procedimiento de obtención de una composición o sistema lipídico que comprende:

- a. añadir aceite de hígado de tiburón quimera (RLO, "Ratfish Liver Oil"), preferiblemente el aceite con las características cualitativas y cuantitativas descritas en la tabla 1, a un recipiente;
- b. regular la temperatura del producto de la etapa a), preferiblemente a 40°C con agitación continua (200 rpm);
- c. añadir una o más lipasas a la mezcla de la etapa b);
- d. incubar el producto de la etapa c), preferiblemente en un agitador orbital a 200 rpm (IKA KS 4000 ic Control,

Staufen, Alemania); y

e. obtener el producto de la reacción de glicerolisis.

5 Preferiblemente, el procedimiento de obtención de una composición o sistema lipídico comprende:

a. añadir aceite de hígado de tiburón quimera (RLO, "*Ratfish Liver Oil*"), preferiblemente el aceite con las características cualitativas y cuantitativas descritas en la tabla 1, a un recipiente que comprende glicerol, preferiblemente en una razón molar RLO:glicerol de 1:1 y preferiblemente añadir un disolvente a la mezcla de aceite y glicerol que mejore su miscibilidad;

b. regular la temperatura de la mezcla de la etapa a), preferiblemente a 40°C con agitación continua (200 rpm);

c. añadir una o más lipasas a la mezcla de la etapa b);

d. incubar el producto de la etapa c), preferiblemente en un agitador orbital a 200 rpm (IKA KS 4000 ic Control, Staufen, Alemania); y

e. obtener el producto de la reacción de glicerolisis.

En concreto, el procedimiento de obtención del sistema lipídico utilizado puede obtenerse realizando reacciones de glicerolisis en condiciones específicas de agitación, temperatura y tiempo (agitación continua a 200 rpm y 40°C durante 48 h) de la siguiente manera partiendo de un recipiente con glicerol: en presencia de disolventes GRAS, incluyendo CPN, HXL y CPME. Para calcular el volumen de disolvente necesario, se añadieron alícuotas de 1 ml de disolvente sucesivamente hasta la disolución completa del glicerol presente en la mezcla de reacción inicial. Después, las disoluciones de glicerol-disolvente se mezclaron con RLO en matraces de 250 ml en la misma razón molar que las reacciones sin disolventes (glicerol:RLO de 1:1). Después de la mezcla con RLO, el glicerol se volvió parcialmente insoluble de nuevo, pero la homogeneidad del sistema se mantuvo más alta que en ausencia de disolvente. La reacción se inició con la adición de lipasa y, en este caso, en un intento de contrarrestar el efecto de dilución del disolvente, la carga enzimática (razón enzima:RLO = 1,25:10 p/p) era mayor que la utilizada en sistemas sin disolvente. Después de la reacción, el disolvente se eliminó del producto de reacción a través de evaporación a 50°C y a vacío (~0,10 kPa) usando un evaporador rotativo RV 10 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) y un vacío de bomba de vacío rotativa sellada por aceite (Edwards, distribuidor en España Iberica Vacuum, Madrid, España).

Un tercer aspecto de la invención se refiere a una composición o sistema lipídico que se obtiene o puede obtenerse mediante el procedimiento del tercer aspecto de la invención.

Se hace notar en este punto, que aparte del sistema lipídico de la invención que presenta una composición cualitativa y cuantitativa determinada que es particularmente útil para suministrar formulaciones bioactivas y mejorar la bioaccesibilidad y biodisponibilidad de dichas formulaciones *in vivo*, los autores de la presente invención han descubierto que otras composiciones lipídicas similares a la de la invención muestran un potencial terapéutico muy interesante. En este sentido, es importante resaltar el contenido del ejemplo 7 en el que se realizó un estudio aleatorizado, con doble enmascaramiento y paralelo de 8 semanas de duración en el que se incluyó a 57 voluntarios sanos (siendo el 58,6% mujeres) y con una edad media de 27,9±10,1 años, de los cuáles 30 pertenecieron al grupo de estudio y 27 al grupo control.

En este estudio, los participantes consumieron una cápsula junto a la comida o cena. Las cápsulas de gelatina blanda, contenían alquilglicerol derivados del RLO, extracto de romero y monoestearina de las siguientes características:

- RLO: aceite de hígado de tiburón con el 20% de alquilglicerol (Gustav Heess): 750 mg (aportando 150 mg de alquilglicerol).
- ESR: extracto antioxidante de romero, 25% de diterpenofenoles, tipo n.º 027.020 (*Rosmarinus officinalis* L.) 45 mg (aportando 11,25 mg de diterpenofenoles).
- ME: monoestearato de glicerol de calidad alimentaria

Composición: el 91,2% de RLO + el 5,2% de ESR + el 3,6% de ME.

En dicho estudio, tras la extracción sanguínea se realizó el aislamiento de PBMC que luego se cultivaron con LPS para la medición de citocinas en el sobrenadante en el que se midieron los niveles de IL1β; IL 2, 4, 5, 6, 8, 10, IFNγ, TNFα, empleando para ello el kit Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel y efectuando las lecturas con el equipo MagPix.

También se realizó el recuento de las CD (agrupación de diferenciación) para las agrupaciones de diferenciación

CD3+, CD4+, CD8+, CD14+, CD16+, CD56+ sobre CD45+, empleando para ello kits y anticuerpos específicos para citometría de flujo.

Como parámetros de seguridad y seguimiento se evaluaron en la visita inicial, intermedia y final los niveles de urea, creatinina, enzimas hepáticas GOT/GPT/GGT, bilirrubina y FA, además del control antropométrico, el control de constantes vitales y el registro de tolerancia y efectos adversos.

La influencia inmunomoduladora del tratamiento se evaluó generando una matriz de correlaciones bivariadas (análisis de componentes principales) con el propósito de mostrar la correlación biológica entre las concentraciones plasmáticas de citocinas, producidas por células mononucleares aisladas de sangre periférica, y la respuesta inmunitaria (Th1, respuesta efectora y Th2, respuesta de tolerancia).

Tal y como se muestra en los resultados del ejemplo 7, el consumo de las capsulas que contenían alquiglicerol derivados del RLO, extracto de romero y monoestearina, proporcionó una tendencia resultante en el perfil de citocinas y fenotipado leucocitario que a su vez refleja un ambiente antiinflamatorio favorable hacia la polarización del sistema inmunitario innato a células efectoras del siguiente tipo: monocitos no clásicos y linfocitos citolíticos naturales, con capacidad fagocítica y actividad citotóxica preventiva del desarrollo tumoral. Por tanto, el análisis de los parámetros inmunitarios (citocinas y fenotipado leucocitario) en los voluntarios que tomaron el complemento nutricional durante 8 semanas, indica una influencia positiva inmunonutricional consistente en:

- activación y tolerancia de la respuesta inmunitaria innata.
- polarización intermedia de la respuesta inmunitaria hacia células efectoras con actividad fagocítica (monocitos) y citotóxica (linfocitos citolíticos naturales).
- producción de un perfil de citocinas con actividad antiinflamatoria y antitumoral.

Estos resultados son sorprendentes dado que otros estudios realizados sólo con alquiglicerol, han mostrado únicamente una estimulación y activación de la respuesta adaptativa. Sin embargo, en el presente estudio donde los alquiglicerol se complementan con ESR, se observa una clara estimulación de la respuesta innata junto a una polarización intermedia M1/M2, un efecto único encontrado en este complemento, donde esta modulación de la respuesta innata es potencialmente efectiva tanto en cáncer como en trastornos del sistema inmunitario.

Por tanto, estos resultados sugieren el uso de composiciones que comprenden alquiglicerol (preferiblemente derivados del aceite de hígado de tiburón quimera (RLO)) complementados con ESR como:

- * agentes que previenen el desarrollo de metástasis en pacientes con cáncer con tumores localizados.
- * agentes que potencian la inmunoterapia en pacientes candidatos, en los que se requiere la activación de respuesta innata hacia la producción de células efectoras maduras con capacidad fagocítica -monocitos, linfocitos citolíticos naturales-, la producción de citocinas con actividad antitumoral y la maduración funcional de linfocitos T dirigidos hacia antígenos tumorales.
- * Agentes que previenen trastornos inmunitarios.

Por tanto, un cuarto aspecto de la invención se refiere a una composición que comprende extracto supercrítico de romero y un sistema lipídico que a su vez comprende aceite de hígado de tiburón quimera o el producto de un procedimiento de glicerolisis enzimática o química a partir de aceite de hígado de tiburón quimera. Se hace notar que dicha composición puede caracterizarse por ser una única composición o una composición combinada donde la composición combinada incluiría una composición A que comprendiese el extracto supercrítico de romero y una composición B que comprendiese el aceite de hígado de tiburón quimera o el producto de un procedimiento de glicerolisis enzimática o química a partir de aceite de hígado de tiburón quimera. Dicha composición combinada puede administrarse a un paciente de forma simultánea o secuencial; preferiblemente en el contexto de la presente invención la administración sería simultánea.

En una realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la composición o composición combinada comprende extracto supercrítico de romero, un sistema lipídico que a su vez comprende aceite de hígado de tiburón quimera y MAG o monoglicéridos. Preferiblemente, entre un 2% y un 30% p/p de MAG o monoglicéridos, preferiblemente entre un 3% y un 30% p/p de MAG o monoglicéridos, incluyendo los valores extremos de estos intervalos. Más preferiblemente, donde los monoglicéridos se seleccionan de la lista que consiste en monooleína (MO) y monoestearina (ME). Más preferiblemente, la composición del cuarto aspecto de la invención comprende el 91,2% p/p de RLO, el 5,2% p/p de ESR y el 3,6% p/p de ME, incluyendo variaciones de +/- el 30%, preferiblemente variaciones de +/- el 20%, más preferiblemente variaciones de +/- el 10%, incluso más preferiblemente variaciones de +/- el 5%, incluso más preferiblemente variaciones de +/- el 2%, incluso más preferiblemente variaciones de +/- el 1%, de estos porcentajes.

En otra realización preferida del cuarto aspecto de la invención, la composición o composición combinada comprende extracto supercrítico de romero y un sistema lipídico que a su vez comprende la composición descrita en el primer o tercer aspecto de la presente invención o en cualquiera de sus realizaciones preferidas.

Se hace notar que las composiciones del cuarto aspecto de la invención se utilizarán preferiblemente como agentes adyuvantes o potenciadores de la inmunoterapia para pacientes con cáncer o trastornos inmunitarios. trastornos inmunitarios que requieren preferiblemente la activación de respuesta innata hacia la producción de células efectoras maduras con capacidad fagocítica -monocitos, linfocitos citolíticos naturales-, la producción de citocinas con actividad antitumoral y la maduración funcional de linfocitos T dirigidos hacia antígenos tumorales. La razón por la cual las composiciones del cuarto aspecto de la invención presentan estas aplicaciones terapéuticas se basa en los resultados descritos en el ejemplo 7, donde la importancia fisiológica de la respuesta en la población monocítica frente al tratamiento hace presuponer una influencia positiva del mismo como parte de terapias adyuvantes, preventivas y/o terapéuticas, con objeto de prolongar la respuesta inmunitaria celular. El 'agotamiento inmunitario' está bien definido en situaciones de crecimiento tumoral, así como la infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica crónica, la infección por el virus de la hepatitis (B y C), infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Además, el preservar el procesamiento antigénico por parte de las poblaciones celulares que tienen su origen en los monocitos puede tener consecuencias importantes y positivas, reduciendo la gravedad y/o el riesgo, en patologías de base autoinmunitaria (es decir, tales como la artritis reumatoide, diabetes tipo I, psoriasis, enfermedad celíaca, esclerosis múltiple). Es muy importante también el aumento de la respuesta inmunitaria innata en la prevención del daño renal (por ejemplo, provocado con contrastes en los procedimientos médicos). De esta forma las composiciones del cuarto aspecto de la invención pueden usarse en el tratamiento de un paciente con un trastorno inmunitario de base autoinmunitaria, preferiblemente seleccionado de la lista que consiste en artritis reumatoide, diabetes tipo I, psoriasis, enfermedad celíaca y esclerosis múltiple. Además, las composiciones del cuarto aspecto de la invención pueden usarse en el tratamiento de un paciente con un crecimiento tumoral, así como con infección por el virus de la coriomeningitis linfocítica crónica, infección por el virus de la hepatitis (B y C), o infección por el virus de la inmunodeficiencia humana. Por último, las composiciones del cuarto aspecto de la invención pueden usarse en la prevención del daño renal.

Con respecto al uso de las composiciones del cuarto aspecto de la invención para tratar el crecimiento tumoral, se hace notar lo siguiente. Los monocitos son precursores directos de los macrófagos derivados de células madre hematopoyéticas. Es importante mantener una adecuada población de 'alerta' dado que después de su reclutamiento en el tejido tumoral, pueden diferenciarse en macrófagos asociados a tumores, una población celular muy heterogénea en términos de fenotipo y función protumoral, apoyando la iniciación tumoral, progresión local y metástasis a distancia. De esta forma, la activación de la respuesta innata provocada por las composiciones del cuarto aspecto de la invención podrían, *a priori*, ser interesantes para tratar todo tipos de tumores, ya que se conseguiría que el sistema inmunitario reconociese y atacase los mismos. Esto resultaría especialmente interesante en aquellos tumores no activados, con linfocitos no activos o sin ningún linfocito en el tumor. El prototipo de este tipo de tumores es el tumor colorrectal, en los que quitando los hipermutados, los otros no funcionan en un nivel inmunitario. Otros tumores en los que las composiciones del cuarto aspecto de la invención serían especialmente efectivas serían tumores digestivos (incluyendo hígado y páncreas) o tumores de mama, así como el melanoma, tumores de pulmón en fumadores, tumores de vejiga y tumores de cabeza y cuello.

