



(86) Date de dépôt PCT/PCT Filing Date: 2006/12/19
(87) Date publication PCT/PCT Publication Date: 2007/06/28
(45) Date de délivrance/Issue Date: 2014/08/19
(85) Entrée phase nationale/National Entry: 2008/06/18
(86) N° demande PCT/PCT Application No.: EP 2006/069899
(87) N° publication PCT/PCT Publication No.: 2007/071670
(30) Priorité/Priority: 2005/12/20 (FR0512933)

(51) Cl.Int./Int.Cl. *C11C 1/08* (2006.01),
A23D 9/007 (2006.01), *B01D 11/04* (2006.01),
C11B 7/00 (2006.01), *C11C 1/00* (2006.01)

(72) Inventeurs/Inventors:
MARCIACQ, FLORENCE, FR;
SOULAYRES, MATHIEU, CA;
FREISS, BERNARD, FR

(73) Propriétaire/Owner:
PIERRE FABRE MEDICAMENT, FR

(74) Agent: GOUDREAU GAGE DUBUC

(54) Titre : PROCEDE D'ENRICHISSEMENT EN DHA
(54) Title: DHA ENRICHMENT PROCESS

(57) **Abrégé/Abstract:**

La présente invention concerne un procédé continu d'enrichissement en DHA d'une solution d'acides gras ou de ses dérivés comprenant moins de 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux de la solution ou à leurs dérivés, le procédé comprenant les étapes de (a) injection simultanée à contre-courant dans une colonne de fractionnement du flux de la solution d'acides gras ou de ses dérivés et d'un flux de CO₂ supercritique à une température inférieure ou égale à 70°C et à une pression comprise entre 100*10⁵ Pa et 160 * 10⁵ Pa, le taux en CO₂ supercritique étant compris entre 30 et 70 et (b) récupération du résidu comprenant au moins 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux du résidu ou à leurs dérivés, le rendement en DHA étant supérieur ou égal à 60%.

(12) DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITÉ DE COOPÉRATION
EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)(19) Organisation Mondiale de la Propriété
Intellectuelle
Bureau international

PCT

(43) Date de la publication internationale
28 juin 2007 (28.06.2007)(10) Numéro de publication internationale
WO 2007/071670 A1

(51) Classification internationale des brevets :
C11C 1/08 (2006.01) **A23D 9/007** (2006.01)
C11C 1/00 (2006.01) **B01D 11/04** (2006.01)
C11B 7/00 (2006.01)

(74) Mandataires : **WARCOIN, Jacques** etc.; Cabinet Regimbeau, 20, rue de Chazelles, F-75847 Paris Cedex 17 (FR).(21) Numéro de la demande internationale :
PCT/EP2006/069899(81) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection nationale disponible*) : AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.(22) Date de dépôt international :
19 décembre 2006 (19.12.2006)

(25) Langue de dépôt : français

(26) Langue de publication : français

(84) États désignés (*sauf indication contraire, pour tout titre de protection régionale disponible*) : ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), européen (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).(30) Données relatives à la priorité :
0512933 20 décembre 2005 (20.12.2005) FR(71) Déposant (*pour tous les États désignés sauf US*) : **PIERRE FABRE MEDICAMENT** [FR/FR]; 45, place Abel Gance, F-92100 Boulogne-Billancourt (FR).

(72) Inventeurs; et

Publiée :

(75) Inventeurs/Déposants (*pour US seulement*) : **MARCI-ACQ, Florence** [FR/FR]; Lagrelle, F-81600 Brens (FR). **SOULAYRES, Mathieu** [FR/CA]; 1128 Rue Saint-Jean # 5, Québec, G1R 1S4 (CA). **FREISS, Bernard** [FR/FR]; 178, chemin de la Fosse, F-81100 Castres (FR).

— avec rapport de recherche internationale

En ce qui concerne les codes à deux lettres et autres abréviations, se référer aux "Notes explicatives relatives aux codes et abréviations" figurant au début de chaque numéro ordinaire de la Gazette du PCT.

