



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 288 193**

51 Int. Cl.:

C07F 9/10 (2006.01)

C07D 407/14 (2006.01)

A23J 7/00 (2006.01)

A61K 31/683 (2006.01)

A61K 31/685 (2006.01)

A61P 25/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C11B 1/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **02753988 .1**

86 Fecha de presentación : **29.07.2002**

87 Número de publicación de la solicitud: **1417211**

87 Fecha de publicación de la solicitud: **12.05.2004**

54 Título: **Fosfolípidos naturales de origen marino que contienen flavonoides y fosfolípidos poliinsaturados y sus usos.**

30 Prioridad: **27.07.2001 US 307842 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.01.2008

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.01.2008

73 Titular/es:
**Neptune Technologies & Bioresources Inc.
500, St-Martin Boulevard West, Suite 550
Laval, Québec H7M 3Y2, CA**

72 Inventor/es: **Sampalis, Fotini**

74 Agente: **Carpintero López, Francisco**

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

Fosfolípidos naturales de origen marino que contienen flavonoides y fosfolípidos poliinsaturados y sus usos.

5 **Referencia a solicitud de patente relacionada**

Esta solicitud de patente reivindica el beneficio de la solicitud de patente de Estados Unidos provisional con el n.º de serie 60/307.842, presentada el 27 de julio de 2001, que se incorpora a la presente memoria por referencia en su totalidad.

10 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a composiciones nutraceuticas, farmaceuticas o cosméticas, de forma particular a composiciones de fosfolípidos derivadas de fuentes naturales marinas o acuáticas.

15 **Antecedentes de la invención**

El documento WO 92/21335 publicado el 10 de diciembre de 1992 y que corresponde a la patente de Estados Unidos n.º 5.434.183 expedida el 18 de julio de 1995 describe una emulsión de fosfolípidos derivada de un origen marino y/o sintético que comprende ácidos grasos poliinsaturados y que tiene efectos antiinflamatorios e inmunosupresores y que promueve un desarrollo y función cerebrales o retinianas normales. El documento U.S. 5.434.183 no describe la presencia de flavonoides ni ácido nerviónico (un ácido graso monoinsaturado) en la composición.

El documento JP 2215351, publicado el 28 de agosto de 1990, describe un procedimiento para extraer y purificar fosfolípidos a partir de krill fresco. El krill se liofiliza y después se extrae con etanol produciendo un extracto que se fracciona mediante cromatografía en columna de absorción produciendo fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina de pureza elevada. No se describe ninguna composición que comprenda un flavonoide ni ácido nerviónico.

El documento WO 00/23546, publicado el 27 de abril de 2000, describe procedimientos para extraer fracciones lipídicas a partir de material de animales marinos y acuáticos mediante extracciones en acetona. La fracción insoluble y en partículas resultante se vuelve a extraer con disolvente, etanol o acetato de etilo, para conseguir nuevas extracciones lipídicas.

El documento de Hosokawa y cols. (35), publicado en 2000, describe la conversión de fosfatilcolinas que contienen ácido docosahexanoico (DHA-PC) provenientes de la lecitina de piel de calamar, en fosfatidilserinas que contienen ácido docosahexanoico (DHA-PS) mediante una transfosfatilación con fosfolipasa D (PLD). De acuerdo con la Tabla 2 de esta referencia, la composición en ácidos grasos de los fosfolípidos incluye porciones importantes de ácido eicosapentanoico. No existen descripciones con respecto a ningún uso farmacéutico, nutraceutico o cosmético de una composición que comprende un flavonoide.

El documento de Henderson y cols. (36), publicado en 1994, describe composiciones lipídicas del órgano pineal de la trucha arco iris que comprenden fosfolípidos. De acuerdo con la Tabla 4 de esta referencia, dichos fosfolípidos contienen ácidos grasos que corresponden al ácido eicosapentanoico y docosahexanoico. De forma similar, el documento de Bell y cols. (37), publicado en 1991, describe composiciones de fosfolípidos derivadas de diferentes órganos del bacalao. Además, el documento de Wiegand y cols. (38), publicado en 1983, describe derivados poliénicos de fosfatidilcolina como especie molecular fosfolipídica de las membranas receptoras de la rana. Sin embargo, no existen descripciones en ninguna de estas referencias relativas a ningún uso farmacéutico, nutraceutico o cosmético de una composición que comprende un flavonoide.

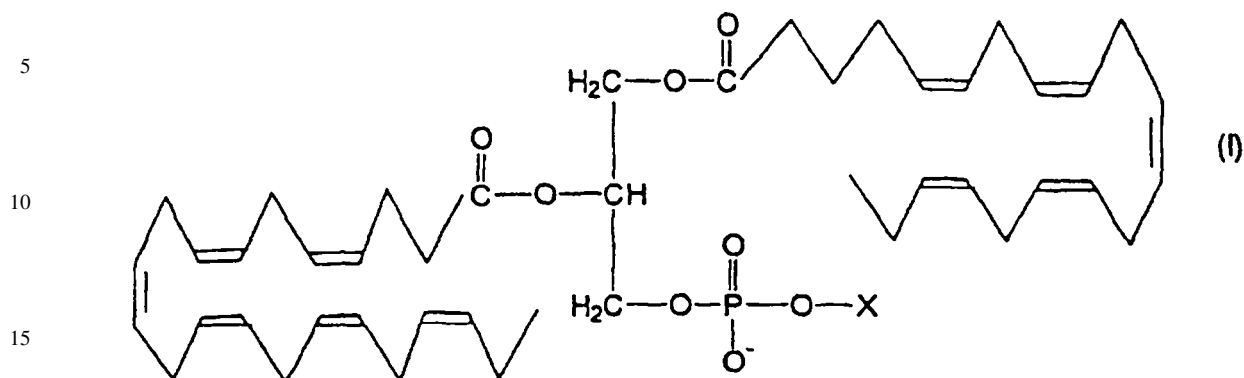
El documento WO 97/39759, publicado el 30 de octubre de 1997, describe o grasos omega-3 y fosfatidilcolina omega-3 para el tratamiento de trastorno bipolar. Los derivados preferidos de fosfatidilcolina omega-3 comprenden ácido eicosapentanoico y/o docosahexanoico. Sin embargo, no existen descripciones relativas a ningún uso farmacéutico, nutraceutico o cosmético de los fosfolípidos más allá del tratamiento de trastorno bipolar o del uso de una a composición que comprende un flavonoide.

El documento EP 0609078 AI, publicado el 8 de marzo de 1994, describe un fosfolípido que comprende dos ácidos grasos insaturados diferentes, en el que un fosfolípido preferido contiene tanto ácido eicosapentanoico como docosahexanoico. Además, el fosfolípido puede usarse en la preparación de alimentos, preparaciones para el cuidado de la piel o como agente farmacéutico. Sin embargo, no existen descripciones relativas al uso farmacéutico, nutraceutico o cosmético de una composición que comprende un flavonoide.

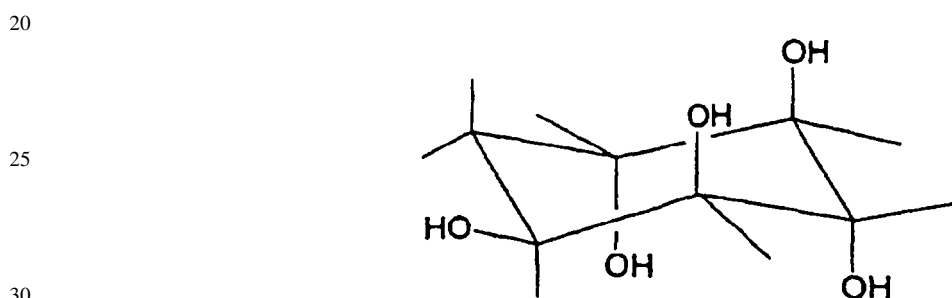
Sumario de la invención

En un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden fosfolípidos, en las que las dos cadenas de los ácidos grasos del fosfolípido están ocupadas por ácido eicosapentanoico (EPA) y ácido docosahexanoico (DHA) de forma simultánea, en la misma molécula,

(a) un fosfolípido de la fórmula general (I),

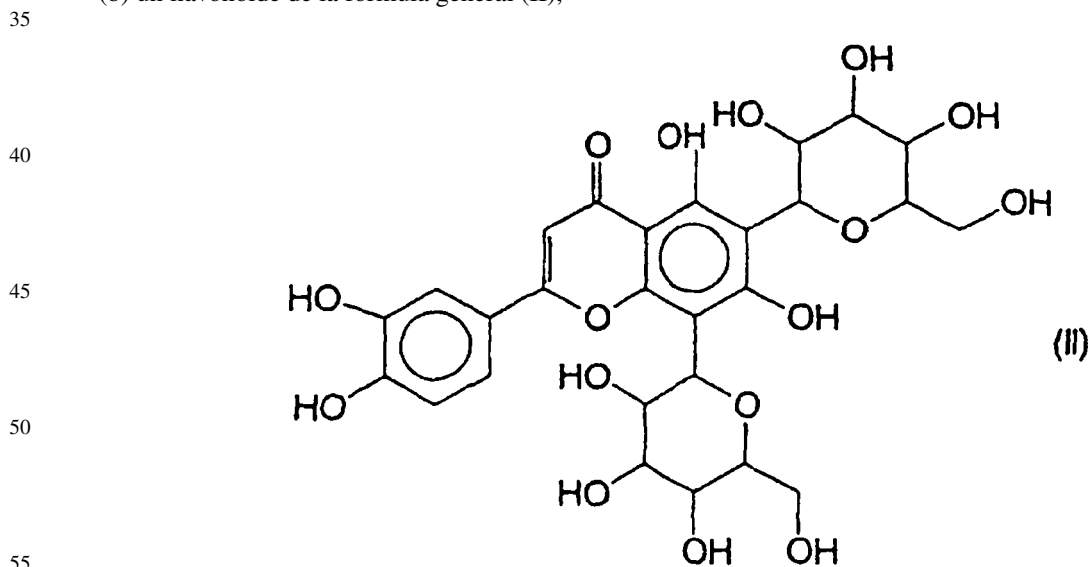


en la que X es $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ o



y

(b) un flavonoide de la fórmula general (II),



También se proporciona una composición que comprende el fosfolípido y flavonoide reseñados anteriormente que se derivan de una biomasa marina o acuática. La composición y los componentes son de utilidad en la prevención o el tratamiento de una variedad de estados de enfermedad y para el mejoramiento estético del cuerpo de un animal, entre otras el ser humano. Los envases comerciales que contienen la composición están también dentro del alcance de la invención.

Los fosfolípidos novedosos del compuesto flavonoide novedoso se derivan de un extracto proveniente de una biomasa marina o acuática.

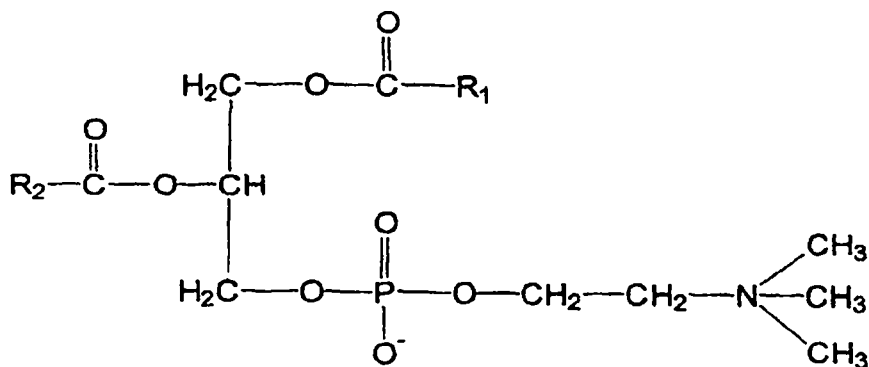
También se proporciona un extracto de fosfolípidos que comprende los fosfolípidos y el compuesto flavonoide derivados de una biomasa marina o acuática. El extracto y los componentes son de utilidad en la prevención o el tratamiento de una variedad de estados de enfermedad y para el mejoramiento estético del cuerpo de un animal, entre

otros el ser humano. Las composiciones farmacéuticas, nutraceuticas y cosméticas que contienen el extracto y sus usos están también dentro del alcance la invención, así como los envases comerciales que contienen las composiciones de la invención.

5 Descripción detallada de la invención

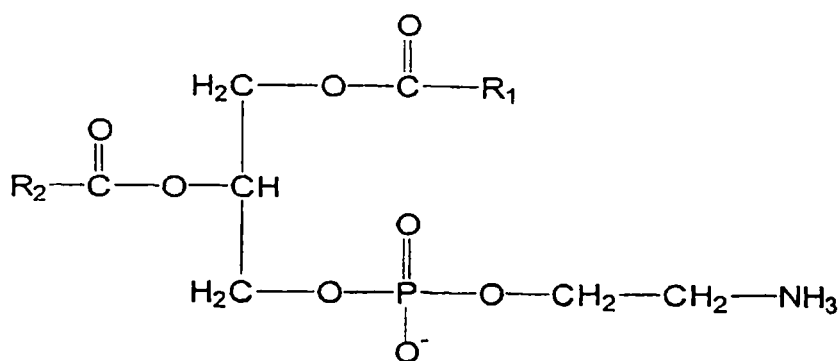
1. Fosfolípidos

Los fosfolípidos son lípidos complejos que contienen fósforo. Los fosfatidos, conocidos como fosfolípidos, habitualmente se dividen en grupos en base a los compuestos de los que se derivan. Además de dos cadenas de ácidos grasos, contienen ácido fosfórico, glicerol y bases nitrogenadas tales como colina. Fosfolípidos importantes son fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE) y fosfatidilinositol (PI). Su naturaleza de moléculas anfófilas les proporciona propiedades fisicoquímicas únicas. Su función como componentes principales de las membranas celulares hace que los fosfolípidos sean esenciales para todos los procesos celulares vitales. Están ampliamente extendidos como componentes secretores y estructurales del organismo y pueden imitar o potenciar los procesos fisiológicos naturales.



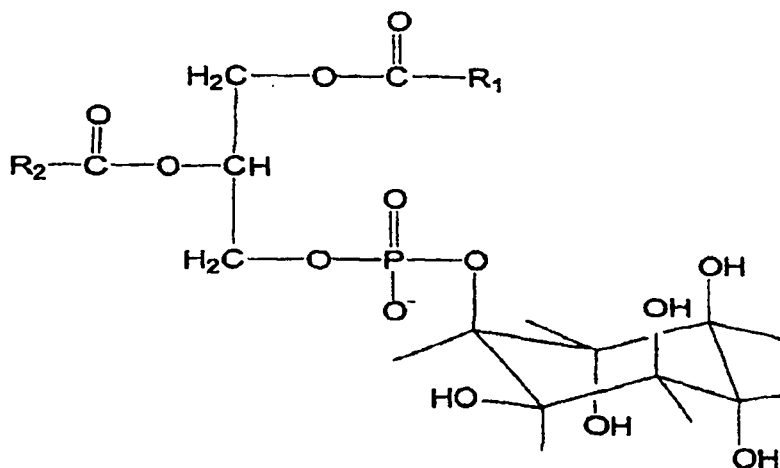
Fosfatidilcolina - estructura habitual

**R₁ y R₂ son restos de ácidos grasos,
diferentes para cada especie molecular**



Fosfatidiletanolamina - estructura habitual

**R₁ y R₂ son restos de ácidos grasos,
diferentes para cada especie molecular**



Fosfatidilinositol - estructura habitual

R_1 y R_2 son restos de ácidos grasos,
diferentes para cada especie molecular

La producción de los fosfolípidos puede ser sintética o mediante la extracción a partir de tejidos naturales. La fuente principal de los fosfolípidos naturales comerciales es la soja, la yema de huevo y las vacas (cerebro e hígado). Dado que un fosfolípido individual puede contener una variedad de restos de ácidos grasos, puede describirse como puro únicamente con esta limitación en mente. Los ácidos grasos poliinsaturados esenciales naturales pueden contribuir a la activación del metabolismo celular. El ácido graso principal que se encuentra en los productos fosfolipídicos es el ácido linoleico (C18:2n6), presente en la soja en más de un 65%. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena más larga que se encuentran en los fosfolípidos disponibles comercialmente ya sea en forma de preparaciones o de forma individual son de 20:4 entre los eicosanoides, conocido como ácido araquidónico y de 22:6 conocido como ácido docosahexanoico.