Un quinto aspecto de la invención se refiere al uso de la composición según cualquiera de los aspectos primero, tercero o cuarto, para la elaboración de un vehículo farmacéuticamente aceptable o de calidad alimentaria para alimentos funcionales, productos nutraceuticos, extractos naturales o fármacos, preferiblemente fármacos anticancerígenos.

En una realización preferida del quinto aspecto de la invención, dichos alimentos funcionales, productos nutraceuticos, extractos naturales o fármacos se caracterizan por presentar un log P* superior a 2, donde log P* es el logaritmo de la razón entre las concentraciones del soluto no ionizado en los disolventes octanol y agua y se determina de acuerdo a la siguiente formula:

$$\log P_{\text{octanol/agua}} = \log \left(\frac{[\text{solute}]_{\text{octanol}}}{[\text{solute}]_{\text{agua}}^{\text{no ionizado}}} \right)$$

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, los productos nutraceuticos se seleccionan de la lista que consiste en icosapento, vitamina A, vitamina E, colecalfierol (vitamina D), alfacalcidol, calcitriol, xantófila, calcidiol, icosapento de etilo, ergocalciferol, ácido diomo-gamma-linolénico, clopidogrel, ácido alfa-linolénico, ácido lipoico y tretinoína.

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, los fármacos se seleccionan de la lista que consiste en vinorelbina, bexaroteno, testolactona, enzalutamida, bicalutamida, vindesina, ruxolitinib, estropipate, lapatinib, regorafenib, plicamicina, anastrozol, drostanolona, irinotecán, ixabepilona, valrubicina, erlotinib y lenvatinib.

En otra realización preferida del quinto aspecto de la invención, los fármacos se seleccionan de la lista que consiste en ritonavir, masoprocol, eletriptán, temazepam, benztropina, terconazol, diatrizoato, venlafaxina, travoprost, etomidato, etonogestrel, ropivacaína, zolmitriptán, tolcapona, indometacina y pimecrolimus.

- 5 Un sexto aspecto de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende la composición o el sistema lipídico según cualquiera de los aspectos primero, tercero o cuarto.

Un séptimo aspecto de la invención se refiere a una composición alimenticia que comprende la composición o el sistema lipídico según cualquiera de los aspectos primero, tercero o cuarto.

- 10 Un octavo aspecto de la invención se refiere a la composición farmacéutica según el sexto aspecto de la invención, en la que dicha composición suministra un fármaco seleccionado de la lista identificada en cualquiera de las realizaciones preferidas del quinto aspecto de la invención. Preferiblemente dicha composición se utiliza para la elaboración de una especialidad farmacéutica para el tratamiento del cáncer, preferiblemente para el tratamiento del
- 15 cáncer de colon.

Un noveno aspecto de la invención se refiere a la composición alimenticia según el séptimo aspecto de la invención, en la que dicha composición suministra un producto nutracéutico seleccionado de la lista identificada en la realización preferida del quinto aspecto de la invención.

- 20 Los siguientes ejemplos específicos que se proporcionan en este documento de patente sirven para ilustrar la naturaleza de la presente invención. Estos ejemplos se incluyen solamente con propósitos ilustrativos y no han de ser interpretados como limitaciones a la invención que se reivindica en el presente documento. Por tanto, los ejemplos descritos a continuación ilustran la invención sin limitar el campo de aplicación de la misma.

25 Ejemplos

Materiales y Métodos

- 30 - Productos químicos y reactivos

El aceite de hígado de quimera (RLO) fue proporcionado amablemente por Rosita RatfishOil® (Helgeland, Noruega).

- 35 La monooleína de calidad alimentaria (99%) y los disolventes utilizados en los procedimientos de glicerolisis, incluyendo la ciclopentanona (CPN), el hexanal (HXL) y el ciclopentil-metil-éter (CPME), eran agentes aromatizantes de calidad alimentaria y se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE.UU.). El glicerol se obtuvo de ICN Biomedicals (Aurora, OH). Los biocatalizadores como Novozym 435 (Nov435) (*Candida antarctica*) fueron amablemente suministrados por Novozymes A/S (Bagsvaerd, Dinamarca). Las lipasas PLG (*Alcaligenes* sp.), SL (*Burkholderia cepacia*) y TL (*Pseudomonas stutzeri*) se adquirieron de Meito Sangyo CO. LTD (Tokio, Japón) y la lipasa DF 15 (*Rizhopus oryzae*) se adquirió de Amano Enzyme Inc. (Nagoya, Japón).

- 40 En cuanto a los reactivos utilizados para el análisis cromatográfico, los patrones puros de ácido oleico (pureza del 99%), monooleína (pureza del 99%) y alcohol batílico (pureza del 99%) se obtuvieron de Sigma-Aldrich (San Luis, MO, EE.UU.), mientras que el patrón puro de oleato de etilo (pureza del 98%) se adquirió de Acros Organics (Geel, Bélgica).
- 45 El iso-octano se obtuvo de Carlo Erba Reagents (Val de Reuil, Francia). El hexano, el metil-terc-butil-éter (MTBE) y el cloroformo se obtuvieron de Lab-Scan (Gliwice, Polonia) y el ácido fórmico (pureza del 98%) de Panreac (Barcelona, España). Todos estos disolventes eran de calidad HPLC.

- 50 - Caracterización cromatográfica del aceite de hígado de tiburón quimera de partida

- El perfil de ácidos grasos del RLO se determinó mediante cromatografía de gases con detector de ionización de llama (GC-FID) después de la metilación de los residuos de ácidos grasos esterificados presentes en la muestra. Para ello, se disolvieron 50 MAG de RLO con 1 ml de *n*-hexano (Lab-Scan, Gliwice, Polonia). Después, se añadió 1 ml de NaOH 0,5 N en metanol para la metanólisis de la muestra, seguido de agitación durante 1 min, calentamiento a 100°C durante
- 55 5 min y metilación adicional mediante la adición de 1 ml de BF₃ al 14% en metanol (Supelco, Pasadena, EE.UU.), agitación durante 1 min e incubación a 100°C durante 5 min. La mezcla resultante de éster metílico de ácidos grasos (FAME) se extrajo con *n*-hexano (1 ml) y una disolución saturada de NaCl (1 ml), después de agitar durante 2 min a temperatura ambiente. Después la fase de hexano decantada se dejó en reposo durante 2 h con sulfato de sodio anhidro (Panreac) para la eliminación de la humedad. Por último, el hexano se evaporó hasta sequedad para obtener
- 60 un residuo de los FAME que después se disolvió en *n*-hexano a una concentración final de 15 MAG·ml⁻¹. El análisis cromatográfico de los MAGE se realizó en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies (6850 N Network GC System) equipado con un detector de ionización de llama (FID). Se inyectó 1 µl de muestra en el modo de división/sin división (razón de división 10:1) en una columna capilar HP-88 ((88%-cianopropil)aril-polisiloxano, 30 m × 0,25 mm × 0,20 µm de grosor; Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). Se utilizó helio como gas portador a una
- 65 velocidad de flujo de 0,9 ml/min. Las temperaturas del inyector y del detector eran de 220 y 250°C, respectivamente. El programa de temperatura era de la siguiente manera: inicio a 50°C y después calentamiento a 180°C a 20°C/min;

seguido de calentamiento de 180 a 220°C a 15°C/min. La temperatura final (220°C) se mantuvo durante 10 min. Para la cuantificación, se representó gráficamente una curva de calibración con oleato de etilo. Se obtuvieron y se integraron los datos utilizando el software Agilent ChemStation Reb. 4B. 03.01 (Wilmington, DE, EE.UU.). El análisis se realizó por duplicado y los datos se expresaron como la media $\pm$ la desviación estándar (DE).

El perfil lipídico del RLO de partida también se evaluó mediante cromatografía líquida acoplada a un detector evaporativo de dispersión de luz (LC-ELSD). La preparación de las muestras y el método cromatográfico utilizado se describen a continuación.

- Reacción de glicerolisis

La glicerolisis catalizada por lipasas se realizó de acuerdo con el método de Torres *et al.* (2002) con ligeras modificaciones. En resumen, se añadieron 10 g de RLO a un matraz de 120 ml que contenía 1 g de glicerol (razón molar de RLO:glicerol de 1:1). Se utilizó una razón estequiométrica de RLO y glicerol para evitar la presencia de reactivo en exceso en la mezcla de productos. Se reguló la temperatura de la mezcla hasta 40°C con agitación continua (200 rpm). La reacción se inició con la adición de diferentes lipasas comerciales en una razón enzima:RLO de 1:10 (p/p). Después, los matraces se taparon y se incubaron en un agitador orbital a 200 rpm (IKA KS 4000 ic Control, Staufen, Alemania). La evolución de la reacción de glicerolisis se determinó tomando alícuotas (50 μ l) de la mezcla de reacción periódicamente. Todos los ensayos se dejaron transcurrir durante 48 h y se realizaron por duplicado.

- Optimización del procedimiento de glicerolisis

Para elaborar el sistema lipídico de la presente invención (el descrito en el ejemplo 2) se realizaron reacciones de glicerolisis adicionales en las mismas condiciones de agitación, temperatura y tiempo (agitación continua a 200 rpm y 40°C durante 48 h) de la siguiente manera:

i) En presencia de disolventes GRAS, incluyendo CPN, HXL y CPME. Para calcular el volumen de disolvente necesario, se añadieron alícuotas de 1 ml de disolvente sucesivamente hasta la disolución completa del glicerol presente en la mezcla de reacción inicial. Después, las disoluciones de glicerol-disolvente se mezclaron con RLO en matraces de 250 ml en la misma razón molar que las reacciones sin disolventes (glicerol:RLO de 1:1). Después de la mezcla con RLO, el glicerol se volvió parcialmente insoluble de nuevo, de acuerdo con diferentes autores (Damstrup *et al.*, 2005, 2006, 2007), pero la homogeneidad del sistema se mantuvo más alta que en ausencia de disolvente. La reacción se inició con la adición de lipasa y, en este caso, para contrarrestar el efecto de dilución del disolvente, la carga enzimática (razón enzima:RLO = 1,25:10, p/p) era mayor que la utilizada en sistemas sin disolvente. Después de la reacción, el disolvente se eliminó del producto de reacción a través de evaporación a 50°C y a vacío (~0,10 kPa) usando un evaporador rotativo RV 10 (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Alemania) y un vacío de bomba de vacío rotativa sellada por aceite (Edwards, distribuidor en España Iberica Vacuum, Madrid, España).

- Análisis de mezclas de glicerolisis mediante cromatografía líquida

La separación y la cuantificación cromatográficas de los lípidos presentes en la muestra original de RLO y en las muestras resultantes del procedimiento de glicerolisis se realizaron mediante LC-ELSD. Se disolvieron alícuotas de 50 μ l retiradas de la mezcla de reacción durante todo el procedimiento de glicerolisis en 2 ml de cloroformo y se filtraron (filtros PVDF de 0,45 μ m, Symta, Madrid, España). Después, el cloroformo se evaporó a 40°C en una corriente de nitrógeno usando un calentador de bloque Stuart SBH200D/3 (Staffordshire, Reino Unido) hasta que se obtuvo un residuo de peso constante. Por último, la muestra de RLO original o las muestras resultantes de la glicerolisis enzimática, se diluyeron con cloroformo a una concentración final de 20 MAG ml⁻¹ antes de la inyección (1 μ l, ~20 μ g de lípidos totales) en el sistema de HPLC.

En presencia de disolventes GRAS, se centrifugaron alícuotas de 200 μ l a 10000 rpm durante 3 min para eliminar posibles residuos de enzima. Después, se pesaron 50 μ l de sobrenadante y se diluyeron 20 veces con cloroformo antes de la inyección (1 μ l, ~20 μ g de lípidos totales) en el sistema de HPLC.

Los análisis de LC-ELSD se realizaron utilizando un sistema de HPLC Agilent Technologies Serie 1200 (Santa Clara, CA, EE.UU.), que contiene un compartimento de columna termostatazada, una bomba cuaternaria, un inyector automático, un desgasificador a vacío y un detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD) (Agilent 1260 Infinity). Las condiciones del ELSD eran 2×10^5 Pa, 50°C, y ganancia 4, que se ajustó para cuantificar con precisión compuestos minoritarios. Las separaciones cromatográficas se realizaron en una columna Agilent Poroshell (Sil 2,7 μ m, 4,6 $\times$ 100 mm) a 35°C, una velocidad de flujo de 2 ml/min y eluyentes de mezcla A (el 100% de isooctano), B (el 0,02% (v/v) de ácido fórmico en isooctano:MTBE (50:50, v/v)) y C (MTBE:propan-2-ol (50:50, v/v)) para formar un sistema de gradiente ternario tal como describió previamente por Torres *et al.* (2005). Esta metodología permite el análisis simultáneo de hasta 18 clases de lípidos neutros diferentes, en particular de éter de diacilglicerol (DAGE), triacilglicerol (TAG) y sus productos de hidrólisis (éter de monoacilglicerol (MAGE), alquilglicerol no esterificado (Guney, 2002), monoacilglicerol (MAG) y diacilglicerol (DAG)), incluyendo diferentes regioisómeros, con una estructura y una polaridad muy similares. El volumen de inyección era de 1 μ l (~20 μ g de lípidos totales). Los datos se obtuvieron

y se procesaron mediante el software Agilent ChemStation (Agilent Technologies, Böblingen, Alemania).

Los lípidos en las mezclas de reacción se identificaron mediante la comparación de sus tiempos de retención (t_R) con los tiempos de retención de diferentes lípidos patrón. Se utilizaron el ácido oleico y el alcohol batílico comerciales para la identificación de ácidos grasos libres (FFA) y AKG, respectivamente. Se identificaron el DAGE y el TAG mediante el uso de RLO comercial y aceite de sáballo (Mbanya *et al.*, 2003). Por último, se utilizaron productos derivados de la glicerólisis del aceite de sáballo y purificados mediante HPLC semipreparativa para la identificación de MAGE, DAG y MAG. El análisis cuantitativo se realizó mediante el método de patrón externo, utilizando curvas de calibración de cada patrón en el intervalo de 0,4-25 MAG·ml⁻¹. Los valores de la desviación estándar relativa estaban por debajo del 10% en todos los casos.