(54) Title: DHA ENRICHMENT PROCESS

(54) Titre : PROCEDE D'ENRICHISSEMENT EN DHA

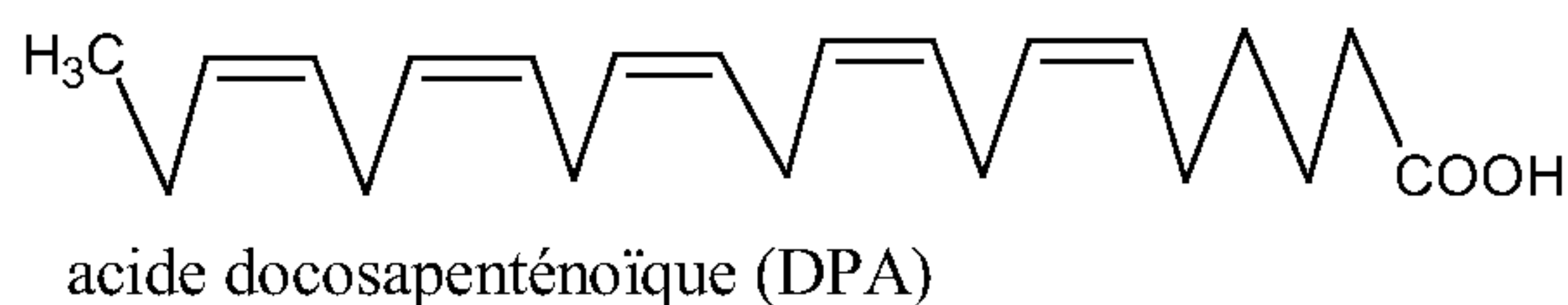
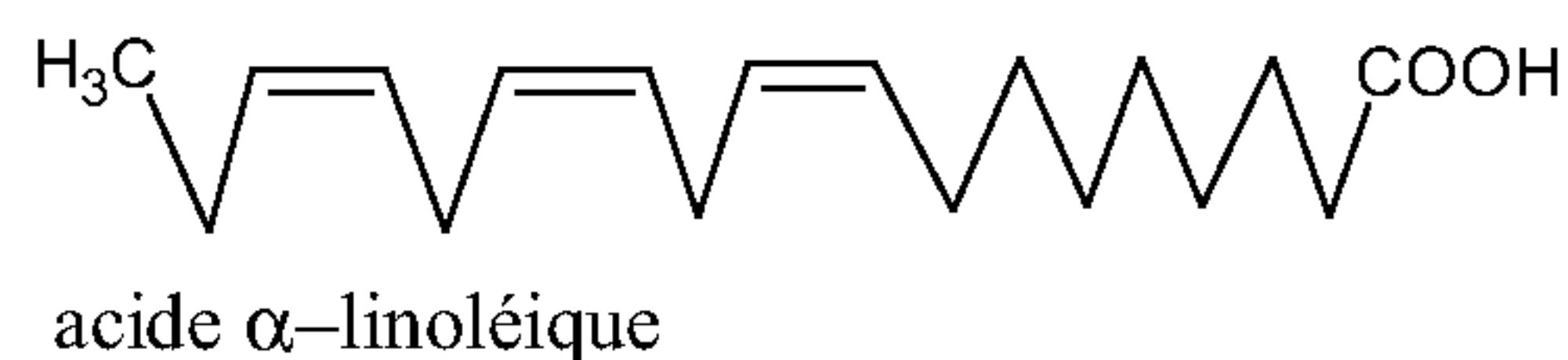
(57) Abstract: The present invention relates to a continuous process of DHA enrichment of a solution of fatty acids or derivatives thereof comprising less than 50% of DHA relative to the total fatty acids of the solution or to derivatives thereof, wherein the process comprises the steps of (a) simultaneous countercurrent injection, into a fractionation column, of the flow of the solution of fatty acids or of derivatives thereof and of a flow of supercritical CO₂ at a temperature of less than or equal to 70°C and at a pressure of between 100×10⁵ Pa and 160×10⁵ Pa, wherein the level of supercritical CO₂ is between 30 and 70, and (b) recovery of the residue comprising at least 50% of DHA relative to the total fatty acids of the residue or to derivatives thereof, wherein the DHA yield is greater than or equal to 60%.(57) Abrégé : La présente invention concerne un procédé continu d'enrichissement en DHA d'une solution d'acides gras ou de ses dérivés comprenant moins de 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux de la solution ou à leurs dérivés, le procédé comprenant les étapes de (a) injection simultanée à contre-courant dans une colonne de fractionnement du flux de la solution d'acides gras ou de ses dérivés et d'un flux de CO₂ supercritique à une température inférieure ou égale à 70°C et à une pression comprise entre 100*10⁵ Pa et 160 *10⁵ Pa, le taux en CO₂ supercritique étant compris entre 30 et 70 et (b) récupération du résidu comprenant au moins 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux du résidu ou à leurs dérivés, le rendement en DHA étant supérieur ou égal à 60%.

WO 2007/071670 A1

TITRE : PROCEDE D'ENRICHISSEMENT EN DHA

- 5 La présente invention concerne un procédé permettant, industriellement, d'enrichir une solution d'esters éthyliques d'acides gras naturels (huile de poisson) en un acide gras spécifique : l'acide docosahéxénoïque (couramment appelé DHA).