El ácido araquidónico es un ácido graso que se encuentra como parte de las membranas fosfolipídicas, generalmente como parte de la fosfatidilcolina y del fosfatidilinositol. Los estímulos celulares adversos activan los enzimas (fosfolipasa) que escinden el ácido araquidónico de la estructura del fosfolípido de la membrana celular. El ácido araquidónico, que sirve como precursor para las prostaglandinas y la prostaciclina (PGs, PGI₂) y el tromboxano (TXs), después puede ser metabolizado por una de las dos vías principales: la vía de la ciclooxigenasa (COX) o la vía de la lipoxigenasa. Los productos de la vía de la COX, PGG₂ y PGH₂, después pueden ser procesados mediante la tromboxano sintasa (en las plaquetas) o por la prostaciclina sintasa (en el endotelio) formando TXs o PGI₂, respectivamente. El ácido araquidónico también puede ser procesado mediante la 5-lipoxigenasa, principalmente en los leucocitos, formando leucotrienos (LTs). Uno o más de estos metabolitos puede mediar todos los signos y síntomas asociados al ácido araquidónico, es decir, la enfermedad principal y el dolor.

Las plaquetas, los leucocitos, la musculatura lisa y el endotelio pueden producir sustancias vasoactivas, productos del metabolismo del ácido araquidónico tales como prostaglandinas (PG), prostaciclina (PGI₂), leucotrienos (LT) y tromboxanos (TX). Estas sustancias pueden actuar o bien como vasodilatadores o como vasoconstrictores. PGI₂ es esencial para la función vascular dado que inhibe la adhesión de las plaquetas al endotelio vascular y tiene propiedades vasodilatadoras significativas. Las células endoteliales dañadas no pueden producir PGI₂, haciendo que el vaso sea más susceptible a la trombosis y al vasoespasmo. Los tromboxanos y los leucotrienos desempeñan una función vascular durante la inflamación, generalmente produciendo la vasoconstricción. Las prostaglandinas desempeñan un papel vascular durante la inflamación; y también desempeñan un papel más sutil en la regulación de la circulación normal, de la forma más notable como moduladores de otros mecanismos de control. Las prostaglandinas presentan tanto actividades vasoconstrictoras como vasodilatadoras. Los leucotrienos y las prostaglandinas también pueden aumentar la permeabilidad de la membrana endotelial promoviendo así el edema durante la inflamación. El ácido araquidónico está presente de forma natural en la mayoría de las mezclas o emulsiones de fosfolípidos disponibles en la actualidad.

El ácido nerviónico (C24:1) se denomina también ácido selacoleico o ácido tetracosénico. El ácido nerviónico es el nutriente predominante de la materia blanca en los glucósidos, que están contenidos de forma cuantitativa en el tejido nervioso y en la materia blanca. La ausencia de ácido nerviónico puede provocar lesiones cerebrales, fatiga, hipodinamia, amencia y demencia senil. El ácido nerviónico, conocido también como ácido tetracosénico, es monoinsaturado, no oxidable ni descomponible y provoca absorción. Se le llama tónico raro ya que raramente se encuentra en la naturaleza. Puede obtenerse en pequeñas cantidades extrayéndolo del condriosoma cerebral. Por lo tanto, la sustancia está muy por debajo de la demanda del cuerpo humano. En el extranjero, el ácido nerviónico proviene principalmente del cerebro y aceite de tiburón.

1.1 Aplicaciones clínicas del fosfatidilinositol

Los avances recientes en la investigación nutricional y bioquímica han documentado que el inositol es un importante constituyente dietético y celular. Las funciones del fosfatidilinositol en las membranas biológicas incluyen la regulación de las respuestas celulares a los estímulos externos y/o a la transmisión nerviosa así como a la mediación de la actividad enzimática mediante interacciones con diversas proteínas específicas (1).

El inositol se ha identificado como un constituyente dietético y celular importante. Funciones bioquímicas:

a. Regulación de las respuestas celulares a los estímulos externos

b. mediación de la actividad enzimática.

La composición en fosfoinosítidos de las membranas celulares del sistema nervioso central está enriquecida en ácidos grasos y está formada principalmente por fosfatidilinositol (PI), fosfatidilinositol-4-fosfato (PIP), y fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂). Una vez se estimula la membrana, la fosfolipasa C se activa y en consecuencia se produce trifosfato de inositol junto con diacilglicerol. El PI se usa como precursor para el fosfatidilinositol-3-fosfato y 3,4,5-trifosfato (2).

Los vehículos de transporte activos, las bombas de calcio de la membrana celular misma y el retículo endoplasmático, mantienen la concentración de calcio citoplasmático muy baja. Habitualmente, la concentración de calcio en el citoplasma es 5.000-10.000 veces inferior a la concentración en el líquido extracelular. Puede accederse a este almacén endoplasmático de calcio mediante la estimulación con inositol. El trifosfato de inositol se libera de la membrana celular y viaja a través del citoplasma hasta que alcanza el retículo endoplasmático. Este inositol después libera el calcio secuestrado, que puede proceder a mediar la liberación de los neurotransmisores como respuesta a la despolarización (3).

Además de liberar el calcio del retículo endoplasmático, el inositol actúa como el principal osmorregulador no nitrogenado del sistema nervioso central. La modulación de esta provisión de inositol se regula en respuesta a estados de osmolaridad alta o baja. La provisión de inositol es suministrada por un transportador de sodio/inositol, un sistema de transporte activo dependiente de sodio y un transportador de baja afinidad pasivo (4,5).

Se han identificado numerosos receptores distintos del inositol en el sistema nervioso central que potencialmente pueden interactuar con el sistema de señalización del inositol. La mayoría de estos receptores están ligados a las proteínas G y producen inositol-1,4,5-trifosfato como mensajeros secundarios. Estos receptores pueden encontrarse en casi todos los sistemas de órganos humanos. Las potenciales interacciones entre estos receptores y sus agonistas son responsables de la regulación del organismo en el día a día. En vista de la complejidad de estos sistemas y sus acciones, es necesario un equilibrio perfecto para la regulación de los sistemas de señalización.

En teoría, un desequilibrio en la concentración del inositol potencialmente podría afectar al desarrollo y la función de uno o todos estos receptores. Los receptores colinérgicos se localizan en el hígado, corazón, estómago y pulmones. Los receptores de serotonina y glutamina se encuentran principalmente en los tejidos del sistema nervioso central (SNC). Los receptores adrenérgicos están presentes en diversos tejidos que incluyen los tejidos del SNC, vasculares y cardíacos. Los receptores histaminérgicos se encuentran predominantemente en los pulmones y el estómago.

Aplicaciones clínicas

Un cambio en la disponibilidad del inositol en el SNC puede producir una señalización cerebral alterada y finalmente provocar el desarrollo de trastornos neurológicos.

a. Depresión

Se cree que la patofisiología de la depresión está ligada a una deficiencia de neurotransmisores en los sitios de los receptores postsinápticos. De acuerdo con la teoría de la catecolamina, la deficiencia es de la cantidad de norepinefrina; en la teoría de la indolamina, la deficiencia es en la cantidad de serotonina. Los receptores ligados al sistema de señalización del inositol incluyen serotonina (5HT_{2a} y 5HT_{2b}) y norepinefrina (alfa 1a, 1b, y 1d).

En 1978, Barkai y cols. demostraron que los pacientes deprimidos tenían un nivel de inositol significativamente menor en el líquido cefalorraquídeo (LCR) comparados con los pacientes sanos (6). En 1993 esta teoría se amplió concluyendo que la administración de inositol en dosis elevadas podría aumentar los niveles en el LCR hasta en un 70 por ciento (7). Esto provocó el estudio del inositol para el tratamiento de la depresión (8,9). En 1995 Levine y cols. completaron un estudio de doble ciego para el tratamiento de la depresión usando inositol a una dosis de 12 gramos al día comparando con placebo. Los pacientes que recibían inositol mostraron una mejora significativa de la depresión según la clasificación de la escala de clasificación de la depresión de Hamilton (33,4 +/- 6 comparado con 0,6 +/- 10). Otra observación importante fue la ausencia de episodios maníacos en los pacientes bipolares tratados con inositol. Esta ausencia de episodios maníacos puede sugerir que, cuando el sistema de señalización no está hiperactivo, la adición de inositol no aumentará la actividad del sistema de señalización (10, 11). Puede concluirse que el inositol es eficaz para manejar las manifestaciones clínicas de la depresión.

b. *Trastorno de pánico*

Benjamin y cols. expandieron el uso clínico del inositol al evaluar su eficacia sobre el trastorno de pánico (12). Este fue un estudio cruzado, de doble ciego y de ocho semanas en el que se trató a los pacientes con inositol a diario durante cuatro semanas y después se pasaron al otro grupo del estudio. La mejora se evaluó usando los diarios de los pacientes, la escala de fobia de Marks-Matthews, la escala de clasificación de la ansiedad de Hamilton, y la escala de clasificación de la depresión de Hamilton. La frecuencia y gravedad de los ataques de pánico y la gravedad de la agorafobia disminuyó de forma significativa más después del inositol que después del placebo (un descenso de 10 ataques por semana a 3 por semana en el grupo tratado comparado con un descenso de 10 a 6 en el grupo de placebo). Los autores concluyeron la eficacia y seguridad del inositol y, el hecho de que el inositol sea un componente natural de la dieta humana, hizo que fuera un agente terapéutico potencialmente atractivo para el trastorno de pánico.

c. *Trastorno obsesivo compulsivo (OCD)*

Dado que se conoce que el ciclo del fosfatidilinositol, como mensajero secundario, afecta a diversos neurotransmisores, que incluyen los receptores de serotonina, se estudió el inositol para el tratamiento del OCD en un ensayo cruzado, de doble ciego, controlado con placebo. Se trató a 13 pacientes durante seis semanas. Se produjo una mejora significativa en la semana seis durante el periodo de tratamiento con inositol comparado con el periodo de tratamiento con placebo. No se reseñaron efectos secundarios durante el periodo de estudio (1).

d. *Enfermedad de Alzheimer (AD)*

Aunque el papel del aluminio en la AD es todavía especulativo en el mejor de los casos, la presencia de aluminosilicatos en el núcleo de las placas seniles en las neuronas enfermas es una característica consistente que se encuentra en el SNC de los pacientes de AD durante la autopsia. Es conocido que el aluminio inhibe la incorporación del inositol a los fosfolípidos y la hidrólisis de los fosfoinosítidos al unirse a uno de los dos grupos fosfato específicos. Esta unión del fosfato y del aluminio afecta a los efectos de liberación del calcio de la célula. La profunda alteración del sistema de segundo mensajero de fosfatidilinositol resultante puede ser la responsable de la disfunción neuronal y de la eventual muerte celular (13).

Dado que el potencial papel del aluminio como agente causante de la muerte celular puede verse afectado por la desregulación de la concentración de calcio, debido posiblemente a la depleción del inositol, el suplemento de inositol puede producir efectos positivos sobre el SNC. Los datos recientes sugieren que la pérdida de los sitios diana del sistema de segundo mensajero de PI puede producir efectos positivos sobre el SNC. Datos recientes sugieren que la pérdida de los sitios diana del sistema de segundo mensajero del PI y de los receptores de IP3 puede aumentar la deficiencia cognitiva y el fallo de las terapias convencionales en la AD. Por lo tanto, el suplemento de inositol para recargar el sistema de PI agotado pueden ser beneficioso para el tratamiento de la AD (13-20).

En 1996 Barak y cols. completaron un estudio cruzado, controlado y de doble ciego de seis gramos de inositol al día comparados con placebo durante 30 días en 11 pacientes de Alzheimer. A los pacientes del estudio se les diagnosticó demencia del tipo de AD según la clasificación del DSM-III-R y tenían una edad de 65 años o más. Se usó el examen de trastornos mentales en la tercera edad de Cambridge (CAMDEX) como parámetro de evaluación básico y se administró tras la admisión en el estudio. En el CAMDEX se incluye la parte A: estado físico y mental actual del paciente, parte B: cognitiva. Subescala del CAMDEX (CAMCOG), parte C: observaciones de los entrevistadores y parte D: examen físico. El CAMCOG se repitió a las dos, cuatro, seis y ocho semanas. Los participantes consiguieron una puntuación de 80 o menor en el examen de CAMCOG y sus síntomas de depresión no eran graves (21).

Los pacientes se excluyeron del estudio si presentaban una historia de trastornos psiquiátricos o de adicción al alcohol y/o a las drogas, o anormalidades en los valores iniciales de los análisis de laboratorio (recuento sanguíneo, electrolitos, funciones hepáticas o renales, VDRL o escáner por tomografía computada) no consistentes con la AD. También se excluyó a los pacientes con trastornos neurológicos, metabólicos o endocrinos adicionales o con presencia de una enfermedad interna que perjudicara gravemente el funcionamiento cerebral.

Se administró a los sujetos o tres gramos de inositol o placebo por la mañana y de nuevo por la noche. Después de cuatro semanas, se cambió a los pacientes al otro grupo (inositol o placebo) durante otras cuatro semanas. Sólo se permitió la administración de benzodiazepinas durante el periodo del estudio (15 mg de oxazepam o equivalente), con la condición de que el paciente las estuviera tomando al ingresar en el estudio.

El análisis de las puntuaciones de mejora de todos los pacientes que completaron el estudio demostró que el inositol aumentó la puntuación total en el CAMCOG a partir de unos resultados iniciales de 31,36 +/- 20,90 a 40,09 +/- 24,54, mientras que el grupo del placebo aumentó desde los resultados iniciales de 35,9 +/- 25,96 a 39,27 +/- 25. Los autores concluyeron que sólo dos de las ocho subescalas (lenguaje y orientación) mostraron una mejora significativa con el inositol.

El mecanismo de acción propuesto para el inositol en el SNC no incluye la manipulación directa de pre o postreceptores. Sin embargo, puede afectar indirectamente a la relación entre el receptor y el agonista. Al mediar en las características fisicoquímicas del receptor presináptico M1 (solubilidad, osmolalidad, etc.), el inositol puede alterar el sitio de unión e influir en la señalización que se produce como resultado.