Los datos cuantitativos se expresaron como conversión de DAGE y TAG durante el procedimiento de glicerólisis (E1) y como porcentaje de cada compuesto de la mezcla de reacción en peso con respecto al peso total de la mezcla de reacción (E2).

$$\frac{100 - [(\%_{\text{final}}/\%_{\text{inicial}}) \times 100]}{[P_{\text{comp}}/P_{\text{m.r.}}] \times 100} \quad \begin{matrix} \text{[E1]} \\ \text{[E2]} \end{matrix}$$

Donde $\%_{\text{final}}$ y $\%_{\text{inicial}}$ son, respectivamente, los porcentajes final e inicial de DAGE y TAG en las mezclas de reacción y P_{comp} y $P_{\text{m.r.}}$ son el peso de cada compuesto de la mezcla de reacción y el peso total de la mezcla de reacción, respectivamente.

Por último, se utilizaron los parámetros definidos a continuación para evaluar la eficiencia de la glicerólisis en términos de producción de MAG:

- i) El rendimiento (g de MAG/100 g de RLO) representa la masa de MAG obtenida durante la glicerólisis por unidad de masa inicial de RLO.
- ii) La productividad (g l⁻¹ h⁻¹) representa la concentración de MAG producida por unidad de tiempo de reacción.

Estos parámetros se evaluaron en el punto temporal en el que se alcanza la concentración máxima de MAG en las diferentes condiciones de glicerólisis sometidas a prueba.

- Escalado a planta piloto

La reacción de glicerólisis en condiciones óptimas específicas se aumentó a escala a planta piloto en un sistema de reactor "kiloclave" (Buchi Glas Uster, Büchiglasuter, Suiza) con agitación mecánica y temperatura controlada a lo largo de todo el procedimiento. La composición de la mezcla de reacción inicial se ajustó a un peso final de aproximadamente 500 g, que consistía en 128 g de RLO, 12,8 g de glicerina y 304 g de PCN. Durante la reacción, se colocó lipasa (12 g) en una cesta, que está acoplada al eje de agitación del reactor con la mezcla de reacción circulando a través de dicha. La cantidad de lipasa utilizada como biocatalizador estaba limitada por la capacidad de la cesta; de modo que la carga enzimática (razón enzima:RLO = 0,94:10, p/p) era menor que a escala de laboratorio. De forma similar a la escala de laboratorio, se retiraron alícuotas periódicamente de la mezcla de reacción para estudiar la cinética de reacción. Se analizaron mediante LC-ELSD, tal como se ha explicado en la sección 2.5. Después de 48 h de reacción, el medio de reacción se vació a través de la válvula de descarga del reactor.

- Caracterización del aceite de hígado de tiburón quimera

La tabla 1 muestra el perfil de ácidos grasos del aceite de hígado de tiburón quimera (RLO) determinado mediante CG-DIL. Tal como se observa, los principales ácidos grasos del RLO son los ácidos oleico y palmítico y el contenido de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) es menor en comparación con el contenido de PUFA de otros aceites de pescado. Este perfil de ácidos grasos podría proporcionar una mayor estabilidad frente a la oxidación en comparación con otros aceites de origen marino.

Análogamente, de acuerdo con el análisis por LC-ELSD, el RLO original estaba comprendido principalmente por dos compuestos, éter de diacilglicerol (DAGE, pico 1, t_R = 6,7 min) y triacilglicerol (TAG, pico 2, t_R = 7,7 min). El contenido en DAGE (80%, p/p) del RLO era mucho más alto que el contenido de TAG (20%, p/p), que, como se ha comentado anteriormente, hace interesante el uso de este aceite como material de partida en procedimientos de glicerólisis para el diseño de sistemas de liberación de lípidos bioactivos y distingue dichos procedimientos de los realizados previamente a partir de aceites vegetales o incluso a partir de aceite de hígado de tiburón, que también contiene alquilglicerol pero en un nivel sustancialmente menor.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos del aceite de hígado de tiburón quimera.

Ésteres metílicos de ácido graso	Concentración (% p/p)
Ácido mirístico (C14:0)	1,0
Ácido palmítico (C16:0)	12,8
Ácido palmitoleico (C16:1)	6,0
Ácido hexadecadienoico (C16:2)	1,5
Ácido hexadecatrienoico (C16:3)	1,9
Ácido esteárico (C18:0)	5,5
Ácido oleico (C18:1)	43,3
Ácido γ -linolénico (C18:3)	4,0
Ácido estearidónico (C18:4)	0,5
Ácido eicosenoico (C20:1)	7,0
Ácido araquidónico (C20:4)	1,2
Ácido eicosapentaenoico (C20:5)	5,4
Ácido docosanoico (C22:0)	3,7
Ácido docosapentaenoico (C22:5)	1,7
Ácido docosahexaenoico (C22:6)	3,5
Ácido tetracosanoico (C24:0)	1,1

Ejemplo 1.

- 5 1- Obtención de formulaciones constituidas por aceite de hígado de tiburón quimera con monooleína (vehículo lipídico) y un extracto supercrítico de romero (compuesto bioactivo) en diferentes proporciones.

10 La mezcla de aceite de hígado de tiburón quimera (RLO) (Phosphotech, Francia) con monooleína de calidad alimentaria (MO) (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania), en una razón molar de 1:1, se mezcló con el extracto supercrítico de romero comercial (ESR) (ESTABILOTON OS) a diferentes concentraciones, incluyendo el 4, el 9 y el 16% (p/p), para dar lugar a las formulaciones denominadas a partir de ahora RLO+MO+4% de ESR, RLO+MO+9% de ESR y RLO+MO+16% de ESR. Posteriormente, estas mezclas se hicieron pasar tres veces a través de un homogenizador de altas presiones a 500 bares (Emulsiflex C5, Avestin Europe).

- 15 2- Evaluación *in vitro* de la digestión gastrointestinal (GTI)

20 Para la digestión gástrica, 3 g de formulación (RLO+MO+4% de ESR, RLO+MO+9 de % ESR y RLO+MO+16% de ESR) se mezclaron con 600 MAG de fosfolípidos (PL) (Phospholipon 90H), para simular los PL procedentes de la dieta, y 16,4 ml de una disolución de simulación gástrica (NaCl 0,15 M a pH 2,5, SGF). El pH se ajustó a 2,5 con HCl 1 M. El medio preparado se emulsionó previamente mediante homogeneización a 3500 rpm durante 2 min y se controló la temperatura a 37°C y agitación continua a 200 rpm en un agitador orbital (IKA KS 4000 ic Control, Staufen, Alemania). A continuación, se añadió una disolución que contenía pepsina de origen porcino (EC 3.4.23.1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) al 16% (p/v) en SGF (pH 2,5) (actividad 3.300 U/MAG de proteína) en una proporción de enzima:sustrato 1:12 (p:p) y se incubó a 37°C durante 1 h.

25 Para la digestión intestinal, 6 ml del digerido gástrico se mezclaron con 26 ml de tampón trizma-maleato 0,1 M y pH 7,5. El medio preparado se emulsionó previamente mediante homogeneización a 3500 rpm durante 2 minutos.

30 Por otro lado, se preparó una disolución con una composición similar a la secreción biliar. Para ello, se mezclaron 200 MAG de fosfatidilcolina de yema de huevo (Lipoid, Ludwigshafen, Alemania), 500 MAG de sales biliares, 40 MAG de colesterol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania), 1 ml de CaCl₂ 325 mM, 3 ml de NaCl 3,25 M (Panreac Química S.A.U, Barcelona, España) y 20 ml del tampón trizma-maleato, y se homogeneizó todo a 3500 rpm durante 2 min. Posteriormente, la muestra emulsionada previamente y la secreción biliar simulada se mezclaron y homogeneizaron juntos a 3500 rpm durante 2 minutos y toda se transfirió a un vaso con su temperatura regulada a 37°C con agitación continua a 1000 rpm. La digestión intestinal comenzó con la adición de extracto recién preparado de pancreatina de origen porcino que se preparó del siguiente modo: 1,167 g de pancreatina disuelto en 7 ml de tampón trizma-maleato, posteriormente agitado durante 10 min y centrifugado a 1600 x g a 5°C durante 15 min. 6 ml de sobrenadante acuoso obtenido se añadió al medio de reacción junto con 10 MAG de fosfolipasa A2 (Nagase Enzymes). Para poder estudiar la evolución de la digestión en el tiempo, así como la evaluación del punto final de la digestión, se tomaron alícuotas de 1,5 ml del medio de reacción a 0, 5, 15, 10, 30 y 60 minutos.

2.1 Extracción lipídica

45 Para extraer los lípidos totales de las diferentes alícuotas tomadas durante la digestión se hicieron tres extracciones consecutivas con diferentes mezclas de disolventes, en una razón muestra:disolvente = 1:3 (v/v) y centrifugando durante 10 min a 14500 rpm cada vez. Las mezclas fueron, de menor a mayor polaridad: i) n-hexano:metil-terc-butil-éter (MTBE) (50:50, v:v); ii) MTBE:éter de petróleo (EP) (50:50, v:v); iii) EP:etanol (1:0.6, v:v).

Al final de cada extracción, se recolectó la fase orgánica superior que contenía los componentes lipídicos, se dejó sedimentar durante 2 h con sulfato de sodio anhidro (Sigma-Aldrich) para asegurar la eliminación de posibles trazas de agua de la muestra y se evaporó el disolvente bajo una corriente de nitrógeno a 40°C hasta obtener un residuo de peso constante. A continuación, los residuos se diluyeron en cloroformo hasta una concentración final de 20 MAG/ml y se analizaron por LC-ELSD.

Los análisis de LC-ELSD se realizaron usando un cromatógrafo de líquidos serie 1200 de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU.) acoplado a un detector ELSD (Agilent 1260 Infinity). Las condiciones del ELSD fueron 2×10^5 Pa, 50°C, y ganancia de 4 que se ajustó para poder cuantificar con exactitud los compuestos minoritarios. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna Agilent Poroshell 120 (Sil 2.7 μ m, 4.6 x 100 mm), a 35°C, una velocidad de flujo de 2 ml/min y mezclando tres eluyentes (A, el 100% de isooctano; B, el 0,02% (v/v) de ácido fórmico en isooctano:MTBE (50:50, v/v); y C, MTBE:propan-2-ol (50:50, v/v)) para formar un gradiente ternario previamente descrito por Torres *et al.* (2005). El volumen de inyección fue de 1 μ l.

3- Determinación de la bioaccesibilidad *in vitro*

3.1 Separación de fases

Con el fin de separar la fracción lipídica no digerida de los productos lipídicos incorporados en estructuras micelares durante el proceso de digestión intestinal *in vitro*, el producto final de digestión se centrifugó a 4000 rpm, a 37°C durante 40 minutos, de acuerdo con el protocolo llevado a cabo por Soler-Rivas *et al.* (2010). Tras la centrifugación, el medio de digestión se separó en 3 fases claramente diferenciadas: una fase superior, denominada fase oleosa (FO), compuesta por la fracción de la muestra lipídica que no se ha digerido y parte del extracto de romero. En condiciones *in vivo* esta fase sería secretada con las heces o transformada por la microbiota del colon; una fase acuosa intermedia, denominada fase micelar (FM), en la que puede encontrarse la fracción lipídica digerida formando estructuras micelares y vesículas con el extracto de romero incorporado. Ésta es la fracción bioaccesible, es decir, la que está disponible para ser absorbida por las células del epitelio intestinal; y una fase inferior insoluble, que es muy minoritaria, denominada fase precipitada (FP), constituida por residuos de sales y jabones de ácidos grasos liberados durante la digestión pancreática (5).

Una vez separadas las fases, se llevó a cabo la extracción lipídica, la preparación de la muestra y el análisis por LC-ELSD tal y como se ha explicado en la sección anterior.

3.2 Medición de los polifenoles totales

El contenido en polifenoles totales de la fracción bioaccesible del ESR suministrado en el sistema RLO+MO se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (6). Brevemente, 10 μ l de muestra se mezclaron con 150 μ l de la disolución de Folin-Ciocalteu y se dejó durante 3 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 μ l de una disolución de bicarbonato de sodio (3%). Finalmente, tras 2 horas de incubación a 37°C en oscuridad, se midió la absorbancia a 735 nm usando un espectrofotómetro (Genesis 10 UV Scanning, Thermo Scientific). Como patrones se usaron el propio extracto de romero y ácido rosmarínico a diferentes concentraciones (0.2 – 2 MAG/ml).

4. Estudio *in vitro* de la actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa *in vitro* de las fases micelares (bioaccesibles) obtenidas tras la digestión de las formulaciones RLO+MO+4% de ESR, RLO+MO+9% de ESR y RLO+MO+16% de ESR se evaluó en modelos celulares de cáncer de colon humano.

4.1 Cultivos celulares

Se cultivaron células de cáncer de colon humano de la línea SW620 en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, 2 mM de glutamina y un 1% de una disolución antibiótica-antimicótica, que contenía 10000 unidades/ml de penicilina base, 10000 μ g/ml de estreptomycin base y 25000 ng/ml de amfotericina B. Se mantuvo el cultivo celular en condiciones estándar de temperatura (37°C), de humedad (95%) y de dióxido de carbono (5%).