Les huiles d'origine marine sont des sources naturellement riches en acides gras poly-insaturés. Les acides gras polyinsaturés ont en particulier, pour les plus utiles
10 les formules suivantes :



- Ces acides gras, bien que nécessaires au bon fonctionnement de l'organisme, ne sont pas naturellement synthétisés par le corps humain. Leur apport est donc lié à une prise quotidienne via l'alimentation. Les sources alimentaires en acides gras poly-insaturés sont les huiles végétales (essentiellement des acides gras de type ω -6 et ω -9) et les huiles de poisson qui contiennent en particulier de grandes quantités d'acides gras de type ω -3. Ces derniers sont très connus pour leurs effets bénéfiques sur la santé (maladies cardiovasculaires, maladies auto-immunes, inflammations ...).
- 20 Les acides gras polyinsaturés sont classés selon la position de la première double liaison, à partir de la fonction méthyle terminale. Ainsi dans la nomenclature ω -x ou n-x, le x correspond à la position de cette première insaturation. La majorité des acides gras polyinsaturés d'intérêt biologique appartient à la famille des ω -6 (acide

arachidonique) ou ω -3 (EPA, DHA). De plus, dans la nomenclature, on définit également le nombre de carbone constituant la chaîne ; ainsi l'EPA est décrit comme C20:5 et le DHA comme C22:6. Le 5 et le 6 correspondent au nombre d'insaturations de la chaîne carbonée présentée respectivement par l'EPA et le DHA.

- 5 Les huiles de poisson sont utilisées essentiellement pour l'isolement et la concentration en acides gras de type ω -3.

Les méthodes conventionnelles pour enrichir les huiles de poisson (article de V.K. Mishra et al., Food Research International, 1993, 26, 217-226) reposent sur la
10 sélectivité par rapport à la longueur des chaînes des acides gras constitutifs des huiles ou leur degré d'insaturation. Les procédés d'enrichissement les plus couramment utilisés sont réalisés sur les acides gras ou les esters correspondants par :

- Cristallisation
- 15 - Extraction à contre-courant
- Distillation moléculaire
- Chromatographie d'absorption.

La plupart du temps, différents procédés sont combinés en vue d'obtenir un fort enrichissement. De plus ces procédés possèdent les inconvénients suivants :

- 20 Les procédés travaillant à haute température (distillation) donnent lieu à de multiples produits de dégradation thermique des acides gras (isomérisation, peroxydation, oligomérisation). De ce fait, il est recommandé de travailler à basse température, avantageusement à des températures inférieures à 100°C.

L'inconvénient des techniques de chromatographie repose sur l'utilisation de
25 quantités massives de solvants souvent toxiques. De plus, la production à grande échelle sur de telles techniques est loin d'être évidente.

Pour ces raisons, des méthodes alternatives ont été développées. Elles reposent sur l'utilisation des fluides supercritiques :

- 30 - Procédé de fractionnement par CO₂ supercritique
- Chromatographie supercritique.

Le procédé de fractionnement d'esters éthyliques d'acides gras par CO₂ supercritique a déjà été décrit abondamment dans la littérature. Il est à noter toutefois que la plupart des procédés cités décrivent un enrichissement en ω-3 ou en
5 acide eicosapanténoïque (EPA) et non en DHA.

L'un des paramètres de conduite du procédé de fractionnement par CO₂ supercritique est le taux de CO₂ supercritique. Ce taux est défini par le rapport du débit de CO₂ sur le débit de solution d'acides gras injectée. Ainsi, à taux de CO₂ supercritique élevé, la sélectivité est accrue au détriment du rendement. A faible
10 taux de CO₂ supercritique, c'est le rendement qui est favorisé tandis que la sélectivité est amoindrie.

Ainsi, Nilsson et al. (JAOCS 1988, 65(1), 109-117) décrivent un procédé batch permettant d'obtenir plusieurs fractions (de 0,1 à 0,2g) riches en EPA et DHA
15 respectivement. Pour ce faire, les auteurs travaillent à des pressions comprises entre 220*10⁵ Pa et 250 *10⁵ Pa. De plus, ils effectuent un gradient de température dans la colonne pour générer un reflux interne (de 20°C en pied de colonne à 100°C en tête de colonne). Les taux de CO₂ supercritique définis sont très élevés, de l'ordre de 100 à 500.

Certains essais permettent d'obtenir, à partir d'esters éthyliques pré-traités à l'urée, des fractions présentant une teneur de l'ordre de 90% en DHA, mais avec des taux
20 de CO₂ supercritique de 500.

En utilisant des esters éthyliques non traités, les auteurs décrivent des fractions riches en DHA (teneur entre 53 et 60%) mais pour des taux de CO₂ supercritique de
25 l'ordre de 300 à 400.

Ce procédé a donc les inconvénients suivants : il s'agit d'un procédé batch. Le taux de CO₂ supercritique utilisé est trop important et le procédé doit donc avoir un faible rendement, ce qui n'est pas utilisable industriellement. En effet, cela induit des surcoûts énergétiques et donc une productivité moindre. La température de 100°C en
30 tête de colonne peut provoquer la dégradation des acides gras. Or il s'agit de la température préconisée par les auteurs. Les pressions utilisées sont trop fortes et si

elles étaient diminuées, il y aurait une augmentation du taux de CO₂ supercritique. Par ailleurs cet article préconise l'utilisation d'un gradient de température au sein de la colonne et surtout d'un reflux interne afin d'améliorer la séparation et donc l'enrichissement. Or la présence d'un tel reflux diminue la productivité du procédé.