1.2 Envejecimiento

La fosfatidilcolina rica en ácidos grasos poliinsaturados es indispensable para la diferenciación, proliferación y regeneración celulares. Las funciones fisiológicas de estos fosfolípidos están relacionadas con la morfología de las membranas biológicas, la incorporación de estas moléculas a las membranas y así el mantenimiento de las membranas celulares intactas.

El actual estudio se diseñó para investigar los efectos de la fosfatidilcolina poliinsaturada sobre la pérdida auditiva relacionada con la edad mediante la evaluación de su capacidad de preservar la función mitocondrial, proteger el ADN mitocondrial de los daños por oxidación y preservar la sensibilidad auditiva (22).

Se usaron 344 ratas Harlan-Fischer, de 18-20 meses de edad como sujetos experimentales.

Los sujetos se enjaularon individualmente y se mantuvieron de 21 a 22°C en un ciclo de 12:12 de luz y oscuridad.

A la dieta oral de cada sujeto se le añadió como suplemento una dosis de 300 mg/kg/día de fosfatidilcolina poliinsaturada.

Los animales se separaron de forma aleatoria en dos grupos ($n = 7$ para cada grupo). El grupo-1 sirvió de control y grupo-2 de grupo experimental.

Al inicio del estudio, se obtuvieron las respuestas auditorias del tronco encefálico para medir los umbrales de audición iniciales en todos los sujetos.

Después se registraron los cambios asociados con el envejecimiento de la sensibilidad auditiva a intervalos de dos meses durante seis meses.

Para evaluar los cambios relacionados con la edad de la función mitocondrial, se estudiaron los potenciales de la membrana mitocondrial usando citometría de flujo. Para este fin, se obtuvo sangre periférica de cada sujeto al inicio y al final del protocolo.

Al final, los sujetos se sacrificaron (de acuerdo con el protocolo de NIH) y se obtuvieron muestras de tejido del cerebro y la cóclea (stria vascularis y nervio auditivo) para estudiar la delección del ADN mitocondrial asociada con el envejecimiento. Esto se logró amplificando la delección mitocondrial habitual específica mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Se realizó una cuantificación del ADN. Los datos obtenidos para cada protocolo se compararon entre los dos grupos y se analizaron usando ANOVA.

Los efectos de la fosfatidilcolina poliinsaturada sobre la pérdida auditiva relacionada con la edad demuestran un declive gradual asociado a la edad de las sensibilidades auditivas a todas las frecuencias analizadas (3, 6, 9, 12 y 18 kHz).

En los sujetos tratados se produjo una conservación estadísticamente significativa de la capacidad auditiva a todas las frecuencias, que se observó a los cuatro y seis meses del tratamiento.

En conjunto, se produjo un declive continuado de la capacidad auditiva en los sujetos de control y un efecto protector estadísticamente significativo de la fosfatidilcolina poliinsaturada sobre los sujetos experimentales ($p < 0,005$).

Los potenciales de las membranas mitocondriales se registraron mediante citometría de flujo en términos de la captación de rodamina 123 por las mitocondrias.

La intensidad media de la fluorescencia (IMF) en los sujetos del grupo 1 fue de 3190 y 2100 al inicio y final del estudio, respectivamente.

Este declive de aproximadamente el 30% del potencial de la membrana con el tiempo era estadísticamente significativo ($p = 0,003$).

Por el contrario, la IMF en el grupo experimental se mantuvo esencialmente sin cambios a 2990 desde 3165 al inicio del estudio.

Esta diferencia entre los grupos de control y de tratamiento fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$), lo que demuestra el efecto protector del suplemento de la fosfatidilcolina poliinsaturada sobre el potencial de la membrana.

Los fosfolípidos son componentes estructurales integrales de todas las membranas biológicas siendo la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina poliinsaturadas los tipos predominantes, cuantitativamente. Constituyen la estructura de bicapa fosfolipídica de las membranas celulares, que es responsable de la estabilidad de las membranas y de la función celular. La fosfatidilcolina poliinsaturada mantiene y promueve la actividad de varias proteínas y enzimas unidas a la membrana, que incluyen Na-K ATPasa, adenilato ciclasa y glutatión reductasa. También se sabe que son precursores de los agentes citoprotectores tales como eicosanoides, prostaglandinas y antioxidantes.

Los resultados de estos estudios sugieren que la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina poliinsaturadas pueden proteger la función mitocondrial al evitar el declive de los potenciales de la membrana mitocondrial relacionado con la edad y conservar así su actividad. La observación de que se producían menos lesiones en el ADN mitocondrial en el grupo tratado puede explicar el efecto de la protección contra la pérdida auditiva asociada a la edad, por la capacidad de la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina poliinsaturadas de regular por aumento específicamente la función mitocondrial coclear. Existen muchos estudios que demuestran los efectos de los metabolitos mitocondriales sobre la cognición y el envejecimiento (22-33). Además, estudios recientes han demostrado que la acetil-L-carnitina y el ácido lipoico retrasan la progresión de la pérdida auditiva relacionada con la edad al proteger el ADN mitocondrial coclear de las lesiones por oxidación (34). Estos resultados apoyan la hipótesis del envejecimiento de la membrana y proporcionan indicios adicionales para apoyar esta teoría como posible explicación para la pérdida auditiva relacionada con la edad. Así, la PPC puede ser una de las muchas estrategias sensatas a considerar con el objetivo de la conservación de la membrana, la potenciación de la función mitocondrial la reducción de las lesiones al ADN mitocondrial relacionadas con la edad y la ralentización de algunos de los procesos de envejecimiento.

1.3 Efecto del extracto fosfoglicolípido (factor NT) sobre las células normales y cancerosas

Los niveles reducidos de fosfolípidos en las células normales pueden limitar la actividad metabólica y limitar la energía disponible. Los fosfolípidos, como parte de la estructura de las membranas:

- i. mantienen la integridad de las membranas
- ii. regulan las actividades enzimáticas y los procesos de transporte a través de las membranas mediante cambios de la fluidez de la membrana (Spector 1981, 1985).
- iii. La transducción de señales utiliza fosfatidilcolina y fosfatidilinositol para la producción de diacil-glicerol (DAG) y por la fosfolipasa C (Berridge 1989) y para la producción de inositol trifosfato (IP3) (Ranan 1990, Michell 1988, Margolis 1990).
- iv. Uno de los fosfolípidos de colina (1-alkil-2-acetil-SN-glicerol-3-fosfocolina) es el sustrato para la síntesis del factor activador de plaquetas (Synder 1989).
- v. El ácido araquidónico que se encuentra como parte de la estructura de la colina o del fosfolípido inositol se utiliza para la producción de prostaglandina y leucotrienos (Nordoy 1990).
- vi. La colina de la fosfatidilcolina puede usarse en el tejido neuronal para la síntesis de acetilcolina (Blusztain 1987).
- vii. El fosfoglicolípido mejora el mantenimiento celular y la actividad metabólica de las células normales.
- viii. Los derivados de fosfatidilcolina alteran las células cancerosas a concentraciones que no afectan a las células normales.
- ix. La fosfatidilcolina es selectivamente citotóxica para las células cancerosas *in vitro* (Hoffman 1986, Harmann 1986, Berger 1984).
- a. Dichos compuestos inhiben las células leucémicas HL60 a una dosis que no tiene efectos sobre las células medulares humanas, el tejido del que se derivan las células leucémicas.
- b. Las células normales eran capaces de tolerar una dosis 4 veces mayor que las células leucémicas durante una incubación de 24 horas con la preparación del fosfolípido (Berdel 1986).
- c. Se observó una diferencia de 5 veces en la sensibilidad entre las células normales y las tumorales con las células de cáncer de mama, ovario y pulmón, así como con las células de mesotelioma (Namba 1993).

1.4 Obtención de imágenes

Es sabido que los fosfolípidos poliinsaturados son importantes con respecto a las funciones biológicas de los ácidos grasos esenciales que por ejemplo, implican a los tejidos neuronales, tales como el cerebro y la retina. Los espectros de RMN de las bicapas poliinsaturadas son muy diferentes de los que presentan menos bicapas de fosfolípidos insaturados. Las simulaciones por MD pueden ayudar a interpretar los complejos espectros de RMN de las bicapas poliinsaturadas, junto con los perfiles de densidad de electrones que se determinan a partir de los estudios de difracción de rayos X en ángulos pequeños. Este trabajo demuestra claramente las conformaciones helicoidales y angulares preferidas de las cadenas poliinsaturadas en las bicapas líquidas cristalinas, que favorecen la extensión de las cadenas a la vez que mantienen la flexibilidad de la bicapa. La presencia de cadenas de ácidos grasos extendidas puede ser importante para solvatar las superficies hidrófobas de las proteínas de las membranas integrales, tales como rodopsina. Además, las cadenas de DHA polialílicas presentan una tendencia a adoptar estructuras replegadas (en forma de horquilla), que aumentan el área entre las fases por lípido. Finalmente, se han analizado las propiedades del material en cuanto a la respuesta de la bicapa a las agresiones mecánicas. Las bicapas simuladas de fosfolípidos que contienen

ácido docosahexanoico eran menos sensibles a la tensión superficial aplicada que los fosfolípidos saturados, lo que posiblemente implica un descenso en la elasticidad de la membrana (módulo elástico del área, rigidez de plegamiento). Las características anteriores distinguen los lípidos que contienen DHA de los lípidos saturados o no insaturados y pueden ser importantes para sus modos de acción biológica.

1.5 En resumen

Las funciones de los fosfolípidos son múltiples y diferentes para cada fosfolípido:

a. Los lípidos que contienen esfingosina y carbohidrato están concentrados principalmente en los tejidos nerviosos.

b. Las partes hidrófilas e hidrófobas de la molécula de fosfolípido les permiten actuar como agentes emulsionantes para mantener el estado coloidal adecuado del protoplasma.

c. Los fosfolípidos ayudan al transporte de los triglicéridos a través del hígado, especialmente durante la movilización desde el tejido adiposo.

d. Los fosfolípidos y sus metabolitos desempeñan un papel importante en la señalización intracelular, por ejemplo mediante la fosfolipasa C, la fosfolipasa D o las fosfatidilinositol cinasas específicas de fosfatidinositol.

e. A través de su concentración en las membranas celulares pueden estar implicados, de algún modo, en el transporte de constituyentes hidrófobos hacia el interior y el exterior de las células.

f. Los fosfolípidos afectan a la función cerebral de dos maneras principales: (Cohen B.M., Babb S.M., Yurgelun-Todd D., y cols. *Brain choline uptake and cognitive function in middle age. Biol. Psych. 1997; 41: 905.*).

a. Las membranas de las células cerebrales dependen de los fosfolípidos como parte de su estructura. La fosfatidilserina (PS) está concentrada en las membranas celulares del cerebro.

b. Los fosfolípidos son necesarios para la producción de los neurotransmisores.

c. La colina es un componente del neurotransmisor acetilcolina. Sin niveles adecuados de acetilcolina, el cerebro no puede almacenar o recuperar la información de forma eficaz.

d. Los niveles bajos de colina en el cerebro son un factor subyacente de los trastornos cognitivos relacionados con la edad.

e. Los pacientes sometidos a una captación aumentada de colina muestran una mejora significativa de su capacidad de recordar la información y de obtener buenos resultados en las pruebas de retención memorística, lo que sugiere una relación causal entre una cantidad de colina deficiente y la cognición.

g. La fosfatidilserina (PS) en las enfermedades relacionadas con la demencia:

a. La demencia es el deterioro de la función mental, que afecta de forma particular a la memoria, la concentración y el juicio.

b. Un caso frecuente de demencia es la enfermedad de Alzheimer.

c. El primer ensayo de doble ciego con PS para la enfermedad de Alzheimer se publicó hace aproximadamente una década. (Delwaide P.J., y cols. *Double-blind randomized controlled study of phosphatidylserine in demented subjects. Acta Neur. Scand. 1986; 73: 136-140*). En este estudio, a 35 pacientes de Alzheimer se les administró un placebo o 300 mg al día de PS durante seis semanas. El grupo con PS mostró una mejora significativa tras este periodo de suplementación a corto plazo.

d. Más recientemente, un gran estudio de doble ciego de 494 pacientes ancianos con síntomas de declive cognitivo comparó placebo con 300 mg al día de PS durante seis meses. (Cenacchi T., Bertoldin T., Farina C., y cols. *Cognitive decline in the elderly: A double-blind, placebo-controlled multicenter study on efficacy of phosphatidylserine administration. Aging Clin. Exp. Res. 1993; 5: 123-133*.) La memoria y el aprendizaje del grupo tratado con PS mejoraron significativamente comparados con el grupo de placebo, así como ciertos componentes emocionales y del comportamiento de la enfermedad de Alzheimer.

e. Los suplementos de PS han demostrado también resultados impresionantes en poblaciones de más edad con deficiencias de la memoria no relacionadas con la enfermedad de Alzheimer (Crook T.H. y cols. *Effects of phosphatidylserine in age-associated memory impairment. Neurology 1991; 41: 644-649*.) Tres meses de administración de 300 mg de PS a diario, en un estudio, invirtió el declive de la función de la memoria en un grupo de 149 pacientes. La función memorística de estos hombres y mujeres inicialmente representaba la media de una persona de 64 años de edad. Después de tomar suplementos de PS, la función memorística media era de 52 años de edad, una mejora mental del 12 años.

h. Restablecimiento y conservación de la función hepática:

- a. Aunque el fosfolípido PS domina en el terreno de la función mental, el fosfolípido fosfatidilcolina (PC) es el principal jugador en la salud hepática.
- b. La PC protege el hígado de las lesiones debidas al alcoholismo, fármacos, sustancias contaminantes, virus y otras influencias tóxicas, la mayoría de las cuales operan lesionando las membranas celulares.
- c. Muchos de los estudios que usan suplementos de PC para ayudar a la recuperación hepática se basan en 800 mg al día (administrado con las comidas). (*Kidd P.M. Phosphatidylcholine: A superior protectant against liver damage. Alt. Med. Rev. 1996; 1:258-274*). Aunque la PC es una fuente de colina, los estudios revisados por el Dr. Kidd sugieren que la PC es mejor que la colina; de hecho, la colina en forma pura puede ser perjudicial para la recuperación del hígado de la sobrecarga tóxica (tal como en el alcoholismo). Como lipotrópico, la colina transporta grasas en el organismo, de forma que una ingesta inadecuada de colina puede provocar una acumulación malsana de grasa en el hígado. (*Newberne P.M. Nauss K.M., y de Camargo J.L. Lipotropes, immunocompetence, and cancer. Cancer Res. 1983; 43: 24265-24345*).