4.2 Ensayo de viabilidad celular

Para medir la actividad antiproliferativa de los productos de digestión se utilizó el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para ello se transfirieron las células en fase exponencial de crecimiento a placas de 24 pocillos, incorporándose un promedio de 25000 células por pocillo en un volumen final de 200 μ l. Después de 2 h de incubación a 37°C, se reemplazó el medio de cultivo por medio que contenía la fracción bioaccesible (FM) de cada uno de los productos ensayados (RLO+MO+4% de ESR, RLO+MO+9% de ESR y RLO+MO+16% de ESR), diluida en medio de cultivo DMEM a diferentes concentraciones (0-11,5 FM μ l·ml⁻¹). La viabilidad celular se determinó tanto en el momento del tratamiento, para tener un control de la población celular de partida, y tras 48 h de incubación

de la placa a 37°C, para determinar el efecto del producto sobre el crecimiento celular. Para determinar el número de células viables, se añadieron 20 µl de disolución MTT (5MAG/ml en FBS) a cada pocillo. A continuación, la placa se dejó incubar durante 3 h para que el formazán (metabolito azul del MTT) se fije a las células viables. Tras la incubación, el medio fue eliminado y se añadieron 200 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) para disociar las células y resuspender el formazán, cuya concentración (medida a 560 nm con un lector de placas espectrofotométrico (UVM 340 Biochrom, CambriDAGE)) está directamente relacionada con el número de células viables. Los valores de concentración de cada uno de los productos correspondientes al CI50 (50% de viabilidad celular inhibida) se calcularon de acuerdo con las definiciones de la NIH utilizando la regresión logística, concepto que se describe como la relación entre la respuesta a un tratamiento con especialidades farmacéuticas y la dosis o concentración de dicha especialidad farmacéutica.

Ejemplo 2.

1- Obtención de formulaciones constituidas por el producto obtenido a partir de RLO mediante un procedimiento de glicerolisis enzimática escalable a planta piloto (vehículo lipídico) y un extracto supercrítico de romero (compuesto bioactivo) en diferentes proporciones.

La mezcla del producto de glicerolisis (PG) obtenido a partir de aceite de hígado de tiburón quimera (RLO) (Phosphotech, Francia) en las condiciones de agitación, temperatura y tiempo (agitación continua a 200 rpm y 40°C durante 48 h) ilustradas en los materiales y métodos (véase el método optimizado de glicerolisis enzimática), se mezcló con el extracto supercrítico de romero comercial (ESR) (ESTABILOTON OS) a diferentes concentraciones, incluyendo el 4, el 9 y el 16% (p/p), para dar lugar a las formulaciones denominadas a partir de ahora PG+4% de ESR, PG+9% de ESR y PG+16% de ESR. Posteriormente, estas mezclas se hicieron pasar tres veces a través de un homogenizador de altas presiones a 500 bares (Emulsiflex C5, Avestin Europe).

En la presente invención el término "condiciones óptimas de reacción" se refiere a las condiciones de glicerolisis, incluyendo tipo de bioacatalizar y la razón enzima:sustrato, temperatura, proporción de glicerina, tiempo de reacción y ausencia/presencia de disolventes, que conducen a la formación de más de un 25% (p/p) de monoacilglicerol y la desaparición completa del triglicérido presente en RLO.

2- Evaluación *in vitro* de la digestión gastrointestinal (GTI)

Para la digestión gástrica, 3 g de formulación (PG+4% de ESR, PG+9% de ESR y PG+16% de ESR) se mezclaron con 600 MAG de fosfolípidos (PL) (Phospholipon 90H), para simular los PL procedentes de la dieta, y 16,4 ml de una disolución de simulación gástrica (NaCl 0,15 M a pH 2,5, SGF). El pH se ajustó a 2,5 con HCl 1 M. El medio preparado se emulsionó previamente mediante homogenización a 3500 rpm durante 2 min y se atemperó a 37°C y agitación continua a 200 rpm en un agitador orbital (IKA KS 4000 ic Control, Staufen, Alemania). A continuación, se añadió una disolución que contenía pepsina de origen porcino (EC 3.4.23.1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) al 16% (p/v) en SGF (actividad 3.300 U/MAG de proteína) en una proporción de enzima:sustrato 1:12 (p:p) y se incubó a 37°C durante 1 h.

Para la digestión intestinal, 6 ml del digerido gástrico se mezclaron con 26 ml de tampón trizma-maleato 0,1 M y pH 7,5. El medio preparado se emulsionó previamente mediante homogeneización a 3500 rpm durante 2 min.

Por otro lado, se preparó una disolución con una composición similar a la secreción biliar. Para ello, se mezclaron 200 MAG de fosfatidilcolina de yema de huevo (Lipoid, Ludwigshafen, Alemania), 500 MAG de sales biliares, 40 MAG de colesterol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania), 1 ml de CaCl₂ 325 mM, 3 ml de NaCl 3,25 M (Panreac Química S.A.U, Barcelona, España) y 20 ml del tampón trizma-maleato, y se homogeneizó todo a 3500 rpm durante 2 min. Posteriormente, la muestra emulsionada previamente y la secreción biliar simulada se mezclaron y homogeneizaron juntos a 3500 rpm durante 2 min y toda se transfirió a un vaso con su temperatura regulada a 37°C con agitación continua a 1000 rpm. La digestión intestinal comenzó con la adición de extracto recién preparado de pancreatina de origen porcino que se preparó del siguiente modo: 1,167 g de pancreatina disuelto en 7 ml de tampón trizma-maleato, posteriormente agitado durante 10 min y centrifugado a 1600 x g a 5°C durante 15 min. 6 ml de sobrenadante acuoso obtenido se añadió al medio de reacción junto con 10 MAG de fosfolipasa A2 (Nagase Enzymes). Para poder estudiar la evolución de la digestión en el tiempo, así como la evaluación del punto final de la digestión, se tomaron alícuotas de 1,5 ml del medio de reacción a 0, 5, 15, 10, 30 y 60 min.

2.1 Extracción lipídica

Para extraer los lípidos totales de las diferentes alícuotas tomadas durante la digestión se hicieron tres extracciones consecutivas con diferentes mezclas de disolventes, en una razón muestra:disolvente = 1:3 (v/v) y centrifugando durante 10 min a 14500 rpm cada vez. Estas mezclas fueron, de menor a mayor polaridad: i) n-hexano:metil-terc-butil-éter (MTBE) (50:50, v:v); ii) MTBE:éter de petróleo (EP) (50:50, v:v); iii) EP:etanol (1:0,6, v:v).

Al final de cada extracción, se recolectó la fase orgánica superior que contenía los componentes lipídicos, se dejó sedimentar durante 2 h con sulfato de sodio anhidro (Sigma-Aldrich) para asegurar la eliminación de posibles trazas de agua de la muestra y se evaporó el disolvente bajo una corriente de nitrógeno a 40°C hasta obtener un residuo que

tenía un peso constante. A continuación, los residuos se diluyeron en cloroformo hasta una concentración final de 20 MAG/ml y se analizaron por LC-ELSD.

Los análisis de LC-ELSD se realizaron usando un cromatógrafo de líquidos serie 1200 de Agilent Technologies (Santa Clara, CA, EE.UU.) acoplado a un detector ELSD (Agilent 1260 Infinity). Las condiciones del ELSD fueron 2×10^5 Pa, 50°C, y ganancia de 4 que se ajustó para poder cuantificar con exactitud los compuestos minoritarios. Las separaciones cromatográficas se llevaron a cabo en una columna Agilent Poroshell 120 (Sil 2.7 μ m, 4.6 x 100 mm), a 35°C, una velocidad de flujo de 2 ml/min y mezclando tres eluyentes (A, el 100% de isooctano; B, el 0,02% (v/v) de ácido fórmico en isooctano:MTBE (50:50, v/v); y C, MTBE:propan-2-ol (50:50, v/v)) para formar un gradiente ternario previamente descrito por Torres *et al.* (2005). El volumen de inyección fue de 1 μ l.

3- Determinación de la bioaccesibilidad *in vitro*

3.1 Separación de fases

Con el fin de separar la fracción lipídica no digerida de los productos lipídicos incorporados en estructuras micelares durante el proceso de digestión intestinal *in vitro*, el producto final de digestión se centrifugó a 4000 rpm, a 37°C durante 40 minutos, de acuerdo con el protocolo llevado a cabo por Soler-Rivas *et al.* (2010). Tras la centrifugación, el medio de digestión se separó en 3 fases claramente diferenciadas: una fase superior, denominada fase oleosa (FO), compuesta por la fracción de la muestra lipídica que no se ha digerido y parte del extracto de romero. En condiciones *in vivo* esta fase sería secretada con las heces o transformada por la microbiota del colon; una fase acuosa intermedia, denominada fase micelar (FM), en la que puede encontrarse la fracción lipídica digerida formando estructuras micelares y vesículas con el extracto de romero incorporado. Ésta es la fracción bioaccesible, es decir, la fracción disponible para ser absorbida por las células del epitelio intestinal; y una fase inferior insoluble, que es muy minoritaria, denominada fase precipitado (FP), constituida por residuos de sales y jabones de ácidos grasos liberados durante la digestión pancreática (5).

Una vez separadas las fases, se llevó a cabo la extracción lipídica, la preparación de la muestra y el análisis por LC-ELSD tal y como se ha explicado en la sección anterior.

3.2 Medición de los polifenoles totales

El contenido en polifenoles totales de la fracción bioaccesible del ESR suministrado en el sistema PG se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (6). Brevemente, 10 μ l de muestra se mezclaron con 150 μ l de la disolución de Folin-Ciocalteu y se dejó durante 3 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 μ l de una disolución de bicarbonato de sodio (3%). Finalmente, tras 2 horas de incubación a 37°C en oscuridad, se midió la absorbancia a 735 nm usando un espectrofotómetro (Genesis 10 UV Scanning, Thermo Scientific). Como patrones se usaron el propio extracto de romero y ácido rosmarínico a diferentes concentraciones (0.2 – 2 MAG/ml).

4- Estudio *in vitro* de la actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa *in vitro* de las fases micelares (bioaccesibles) obtenidas tras la digestión de las formulaciones PG+4% de ESR, PG+9% de ESR y PG+16% de ESR se evaluó en modelos celulares de cáncer de colon humano.

4.1 Cultivos celulares

Se cultivaron células de cáncer de colon humano de la línea SW620 en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, 2 mM de glutamina y un 1% de una disolución antibiótica-antimicótica, que contenía 10000 unidades/ml de penicilina base, 10000 μ g/ml de estreptomycin base y 25000 ng/ml de amfotericina B. Se mantuvo el cultivo celular en condiciones estándar de temperatura (37°C), de humedad (95%) y de dióxido de carbono (5%).

4.2 Ensayo de viabilidad celular

Para medir la actividad antiproliferativa de los productos de digestión se utilizó el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para ello se transfirieron las células en fase exponencial de crecimiento a placas de 24 pocillos, incorporándose un promedio de 25000 células por pocillo en un volumen final de 200 μ l. Después de 2 h de incubación a 37°C, se reemplazó el medio de cultivo por medio que contenía la fracción bioaccesible (FM) de cada uno de los productos ensayados (PG+4% de ESR, PG+9% de ESR y PG+16% de ESR), diluida en medio de cultivo DMEM a diferentes concentraciones (0-11,5 FM μ l/ml). La viabilidad celular se determinó tanto en el momento del tratamiento, para tener un control de la población celular de partida, y tras 48 h de incubación de la placa a 37°C, para determinar el efecto del producto sobre el crecimiento celular. Para determinar el número de células viables, se añadieron 20 μ l de disolución MTT (5 MAG/ml en FBS) a cada pocillo. A continuación, la placa se dejó incubar durante 3 h para que el formazán (metabolito azul del MTT) se fije a las células viables. Tras la incubación, el medio se eliminó y se añadieron 200 μ l de DMSO (dimetilsulfóxido) para disociar las células y resuspender el formazán, cuya

concentración (medida a 560 nm con un lector de placas espectrofotométrico (UVM 340 Biochrom, CambriDAGE)) está directamente relacionada con el número de células viables. Los valores de concentración de cada uno de los productos correspondientes al CI50 (50% de viabilidad celular inhibida) se calcularon de acuerdo con las definiciones de la NIH utilizando la regresión logística, concepto que se describe como la relación entre la respuesta a un tratamiento con especialidades farmacéuticas y la dosis o concentración de dicha especialidad farmacéutica.

Ejemplo 3.

1- Digestión gastrointestinal *in vitro* del extracto supercrítico de romero (compuesto bioactivo) no suministrado en diferentes proporciones

Para la digestión gástrica, 120, 270 y 480 MAG de ESR comercial (cantidad equivalente a la presente en las formulaciones con un 4, 9 y 16% de ESR suministrado, respectivamente) se mezclaron con 600 MAG de fosfolípidos (PL) (Phospholipon 90H), para simular los PL procedentes de la dieta, y 16,4 ml de una disolución de simulación gástrica (NaCl 0,15 M a pH 2,5, SGF). El pH se ajustó a 2,5 con HCl 1 M. El medio preparado se emulsionó previamente mediante homogenización a 3500 rpm durante 2 min y se controló la temperatura a 37°C y agitación continua a 200 rpm en un agitador orbital (IKA KS 4000 ic Control, Staufen, Alemania). A continuación, se añadió una disolución que contenía pepsina de origen porcino (EC 3.4.23.1, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania) al 16% (p/v) en SGF (pH 2,5) (actividad 3.300 U/MAG de proteína) en una proporción de enzima:sustrato de 1:12 (p:p) y se incubó a 37°C durante 1 h.

Para la digestión intestinal, 6 ml del digerido gástrico se mezclaron con 26 ml de tampón trizma-maleato 0,1 M y pH 7,5. El medio preparado se emulsionó previamente mediante homogeneización a 3500 rpm durante 2 min.