5

Kado et al. (JP2005-255971) décrivent dans leur brevet un procédé d'enrichissement d'esters éthyliques d'huile de poisson en EPA et DHA. Les plages de température et pression revendiquées sont de 35-200°C et 100*10⁵ Pa-500*10⁵ Pa. Les auteurs préconisent deux extractions successives en vue d'obtenir des teneurs élevées. Une première extraction est faite sur la matière première, et une deuxième extraction est faite sur le résidu de la première opération. La colonne utilisée fait 3m de haut pour un diamètre interne de 50mm. Elle comporte 6 enceintes de chauffe distinctes. Les deux extractions successives compliquent le procédé et le rendent inapplicable industriellement.

10

Les taux de CO₂ supercritique utilisés pour obtenir des teneurs élevées en DHA sont élevés (de l'ordre de 127). Le rendement en DHA est donc faible. Par ailleurs les auteurs préconisent l'application d'un gradient de température (qui permet d'avoir un effet de rectification) dans la colonne. La productivité est donc restreinte.

15

Lucien et col. (Australasian biotechnology, 1993, 3 (3), 143-147) décrivent un procédé d'obtention d'extraits enrichis en esters éthyliques d'EPA et de DHA à partir d'huile de sardine 17/12 (EPA/DHA). Un reflux interne généré par une enceinte chauffante placée en tête de colonne permet d'améliorer les teneurs obtenues : on peut atteindre des teneurs de 42% et 54% respectivement en EPA et DHA. Les meilleures conditions opératoires dans cette configuration sont 150 *10⁵ Pa, 40°C dans la colonne et une température de reflux de 100°C. Le taux de CO₂ supercritique utilisé n'est pas indiqué.

25

Le tableau ci-dessous reprend les résultats obtenus :

30

Pression (Pa)	Température extraction (°C)	Température reflux (°C)	[EPA] (%)	[DHA] (%)
150 *10 ⁵	40	60	21	34
150*10 ⁵	40	80	33	39
150*10 ⁵	40	100	42	54

Ce procédé a donc les inconvénients suivants : La température de 100°C en tête de colonne peut provoquer la dégradation des acides gras. Or il s'agit de la température préconisée par les auteurs. Par ailleurs cet article préconise l'utilisation d'un gradient de température au sein de la colonne et surtout d'un reflux interne afin d'améliorer la séparation et donc l'enrichissement. Or la présence d'un tel reflux diminue la productivité du procédé.

Enfin Zhu et col. (Proceedings of the 3rd International Symposium on supercritical fluids – Strasbourg, 1994) décrivent un procédé d'extraction /fractionnement d'une solution d'esters éthyliques d'acides gras en vue d'obtenir des fractions riches respectivement en EPA et en DHA. Pour ce faire, un flux de CO₂ extrait les esters d'acides gras contenus dans un extracteur, et ce flux de CO₂ chargé en esters est ensuite fractionné dans une colonne. Un gradient de température et une programmation de pression est effectuée au sein de la colonne, afin d'améliorer la sélectivité par rapport aux composés recherchés. Ce procédé batch permet d'isoler une fraction représentant 12% du DHA engagé avec une pureté supérieure à 50%.

Ce procédé a donc les inconvénients suivants : il s'agit d'un procédé batch et c'est pour cela qu'il peut comprendre une programmation en pression. Le taux de CO₂ supercritique utilisé est trop important (211) et le procédé doit donc avoir un faible rendement, ce qui n'est pas utilisable industriellement. En effet, cela induit des surcoûts énergétiques et donc une productivité moindre. Par ailleurs cet article préconise l'utilisation d'un gradient de température au sein de la colonne et surtout d'un reflux interne afin d'améliorer la séparation et donc l'enrichissement. Or la présence d'un tel reflux diminue la productivité du procédé.

La majorité des procédés décrits dans la littérature utilisent donc un fort taux de CO₂ supercritique, ce qui donne un très faible rendement en DHA et donc un procédé qui n'est pas réalisable industriellement. De plus, afin qu'un procédé soit industriellement réalisable, il est également nécessaire de ne pas travailler à trop forte pression. Or, lorsque la pression diminue, la densité diminue et il faut donc augmenter le taux de CO₂ supercritique pour obtenir une teneur en DHA équivalente. Il convient donc de trouver un compromis entre pression, taux de CO₂ supercritique et rendement, afin d'obtenir un enrichissement intéressant en DHA, c'est à dire d'au moins 50%. Par ailleurs, seuls les procédés continus sont intéressants du point de vue industriel.

Enfin, afin d'éviter la dégradation des acides gras et en particulier du DHA, il convient de travailler à faible température, c'est à dire à une température inférieure à 100°C et en particulier inférieure ou égale à 70°C.