2. Flavonoides

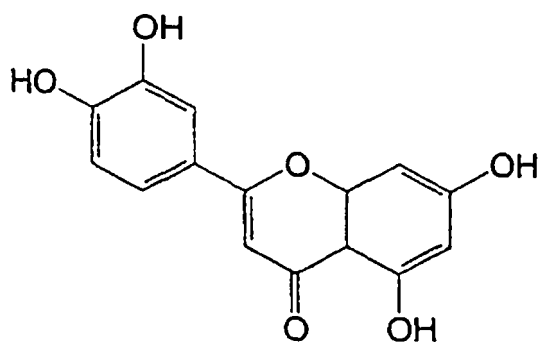
Los flavonoides son compuestos polifenólicos muy abundantes en la naturaleza. Se clasifican en isoflavonas, antocianidinas, flavanos, flavonoles, flavonas, flavonoides de cítricos, hesperidina, calconas, catequinas, rutina y flavanonas. Los flavonoides esenciales, tales como la quercetina en las cebollas y la genisteína en la soja realmente se consideran subcategorías en lugar de categorías independientes. Se han identificado más de 4.000 flavonoides en las frutas, vegetales y bebidas (té, café, cerveza y bebidas de frutas). Incluso aunque tienen una estructura molecular similar entre sí, las funciones de unos son diferentes a las de los otros. Se ha demostrado que los flavonoides presentan una actividad antibacteriana, antiinflamatoria, antialérgica, antimutagénica, antiviral, antineoplásica, antitrombótica y vasodilatadora. Se ha demostrado que la quercetina bloquea la "ruta del sorbitol" que está directamente asociada a la diabetes así como que previene las lesiones oxidativas provocadas por el colesterol asociado a LDL, lo que es esencial para el mantenimiento de un sistema cardiovascular sano.

Los flavonoides se encuentran en una amplia variedad de frutas y verduras. Por ejemplo, la quercetina (un flavonol presente en verduras, frutas y cebollas), el xantohumol (una calcona prenilada de la cerveza), el isoxantohumol (una flavonona prenilada de la cerveza), la genisteína (una isoflavona de la soja), la calconaringenina (una calcona no prenilada de los cítricos) y la naringenina (una flavanona no prenilada de los cítricos).

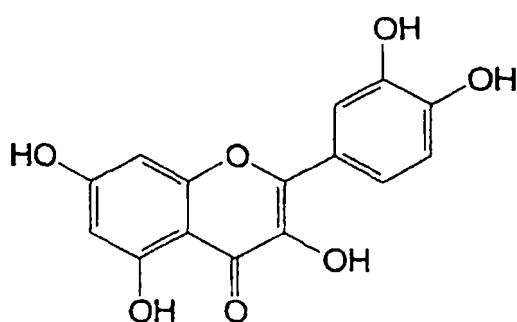
En las plantas, los flavonoides tienen funciones muy definidas. Primero, la acumulación de pigmento en los pétalos de las flores, semillas y hojas. Las flores, como polinizadoras, deben atraer a los portadores del polen. Segundo, protegen a las plantas de las lesiones provocadas por los rayos UV, absorbiendo los rayos UV de la capa epidérmica. Tercero, protegen las plantas de los insectos y patógenos.

La vía de la biosíntesis de los flavonoides es una de las vías de metabolismo secundario vegetal mejor entendidas (1992, Gerats). Las enzimas clave son fenilalanina-amoniaco liasa y calcona sintasa. La fenilalanina-amoniaco liasa convierte fenilalanina en ácido cinámico ya que controla la conversión total de los carbonos en compuestos fenólicos que se ha demostrado que es la etapa limitante de esta vía (1974, Creasy). Otra enzima clave de la vía de los flavonoides es la calcona sintasa. Condensa tres moléculas de malonil-CoA con una molécula de p-curmaroil-CoA formando un intermedio de C15, naringenina calcona, con una estereoquímica R en el segundo carbono. La calcona isomerasa transforma el intermedio en el primer flavonoide de la vía, 2S-flavonona (naringenina). Esta reacción es parte de todas las vías principales de biosíntesis de flavonoides. La calcona sintasa y la calcona isomerasa forman un complejo que asegura la estereoquímica correcta (1996, Lyster).

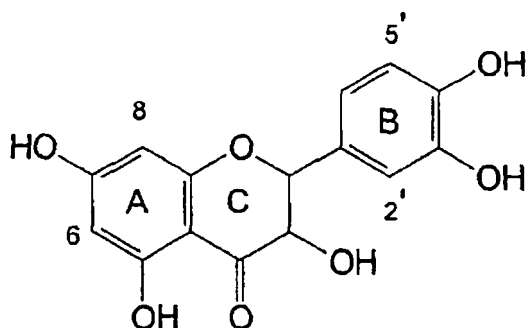
Los componentes estructurales de los flavonoides incluyen dos anillos de benceno a uno u otro lado de un anillo de 3 carbonos. Las diferentes combinaciones de grupos hidroxilo, azúcares, oxígenos y grupos metilo unidos a estas estructuras crean las diversas categorías de flavonoides mencionadas anteriormente. La capacidad de los flavonoides de actuar como antioxidantes depende de su estructura bioquímica y, más específicamente, de la posición de los grupos hidroxilo. Epicatecina galato, epigallocatecina galato, luteolina y quercetina exhiben la mayor actividad antioxidante, seguidos de epigallocatecina, ácido gálico, epicatecina, catequina, rutina y dihidroquercetina. Debe destacarse en este punto que la única diferencia entre la quercetina o la luteolina (la más potente) y dihidroquercetina (la menos potente) es el doble enlace entre el segundo (2º) y tercer (3º) carbonos del anillo central (C). La presencia de este enlace doble aumenta significativamente la actividad antioxidante del flavonoide. La actividad antioxidante puede aumentarse mediante la adición de otro grupo hidroxilo en el anillo B o C.



Luteolina



Quercetina



Dihidroquercetina

La potente actividad antioxidante de los flavonoides parece ser la función más importante de los flavonoides y ser responsable de cualquiera de los beneficios mencionados anteriormente.

Los flavonoides más reconocidos por los científicos actualmente son:

Quercetina y quercetina calcona

La quercetina calcona, es quercetina con un anillo C abierto y el oxígeno que se encuentra en el anillo de C de la quercetina convertido en un grupo hidroxilo. La quercetina se encuentra principalmente en el té e incluso más en el té verde.

Proantocianidinas oligoméricas

Las proantocianidinas oligoméricas son flavonoides oligoméricos, habitualmente dímeros y trímeros, que se basan en la molécula de flavan-3-ol o catequina, unida algunas veces al ácido gálico. Se encuentran en la corteza de los pinos, en las semillas y pellejos de las uvas, en la piel de los cacahuets, en los arándanos, el té y otras fuentes.

Extracto de Ginkgo biloba

Los extractos de *Ginkgo biloba* contienen un 24% de glicósidos de flavonas de ginkgo y un 6% de terpenos. Se extraen de la más antigua de las especies de árboles vivientes, el *Ginkgo biloba*. La investigación científica sugiere que los constituyentes beneficiosos de los extractos de *Ginkgo biloba* son la quercetina y la miricetina.

Luteolina

La luteolina es un flavonoide que se encuentra en los mismos alimentos que la apigenina (verduras y frutas). La investigación científica ha demostrado que la luteolina y la quercetina pueden inhibir el factor activador de plaquetas y suprimir la respuesta inflamatoria inducida por los alérgenos.

Los flavonoides se han estudiado durante los últimos 60 años. Su actividad antioxidante se acepta como hecho científico. La investigación epidemiológica, clínica y de laboratorio sobre los flavonoides demuestra que el uso de flavonoides en la prevención y el tratamiento de enfermedad cardiovascular, cáncer, afecciones inflamatorias, asma, enfermedad periodontal, enfermedad hepática, cataratas y degeneración macular. Hasta la fecha nunca se ha extraído un flavonoide de ninguna otra cosa que una planta, hortaliza, fruta o alga.

3. Preparación de extractos

El extracto de fosfolípidos de la presente invención puede extraerse de una variedad de fuentes de biomasa marina o acuática. Las fuentes preferidas para la composición de fosfolípidos son los crustáceos, en particular, el zooplancton. Un zooplancton preferido de forma particular es el krill. El krill puede encontrarse en muchos entornos marinos en todo el mundo. Por ejemplo, en el océano Antártico (donde el krill es *Euphasia superba*), el océano Pacífico (donde el krill es *Euphasia pacifica*), el océano Atlántico y el océano Índico todos contienen hábitats de krill. En particular, las regiones costeras de isla Mauricio y/o de la isla Reunión en la costa de Madagascar, la costa oeste canadiense, la costa japonesa, el golfo de St. Lawrence y la bahía de Fundy son hábitats del krill.

El extracto de fosfolípidos de la presente invención es preferiblemente un producto del procesamiento inicial de la biomasa. Por lo tanto, los fosfolípidos se extraen de la grasa de la biomasa no del aceite, que es un producto de las etapas posteriores del procesamiento de una biomasa. Dado que el extracto de fosfolípidos se deriva de la grasa de la biomasa, la viscosidad del extracto de fosfolípidos tiende a ser mayor que la de los extractos de los aceites de la biomasa. El extracto presenta una estabilidad natural muy alta con un valor de peróxidos de cero o cercano al cero y un buen índice de estabilidad de aceite inferior a aproximadamente 0,2 Meq/kg después de 20 o más horas. La Tabla 1 siguiente detalla la estabilidad del extracto.

TABLA 1

Índices de estabilidad del extracto después de 50 horas a 97,8°C

Valor de peróxidos (mEq/kg)	< 0,1
Índice de estabilidad de aceite (después de 50 horas) a 97,8 °C (mEq/kg)	< 0,1
Índice de saponificación	70-180
Índice de yodo (%)	60-130

Los fosfolípidos generalmente están presentes en el extracto en una cantidad de al menos el 40% p/p, preferiblemente al menos el 45% p/p. Más preferiblemente, la cantidad de fosfolípido es de aproximadamente el 45-60% p/p. Puede haber una variedad de fosfolípidos presentes en el extracto. Estos incluyen fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, fosfatidilcolina y esfingomielina.

El extracto de fosfolípidos preferiblemente comprende además otros componentes numerosos. El extracto también puede comprender ácidos grasos, antioxidantes y/o metales.

Los ácidos grasos que se encuentran en el extracto de fosfolípidos pueden ser ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados. Se prefieren de forma particular los ácidos grasos poliinsaturados, prefiriéndose de la forma más particular los ácidos grasos omega-3 y omega-6. En particular están presentes el ácido docosahexanoico (DHA), el ácido eicosapentanoico (EPA), ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido lignocérico, ácido linolénico, ácido alfa-linolénico, ácido nerviónico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico y ácido palmitoleico en cantidades significativas. El contenido en ácido araquidónico del extracto es generalmente de muy bajo a inexistente a pesar de la presencia de fosfatidilinositol y de fosfatidilserina. Otros componentes lipídicos que pueden estar presentes en el extracto incluyen monoglicéridos, triglicéridos y/o colesterol.

La Tabla 2 a continuación detalla las composiciones de los ácidos grasos de los fosfolípidos del extracto.

ES 2 288 193 T3

TABLA 2

Composición de los ácidos grasos del extracto de los fosfolípidos

Ácidos grasos	AG PL totales %	AG PC %	AG PE %
C14:0 MIRISTICO	2,04	1,70	0,7
C14:1 MIRISTOLEICO	1,22		
C15:0 PENTADECANOICO	0,2	0,30	0,3
C16:0 PALMITICO	24,08	26,50	23,9
C16:1 PALMITOLEICO	2,24	2,30	0,7
C18:0 ESTEARICO	1,02	1,30	2,9
C18:1 OLEICO	9,18	11,90	24,1
C18:2n6 LINOLEICO	1,63	2,30	0,8
C18:3n6 GLA	1,02	0,30	
C18:3n3 ALA	1,02	1,30	
C18:4n3 OTA	1,84	2,00	0,3
C20:0 ARAQUIDICO			
C20:1 cis-11-EICOSENOICO	0,41	0,60	0,7
C20:2n6 EICOSADIENOICO			
C20:3n6 METIL ETA		0,20	
C20:4n6 ARAQUIDONICO	0,61	0,70	0,6
C20:3n3 Homo-γ-LINOLENICO			
C20:4n3			
C20:5n3 EPA	27,35	31,90	12,9
C22:0 BEHENICO			
C22:1 ERUCICO	1,22	1,50	
C22:2n6			
C22:4n6			
C22:5n6 METIL DPA			
C22:5n3 DPA		1,00	
C22:6n3 DHA	24,9	14,20	32,1
C24:0 LIGNOCERICO			
C24:1 NERVONICO			
Total	100,0	100	100

Comparados con los fosfolípidos que existen actualmente en el mercado, los fosfolípidos del extracto:

- a. consiguen un perfil mejor;
- b. tienen las mayores cantidades de ácidos grasos poliinsaturados;
- c. tienen las mayores cantidades de DHA;
- d. son los únicos fosfolípidos que contienen EPA; y
- e. son los únicos fosfolípidos que contienen una combinación de EPA y DHA en la misma molécula.

PL = fosfolípido

ES 2 288 193 T3

AG = ácido graso

PC = fosfatidilcolina

5 PE = fosfatidiletanolamina

Los ácidos grasos libres están presentes en el extracto en una cantidad de al menos el 4% p/p y preferiblemente al menos el 5% p/p. Los ácidos grasos poliinsaturados, en particular los ácidos grasos omega-3, preferiblemente forman al menos el 15% p/p, más preferiblemente al menos el 40% p/p, e incluso más preferiblemente al menos el 45% p/p, de los lípidos totales del extracto. El DHA y el EPA son generalmente el componente mayoritario de los ácidos grasos y preferiblemente suponen al menos el 32% p/p, más preferiblemente al menos el 35% o el 37%, del contenido lipídico total del extracto.

15 La Tabla 3 a continuación detalla la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales del extracto.

TABLA 3

Composición de los ácidos grasos de los lípidos totales del extracto

20	Muestra	%
	Composición de los ácidos grasos	
	C14:0	≥ 3,00
25	C14:1	≥ 0,01
	C15:0	≥ 0,3
	C16:0	≥ 20,00
30	C16:1	≥ 3,25
	C18:0	≥ 1,00
35	C18:1	≥ 10,00
	C18:2n6	≥ 2,00
	C18:3n6 GLA	≥ 0,04
40	C18:3n3 ALA	≥ 0,01
	C18:4n3	≥ 1,50
	C20:0	≥ 0,05
45	C20:1	≥ 1,00
	C20:2n6	≥ 0,05
	C20:3n6	≥ 0,05
50	C20:4n6	≥ 0,50
	C20:3n3	≥ 0,01
55	C20:4n3	≥ 0,20
	C20:5n3 EPA	≥ 25,00
	C22:0	≥ 0,01
60	C22:1	≥ 1,50
	C22:2n6	≥ 0,03
65	C22:4n6	≥ 0,01

ES 2 288 193 T3

	C22:5n6	$\geq 0,01$
	C22:5n3 DPA	$\geq 0,50$
5	C22:6n3 DHA	$\geq 10,00$
	C24:0	$\geq 0,01$
	C24:1	$\geq 0,05$

La Tabla 4 a continuación también detalla la composición de los ácidos grasos de los lípidos totales del extracto.

TABLA 4

Composición en ácidos grasos de los lípidos totales del extracto

	Saturados (g/100 g de lípido)	$\geq 22,00$
	Monoinsaturados (g/100 g de lípido)	$\geq 11,00$
	Poliinsaturados (g/100 g de lípido)	$\geq 35,00$
	omega-3 (g/100 g de lípido)	$\geq 30,00$
	omega-6 (g/100 g de lípido)	$\geq 1,00$

Los antioxidantes presentes en el extracto pueden incluir vitamina A (por ejemplo, todo-trans retinol), vitamina E (por ejemplo, alfa-tocoferol), beta-caroteno, astaxantina (principalmente esterificada pero también puede estar presente sin esterificar), cantaxantina y/o flavonoides. Los antioxidantes preferiblemente están presentes en el extracto en una cantidad de al menos 20 y preferiblemente al menos 200 mg/100 ml.