Por otro lado, se preparó una disolución con una composición similar a la secreción biliar. Para ello, se mezclaron 200 MAG de fosfatidilcolina de yema de huevo (Lipoid, Ludwigshafen, Alemania), 500 MAG de sales biliares, 40 MAG de colesterol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Alemania), 1 ml de CaCl₂ 325 mM, 3 ml de NaCl 3,25 M (Panreac Química S.A.U, Barcelona, España) y 20 ml del tampón trizma-maleato, y se homogeneizó todo a 3500 rpm durante 2 min. Posteriormente, la muestra emulsionada previamente y la secreción biliar simulada se mezclaron y homogeneizaron juntos a 3500 rpm durante 2 min y toda se transfirió a un vaso con su temperatura regulada a 37°C con agitación continua a 1000 rpm. La digestión intestinal comenzó con la adición de extracto recién preparado de pancreatina de origen porcino que se preparó del siguiente modo: 1,167 g de pancreatina disuelto en 7 ml de tampón trizma-maleato, posteriormente agitado durante 10 min y centrifugado a 1600 x g a 5°C durante 15 min. 6 ml de sobrenadante acuoso obtenido se añadió al medio de reacción junto con 10 MAG de fosfolipasa A2 (Nagase Enzymes) y se incubó a 37°C durante 60 min.

2- Determinación de la bioaccesibilidad *in vitro*

2.1 Separación de fases

Con el fin de separar la fracción bioaccesible de ESR, de la fracción no bioaccesible, debido a degradación o precipitación durante el proceso digestivo, el producto final de digestión se centrifugó a 4000 rpm, a 37°C durante 40 minutos, de acuerdo con el protocolo llevado a cabo por Soler-Rivas *et al.* (2010).

2.2 Medición de los polifenoles totales

El contenido en polifenoles totales de la fracción bioaccesible del ESR no suministrado se determinó mediante el método de Folin-Ciocalteu (6). Brevemente, 10 µl de muestra se mezclaron con 150 µl de la disolución de Folin-Ciocalteu y se dejó durante 3 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 50 µl de una disolución de bicarbonato de sodio (3%). Finalmente, tras 2 horas de incubación a 37°C en oscuridad, se midió la absorbancia a 735 nm usando un espectrofotómetro (Genesis 10 UV Scanning, Thermo Scientific). Como patrones se usaron el propio extracto de romero y ácido rosmarínico a diferentes concentraciones (0.2 – 2 MAG/ml).

3- Estudio *in vitro* de la actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa *in vitro* de las fases micelares (bioaccesibles) obtenidas tras la digestión del ESR no suministrado se evaluó en modelos celulares de cáncer de colon humano.

3.1 Cultivos celulares

Se cultivaron células de cáncer de colon humano de la línea SW620 en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, 2 mM de glutamina y un 1% de una disolución antibiótica-antimicótica, que contenía 10000 unidades/ml de penicilina base, 10000 µg/ml de estreptomycin base y 25000 ng/ml de amfotericina B. Se mantuvo el cultivo celular en condiciones estándar de temperatura (37°C), de humedad (95%) y de dióxido de carbono (5%).

3.2 Ensayo de viabilidad celular

Para medir la actividad antiproliferativa de los productos de digestión se utilizó el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para ello se transfirieron las células en fase exponencial de crecimiento a placas de 24 pocillos, incorporándose un promedio de 25000 células por pocillo en un volumen final de 200 µl. Después de 2 h de incubación a 37°C, se reemplazó el medio de cultivo por medio que contenía la fracción bioaccesible (FM) de cada uno de los productos ensayados (4% de ESR, 9% de ESR y 16% de ESR no suministrado), diluida en medio de cultivo DMEM a diferentes concentraciones (0-11,5 FM µl/ml). La viabilidad celular se determinó tanto en el momento del tratamiento, para tener un control de la población celular de partida, y tras 48 h de incubación de la placa a 37°C, para determinar el efecto del producto sobre el crecimiento celular. Para determinar el número de células viables, se añadieron 20 µl de disolución MTT (5MAG/ml en FBS) a cada pocillo. A continuación, la placa se dejó incubar durante 3 h para que el formazán (metabolito azul del MTT) se fije a las células viables. Tras la incubación, el medio se eliminó y se añadieron 200 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) para disociar las células y resuspender el formazán, cuya concentración (medida a 560 nm con un lector de placas espectrofotométrico (UVM 340 Biochrom, CambriDAGE)) está directamente relacionada con el número de células viables. Los valores de concentración de cada uno de los productos correspondientes al CI50 (50% de viabilidad celular inhibida) se calcularon de acuerdo con las definiciones de la NIH utilizando la regresión logística, concepto que se describe como la relación entre la respuesta a un tratamiento con especialidades farmacéuticas y la dosis o concentración de dicha especialidad farmacéutica.

Ejemplo 4.

1- Estudio *in vitro* de la actividad antiproliferativa del extracto supercrítico de romero no suministrado y no digerido

La actividad antiproliferativa *in vitro* del ESR no suministrado y no digerido se evaluó en modelos celulares de cáncer de colon humano.

1.1 Cultivos celulares

Se cultivaron células de cáncer de colon humano de la línea SW620 en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS, 2 mM de glutamina y un 1% de una disolución antibiótica-antimicótica, que contenía 10000 unidades/ml de penicilina base, 10000 µg/ml de estreptomicina base y 25000 ng/ml de amfotericina B. Se mantuvo el cultivo celular en condiciones estándar de temperatura (37°C), de humedad (95%) y de dióxido de carbono (5%).

1.2 Ensayo de viabilidad celular

Para medir la actividad antiproliferativa de los productos de digestión se utilizó el método MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para ello se transfirieron las células en fase exponencial de crecimiento a placas de 24 pocillos, incorporándose un promedio de 25000 células por pocillo en un volumen final de 200 µl. Después de 2 h de incubación a 37°C, se reemplazó el medio de cultivo por medio que contenía el ESR a diferentes concentraciones (0-100 µg/ml). La viabilidad celular se determinó tanto en el momento del tratamiento, para tener un control de la población celular de partida, y tras 48 h de incubación de la placa a 37°C, para determinar el efecto del producto sobre el crecimiento celular. Para determinar el número de células viables, se añadieron 20 µl de disolución MTT (5MAG/ml en FBS) a cada pocillo. A continuación, la placa se dejó incubar durante 3 h para que el formazán (metabolito azul del MTT) se fije a las células viables. Tras la incubación, el medio se eliminó y se añadieron 200 µl de DMSO (dimetilsulfóxido) para disociar las células y resuspender el formazán, cuya concentración (medida a 560 nm con un lector de placas espectrofotométrico (UVM 340 Biochrom, CambriDAGE)) está directamente relacionada con el número de células viables. Los valores de concentración de cada uno de los productos correspondientes al CI50 (50% de viabilidad celular inhibida) se calcularon de acuerdo con las definiciones de la NIH utilizando la regresión logística, concepto que se describe como la relación entre la respuesta a un tratamiento con especialidades farmacéuticas y la dosis o concentración de dicha especialidad farmacéutica.

Ejemplo 5.

1. Evaluación *in vitro* de la digestión gastrointestinal (GTI)

El modelo de digestión GTI *in vitro* empleado consiste en dos fases consecutivas, una gástrica (pH 2,5, 37°C, 1 h en presencia de pepsina) y una intestinal (pH 7,4, 37°C, 1 h en presencia de pancreatina). En la presente invención, la fase gástrica se usó no tanto para digerir el lípido portador, sino para estudiar el efecto del pH ácido y el medio acuoso del estómago sobre la estabilidad del componente o fármaco suministrado. En cuanto a la fase intestinal, con el fin de reproducir los resultados fisiológicos observados en la bibliografía en cuanto al grado de hidrólisis y nivel de especies lipídicas generadas [Hofmann y Borgstrom, 1964], las condiciones empleadas durante esta etapa (razón enzima/sustrato, razón lecitina/sales biliares, tiempo de digestión, pH y composición mineral de los fluidos digestivos) simulan las condiciones fisiológica durante la digestión intestinal de lípidos.

El comportamiento de cada uno de los sistemas lipídicos durante el proceso de digestión depende de su composición

lipídica inicial y va a determinar en gran medida su comportamiento como vehículo lipídico, así como su bioaccesibilidad y, por tanto, su bioactividad.

La digestibilidad de cada uno de los sistemas lipídicos y formulaciones con ESR (véanse los ejemplos 1 a 4) de la invención se evaluó mediante la determinación de la hidrólisis del DAGE y TAG y la formación de los productos de hidrólisis (ácido graso libre (FFA), DAG, MAGE y MAG) durante el proceso de digestión. Para ello, en primer lugar, se llevó a cabo la extracción lipídica de cada una de las alícuotas recogidas durante la digestión y, posteriormente, la caracterización exhaustiva de su composición por LC-ELSD.

Debido a la ausencia de lipasa en el medio de digestión, durante la fase gástrica el perfil lipídico no cambió con respecto al inicial. Sin embargo, durante la fase intestinal, los lípidos son hidrolizados fundamentalmente por acción de la lipasa pancreática, de modo que los digeridos presentan una composición lipídica diferente de la composición lipídica inicial.

La figura 2 muestra la composición de la mezcla lipídica de los productos finales de la digestión del RLO original (figura 2A), RLO + MO (figura 2B) y PG (figura 2C). En todos los casos, los TAG se hidrolizaron completamente, mientras que al final del proceso de digestión, aún se detectaban DAGE sin hidrolizar. Por tanto, tal como se observa en la figura 2, el mayor grado de hidrólisis de DAGE y de formación de FFA, DAG, MAGE y MAG se observó para el PG, seguido por el sistema RLO+MO. El RLO original, con el mayor contenido inicial en DAGE, fue el menos digerible de todos los sistemas estudiados. Estos resultados indican, además, que la presencia de un agente emulsionante en el medio favorece la digestión. De este modo lípidos con carácter emulsionante, tal como MAG, mejoran la dispersión de los lípidos al inicio de la digestión en comparación con los TAG y DAGE, lo cual puede favorecer tanto una mejor hidrólisis, así como una mayor formación de estructuras micelares, donde pueden incluirse más fácilmente los productos de la digestión. Asimismo, es de destacar el mayor porcentaje de AKG libre (no esterificado) del producto final de digestión del PG respecto al porcentaje de los digeridos del sistema RLO+MO y RLO original. Éste puede atribuirse al mayor contenido inicial en MAGE del PG, el cual se hidroliza preferiblemente antes que el DAGE para dar AKG libre.

En cuanto a la digestión de las formulaciones con romero, la presencia de un 4% (p/p) y un 9% (p/p) de ESR no cambió la digestión del vehículo lipídico (PG y RLO + MO), ya que no se observaron diferencias significativas con respecto a los sistemas sin romero. Sin embargo, en las formulaciones con un 16% de ESR, la digestibilidad de la fracción lipídica es significativamente menor (menor grado de hidrólisis del DAGE y menor formación de FFA, MAGE, DAG y MAG). Esto se debe a la inhibición de la lipasa pancreática en presencia de una proporción elevada de extracto de romero.

2. Determinación de la bioaccesibilidad *in vitro*

Previo al estudio de la bioaccesibilidad, los productos finales de la digestión se centrifugaron a 4000 rpm y 37°C durante 40 minutos. Tras la centrifugación, el medio de digestión se separó en 3 fases claramente diferenciadas: una fase superior, denominada fase oleosa (FO), compuesta por la fracción de la muestra lipídica que no se ha digerido y parte del extracto de romero. En condiciones *in vivo* esta fase sería secretada con las heces o transformada por la microbiota del colon; una fase inferior insoluble, que es muy minoritaria, denominada fase precipitado (FP), que consiste en residuos de sales y jabones de ácidos grasos liberados durante la digestión pancreática; y una fase acuosa intermedia, denominada fase micelar (FM), en la que puede encontrarse la fracción lipídica digerida por la lipasa pancreática y emulsionada con las sales biliares y fosfolípidos secretados por la vesícula biliar, formando estructuras micelares y vesículas (junto con el ESR incorporado, en el caso de las formulaciones con extracto). Ésta es la fracción bioaccesible, es decir, la fracción disponible para ser absorbida por las células del epitelio intestinal.

La bioaccesibilidad de los sistemas lipídicos de la invención (RLO, RLO+MO y PG), formulaciones con el ESR incorporado (RLO+MO+ESR y PG+ESR) y ESR no suministrado se evaluó por LC-ELSD mediante la caracterización de la fracción de fase micelar o bioaccesible de cada uno de ellos. Tal como se muestra en la figura 3, en general, la fase micelar (FM) o bioaccesible, fundamentalmente constituida por los productos de digestión (FFA, MAGE, DAG y MAG), es generalmente la fase principal para todos los digeridos estudiados. Sin embargo, de acuerdo con los resultados derivados del estudio de digestibilidad, la fase micelar es particularmente abundante en el producto final de digestión del PG, en el que un aproximadamente el 98,5% (p/p) de la fracción lipídica se encuentra en forma de micelas mixtas o vesículas, indicando que prácticamente todos los productos liberados de la hidrólisis del PG son potencialmente bioaccesibles. El sistema RLO+MO y, especialmente, el RLO original son significativamente menos bioaccesibles que el PG, ya que sólo aproximadamente el 75 y el 54% (p/p), respectivamente, de la fracción lipídica se encuentra en la FM, mientras que aproximadamente el 22 y el 41% (p/p), respectivamente, forma parte de la fase oleosa, fundamentalmente constituida por DAGE y MAGE no digeridos. Cabe destacar que en el PG digerido, el MAGE se encuentra mayoritariamente en forma micelar y, por tanto, bioaccesible. Asimismo, es también importante resaltar el elevado porcentaje de AKG libre (aproximadamente el 7,5%, p/p) en la FM del PG digerido en comparación con el de la FM del sistema RLO+MO (aproximadamente 1%, p/p) y RLO original (aproximadamente 0,7%, p/p) (figura 4). Ambos, el MAGE y, especialmente, el AKG libre, son potencialmente más bioactivos que el DAGE, de acuerdo con diversos estudios llevados a cabo previamente con cultivos de células de cáncer de colon.