De plus, il convient également de trouver un procédé permettant d'enrichir une solution d'acides gras en DHA n'utilisant qu'une seule étape de fractionnement à contre-courant et ne nécessitant pas le pré-traitement des acides gras à l'urée.

Les inventeurs ont ainsi découvert de façon surprenante qu'une température d'au plus 70°C, qu'une pression comprise entre $100 \cdot 10^5$ Pa et $160 \cdot 10^5$ Pa et qu'un taux de CO₂ supercritique compris entre 30 et 70 permettait, dans le cadre d'un procédé continu en une seule étape de fractionnement à contre-courant par CO₂ supercritique, d'obtenir un enrichissement en DHA d'au moins 50%, en partant d'une solution d'acides gras ou de ses dérivés comprenant moins de 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux de la solution ou à leurs dérivés et n'ayant pas été prétraitée à l'urée.

La présente invention concerne donc un procédé continu d'enrichissement en DHA d'une solution d'acides gras ou de ses dérivés comprenant moins de 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux de la solution ou à leurs dérivés, le procédé comprenant les étapes de

(a)- injection simultanée à contre-courant dans une colonne de fractionnement du flux de la solution d'acides gras ou de ses dérivés et d'un flux de CO₂ supercritique à une température inférieure ou égale à 70°C et à une pression comprise entre 100*10⁵ Pa et 160*10⁵ Pa, avantageusement entre 120*10⁵ Pa et 140*10⁵ Pa, le taux
5 de CO₂ supercritique étant compris entre 30 et 70, avantageusement entre 30 et 40, et

(b) récupération du résidu comprenant au moins 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux du résidu ou à leurs dérivés, le rendement en DHA étant supérieur ou égal à 60%.

10 Sauf autrement indiqué les pourcentages en DHA (ou EPA) par rapport aux acides gras totaux ou à leurs dérivés sont exprimés en pourcentage de surface. En effet, ces valeurs correspondent à l'aire du pic attribué au DHA (ou EPA) divisée par la somme de toutes les aires de pic attribuées aux acides gras présents dans la solution ou le résidu. Ces pics sont obtenus par chromatographie en phase gazeuse selon la
15 méthode indiquée dans la partie expérimentale et leur aire est mesurée sur les chromatogrammes obtenus.

Au sens de la présente invention on entend par « dérivés d'acide gras » les esters d'acides gras, en particulier les esters méthyliques ou éthyliques. Avantageusement
20 il s'agit d'esters éthyliques.

De façon avantageuse, la solution d'acides gras ou de ses dérivés utilisée est une solution brute, c'est à dire n'ayant pas subi de prétraitement à l'urée, les acides gras et ses dérivés n'ayant donc pas été complexés par l'urée. Avantageusement il s'agit d'une solution d'esters éthyliques.

25 Avantageusement la solution d'acides gras ou de ses dérivés utilisée comprend au moins 20 %, de façon avantageuse au moins 25% de DHA par rapport aux acides gras totaux de la solution ou à leurs dérivés.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la solution d'acides gras ou de ses dérivés utilisée est une huile de poisson ou d'algue, de façon avantageuse une
30 huile de poisson. En particulier il s'agit d'une huile de thon ou de foie de morue.

En particulier cette huile comprend au moins 20 %, de façon avantageuse au moins 25% de DHA par rapport aux acides gras totaux de l'huile ou à leurs dérivés. En particulier l'huile de foie de morue utilisée a la composition suivante, en ce qui concerne ses acides gras principaux :

5

Acide gras	Huile de foie de morue (%)
14 : 0	1,1
16 : 0	18,5
16 : 1	3,7
18 : 0	5,3
18 : 1	14,7
18 : 2 ω 6	1,7
20 : 1	9,8
20 : 4 ω 6	0,4
20 : 5 ω 3 (EPA)	6,4
22 : 1	2,3
22 : 6 ω 3 (DHA)	27,4
Total saturé	29,1
Total monoinsaturé	29,7
Total ω 6 (LA+AA)	2,1
Total ω 3 (EPA+DHA)	33,8

Avantageusement l'huile de thon utilisée comprend 5,5 % d'EPA et 26,6% de DHA. De façon avantageuse son chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse par la méthode indiquée ci-après dans les exemples est représenté à la figure

10 1.

De façon avantageuse, il s'agit de l'huile de thon 25 DHA commercialisée par la société POLARIS ou PRONOVA BIO CARE.

Au sens de la présente invention on entend par « taux de CO₂ supercritique » le rapport du débit de CO₂ supercritique sur le débit de solution d'acides gras ou de ses dérivés.

- 5 Le procédé selon la présente invention consiste donc à injecter simultanément dans une colonne de fractionnement, à contre-courant, la solution d'acides gras ou de ses dérivés et le CO₂ supercritique. Ce dernier est injecté en pied de colonne, tandis que la solution d'acides gras ou de ses dérivés est injectée plus haut dans la colonne. Le flux de CO₂ se charge progressivement en composés les plus volatils qu'il extrait.
- 10 Ces composés sont récupérés après dépressurisation dans des séparateurs cycloniques.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, la température en pied de colonne est inférieure à la température en tête de colonne. Il y a donc un gradient de

15 température au sein de la colonne. Avantageusement la température en tête de colonne est comprise entre 55 et 70°C et la température en pied de colonne est comprise entre 35 et 50°C.