La Tabla 5 a continuación detalla los lípidos y otros compuestos (no metálicos) del extracto.

TABLA 5

Composición de los lípidos, vitaminas A y E, pigmentos y flavonoides del extracto

	Monoglicéridos (MG) (g/100 g de muestra)	$\geq 0,7$
	Triglicéridos (TG) (g/100 g de muestra)	$\geq 3,00$
	Ácidos grasos libres (FAA) (g/100 g de muestra)	$\geq 5,00$
	Colesterol (g/100 g de muestra)	$\geq 2,00$
	Fosfolípidos totales (PL) (g/100 g de muestra)	$\geq 40,00$
	Fosfatidil etanolamina (PE) (g/100 g de muestra)	$\geq 2,50$
	Fosfatidil inositol (PI) (g/100 g de muestra)	$\geq 0,20$
	Fosfatidil serina (PS) (g/100 g de muestra)	$\geq 0,20$
	Fosfatidil colina (PC) (g/100 g de muestra)	$\geq 35,00$
	Esfingomielina (g/100 g de muestra)	$\geq 0,50$
	Vitamina A ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	≥ 1.400
	Vitamina E ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	≥ 15
	beta-caroteno ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	≥ 1.600
	Astaxantina (mg/100 ml)	≥ 10
	Cantaxantina (mg/100 ml)	≥ 10
	Flavonoide (mg/100 ml)	$> 7,0$

ES 2 288 193 T3

Los metales presentes en el extracto son preferiblemente cinc y selenio. El cinc preferiblemente está presente en una cantidad de al menos 0,05 mg/100 g de extracto mientras que el selenio está generalmente presente en una cantidad inferior a 3 mg/100 g de extracto.

5 La Tabla 6 a continuación detalla el contenido en metales del extracto.

TABLA 6

Composición de los metales y residuo del disolvente de la mezcla del extracto

10

Cinc (mg/100 g)	> 0,1
Selenio (mg/100 g)	< 2
Residuo del disolvente	< 25 ppm

15

La tabla 7 a continuación detalla las características fisicoquímicas del extracto-

TABLA 7

Características fisicoquímicas del extracto

20

Color	Rojo
Viscosidad (cPs)	< 1300
Olor	Pescado

25

30 La extracción de la composición de fosfolípidos de la biomasa generalmente se realiza mediante un procedimiento similar al que se describen en la publicación de patente PCT publicación número WO 00/23546 de propiedad común, publicada el 27 de abril de 2000. La extracción generalmente se realiza mediante tratamientos sucesivos de acetona y alcohol. Para la extracción de la presente solicitud de patente, el tratamiento preferido implica el uso de >60% de acetona en la primera extracción seguida de extracción con una mezcla de disolventes orgánicos a 65-95%/45-50% preferiblemente en una mezcla de acetona, acetato de etilo/etanol. El sistema de disolventes de extracción más preferido es acetona al 100% en la primera extracción seguida de una mezcla al 95%/5% de acetato de etilo/etanol. Sin embargo, también pueden usarse otras cetonas combinadas o en lugar de acetona. El alcohol puede ser distinto del etanol, por ejemplo, isopropanol o t-butanol. El acetato también puede variar. Además, la relación entre alcohol y acetato puede variar ampliamente de 100:0 a 0:100. El procedimiento produce dos fracciones lipídicas sucesivas y un residuo seco enriquecido en proteína, que incluye enzimas activas.

35

40

Preferiblemente, el material animal marino y acuático recién cogido y finamente fraccionado se somete a extracción con acetona, durante al menos aproximadamente dos horas y preferiblemente toda la noche. Sin embargo, el tiempo de extracción no es crítico para el rendimiento del lípido extraído. Se prefieren tamaños de las partículas de los crustáceos molidos de menos de 5 mm. La extracción preferiblemente se realiza preferiblemente en una atmósfera inerte y a una temperatura de aproximadamente 5 grados Celsius o menos. La mezcla puede agitarse durante la extracción y generalmente la relación entre los volúmenes de acetona y biomasa de aproximadamente 6:1 es la más preferida.

45

La fracción lipídica solubilizada se separa del material inicial sólido mediante técnicas conocidas, por ejemplo, mediante filtración, centrifugación o sedimentación. Se prefiere la filtración. El residuo se lava opcionalmente con acetona para recuperar más lípido y la acetona se elimina mediante evaporación ultrarrápida o secado por pulverización. Se deja separar el residuo en agua del extracto lipídico a temperatura baja.

50

El residuo sólido que queda en el filtro a partir de la extracción inicial se suspende y se extrae con 95/5 de acetato de etilo/etanol, preferiblemente dos volúmenes (volumen original del material). El filtrado se evapora proporcionando una segunda fracción de lípidos. El periodo de extracción no es crítico aunque se prefiere extraer durante aproximadamente 30 minutos a una temperatura inferior a aproximadamente 5 grados Celsius.

55

Cada fosfolípido se subdivide en múltiples categorías dependiendo de los ácidos grasos que están unidos a la molécula. La actividad biológica, la biodisponibilidad así como el valor de los fosfolípidos se determinan por la pureza y la fuente:

60

a. Pureza

65

i. La pureza óptima del fosfolípido o flavonoide de la invención es de al menos 99% en peso. La pureza del fosfolípido o flavonoide después de la extracción a partir del krill puede variar, pero normalmente estará en el intervalo de al menos el 90% al 100% de la mezcla de compuesto(s) fosfolipídico(s). Habitualmente, la pureza será de al menos

el 95%. Preferiblemente, la pureza será de al menos 96%, 97% ó 98%. Más preferiblemente, la pureza será de al menos 99,5%. Lo más preferiblemente, la pureza será de al menos el 99,9%. Por “pureza” se quiere decir que el fosfolípido o flavonoide de la invención está aislado de otros fosfolípidos, flavonoides o componentes del extracto, al porcentaje en peso especificado. El aislamiento puede realizarse por ejemplo por HPLC. Por ejemplo, un fosfolípido que es puro al 99%, contiene menos del 1% en peso de cualquier material distinto del fosfolípido especificado.

ii. Con una pureza mayor se logra una biodisponibilidad y eficacia mayores.

iii. El valor del mercado de los fosfolípidos es directamente análogo a la pureza del producto final que se logre.

b. Fuente y contenido en ácidos grasos

i. Los tipos de ácidos grasos unidos al fosfolípido dependen mucho de la fuente.

ii. Los fosfolípidos de origen vegetal contienen principalmente ácido palmítico (16:0), ácido esteárico (18:0), ácido vaccénico (18:1), ácido linoleico (18:2) o ácido alfa-linoleico (18:3).

iii. Los fosfolípidos de origen animal contienen un mayor porcentaje de ácidos grasos de cadena más larga con un mayor grado de insaturación como el ácido homo- γ -linoleico (20:3), ácido araquidónico (20:4), ácido behénico (22:0) y ácido docosahexanoico DHA (22:6).

iv. Los fosfolípidos Neptune Krill Oil™ (la presente invención) contienen grandes cantidades de ácido eicosapentanoico EPA (20:5) y ácido docosahexanoico DHA (22:6). Su perfil de ácidos grasos se parece mucho al de los fosfolípidos del cerebro humano.

v. La eficacia sobre la salud humana y el valor de los fosfolípidos aumenta de forma directamente análoga a la longitud de la cadena de ácidos grasos y al grado de insaturación. Por lo tanto, los fosfolípidos con más ácidos grasos poliinsaturados unidos son más eficaces y de mayor valor.

vi. El ácido araquidónico, aunque poliinsaturado, ha demostrado que predispone a la enfermedad inflamatoria. Por lo tanto se prefieren cantidades moderadas.

vii. DHA y EPA son los dos ácidos grasos poliinsaturados más activos del cuerpo humano, que contribuyen a todos los beneficios para la salud asociados a los ácidos grasos omega-3.

viii. Las mayores cantidades de ácidos grasos poliinsaturados contenidos en los fosfolípidos del mercado actualmente son:

a. Ácido araquidónico:	30,1%
b. Ácido homo-gamma-linolénico:	9,0%
c. DHA	8,4%

4. Composiciones farmacéuticas, nutraceuticas y cosméticas

El extracto de fosfolípidos de la presente invención puede usarse con o sin otros aditivos. Preferiblemente no se usan otros aditivos. Sin embargo, si se usan otros aditivos, las formulaciones farmacéuticas o nutraceuticas pueden prepararse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, las composiciones de la presente invención pueden formularse de forma convencional usando uno o más vehículos farmacéuticamente o nutraceuticamente aceptables. Así, el extracto puede formularse para la administración oral. Para la administración oral, las composiciones farmacéuticas o nutraceuticas pueden tomar forma, por ejemplo, de comprimidos o cápsulas preparados por medios convencionales con excipientes farmacéuticamente o nutraceuticamente aceptables tales como agentes ligantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo lactosa, celulosa microcristalina o fosfato cálcico); lubricantes (por ejemplo estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o almidón glicolato sódico); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato sódico). Los comprimidos pueden recubrirse mediante procedimientos notorios en la técnica. Las preparaciones líquidas para la administración oral pueden tomar forma, por ejemplo, de soluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse en forma de producto seco para su reconstitución con agua u otro vehículo adecuado antes de usar. Dichas preparaciones líquidas pueden prepararse por medios convencionales con aditivos farmacéuticamente o nutraceuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo jarabe de sorbitol, metilcelulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres oleosos o alcohol etílico); y conservantes (por ejemplo p-hidroxibenzoatos metílico o propílico o ácido sórbico).

Cuando el extracto de fosfolípidos de la invención se usa como sustancia nutraceutica, puede estar en forma de alimentos, bebidas, barritas energéticas, bebidas deportivas, suplementos u otras formas, todas tal como se conocen en la técnica.

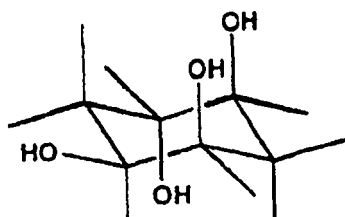
Tal como se refiere anteriormente, el extracto de fosfolípidos de la invención también es de utilidad en las preparaciones cosméticas, por ejemplo, cremas hidratantes, productos de pantalla solar y otros productos cosméticos tópicos tal como se conocen en la técnica.

El extracto de fosfolípidos de la presente invención puede usarse en el tratamiento o prevención de una variedad de estados de enfermedad que incluyen: enfermedad hepática; hepatitis crónica; esteatosis; fibrosis hepática; alcoholismo; malnutrición; nutrición parenteral crónica; déficit de fosfolípidos; peroxidación lipídica; disaritmia de la regeneración celular; desestabilización de las membranas celulares; enfermedad arteri coronaria provocada por la hipercolesterolemia; hipertensión arterial; afecciones menopáusicas o postmenopáusicas; cáncer, por ejemplo, cáncer de piel; hipertensión; envejecimiento; hiperplasia prostática benigna; enfermedad renal; edema; enfermedades de la piel; enfermedades gastrointestinales; enfermedades del sistema vascular periférico (por ejemplo úlceras en las piernas); toxemia del embarazo; y enfermedades neurodegenerativas y psiquiátricas (por ejemplo Parkinson, Alzheimer, autismo, trastorno de déficit de atención, trastornos del aprendizaje (por ejemplo, dislexia), trastornos del estado de ánimo, depresión bipolar y función motora anormal, tal como esclerosis múltiple y distrofia muscular).

Los extractos, por ejemplo, pueden usarse por vía oral o tópica para tratar el cáncer de piel.

Los extractos también son de utilidad para dirigirse contra los tumores y pueden usarse junto con radioisótopos para diagnosticar o dirigirse contra los tumores, tales como tumores del sistema nervioso central. El extracto también puede usarse para reducir los depósitos de grasa local y para reducir la celulitis visible. El extracto también puede usarse en operaciones estéticas tales como aumento mamario actuando sobre el tejido lobular de la mama y aumentando la hidratación de la mama.

Tal como se reseña anteriormente, la presente invención proporciona composiciones que comprenden fosfolípidos que se derivan de una biomasa marina o acuática que tiene la fórmula general (I) anterior, en la que X representa $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$, o



para fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina o fosfatidilinositol, respectivamente.

El resto ácido de la parte izquierda se deriva del ácido docosahexanoico (DHA) [C22:6n3]. El resto de la parte derecha se deriva de ácido eicosapentanoico (EPA) [C20:5n3].

Tal como se reseña anteriormente, las composiciones de la presente invención también comprenden un compuesto flavonoide que se deriva de una biomasa marina o acuática que tiene la fórmula (II) anterior. El flavonoide es un antioxidante y así es de utilidad en las composiciones farmacéuticas, nutracéuticas y cosméticas de la invención.

Tal como se usa en la presente memoria y en las reivindicaciones, cuando se usa el término “aproximadamente” con un valor numérico, el valor numérico puede variar en al menos $\pm 50\%$. Preferiblemente, la variación será de $\pm 40\%$ o $\pm 30\%$ y más preferiblemente $\pm 20\%$ o $\pm 10\%$. Variaciones incluso más preferidas están en el intervalo de $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$ o $\pm 2\%$. Lo más preferiblemente, la variación está en el intervalo de $\pm 1\%$.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1 a 3 son cromatogramas del producto del Ejemplo 1.

La Fig. 4 es un espectrograma de masas para caracterizar el compuesto flavonoide novedoso (II).

La invención se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos no limitantes.

La extracción de los para el ejemplo 1 fue tal como se describió anteriormente para las extracciones de krill.

Ejemplos

Materiales y Métodos

Para el análisis de los lípidos, se disolvieron muestras en disolvente y se añadieron patrones. Las clases de lípido se aislaron usando gel de sílice y se cuantificaron. La composición en ácidos grasos de los lípidos totales e individuales se determinó mediante cromatografía de gases. Los pigmentos se midieron mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa.

ES 2 288 193 T3

Ejemplo 1

Este ejemplo ilustra el aislamiento y caracterización molecular de los fosfolípidos del extracto.

5 Muestra n.º 804 determinación de la especie molecular

La muestra contiene grandes cantidades de fosfolípidos, principalmente:

PC (438,48 mg/g de lípido)

PE (183,15 mg/g de lípido).

Se obtuvieron resultados preliminares sólo para estas dos fracciones fosfolipídicas.

15 Métodos

Separación de las principales fracciones fosfolipídicas

Para obtener grandes cantidades de PC y PE, la separación se realizó mediante cromatografía en capa fina (TLC) y la identidad de las bandas se confirmó por HPLC.

Formación de diacilglicerol

Ambas fracciones (PC y PE) se incubaron con fosfolipasa C, la enzima que elimina colina fosfato de PC y etanolamina fosfato de PE. Los diacilgliceroles restantes se extrajeron con éter etílico.

Derivatización de los benzoatos

Cada mezcla de diacilgliceroles debe derivarse (usando anhídrido benzoico y 4-dimetilaminopiridina) para posibilitar una separación ulterior. En un experimento paralelo, la derivatización se realizó para tres patrones de diacilgliceroles auténticos, dilinoleína, dioleína y dipalmitina.