En base a los resultados de digestibilidad y bioaccesibilidad, se decidió descartar el RLO original como vehículo

potencialmente eficaz del ESR. Esta es la razón por la que en la presente invención sólo se obtienen formulaciones de ESR con los sistemas lipídicos PG (PG+ESR) y RLO + MO (RLO+MO+ESR). La incorporación de un 4% (p/p) y un 9% (p/p) de ESR no afecta significativamente a la bioaccesibilidad de la fracción lipídica, observándose una distribución de fases (FO, FM y FP) y una composición lipídica de cada una de ellas similar a la de los sistemas PG y RLO+MO sin ESR (figura 4). Sin embargo, en las formulaciones con un 16% de ESR, la fracción lipídica es claramente menos bioaccesible que en los sistemas sin ESR, observándose un mayor porcentaje de compuestos lipídicos en fase oleosa y una reducción importante de la FM. Estos resultados están de acuerdo con la reducción de digestibilidad lipídica observada anteriormente en estas formulaciones como consecuencia del elevado porcentaje de ESR.

La bioaccesibilidad del ESR en las formulaciones PG+ESR y RLO+MO+ESR, así como del ESR no suministrado, se evaluó mediante la determinación de los polifenoles totales en la FM de acuerdo con el método de Folin-Ciocalteu. El ESR no suministrado presenta una bioaccesibilidad a nivel intestinal relativamente baja, ya que sólo se detecta aproximadamente un 39% en FM respecto al contenido inicial, antes de la digestión. Tal como se comentó anteriormente, esto puede atribuirse a la degradación o precipitación del extracto durante la fase de digestión gástrica. Con ambos vehículos lipídicos (PG y RLO+MO), sin embargo, la bioaccesibilidad del ESR mejora significativamente con respecto a la del extracto que no se suministra, especialmente con el PG, ya que las formulaciones de PG+ESR muestran en FM aproximadamente un 91% de ESR respecto al contenido inicial (en comparación con el 84% observado en FM cuando el RLO+MO es el vehículo lipídico).

3. Estudio *in vitro* de la actividad antiproliferativa

La actividad antiproliferativa de los sistemas lipídicos de la invención (RLO, RLO+MO y PG), formulaciones con el ESR incorporado (RLO+MO+ESR y PG+ESR) y ESR no suministrado (digerido y no digerido) se evaluó en cultivos de células humanas de cáncer de colon (línea SW620) mediante el método del MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). Para ello, las células se trataron con las fracciones bioaccesibles (FM) de los sistemas lipídicos, formulaciones con ESR y ESR no suministrado, diluidas en medio de cultivo DMEM a diferentes concentraciones (0-11,5 µl de FM/ml). En el caso del ESR no digerido y no suministrado, las células se trataron con diferentes concentraciones del extracto en DMSO (0-100 µg/ml). La viabilidad celular se determinó en el momento del tratamiento, para tener un control de la población celular de partida, y tras 48 h de incubación a 37°C, para determinar el efecto del producto sobre el crecimiento celular. El parámetro utilizado para estimar la actividad antiproliferativa de los productos fue la CI50 (50% de viabilidad celular inhibida), el cual se describe como la relación entre la respuesta a un tratamiento con especialidades farmacéuticas y la dosis o concentración de dicha especialidad farmacéutica. Para poder validar los resultados, se llevaron a cabo tres experimentos independientes al menos por triplicado (n = 9).

La tabla 3 muestra los valores de CI50 (concentración de FM (µl/ml) que inhibe la viabilidad celular un 50%) de todos los productos ensayados.

Tabla 3

		CI50 (µl de FM/ ml)
Vehículos lipídicos	RLO original	5,07 ± 0,09
	RLO + MO	4,75 ± 0,26
	PG	2,10 ± 0,02
Formulaciones con ESR	RLO+MO+4% de ESR	4,73 ± 0,07
	RLO+MO+9% de ESR	4,21 ± 0,29
	PG + 4% de ESR	2,15 ± 0,12
	PG + 9% de ESR	0,92 ± 0,10
	PG + 16% de ESR	2,03 ± 0,08
ESR no suministrado	9% de ESR digerido	n.a*
	ESR no digerido	42,33 ± 0,22**

*n.a = CI50 no alcanzada.

**CI50 = µg/ml de ESR no suministrado y no digerido que inhibe la viabilidad celular un 50%.

El PG mostró una CI50 significativamente menor que la del RLO original y el sistema RLO+MO. Tales resultados indican un mayor efecto antiproliferativo de la fracción bioaccesible del PG, lo cual está directamente relacionado con

la mayor bioaccesibilidad observada para el PG y, consecuentemente, al mayor porcentaje de alquilgliceroles bioactivos totales (AKG_t) y, fundamentalmente, de AKG libre, en forma micelar o bioaccesible (figura 4). Es importante también destacar que, en el caso el sistema RLO+MO, la adición de MO al RLO supone una dilución en el contenido total de alquilgliceroles, lo cual puede estar relacionado con el menor efecto antiproliferativo observado.

La viabilidad de las células tratadas con las formulaciones con un 4% de ESR (PG+4% de ESR y RLO+MO+4% de ESR) es similar a la de los sistemas lipídicos por separado, no observándose diferencias significativas en los valores de CI50 (tabla 1).

De especial interés son, sin embargo, los resultados observados para las formulaciones con un 9% de ESR (PG+9% de ESR y RLO+MO+9% de ESR), las cuales muestran un valor de CI50 inferior al de los sistemas lipídicos por separado, siendo esto particularmente significativo en el caso de la formulación PG+9% de ESR (tabla 1). La fracción bioaccesible del ESR no suministrado (con una cantidad de ESR inicial similar a la de las formulaciones con un 9% de ESR suministrado) no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular (no se alcanza la CI50 para ninguna de las concentraciones de FM aplicadas) como resultado de su reducida bioaccesibilidad a nivel intestinal (sólo un 39% del contenido inicial). En base a esto, los resultados obtenidos indican que el suministro de un 9% de ESR con los sistemas RLO+MO y, particularmente, PG, aumenta eficientemente la estabilidad del ESR durante la digestión y, consecuentemente, su bioaccesibilidad a nivel intestinal y su efecto antiproliferativo.

Además, en el caso de la formulación PG+9% de ESR, el contenido en principios bioactivos (AKG y ESR) de la FM a la concentración necesaria para alcanzar la CI50 (AKG_t 50,23 µM y 3,14 µg/ml de ESR) es menor que para el PG (AKG_t 124,54 µM) y el ESR no suministrado y no digerido (CI50 ~ 40 µg/ml) por separado, indicando un efecto sinérgico entre el vehículo lipídico y el ESR suministrado.

Finalmente, la incorporación de un 16% de ESR al PG no da lugar a un aumento del efecto antiproliferativo, debido a que la digestibilidad y bioaccesibilidad de la fracción lipídica en esta formulación se encuentran comprometidas como consecuencia de la elevada proporción de ESR, observándose un menor contenido de alquilgliceroles bioactivos en la FM.

Ejemplo 6. Estudio de la actividad antiproliferativa *in vitro* sobre células humanas de cáncer de páncreas

La actividad antiproliferativa de los sistemas lipídicos (RLO, RLO+MO y PG), formulaciones con ESR incorporado (RLO+MO+9% de ESR y PG+9% de ESR) y ESR no suministrado (digerido y no digerido) se evaluó en cultivos de células humanas de cáncer de páncreas (línea MiaPaca-2) mediante el método MTT.

Se realizaron 3 experimentos independientes con diferentes cepas celulares y en diferentes días. La tendencia observada en cuanto al efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular fue similar en los 3 experimentos.

Entre los sistemas lipídicos estudiados, el PG mostró un efecto mayor a concentraciones menores sobre la viabilidad celular en comparación con el RLO original y el RLO+MO. En cuanto a las formulaciones con ESR, mientras que el efecto de RLO+MO+9% de ESR sobre la viabilidad celular fue similar al observado con el sistema RLO+MO sin romero, la formulación PG+9% de ESR inhibió la viabilidad celular de forma más eficaz que el PG sin ESR. La viabilidad de las células tratadas con un 1% de ciclopentanona no cambió de modo que puede asumirse que la inhibición de la viabilidad celular por el PG y PG+9% de ESR se debía a los principios bioactivos de los tratamientos.

El parámetro empleado para valorar el efecto sobre la viabilidad celular de un compuesto es la concentración inhibitoria media (CI50), que es la concentración de producto que inhibe la viabilidad celular un 50%. De modo que cuanto menor es la CI50 de un compuesto, mayor será su efecto. Los dos tratamientos con menor valor de CI50 y, por tanto, más efectivos, fueron el PG y PG+9% de ESR. El RLO original y RLO+MO con y sin ESR mostraron valores CI50 significativamente mayores y el ESR no suministrado no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular (no inhibió el 50% de la viabilidad a ninguna de las concentraciones estudiadas).

El mayor efecto antiproliferativo del PG con respecto a los otros dos sistemas lipídicos estudiados es probablemente debido a su mayor digestibilidad y bioaccesibilidad y, consecuentemente, al mayor porcentaje de AKG bioactivos totales (AKG_t) y, fundamentalmente, de AKG libre, en forma micelar o bioaccesible. Es importante destacar que, en el caso el sistema RLO+MO, la adición de MO al RLO supone una dilución en el contenido total de AKG, lo cual puede estar relacionado con el menor efecto antiproliferativo observado en comparación con el efecto del PG.

Respecto a la formulación PG+9% de ESR, el valor tan bajo de CI50 observado sugiere un efecto sinérgico entre los principios activos de ambos componentes.

La fracción bioaccesible del ESR digerido no suministrado (con una cantidad de ESR inicial similar a la de las formulaciones de PG con un 9% de ESR) no tuvo ningún efecto sobre la viabilidad celular (no se alcanza la CI50 para ninguna de las concentraciones de FM aplicadas). Esto se debe a la reducida bioaccesibilidad a nivel intestinal del romero no suministrado (sólo un 39% del contenido inicial). En base a esto, los resultados obtenidos indican que el suministro de un 9% de ESR con el PG, aumenta eficientemente la estabilidad del ESR durante la digestión y,

consecuentemente, su bioaccesibilidad a nivel intestinal y su efecto antiproliferativo.

La tabla 4 muestra los valores de CI₅₀ (concentración de FM (μl/ml) que inhibe la viabilidad celular un 50%) de todos los productos ensayados.

Tabla 4

		CI ₅₀ (μl de FM/ ml)
Vehículos lipídicos	RLO original	9,20 ± 0,04
	RLO + MO	7,60 ± 0,09
	PG	5,50 ± 0,76
Formulaciones con ESR	RLO+MO+9% de ESR	5,18 ± 0,68
	PG + 9% de ESR	3,75 ± 0,19
ESR no suministrado	9% de ESR digerido	n.a*
	ESR no digerido	48,69 ± 0,88**
*n.a = CI ₅₀ no alcanzada.		
**CI ₅₀ = μg/ml de ESR no suministrado y no digerido que inhibe la viabilidad celular un 50%.		

Ejemplo 7.- Complemento inmunomodulador (potenciador de la respuesta innata)

7.1. Metodología

Se realizó un estudio aleatorizado, con doble enmascaramiento y paralelo de 8 semanas de duración en el que se incluyeron a 57 voluntarios sanos (siendo el 58,6% mujeres) y con una edad media de 27,9±10,1 años, de los cuáles 30 pertenecieron al grupo de estudio y 27 al grupo control.

Los participantes consumieron una cápsula junto a la comida o cena. Las cápsulas de gelatina blanda, contenían alquilglicerol, extracto de romero y monoestearina de las siguientes características:

- RLO: aceite de hígado de tiburón con el 20% de alquilglicerol (Gustav Heess): 750 mg (aportando 150 mg de alquilglicerol)
- ESR: extracto antioxidante de romero, el 25% de diterpenofenoles, tipo n.º 027.020 (*Rosmarinus officinalis* L.) 45 mg (aportando 11,25 mg de diterpenofenoles)
- ME: monoestearato de glicerilo de calidad alimentaria.

Composición: el 91,2% de RLO + el 5,2% de ESR + el 3,6% de ME

Tras la extracción sanguínea se realizó el aislamiento de PBMC que luego se cultivaron con LPS para la medición de citocinas en sobrenadante en los que se midieron los niveles de IL1β; IL 2, 4, 5, 6, 8, 10, IFNγ, TNFα, empleando para ello el kit Human High Sensitivity T Cell Magnetic Bead Panel y efectuando las lecturas con el equipo MagPix.

También se realizó el recuento de las CD (agrupaciones de diferenciación) para las agrupaciones de diferenciación CD3+, CD4+, CD8+, CD14+, CD16+, CD56+ sobre CD45+, empleando para ello kits y anticuerpos específicos para citometría de flujo.

Como parámetros de seguridad y seguimiento se evaluaron en la visita inicial, intermedia y final los niveles de urea, creatinina, enzimas hepáticas GOT/GPT/GGT, bilirrubina y FA, además del control antropométrico, el control de constantes vitales y el registro de tolerancia y efectos adversos.

La influencia inmunomoduladora del tratamiento se evaluó generando una matriz de correlaciones bivariadas (análisis de componentes principales) con el propósito de revelar la correlación biológica entre las concentraciones plasmáticas de citocinas, producidas por células mononucleares aisladas de sangre periférica, y la respuesta inmunitaria (Th1, respuesta efectora y Th2, respuesta de tolerancia).

7.2. Resultados

Tal como se muestra en la figura 5 que ilustra el perfil de citocinas de células mononucleares estimuladas *in vitro*, el análisis de componentes principales indica una tendencia a la disminución de IL4, y aumento moderado de IL10 e IFN γ asociados al complemento nutricional descrito en detalle en la metodología que refleja por un lado una adecuada respuesta de activación y tolerancia de la respuesta inmunitaria innata con polarización intermedia de macrófagos M1/M2 y un perfil de citocinas que favorece la maduración de células efectoras (monocitos con actividad fagocítica, linfocitos citolíticos naturales con actividad citotóxica).