La présence de ce gradient diminue la productivité du procédé mais augmente le rendement en DHA. En effet le gradient de température provoque un reflux interne

20 ce qui peut générer un engorgement de la colonne. Il est donc nécessaire de travailler avec des débits en solution plus bas.

Dans un autre mode de réalisation de l'invention, la température de l'étape (a) est constante au sein de la colonne. Il n'y a donc pas de gradient de température.

25 Avantageusement la température est comprise entre 40 et 70°C. L'absence de ce gradient améliore la productivité mais diminue le rendement en DHA.

Dans un mode de réalisation avantageux, la colonne de fractionnement a une longueur d'au moins 1,5 m et un diamètre interne d'au moins 20 mm,

30 avantageusement une longueur d'au moins 8m et un diamètre interne d'au moins 126 mm.

Dans un autre mode de réalisation, la pression utilisée dans la colonne est de $135 \cdot 10^5$ Pa.

- 5 Le procédé selon la présente invention permet donc d'obtenir un résidu comprenant au moins 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux du résidu ou à leurs dérivés, avantageusement entre 50 et 70% de DHA. Ce résidu est soutiré en continu en bas de colonne. Avantageusement ce résidu comprend au moins 52% de DHA, de façon avantageuse au moins 55% de DHA, de façon encore plus avantageuse au
- 10 moins 60% de DHA par rapport aux acides gras totaux du résidu ou à leurs dérivés. De façon avantageuse, le rendement en DHA du procédé selon la présente invention est d'au moins 60%, de façon avantageuse d'au moins 65%, de façon encore plus avantageuse, d'au moins 70%. Dans le cas d'un gradient de température dans la colonne, ce rendement est avantageusement d'au moins 80%.

15

La présente invention concerne en outre une solution d'acides gras ou de ses dérivés contenant au moins 50 % de DHA susceptible d'être obtenue par le procédé selon la présente invention.

- 20 Elle concerne également une solution d'acides gras ou de ses dérivés selon la présente invention pour son utilisation en tant que médicament.

Enfin, elle concerne une solution d'acides gras ou de ses dérivés selon la présente invention pour son utilisation en tant que médicament destiné à traiter les

25 pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes et/ou les inflammations.

Selon un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'une solution telle que définie ci-dessus, dans la fabrication d'un médicament pour le traitement de pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes et/ou les inflammations.

5

Selon un autre aspect, la présente invention concerne une composition pharmaceutique comprenant une solution telle que définie ci-dessus et un support pharmaceutiquement acceptable.

- 10 Selon un autre aspect, la présente invention concerne l'utilisation d'une composition pharmaceutique telle que définie ci-dessus, pour le traitement de pathologies neurodégénératives, telles que la maladie d'Alzheimer, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes et/ou les inflammations.

- 15 L'invention sera mieux comprise au vu des figures et des exemples qui suivent.
La figure 1 représente un chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse de l'huile de thon utilisée dans les exemples.

La figure 2 représente un chromatogramme obtenu par chromatographie en phase gazeuse sur le résidu enrichi obtenue à l'exemple 1.

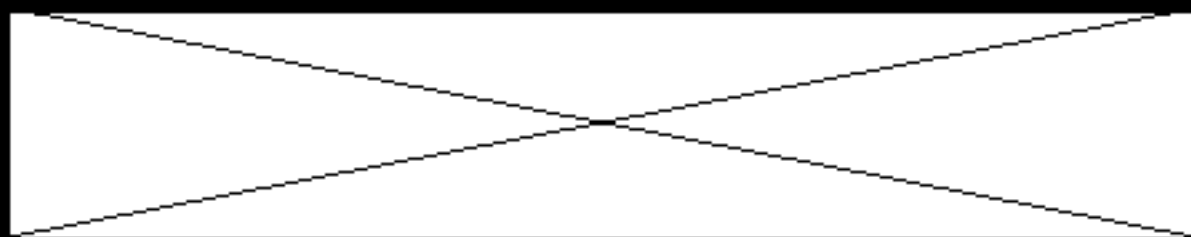
Le protocole d'analyse des solutions enrichies et de l'huile de thon de départ est le
5 suivant :

La composition des solutions enrichies et de l'huile de thon de départ est réalisée par chromatographie en phase gazeuse, selon la méthode suivante :

Appareillage : - Chromatographe en Phase Gazeuse avec détecteur à ionisation de
10 flamme

Conditions Opératoires :