Separación de subclases

Se realizó una separación preliminar de los derivados de diacilgliceroles en subclases por TLC. Los derivados del diacilglicerol obtenidos a partir de PC y a partir de PE se separaron en dos bandas principales (n.º 3 y n.º 4). También podían verse bandas n.º 2 adicionales muy cerca del principio. Sólo se procesaron las bandas n.º 3 y n.º 4 adicionalmente porque su localización correspondía a la localización de la banda n.º 2 principal obtenida para una mezcla de patrones (derivados benzoato de dilinoleína, dioleína y dipalmitina).

Separación de las placas de TLC del ejemplo

# 3		
#4 (Rf = 0.37)	#4 (Rf = 0.37)	
#2		
#3 (Rf = 0.25)	#3 (Rf = 0.25)	
#2	#2	
Inicio Mezcla de patrones	Inicio PC	Inicio PE

Fraccionamiento por HPLC

Las bandas n.º 3 y n.º 4 obtenidas para PC y PE se eluyeron y se separaron ulteriormente en especies de diacilglicerol individuales por HPLC. Para confirmar un número de picos para el análisis por CG posterior, cada pico se recogió y se volvió a pasar por HPLC.

ES 2 288 193 T3

Número de picos confirmados:

Para la banda de PC n.º 3, se identificaron y confirmaron nueve picos.

5 Para la banda de PC n.º 4, se identificaron y confirmaron nueve picos.

Para la banda de PE n.º 3, se identificaron y confirmaron ocho picos.

10 Para la banda de PE n.º 4, se identificaron y confirmaron ocho picos.

Véase la Figura 1.

Hidrólisis, derivatización del éster metílico y análisis por CG

15 Tanto para PC como para PE, se hidrolizaron todos los picos confirmados obtenidos de la separación por HPLC de la banda n.º 3 y se determinaron los perfiles de los ácidos grasos mediante GC tras la conversión en ésteres metílicos. La identidad de los picos se evaluó mediante espectrometría de masas. Los perfiles de los ácidos grasos se compararon con los obtenidos para las fracciones de PC y PE intactos sometidos a hidrólisis y metilación.

20 *Resultados*

Las áreas de los picos calculadas para las especies moleculares de ácidos grasos en las fracciones seleccionadas se resumen en la Tabla 8. Las áreas de los picos de los ácidos grasos para la fracción de PC y PE intactos están en la Tabla 9. Los perfiles representativos de la cromatografía de gases para una fracción individual y para el fosfolípido 25 intacto (PC) se presentan en la Tabla 10.

Los perfiles de cromatografía de gases obtenidos para los picos individuales fueron consistentes con los perfiles obtenidos para PC intacto. Contenían únicamente 5-6 picos principales mientras que los perfiles de la cromatografía de gases de los fosfolípidos intactos estaban formados por un número de picos mucho mayor. Entre los 5-6 picos que 30 se encuentran de forma consistente en los perfiles de las especies moleculares, sólo se confirmó la identidad de dos mediante espectrometría de masas (C16:0 y C18:0). Entre los tres picos restantes, uno no correspondía a ningún ácido graso y dos tenían tiempos de retención idénticos a los de los ácidos grasos omega-3 auténticos, EPA y DHA.

El pico de C16:0 era prominente en todas las especies moleculares individuales y también era prominente en las 35 fracciones fosfolipídicas intactas. Para el pico de C18:0, las proporciones que se encuentran en los picos individuales eran relativamente altas. Se encontró ácido oleico (C18:1) a niveles elevados tanto en el perfil de los ácidos grasos de PC como de PE.

TABLA 8

40

Áreas de los picos de las especies moleculares obtenidos para las fracciones seleccionadas					
Fracción	C16:0	C18:0	EPA	TR 48,33	DHA
Banda de PC n.º 3 F1	205,27	57,79	42,76	103,83	62,07
Banda de PC n.º 3 F2	21,39	8,87	0	71,96	7,11
50 Banda de PC n.º 3 F3	58,74	17,70	0	45,64	14,75
Banda de PC n.º 3 F4	93,41	9,72	0	44,31	9,19
Banda de PC n.º 3 F5	19,87	9,67	4,56	46,89	3,96
55 Banda de PC n.º 3 F6	15,26	10,34	12,45	59,86	14,29
Banda de PC n.º 3 F7	28,32	10,93	30,70	56,83	25,12
Banda de PC n.º 3 F8	6,39	4,49	0	84,24	11,89
Banda de PC n.º 3 F9	14,65	8,21	8,60	58,95	28,22
60 Banda de PE n.º 3 F2	4,50	10,79	0	77,68	9,19
Banda de PE n.º 3 F3	26,85	22,14	14,45	49,62	21,76
Banda de PE n.º 3 F4	13,08	22,45	28,70	62,11	29,43
65 Banda de PE n.º 3 F5	22,42	20,34	11,06	100,79	30,61
Banda de PE n.º 3 F6	3,05	6,13	4,93	54,88	7,28

ES 2 288 193 T3

TABLA 9

Áreas de los picos de los ácidos grasos seleccionados de PC y PE intactos

	C16:0	C18:0	C18:1	EPA	Sin ident.	DHA
Tiempo de retención	15,80	21,66	22,36+22,63	39,68	48,34	53,59
PC	1141,36	35,75	257,99	642,50	68,61	192,2
PE	166,43	20,45	87,75	59,77	110,27	109,6

Véase la Fig. 2

TABLA 10

Perfiles de CG representativos para una fracción individual y para fosfolípidos (PE) intacto

CH	PKNO	TIEMPO	AREA	ALTURA	MK	IDNO	CONC
1	5	0,826	17654310	1368301	E		21,8397
	13	2,637	11027760	1352920	E		13,6422
	14	2,916	2167386	203115	E		2,6812
	15	3,15	597812	87264	V		0,7395
	22	4,408	667991	60799	V		0,8264
	29	7,063	7293939	290768			9,0231
	30	8,397	144489	13997			0,1787
	32	9,933	32467398	1384059	E		40,1646
	33	10,252	8166303	661493	V		10,1023
	43	14,451	348072	20030			0,4306
	44	14,813	102126	9975			0,1263
	45	15,12	198366	21561			0,2454
TOTAL			80835952	5474282			100

Véase la figura 3

Ejemplo 2

Cáncer de piel inducido por UVB

Objetivos

Evaluar el potencial fotoprotector del extracto de krill contra el cáncer de piel inducido por UVB

Diseño del estudio

Ensayo con control aleatorizado

Significación estadística $p < 0,05$

Fase de estudio

Preclínica

Animales experimentales

Tipo: ratones atímicos

- 5 Cepa: Ratones congénicos atímicos C57BL6 - B6NU - T (heterozigotos)
(Preferencia de tipo específico debido a la susceptibilidad probada al cáncer de piel).

10 *Protocolo del estudio*

Número de ratones atímicos = 96

Grupos de aleatorización:

- 15 48 con placebo:
16 por vía oral
20 16 por aplicación local
16 por vía oral y por aplicación local
48 con extracto de krill:
25 16 por vía oral
16 por aplicación local
30 16 por vía oral y por aplicación local

- 35 Para establecer la eficacia del extracto de krill para la prevención del cáncer de piel, la prueba se realizó en forma de un ensayo controlado de doble ciego aleatorizado (tanto el anatomopatólogo como el ayudante de la investigación eran ciegos). La mitad de los ratones se trataron por vía oral o tópica o ambas con extracto que contenía el 100% en peso de extracto de krill y la otra mitad pasó por el mismo procedimiento de tratamiento con un placebo. Los grupos se dividieron de la siguiente manera:

Alimentación: Semana

- 40 1: dieta sin grasas
Semanas 2-20: según el grupo

45 *Diseño experimental*

Los ratones se dividieron en seis grupos de la forma siguiente:

- 50 Grupo A: dieta sin grasas con suplemento de extracto de soja (20% de las calorías totales)
Grupo B: dieta sin grasas (100% de las calorías) + aplicación local de extracto de soja 2 veces al día
Grupo C: dieta sin grasas con suplemento de extracto de soja (20% de las calorías totales) + aplicación local de extracto de soja 2 veces al día.
55 Grupo D: dieta sin grasas con suplemento de extracto de krill (20% de las calorías totales)
Grupo E: dieta sin grasas (100% de las calorías) + aplicación local de extracto de krill 2 veces al día
60 Grupo F: dieta sin grasas con suplemento de extracto de krill (20% de las calorías totales) + aplicación local de extracto de krill 2 veces al día
Semanas 2-20: radiación UVB usando una lámpara de ensayo fluorescente, espectro de emisión 270 - 400 nm.
65 Semanas 3-20: se examina el líquido de las vesículas formadas para determinar los niveles de PGE2
Semanas 3-20: se anestesia a los ratones con éter y se sacrifican cuando se han formado los tumores malignos al final de las 20 semanas.

La piel es examinada por un anatomopatólogo para determinar signos de carcionogénesis.

Los resultados se muestran en la siguiente Tabla 11.

TABLA 11

	Frecuencia del cáncer	
	Aceite de krill	Placebo
Aplicación	Frecuencia %	Frecuencia %
Oral	13	69,3
Tópica	0	63,8
Oral y tópica	0	37,5

Como conclusión, los resultados del presente estudio demuestran que el extracto de krill tanto por vía oral como tópica puede ser empleado eficazmente para la protección de la piel contra los efectos dañinos de la radiación UVB que incluyen el cáncer de piel.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra el uso del presente extracto de krill para mejorar la dislexia y la función motora anormal en una niña de 7 años.

Se administraron 2 g al día del extracto de krill a una niña de 7 años que padecía dislexia y función motora anormal. Después de 15 meses, mostraba:

- Mayor capacidad de aprendizaje (observación ciega de un psicólogo)
- Mejora de la función motora (patinaje sobre hielo moderado)
- Mejora de las habilidades sociales
- Mejora del habla

Por consiguiente, el extracto de krill presenta propiedades neurológicas beneficiosas.

Aunque la invención precedente se ha descrito con cierto grado de detalle mediante ilustración y ejemplo, para mayor claridad de la comprensión, para las personas de experiencia ordinaria en la técnica, a la vista de la enseñanzas de esta invención, será obvio que pueden realizarse ciertos cambios y modificaciones sin separarse del alcance de las reivindicaciones anexas.

Referencias

1. Lisa Colodny, Pharm D. y Ronald L Hoffman, M.D. *Altern Med Rev* 1998; 3(6): 432-447.
2. Vandal R. Role of inositol in the treatment of psychiatric disorders. *CNS Drugs* 1997; 7: 6-16.
3. Gill DL, Ghosh TK, Mullaney JM. Calcium signaling mechanisms in endoplasmic reticulum activated by inositol 1,4,5 triphosphate and GTP. *Cell Calcium* 1989; 10: 363-374.
4. Parthasarathy L, Vandal R, Parthasarathy R, y cols. Biochemical and molecular properties of lithium-sensitive myo-inositol monophosphatase. *Life Sci* 1994; 54:1127-1142.
5. Kitamura H, Yamauchi A, Sugiura T, y cols. Inhibition of myo-inositol transport causes acute renal failure with selective medullary injury in the rat. *Kidney Int* 1998; 53: 146-153.
6. Barkai A, Dunner D, Gross H, y cols. Reduced myo-inositol levels in cerebrospinal fluid from patients with affective disorder. *Biol Psychiatry* 1976; 13: 65-72.
7. Levine J, Rapaport A, Lev L, y cols. Inositol treatment raises CSF inositol levels. *Brain Research* 1993; 627: 168-169.
8. Levine J. Controlled trials of inositol in psychiatry. *Eur Neuropsychopharmacol* 1997; 7: 147-155.

9. **Cohen H, Kotler M, Kaplan Z**, y cols. Inositol has behavioral effects with adaptation after chronic administration. *J Neural Transm* 1997; 104: 299-305.

10. **Levine J, Barak Y, Gonzalves M**, y cols. Double-blind, controlled trial of inositol treatment of depression. *Am J Psychiatry* 1995; 152: 792-794.

11. **Levine J, Barak Y, Kofman D**, y cols. Follow-up and relapse of an inositol study of depression. *Isr J Psychiatry Relat Sci* 1995; 32: 14-21.

12. **Benjamin J, Levine J, Fux M**, y cols. Double-blind, placebo-controlled, crossover trial of inositol treatment for panic disorder. *Am J Psychiatry* 1995; 15: 1084-1086.

13. **Birchall J, Chappell J**. Aluminum, chemical physiology, and Alzheimer's disease. *Lancet* 1988; 29: 1008-1010.

14. **Cheng D, Ren H, Tang X**. Huperzine A. A novel promising acetylcholinesterase inhibitor. *Neuroreport* 1996; 8: 97-101.

15. **Kawakami Y, Inoue A, Kawai T**, y cols. The rationale for E2020 as a potent acetylcholinesterase inhibitor. *Bioorg Med Chem* 1996; 4: 1429-1446.

16. **Knopman D, Schneider L, Davis K**, y cols. Long term tacrine (Cognex) treatment effect on nursing home placement and mortality, tacrine study group. *Neurology* 1996; 47: 166-167.

17. **Mohr E, Nair N, Sampson M**, y cols. Treatment of Alzheimer's Disease with sabeluzole: functional and structural correlates. *Clin Neuropharmacol* 1997; 20: 338-345.

18. **Rogers S, Friedhoff L**. The efficacy and safety of donepezil in patients with Alzheimer's disease: results of a US multicentre, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The donepezil study group. *Dementia* 1996; 7: 293-303.

19. **Schneider L, Farlow M, Pogoda J**. Potential role for estrogen replacement in the treatment of Alzheimer's dementia. *Am J Med* 1997; 103: 46S-50S.

20. **Van Dyck C, Lin C, Robinson R**, y cols. The acetylcholine releaser linopiridine increases parietal regional cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Psychopharmacology* 1997; 132: 217-226.

21. **Barak Y, Levine J, Glasman A**, y cols. Inositol treatment of Alzheimer's disease: a double blind, cross-over placebo controlled trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 1996; 20: 729-735.

22. **Michael D., Seidman, MD.**, FACS Polyunsaturated Phosphatidylcholine in NT Factor™ Improves Mitochondrial Function, Auditory Sensitivity and May Slow Some Aspects of the Aging Processes. *Anti-aging Medical News*, invierno de 2001-01.

23. **Imperato A, Ramacci MT, Angelucci L**. Acetyl L-carnitine enhances acetylcholine release in the striatum and hippocampus of awake freely moving rats. *Neuroscience letters*. 1989; 107(1-3): 251-255.

24. **Ghirardi O, Milano S, Ramacci MT, Angelucci L**. Effects of acetyl L-carnitine chronic treatment on discrimination models in aged rats. *Physiol. Behav.* 1988; 44(6): 769-773.

25. **Caprioli A, Ghirardi O, Ramacci MT, Angelucci L**. Age-dependent deficits in radial maze performance in the rat: effect of chronic treatment with acetyl L-carnitine. *Prog. in Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatr.* 1990; 14 (3): 359-369.

26. **Bast A y Haenen GRMM**. Interlay between lipoic acid and glutathione in the protection against microsomal lipid peroxidation. *Biochem. Biophys. Acta.* 1988; 963: 558-561.

27. **Suzuki Y J, Aggarwal B, Packer L**. Alpha-lipoic acid is a potent inhibitor of NFkB activation in human T cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992; 189: 1709-1715.