Adicionalmente, el fenotipado (marcadores de diferenciación CD) de la población leucocitaria muestra un aumento (24%) en la población leucocitaria (CD45⁺) posiblemente derivado de la utilización del extracto de romero ESR, que no se observa en otros estudios con la administración independiente de RLO (Palmieri B, Penneli A, Di Cerbo A. Jurassic surgery and immunity enhancement by alkylglycerols of shark liver oil. *Lipids in Health and Disease* 2014, 13:178). Este aumento se asocia con cambios significativos en los marcadores de poblaciones efectoras maduras: monocitos (con una diferenciación funcional hacia una mayor actividad fagocítica) y linfocitos citolíticos naturales (con actividad citotóxica potencial frente a células tumorales).

Por otro lado, la combinación del aumento de IL-10 y la reducción de IL-4 sugiere la ausencia de expansión de células T reguladoras y un estado funcional más maduro de dichas células T (y por tanto alejado del estado inmaduro asociado a procesos protumorales) (figura 6).

En resumen, la tendencia resultante en el perfil de citocinas y fenotipado leucocitario refleja un ambiente antiinflamatorio favorable hacia la polarización del sistema inmunitario innato a células efectoras de tipo: monocitos no clásicos y linfocitos citolíticos naturales, con capacidad fagocítica y actividad citotóxica preventiva del desarrollo tumoral. Por tanto, el análisis de los parámetros inmunitarios (citocinas y fenotipado leucocitario) en los voluntarios que han tomado el complemento nutricional durante 8 semanas, indica una influencia positiva inmunonutricional consistente en:

- activación y tolerancia de la respuesta inmunitaria innata.
- polarización intermedia de la respuesta inmunitaria hacia células efectoras con actividad fagocítica (monocitos) y citotóxica (linfocitos citolíticos naturales).
- producción de un perfil de citocinas con actividad antiinflamatoria y antitumoral.

Estos resultados son sorprendentes dado que otros estudios que se han realizado sólo con alquilglicerol, han mostrado únicamente una estimulación y activación de la respuesta adaptativa. Sin embargo, en el presente estudio donde los alquilglicerol se complementan con ESR, se observa una clara estimulación de la respuesta innata junto a una polarización intermedia M1/M2, efecto único encontrado en este complemento, donde esta modulación de la respuesta innata es potencialmente efectiva tanto en cáncer como en trastornos del sistema inmunitario.

Por tanto, estos resultados sugieren el uso de este complemento como:

- * agente que previene el desarrollo de metástasis en pacientes con cáncer con tumores localizados
- * Agente que potencia la inmunoterapia en pacientes candidatos, en los que se requiere la activación de respuesta innata hacia la producción de células efectoras maduras con capacidad fagocítica -monocitos, linfocitos citolíticos naturales-, producción de citocinas con actividad antitumoral y maduración funcional de linfocitos T dirigidos hacia antígenos tumorales.
- * Agente que previene trastornos inmunitarios

Por otro lado, en los glóbulos sanguíneos de voluntarios que tomaron el complemento tal como se indica en la metodología durante 8 semanas se observó la disminución significativa del gen JAK1 (véase la figura 7).

JAK1 es una proteína tirosina cinasa esencial en la señalización de determinadas citocinas de tipo I y tipo II y transducción de señales de interferones IFN- $\alpha/\beta/\gamma$ y miembros de la familia IL10-R. Por tanto, su disminución tras la intervención nutricional podría atenuar la respuesta inflamatoria general (que es potencialmente útil en el acontecimiento de inflamación de bajo grado).

Por otro lado, la sobreexpresión en cáncer del gen JAK1 se ha asociado con la promoción de metástasis. En el contexto de cáncer, además, podría contribuir a frenar la progresión tumoral y metástasis, no sólo como resultado de su actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria, sino como resultado de su efecto específico sobre la inhibición de la ruta de JAK1.

El gen NFE2L2 también disminuyó su expresión de forma significativa en el grupo de tratamiento. Nrf2 es un factor de

transcripción asociado a la expresión de proteínas antioxidantes que reducen el estrés oxidativo frente a lesión e inflamación.

5 Además, se observó que el gen BMP2 también disminuyó su expresión de forma significativa en el grupo de tratamiento. BMP2 pertenece a la superfamilia de TNF y contribuye a la iniciación y desarrollo del cáncer de colon al promover el desarrollo de las CSC, reflejado en el aumento de marcadores de células pluripotentes (CD133+ y EpCAM+) junto al aumento de la resistencia a fármacos. Por tanto, una intervención capaz de disminuir los niveles circulantes de BMP2 puede contribuir a la disminución en el número de células madre promotoras de cáncer de colon.

10 Los estudios *in vitro* realizados con extracto de romero y RLO y ME en células tumorales humanas de cáncer de colon (SW620) validan el efecto específico del ESR en la disminución de la expresión de los genes JAK1, CHOKA y BMP2 (figura 8)

15 Por último, en los glóbulos sanguíneos de voluntarios que tomaron el complemento durante 8 semanas el extracto descrito en la metodología se observó una inhibición de CHKA, siendo CHKA la primera enzima de la ruta de Kennedy de biosíntesis de fosfatidilcolina, no sólo implicada en el proceso tumoral, sino también en la homeostasis metabólica, cuyas alteraciones se han visto asociadas con diferentes enfermedades metabólicas asociadas con el cáncer tal como la obesidad o síndrome metabólico (figura 7).

20

REIVINDICACIONES

1. Composición que comprende un extracto supercrítico de romero (ESR) y un sistema lipídico que a su vez comprende aceite de hígado de tiburón quimera (RLO) o el producto de un procedimiento de glicerolisis enzimática o química basado en aceite de hígado de tiburón quimera (RLO).
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición se caracteriza porque comprende aceite de hígado de tiburón quimera (RLO) y ESR.
3. Composición según la reivindicación 2, en la que dicha composición comprende además monoglicéridos, preferiblemente entre un 2 y un 30% p/p de monoglicéridos.
4. Composición según la reivindicación 3, en la que dichos monoglicéridos se seleccionan de la lista que consiste en monooleína (MO) y monoestearina (ME).
5. Composición según la reivindicación 4, en la que dicho monoglicérido es ME.
6. Composición según la reivindicación 5, en la que dicha composición comprende:
 - a. el 91,2% p/p de RLO,
 - b. el 5,2% p/p de ESR, y
 - c. el 3,6% p/p de ME.
7. Composición según la reivindicación 1, en la que el sistema lipídico es el producto de un procedimiento de glicerolisis enzimática o química a partir de aceite de hígado de tiburón quimera caracterizado porque comprende:
 - a. entre un 25% y un 35% (p/p) de monoglicéridos y/o alquilglicerol (DAGE); y
 - b. entre un 10% y un 25% (p/p) de éteres de diacilglicerol (DAGE); y
 - c. entre un 40% y un 60% (p/p) de éteres de monoacilglicerol (MAGE) y/o diacilglicerol (DAG), en la que la proporción de MAGE con respecto a la cantidad total de MAGE y DAG presentes en el sistema lipídico es de al menos el 50% (p/p).
8. Composición según la reivindicación 1, en la que el sistema lipídico es el producto de un procedimiento de glicerolisis enzimática o química basado en aceite de hígado de tiburón quimera caracterizado porque comprende:
 - a. entre un 25% y un 35% (p/p) de monoglicéridos y/o alquilglicerol (DAGE);
 - b. entre un 10% y un 25% (p/p) de éteres de diacilglicerol (DAGE);
 - c. entre un 0 y un 5% (p/p) de triglicéridos;
 - d. entre un 0 y un 3% de glicerina; y
 - e. entre un 40% y un 60% (p/p) de éteres de monoacilglicerol (MAGE) y/o diacilglicerol (DAG), en la que la proporción de MAGE con respecto a la cantidad total de MAGE y DAG presentes en el sistema lipídico es de al menos el 50% (p/p).
9. Composición según la reivindicación 1, en la que el sistema lipídico es el producto de un procedimiento de glicerolisis enzimática o química a partir de aceite de hígado de tiburón quimera caracterizado porque comprende:
 - a. entre un 28% y un 32% (p/p) de monoglicéridos y/o alquilglicerol (DAGE);
 - b. entre un 18% y un 22% (p/p) de éteres de diacilglicerol (DAGE);
 - c. entre un 0 y un 2% (p/p) de triglicéridos;
 - d. entre un 1% y un 3% de glicerina; y
 - e. entre un 40% y un 50% (p/p) de éteres de monoacilglicerol (MAGE) y/o diacilglicerol (DAG), en la

que la proporción de MAGE con respecto a la cantidad total de MAGE y DAG presentes en el sistema lipídico es de al menos el 50% (p/p).

- 5 10. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, para su uso como potenciadores de la inmunoterapia.
11. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 para su uso como vehículo farmacéuticamente aceptable o de calidad alimentaria para alimentos funcionales, productos nutracéuticos, extractos naturales o fármacos, preferiblemente fármacos anticancerígenos.
- 10 12. Composición alimenticia que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.
13. Composición farmacéutica que comprende la composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, y opcionalmente excipientes farmacéuticamente aceptables.
- 15