Colonne	Type :	CP-WAX 52CB	
	Longueur (m) :	25	
	Diamètre (mm) :	0,25	
		0,20	
Gaz	Gaz vecteur :	Hélium	
	Pression tête de colonne :	1,38*10 ⁵ Pa	
	Mode pression ou débit constant :	débit constant	
	Débit colonne (ml/min) :	1,4	
Injecteur	Température (°C) :	250	
	Débit de Fuite (split) (ml/min) :	280	
	Type liner (désactivé/non désactivé) :	désactivé	
	Volume liner (µl):	860	
Détecteur	Température (°C) :	270	
	Débit Hydrogène (ml/min) :	30	
	Débit Oxygène (ml/min) :	300	
	Make-up + colonne (ml/min) :	30	
Programme du four	Rampe (°C/min)	Température (°C)	Durée (min)

		170	2
	2,95	240	2,30
Durée de l'analyse (min)	28,03		
Volume d'injection (µl)	1		

Méthodologie :

Préparation d'une solution témoin :

- 5 Dans une fiole de 5,0 ml, introduire 30 mg d'ester éthylique d'acide docosahexaénoïque SCR (DHA), 45 mg d'ester éthylique d'acide éicosapentaénoïque SCR (EPA). Dissoudre dans une solution de butylhydroxytoluène R à 50 mg/l dans le triméthylpentane R et compléter au volume avec la même solution.

10

Préparation de la solution à analyser (2 essais) :

Dans une fiole de 10,0 ml, introduire 0,5 g de substance à examiner .Dissoudre dans une solution de butylhydroxytoluène R à 50 mg/l dans le triméthylpentane R et compléter au volume avec la même solution.

15

Exploitation des résultats :

Relever les % surfaces de l'ester éthylique d'acide éicosapentaénoïque (EPA) et de l'ester éthylique d'acide docosahexaénoïque (DHA) dans la solution à analyser.

- 20 Les exemples suivants sont donnés à titre indicatif non limitatif.

Exemple 1 :

- Sur une colonne de laboratoire garnie de 1,5 m de haut et de diamètre interne de 20mm, on injecte 1520 g d'huile de thon 25 DHA commercialisée par la société POLARIS dont le chromatogramme est représenté à la figure 1 et contenant 5,5 % d'EPA et 26,6% de DHA. La durée totale de l'injection est de 4 heures.

Les paramètres opératoires sont les suivants :

- Pression et température dans la colonne : $135 \cdot 10^5$ Pa - 60°C.
- Débit d'injection de la solution : 280 g/h.
- Débit de CO₂ : 19 kg/h.

Le taux de CO₂ supercritique est donc de 67,8.

- 5 On soutire en continu en pied de colonne la solution enrichie. On récupère ainsi 534g d'une solution d'esters éthyliques d'acides gras contenant 55,0% de DHA par rapport aux acides gras totaux ou à leurs dérivés. Le rendement de récupération du DHA est de 77%.

10 **Exemple 2 :**

Sur une colonne garnie industrielle de 8 m de haut et de diamètre interne de 126mm, on injecte 210,6 kg d'huile de thon 25 DHA commercialisée par la société POLARIS dont le chromatogramme est représenté à la figure 1 et contenant 5,5 % d'EPA et 26,6% de DHA. La durée totale de l'injection est de 9 heures.

- 15 Les paramètres opératoires sont les suivants :

- Pression et température dans la colonne : $135 \cdot 10^5$ Pa – 60°C.
- Débit d'injection de la solution : 23 kg/h.
- Débit de CO₂ : 900 kg/h.

Le taux de CO₂ supercritique est donc de 39,1.

- 20 On soutire en continu en pied de colonne la solution enrichie. On récupère ainsi 63,3 kg d'une solution d'esters éthyliques d'acides gras contenant 63,7% de DHA par rapport aux acides gras totaux ou à leurs dérivés. Le rendement de récupération du DHA est de 64%.

25 **Exemple 3 :**

Sur une colonne garnie industrielle de 8 m de haut et de diamètre interne de 126mm, on injecte 203,0 kg d'huile de thon 25 DHA commercialisée par la société POLARIS dont le chromatogramme est représenté à la figure 1 et contenant 5,5 % d'EPA et 26,6% de DHA. La durée totale de l'injection est de 8,5 heures.

- 30 Les paramètres opératoires sont les suivants :

- Pression et température dans la colonne : $135 \cdot 10^5$ Pa – 60°C.

- Débit d'injection de la solution : 24 kg/h.

- Débit de CO₂ : 800 kg/h.

Le taux de CO₂ supercritique est donc de 33,3.

On soutire en continu en pied de colonne la solution enrichie. On récupère ainsi 85,4
5 kg d'une solution d'esters éthyliques d'acides gras contenant 53,5% de DHA par rapport aux acides gras totaux ou à leurs dérivés. Le rendement de récupération du DHA est de 75%.

Exemple 4 :

10 Sur une colonne de laboratoire garnie de 1,5 m de haut et de diamètre interne de 20mm, on injecte 333 g d'huile de thon 25 DHA commercialisée par la société POLARIS dont le chromatogramme est représenté à la figure 1 et contenant 5,5 % d'EPA et 26,6% de DHA. La durée totale de l'injection est de 1 heure 45.