28. **Kagan VE, Shvedova A, Serbinova E, Khan S, Swanson C, Poweel R, Packer L**. Dihydrolipoic acid: A universal antioxidant both in the membrane and in the aqueous phase. *Biochem Pharmacol.* 1992; 44: 1637-1649.

29. **Devasagayam TP, Subramanian M, Pradhan DS, Sies H**. *Chemical Biological Interactions.* 1993; 86: 79-92.

30. **Gadaleta MN, Petruzalla V, Daddabbo L**, y cols. Mitochondrial DNA transcription and translation in aged rat. Effect of acetyl-L-carnitine. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1994; 717: 150-160.

31. **Paradies G, Ruggiere FM, Petrosillo G, Gadaleta MN, Quagliariello E.** Carnitine-acylcarnitine tranalocase activity in cardiac mitochondria from aged rats: the effect of acetyl-L-carnitine. *Mech. of aging and develop.* 1995; 84 (2): 103-112.
- 5 32. **Auteli T, Miccheli A, Ricciolini R, Di Cocco M,** y cols. Aging brain: effect of acetyl L-carnitine treatment on rat brain energy and phospholipid metabolism. A study by ³IP and ¹H NMR spectroscopy. *Brain Research.* 1990; 526(1): 108-112.
- 10 33. **Sebinova E, Khwaja S, Reznick AZ, Packer L.** Thioctic acid protects against ischemia-reperfusion injury in the isolated perfused Langendorif heart. *Free Rad. Res. Commun.* 1994; 17: 49-58.
34. **Seidman MD, Khan MJ, Bai U, Shirwany N.** Quirk WS. Biologic Activity of Mitochondrial Metabolites on Aging and Age-Related Hearing Loss. *Am. J. Otol.* 2000; 21: 161-167.
- 15 35. **Hosokawa M., Shimatani T., Kanada T., Inoue Y,** y **Takahashi K.** Conversation of Docosaheaxaenoic Acid-Containing Phosphatidylserine from Squid Skin Lecithin by Phospholipase D-Mediated Transphosphatidylation. *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48, 4550-4554.
- 20 36. **Henderson R.J., Bell M.V., Park M.T., Sargent, J.R.,** y **Falcon J.** Lipid Composition of the Pineal Organ from Rainbow Trout. *Lipids*, 29(5), 311-317 (1994).
37. **Bell M.V. and Dick J.R.** Molecular Species Composition of the Major Diacyl Glycerophospholipids from Muscle, Liver, Retina and Brain of Cod. *Lipids*, 26(8), 565-573 (1991).
- 25 38. **Wiegand R.D. and Anderson R. E.** Phospholipid Molecular Species of Frog Rod Outer Segment Membranes. *Exp. Eye Res.*, 37(2), 157-173 (1983).

30

35

40

45

50

55

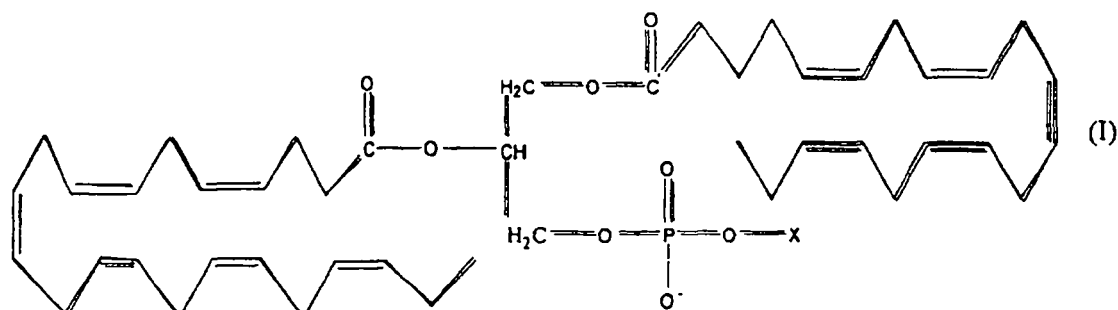
60

65

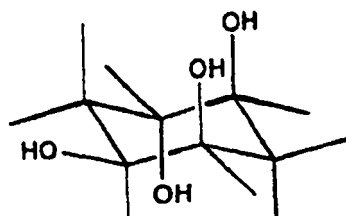
REIVINDICACIONES

1. Una composición, que comprende:

(a) un fosfolípido de la fórmula general (I),

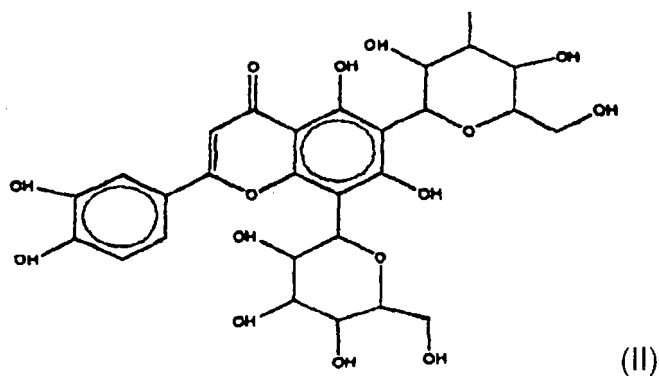


en la que X es $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3$ o



y

(b) un flavonoide de la fórmula general (II)



2. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la composición se deriva de una biomasa marina o acuática.

3. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la biomasa es de crustáceos.

4. La composición de acuerdo con la reivindicación 2, en la que la biomasa es zooplancton.

5. La composición de acuerdo con la reivindicación 4, en la que el zooplancton es krill.

6. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la composición se deriva del procesamiento inicial de la biomasa.

7. La composición de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el procesamiento se realiza a una temperatura de aproximadamente 5°C o menos.

8. La composición de acuerdo con la reivindicación 6 ó 7, en la que la composición se deriva a partir de la grasa de la biomasa.

ES 2 288 193 T3

9. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que comprende al menos aproximadamente el 40% p/p de fosfolípido.
- 5 10. La composición de acuerdo con la reivindicación 9, que comprende al menos aproximadamente el 45% p/p de fosfolípido.
11. La composición de acuerdo con la reivindicación 10, que comprende desde aproximadamente 45 a 60% p/p de fosfolípido.
- 10 12. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el fosfolípido comprende fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol, fosfatidilserina, esfingomielina o una mezcla de los mismos.
- 15 13. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el fosfolípido comprende ácidos grasos saturados, monoinsaturados o poliinsaturados.
14. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que los ácidos grasos poliinsaturados se seleccionan a partir del grupo constituido por ácidos grasos omega-3 y omega-6.
- 20 15. La composición de acuerdo con la reivindicación 13, en la que los ácidos grasos poliinsaturados se seleccionan a partir del grupo constituido por ácido docosahexanoico (DHA), ácido eicosapentanoico (EPA), ácido mirístico, ácido miristoleico, ácido lignocérico, ácido linolénico, ácido alfa-linolénico, ácido nerviónico, ácido linoleico, ácido oleico, ácido esteárico, ácido palmítico y ácido palmitoleico.
- 25 16. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el fosfolípido comprende además un componente lipídico adicional.
17. La composición de acuerdo con la reivindicación 16, en la que el componente lipídico adicional es un monoglicérido, triglicérido, colesterol o una mezcla de los mismos.
- 30 18. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17, que comprende además al menos aproximadamente el 4% p/p de ácidos grasos libres.
19. La composición de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende al menos aproximadamente el 5% p/p de ácidos grasos libres.
- 35 20. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19, en la que los ácidos grasos poliinsaturados comprenden al menos aproximadamente un 15% p/p de los lípidos totales de la composición.
- 40 21. La composición de acuerdo con la reivindicación 20, en la que los ácidos grasos poliinsaturados comprenden al menos aproximadamente el 40% p/p de los lípidos totales de la composición.
22. La composición de acuerdo con la reivindicación 21, en la que los ácidos grasos poliinsaturados comprenden al menos aproximadamente el 45% p/p de los lípidos totales de la composición.
- 45 23. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 20 a 22, en la que los ácidos grasos poliinsaturados son ácidos grasos omega-3.
24. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 23, en la que DHA y EPA comprenden al menos aproximadamente el 32% p/p de los lípidos totales de la composición.
- 50 25. La composición de acuerdo con la reivindicación 24, en la que DHA y EPA forman al menos aproximadamente el 35% p/p de los lípidos totales de la composición.
- 55 26. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, que comprende además un antioxidante.
27. La composición de acuerdo con la reivindicación 26, en la que el al menos un antioxidante supone 20 mg/100 ml de la composición.
- 60 28. La composición de acuerdo con las reivindicaciones 26 ó 27, en la que el antioxidante se selecciona a partir del grupo constituido por vitamina A, vitamina E, beta-caroteno, astaxantina, cantaxantina, flavonoide y sus mezclas.
29. La composición de acuerdo con la reivindicación 28, en la que la vitamina A es todo-trans retinol, la vitamina E es alfa-tocoferol y la astaxantina está principalmente esterificada.
- 65 30. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 29, que comprende además un metal.

ES 2 288 193 T3

31. La composición de acuerdo con la reivindicación 30, en la que el metal es cinc, selenio o una mezcla de los mismos.

32. La composición de acuerdo con la reivindicación 31, en la que el cinc comprende al menos 0,05 mg/100 g de la composición y el selenio comprende menos de 3 mg/100 g de la composición.

33. La composición de acuerdo una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 32, en la que la composición de ácidos grasos de los lípidos de la composición es aproximadamente:

Ácidos grasos	Ácido graso		
	Fosfolípido total %	Fosfatidil colina %	Fosfatidil etanolamina %
C14:0 MIRISTICO	2	2	0,7
C14:1 MIRISTOLEICO	1		
C15:0 PENTADECANOICO	0,2	0,3	0,3
C16:0 PALMITICO	24	27	24
C16:1 PALMITOLEICO	2	2	0,7
C18:0 ESTEARICO	1	1	3
C18:1 OLEICO	9	12	24
C18:2n6 LINOLEICO	2	2	0,8
C18:3n6 GLA	1	0,3	
C18:3n3 ALA	1	1	
C18:4n3 OTA	2	2	0,3
C20:0 ARAQUIDICO			
C20:1 cis-11-EICOSENOICO	0,5	0,6	0,7
C20:2n6 EICOSADIENOICO			
C20:3n6 METIL ETA		0,2	
C20:4n6 ARAQUIDONICO	0,6	0,7	0,6
C20:3n3 Homo-gamma-			
C20:4n3			
C20:5n3 EPA	27	32	13
C22:0 BEHENICO			
C22:1 ERUCICO	1	1,5	
C22:2n6			
C22:4n6			
C22:5n6 METIL DPA			
C22:5n3 DPA		1,0	
C22:6n3 DHA	25	14	32
C24:0 LIGNOCERICO			
C24:1 NERVONICO			
Total	100,0	100	100

ES 2 288 193 T3

34. La composición de acuerdo con la reivindicación 33, en la que la composición de los ácidos grasos totales de todos los lípidos de la composición es aproximadamente:

5	Muestra	%
	Composición de los ácidos grasos	
10	C14:0	$\geq 3,00$
	C14:1	$\geq 0,01$
	C15:0	$\geq 0,3$
15	C16:0	$\geq 20,00$
	C16:1	$\geq 3,25$
	C18:0	$\geq 1,00$
20	C18:1	$\geq 10,00$
	C18:2n6	$\geq 2,00$
	C18:3n6 GLA	$\geq 0,04$
25	C18:3n3 ALA	$\geq 0,01$
	C18:4n3	$\geq 1,50$
30	C20:0	$\geq 0,05$
	C20:1	$\geq 1,00$
	C20:2n6	$\geq 0,05$
35	C20:3n6	$\geq 0,05$
	C20:4n6	$\geq 0,50$
	C20:3n3	$\geq 0,01$
40	C20:4n3	$\geq 0,20$
	C20:5n3 EPA	$\geq 25,00$
	C22:0	$\geq 0,01$
45	C22:1	$\geq 1,50$
	C22:2n6	$\geq 0,03$
	C22:4n6	$\geq 0,01$
50	C22:5n6	$\geq 0,01$
	C22:5n3 DPA	$\geq 0,50$
55	C22:6n3 DHA	$\geq 10,00$
	C24:0	$\geq 0,01$
	C24:1	$\geq 0,05$

ES 2 288 193 T3

35. La composición de acuerdo con la reivindicación 34, en la que la composición de los ácidos grasos totales de todos los lípidos es además aproximadamente

5	Saturados (g/100 g de lípido)	$\geq 22,00$
	Monoinsaturados (g/100 g de lípido)	$\geq 11,00$
	Poliinsaturados (g/100 g de lípido)	$\geq 35,00$
10	omega-3 (g/100 g de lípido)	$\geq 30,00$
	omega-6 (g/100 g de lípido)	$\geq 1,00$

15 36. La composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35, que comprende aproximadamente:

	Monoglicéridos (MG) (g/100 g de muestra)	$\geq 0,7$
20	Triglicéridos (TG) (g/100 g de muestra)	$\geq 3,00$
	Ácidos grasos libres (FAA) (g/100 g de muestra)	$\geq 5,00$
25	Colesterol (g/100 g de muestra)	$\geq 2,00$
	Fosfolípidos totales (PL) (g/100 g de muestra)	$\geq 40,00$
	Fosfatidil etanolamina (PE) (g/100 g de muestra)	$\geq 2,50$
30	Fosfatidil inositol (PI) (g/100 g de muestra)	$\geq 0,20$
	Fosfatidil serina (PS) (g/100 g de muestra)	$\geq 0,20$
	Fosfatidil colina (PC) (g/100 g de muestra)	$\geq 35,00$
35	Esfingomielina (g/100 g de muestra)	$\geq 0,50$
	Vitamina A ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	≥ 1.400
	Vitamina E ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	≥ 15
40	beta-caroteno ($\mu\text{g}/100 \text{ ml}$)	≥ 1.600
	Astaxantina (mg/100 ml)	≥ 10
	Cantaxantina (mg/100 ml)	≥ 10
45	Flavonoide (mg/100 ml)	$> 7,0$

50 37. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de la enfermedad hepática.

38. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de hepatitis crónica.

55 39. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de esteatosis.

40. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de fibrosis hepática.

60 41. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de alcoholismo.

65 42. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de malnutrición.

43. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de malnutrición parenteral crónica.

ES 2 288 193 T3

44. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de déficit de fosfolípidos.
- 5 45. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de peroxidación lipídica.
46. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de disarritmia en la regeneración celular.
- 10 47. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de desestabilización de las membranas celulares.
- 15 48. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedad arteri coronaria provocada por la hipercolesterolemia, hipertensión arterial, afecciones menopáusicas o posmenopáusicas.
49. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención del cáncer.
- 20 50. Uso de la reivindicación 49, en el que cáncer es cáncer de piel.
51. Uso de la reivindicación 50, en el que el uso de la composición es oral o tópico.
52. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de hipertensión.
- 25 53. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento del envejecimiento.
- 30 54. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de hiperplasia prostática benigna.
55. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedad renal.
- 35 56. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de edema.
57. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades de la piel.
- 40 58. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades gastrointestinales.
- 45 59. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedades del sistema vascular periférico.
60. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de toxemia del embarazo.
- 50 61. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedad de Parkinson.
62. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de enfermedad de Alzheimer.
- 55 63. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de autismo.
- 60 64. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de trastorno de déficit de atención.
65. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de trastornos del aprendizaje.
- 65 66. Uso de la reivindicación 65, en el que el trastorno del aprendizaje es dislexia.