Figura 1

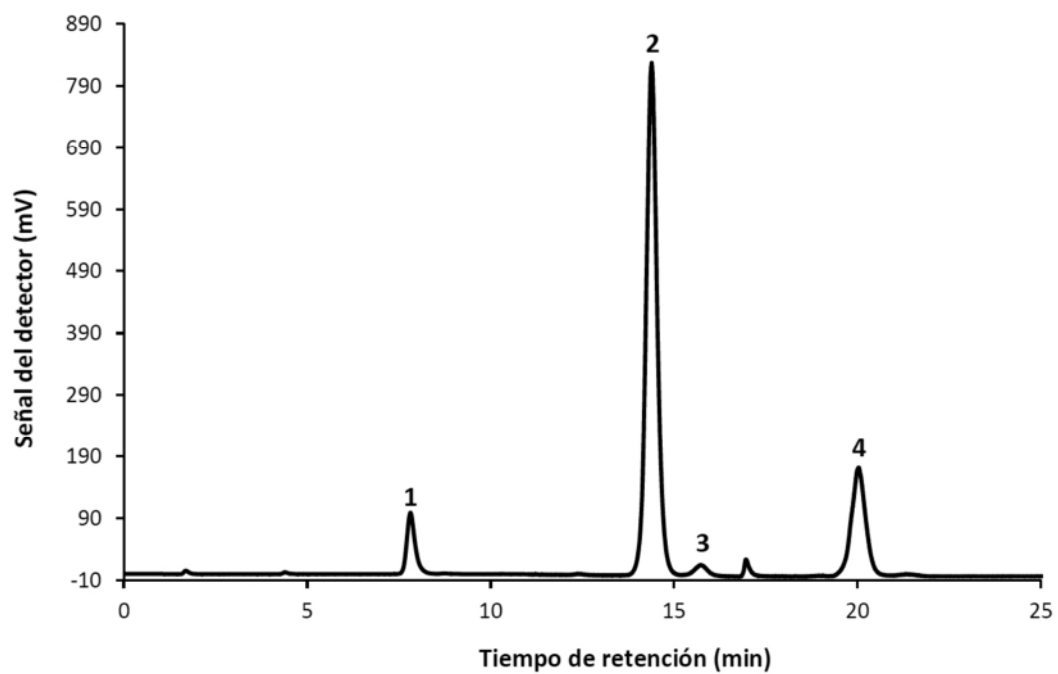


Figura 2

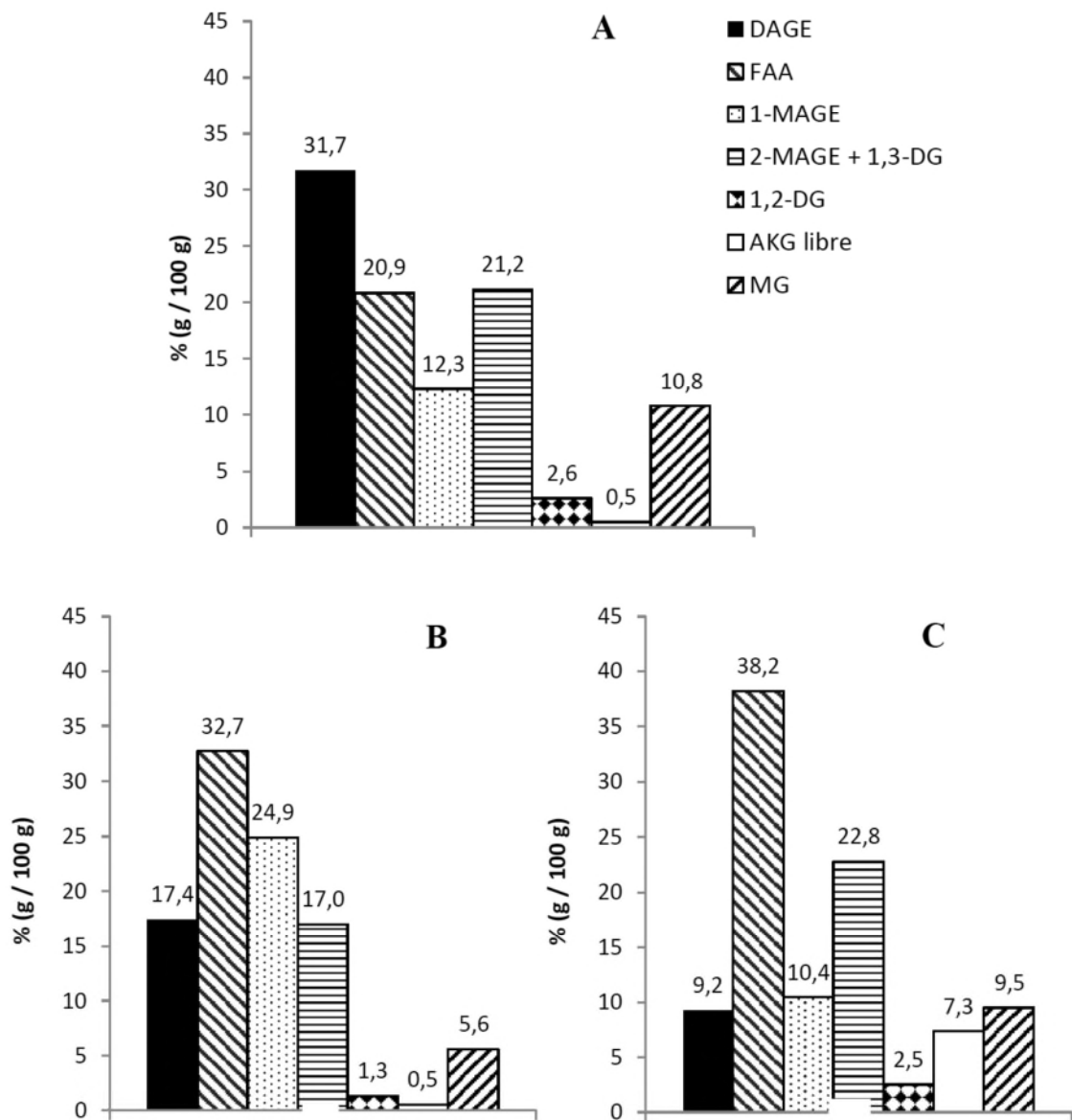


Figura 3

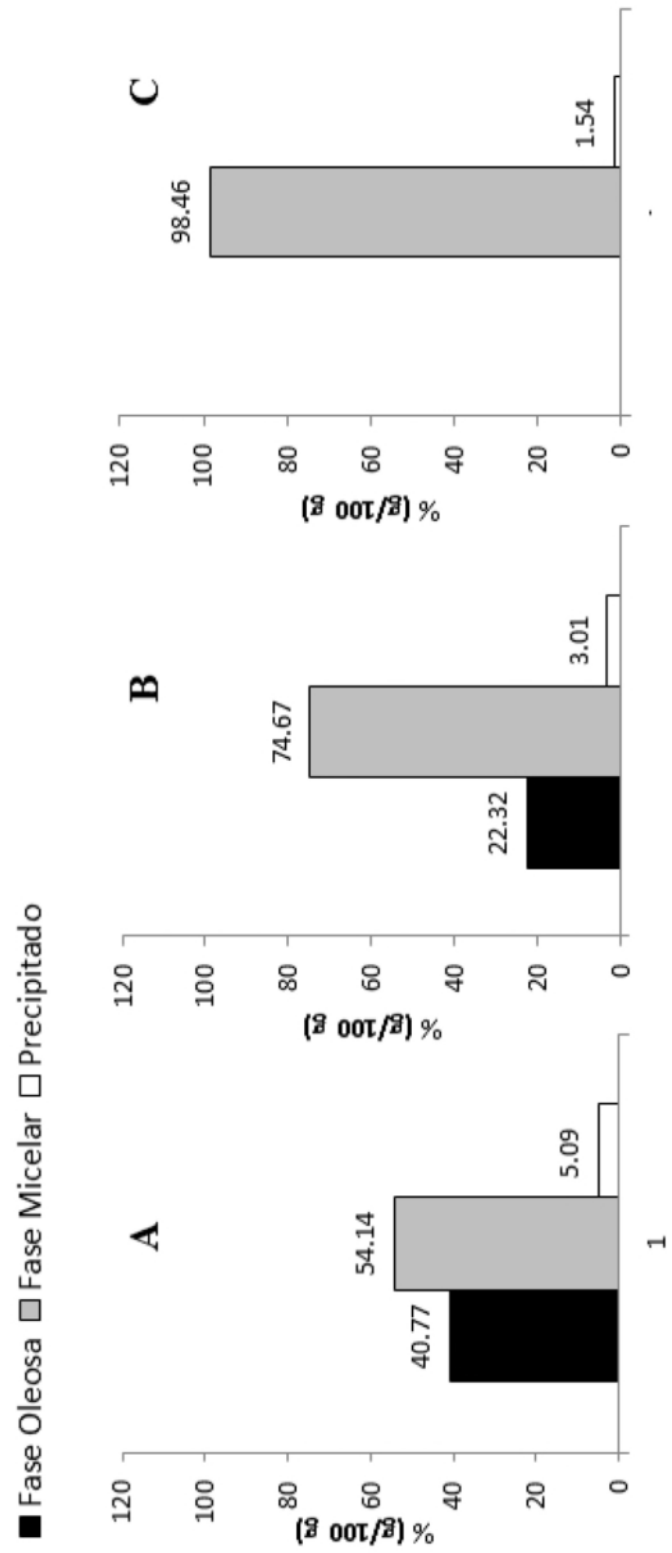


Figura 4

■ DAGE ■ FFA □ 1-MAGE ▨ 2-MAGE+1,3-DG ▩ 1,2-DG □ AKG libre ▨ MG

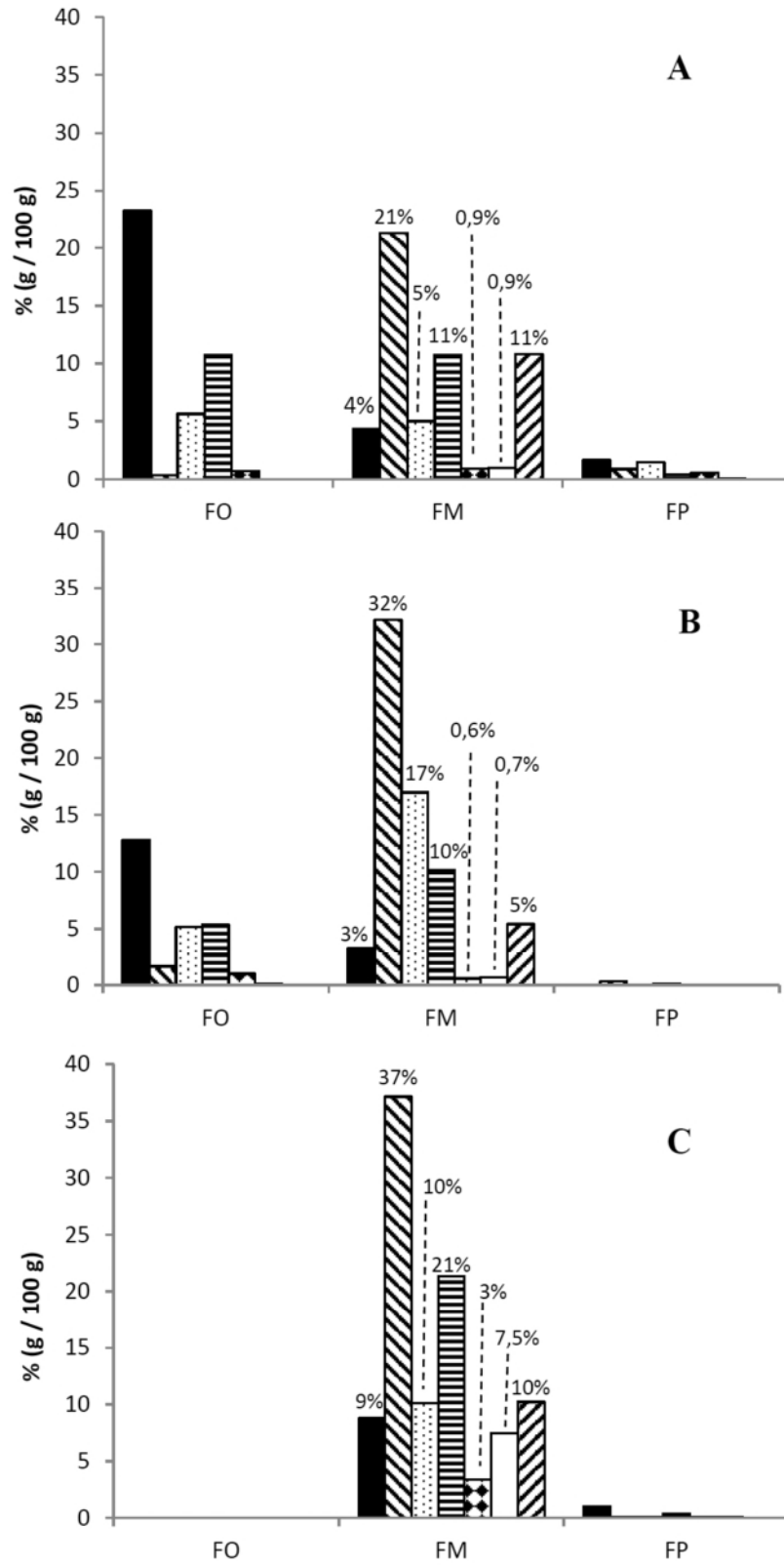


Figura 5

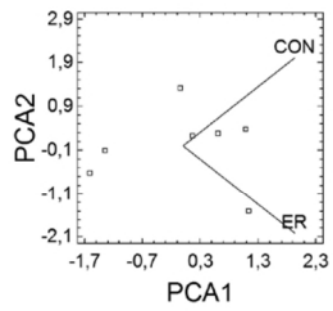


Figura 6

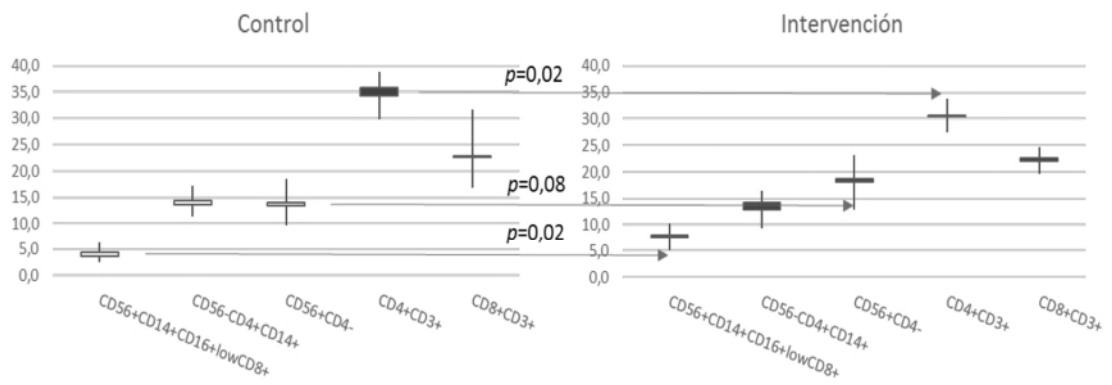


Figura 7

Ruta	Gen	Nombre del gen
Inflamación y respuesta inflamatoria. Inmunomodulación	IL1B	Interleucina 1, Beta
	TNF (TNFA)	Factor de necrosis tumoral
	MAPK1	Proteína cinasa activada por mitógenos 1
	PTK2B	Proteína tirosina cinasa 2 Beta
	STAT3	Transductor de señal y activador de transcripción 3
	JAK1	Cinasa Janus 1
	JAK3	Cinasa Janus 3
	NFKB	Factor nuclear de potenciador génico polipeptídico ligero Kappa en células B 1
	NLRP3	Familia NLR, que contiene dominio pirina 3
	CCL2 (MCP-1)	Ligando 2 de quimiocinas (motivo C-C)
	CXCR1	Receptor 1 de quimiocinas (motivo C-X-C)
	CSF2	Factor 2 estimulante de colonias (granulocitos-macrófagos)
	CCL5(RANTES)	Ligando 5 de quimiocinas (motivo C-C)
	CCR5	Receptor 5 de quimiocinas (motivo C-C) (gen/pseudogen)
	PLCG1	Fosfolipasa C, Gamma 1
	PRKCD	Proteína cinasa C, Delta
	ADIPOQ	Adiponectina, que contiene dominio C1Q y colágeno
	BMP2	Proteína morfogenética ósea 2
	LIF	Factor inhibidor de leucemia
	TGFB2	Factor de crecimiento transformante, Beta 2
	IFNG	Interferón, Gamma
	IL2	Interleucina 2
	IL6	Interleucina 6
	TLR4	Receptor 4 de tipo Toll
Estrés oxidativo y respuesta antioxidante	NOS2	Óxido nítrico sintasa 2, inducible
	NOX5	NADPH oxidasa, dominio de unión de calcio a mano EF 5
	NCF2	Factor citosólico de neutrófilos 2
	SOD1	Superóxido dismutasa 1, soluble
	GPX1	Glutatión peroxidasa 1
	PRDX5	Peroxirredoxina 5
Dianas moleculares de romero en cáncer colorrectal	NFE2L2	Factor nuclear 2, de tipo eritroide 2
	DTYMK	Desoxitimidilato cinasa (timidilato cinasa)
	TK1	Timidina cinasa 1, soluble
	GCNT3	Glucosaminil (N-acetil) transferasa 3, tipo mucina
Metabolismo de ácidos grasos, adipogénesis y obesidad	PLA2G7	Fosfolipasa 2, grupo VII (acetilhidroasa del factor activante de plaquetas, plasma)
	PPARA	Receptor alfa activado de proliferadores de peroxisomas
	PPARG	Receptor gamma activado de proliferadores de peroxisomas
	CEBPA	Proteína de unión al potenciador de CCAAT (C/EBP), alfa
	CEBPB	Proteína de unión al potenciador de CAAT (C/EBP, beta)
	SREBF1	Factor 1 de transcripción de unión a elementos reguladores de esteroides
	FASN	Ácido graso sintasa
	IRS2	Sustrato del receptor de insulina 2
	ACSL4	Miembro 4 de la familia de cadena larga de acil-CoA Sintetasa
	GPD2	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa 2 (mitocondrial)
	CHKA	Colina cinasa alfa
	LEP	Leptina
	LEPR	Receptor de leptina

Genes afectados en la intervención nutricional

gen	Grupo A*	Grupo B*	p
<i>JAK1</i>	0.37 (0.33)	-0.09 (0.32)	0.02
<i>NFE2L2</i>	-0.13 (0.65)	-0.67 (0.76)	0.031
<i>BMP2</i>	0.79 (1.3)	-0.41 (0.7)	0.008
<i>CHKA</i>	-0.24 (0.7)	-0.76 (0.74)	0.083
*datos expresados en -ddCt (logRQ)			

Figura 8

DLD1-SFRE8