ES 2 288 193 T3

67. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de trastornos del estado de ánimo.

5 68. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de depresión bipolar.

69. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de esclerosis múltiple.

10 70. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de distrofia muscular.

15 71. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para la prevención o el tratamiento de función motora anormal.

72. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para reducir los depósitos locales de grasa y reducir la celulitis visible.

20 73. Uso no terapéutico de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para reducir los depósitos locales de grasa y reducir la celulitis visible.

74. Uso de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para la fabricación de un medicamento para el realce estético.

25 75. Uso no terapéutico de la composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 36, para el realce estético.

30 76. Uso no terapéutico de la composición de acuerdo con la reivindicación 75, en el que el realce estético es aumento de pecho.

35

40

45

50

55

60

65

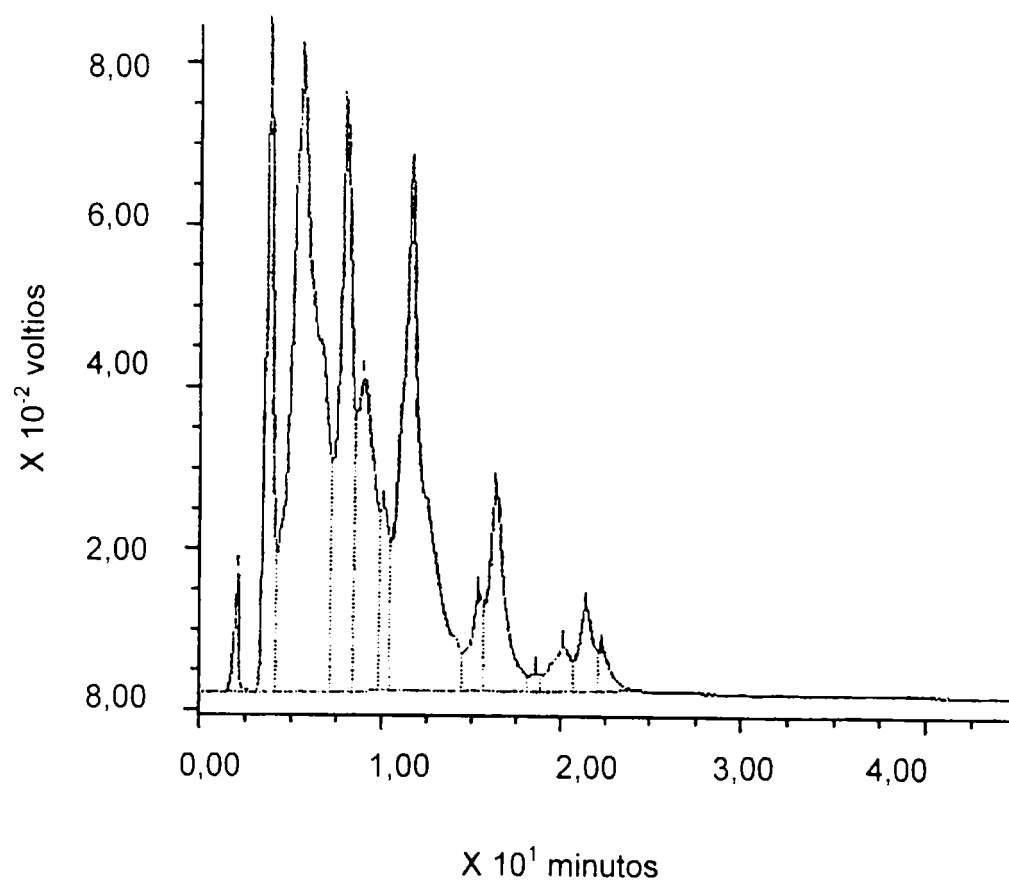


FIG. 1

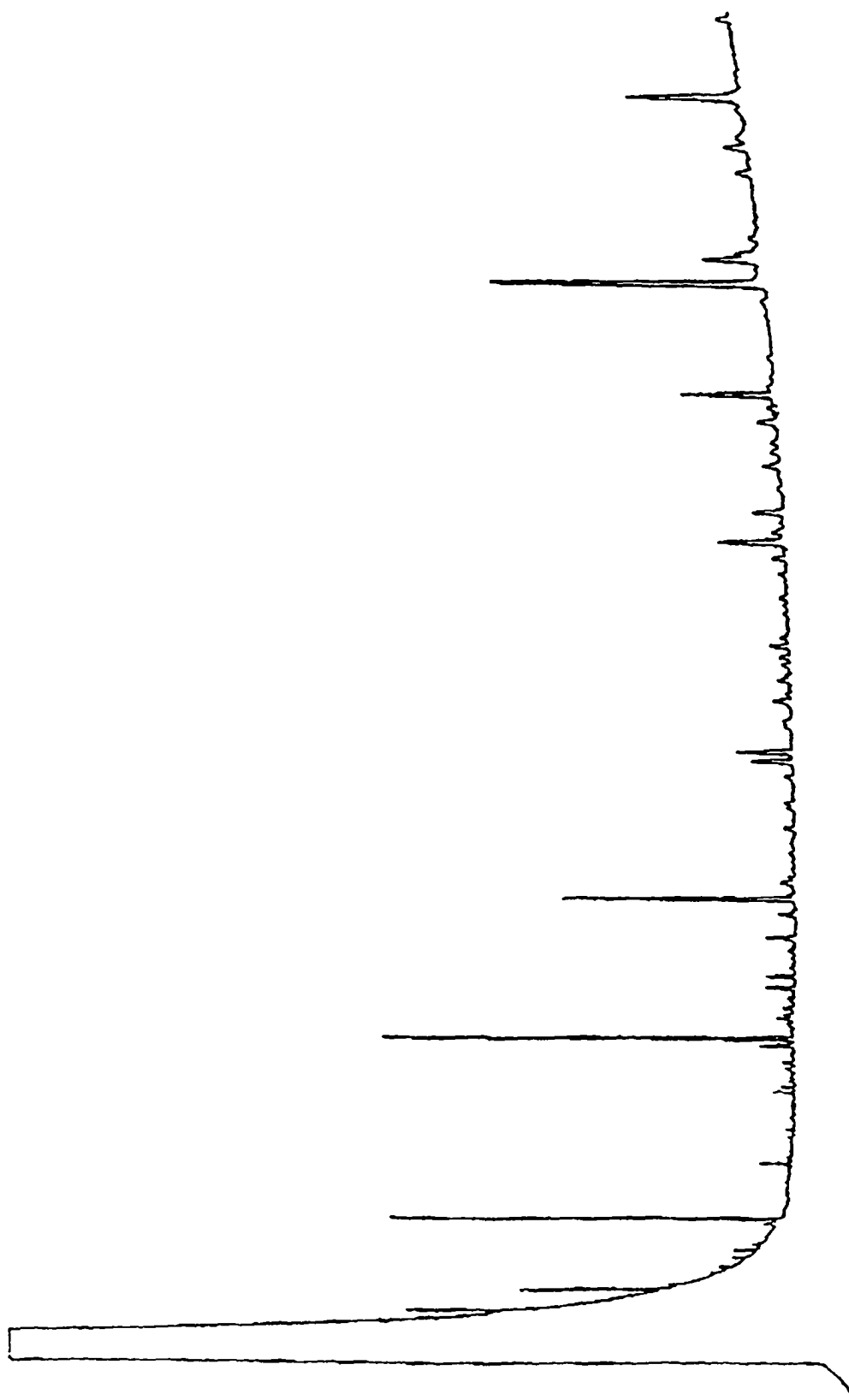


Fig. 2

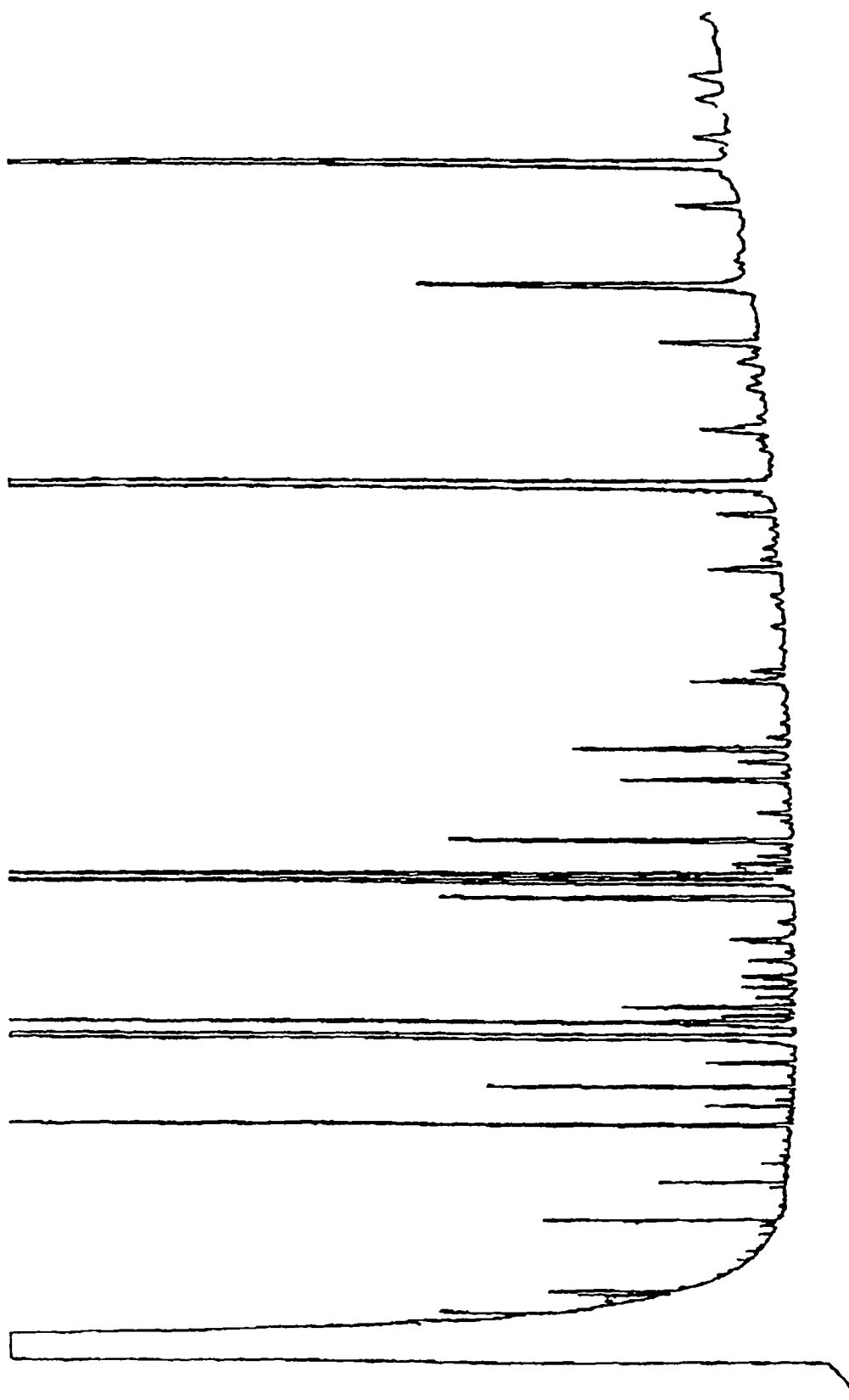


Fig. 3

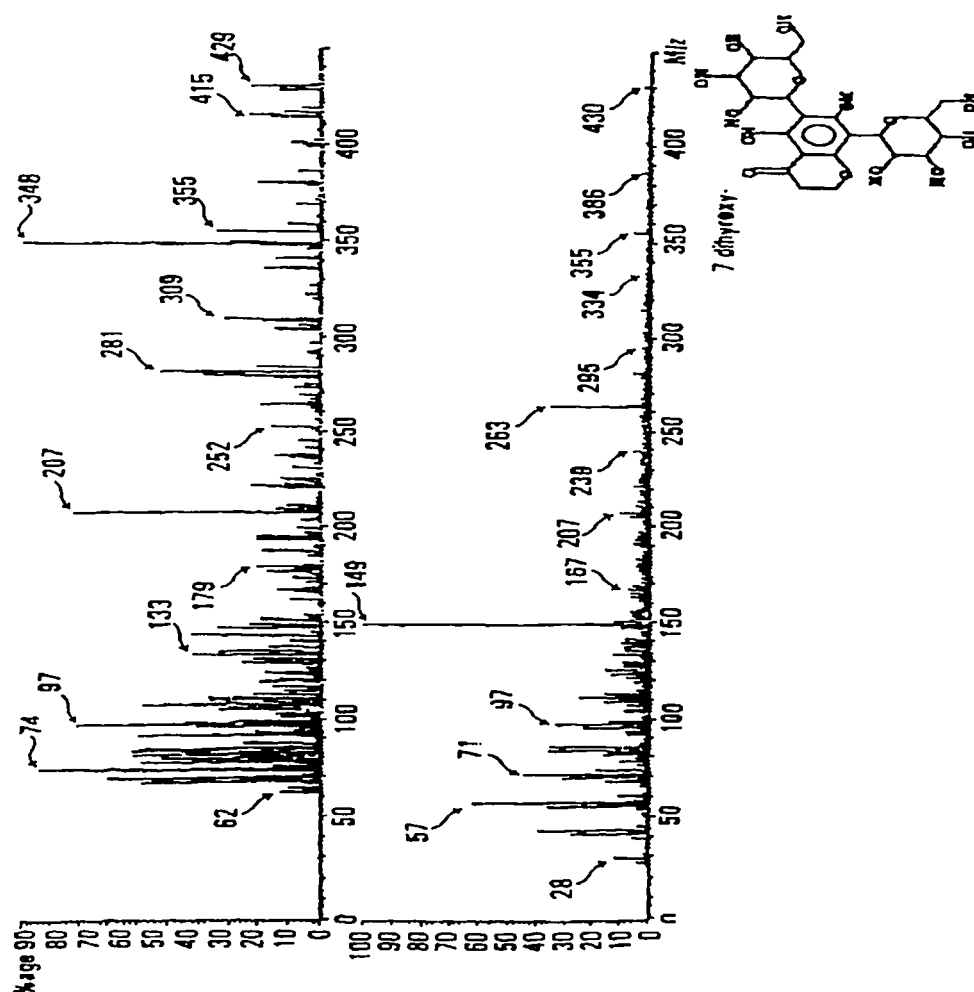


Fig. 4

SI: 515

Nombre(s): 4H-1-benzopirán-4-ona, 2-(3,4 glucopiranosil-5,7-dihidroxi-

(2) Lucenina 2

(3) Luetolina 6,8-C-diglucósico

(4) 6,8-Di-C-glucosil-luteolina

(5) Flavona,6,8-diglucopiranosil-3',4',5,7-tetrahidro)

(6) 6,8-Diglucopiranosil-3',4',5,7-tetrahidroxiflavona

(7) 6,8-Di-C-beta-glucosiluteolina

Fórmula: C₂₇H₃₀O₁₆

PM: 610

N.º CAS: 29428-58-8

N.º NIST: 44069

N.º DE ID: 38622

Base de datos: principal