Les paramètres opératoires sont les suivants :

15 - Pression dans la colonne : $135 \cdot 10^5$ Pa.

- Gradient de température dans la colonne : 45°C en pied de colonne et 65°C en tête de colonne.

- Débit d'injection de la solution : 220 g/h.

- Débit de CO₂ : 15 kg/h.

20 Le taux de CO₂ supercritique est donc de 68.

On soutire en continu en pied de colonne la solution enrichie. On récupère ainsi 166 g d'une solution d'esters éthyliques d'acides gras contenant environ 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux ou à leurs dérivés. Le rendement de récupération du DHA est de 88% et la productivité de 95g/h.

25

Exemple 5 :

Sur une colonne de laboratoire garnie de 1,5 m de haut et de diamètre interne de 20mm, on injecte 800 g d'huile de thon 25 DHA commercialisée par la société POLARIS dont le chromatogramme est représenté à la figure 1 et contenant 5,5 %
30 d'EPA et 26,6% de DHA. La durée totale de l'injection est de 1h50.

Les paramètres opératoires sont les suivants :

- Pression et température dans la colonne : $135 \cdot 10^5$ Pa - 60°C.
- Débit d'injection de la solution : 440 g/h.
- Débit de CO₂ : 29 kg/h.

Le taux de CO₂ supercritique est donc de 65,9.

- 5 On soutire en continu en pied de colonne la solution enrichie. On récupère ainsi 272g d'une solution d'esters éthyliques d'acides gras contenant 51,0% de DHA par rapport aux acides gras totaux ou à leurs dérivés. Le rendement de récupération du DHA est de 65%. La productivité est de 160g/h.

Revendications

1. Procédé continu d'enrichissement en DHA d'une solution d'acides gras ou de ses dérivés comprenant moins de 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux de la solution ou à leurs dérivés, le procédé comprenant les étapes de:
injection simultanée à contre-courant dans une colonne de fractionnement du flux de la solution d'acides gras ou de ses dérivés et d'un flux de CO₂ supercritique à une température inférieure ou égale à 70°C et à une pression comprise entre $100 \cdot 10^5$ Pa et $160 \cdot 10^5$ Pa, le taux en CO₂ supercritique étant compris entre 30 et 40; et
récupération du résidu comprenant au moins 50% de DHA par rapport aux acides gras totaux du résidu ou à leurs dérivés, le rendement en DHA étant supérieur ou égal à 60%.
2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la température en pied de colonne est inférieure à la température en tête de colonne.
3. Procédé selon la revendication 2, dans lequel la température en tête de colonne est comprise entre 55 et 70°C, et la température en pied de colonne est comprise entre 35 et 50°C.
4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la température de l'étape (a) est constante au sein de la colonne.
5. Procédé selon la revendication 4, dans lequel la température de l'étape (a) est comprise entre 40 et 70°C.
6. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 5, dans lequel l'étape (a) est réalisée à une pression comprise entre $120 \cdot 10^5$ Pa et $140 \cdot 10^5$ Pa.
7. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, dans lequel la solution d'acides gras ou de leurs dérivés est une solution d'huile de poisson.
8. Procédé selon la revendication 7, dans lequel la solution d'acides gras ou de leurs dérivés est une solution d'huile de thon ou de foie de morue.

9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, dans lequel la solution d'huile de poisson comprend au moins 20% de DHA par rapport aux acides gras totaux de la solution d'huile de poisson ou à leurs dérivés.
10. Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, dans lequel la solution d'acides gras ou de ses dérivés est une solution d'esters éthyliques d'acides gras.
11. Solution d'esters éthyliques d'acides gras contenant au moins 50% de DHA, obtenue par le procédé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour son utilisation en tant que médicament destiné à traiter les pathologies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes et/ou les inflammations.
12. Solution d'esters éthyliques d'acides gras selon la revendication 11, pour son utilisation en tant que médicament destiné à traiter la maladie d'Alzheimer.
13. Utilisation d'une solution contenant au moins 50% de DHA, obtenue par le procédé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour le traitement de pathologies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes et/ou les inflammations.
14. Utilisation selon la revendication 13, pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.
15. Utilisation d'une solution contenant au moins 50% de DHA, obtenue par le procédé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, dans la fabrication d'un médicament pour le traitement de pathologies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes et/ou les inflammations.
16. Utilisation selon la revendication 15, dans la fabrication d'un médicament pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.
17. Utilisation d'une composition comprenant une solution contenant au moins 50% de DHA, la solution étant obtenue par le procédé tel que défini selon l'une quelconque des revendications 1 à 10, pour le traitement de pathologies neurodégénératives, les maladies cardiovasculaires, les maladies auto-immunes et/ou les inflammations.

18. Utilisation selon la revendication 17, pour le traitement de la maladie d'Alzheimer.

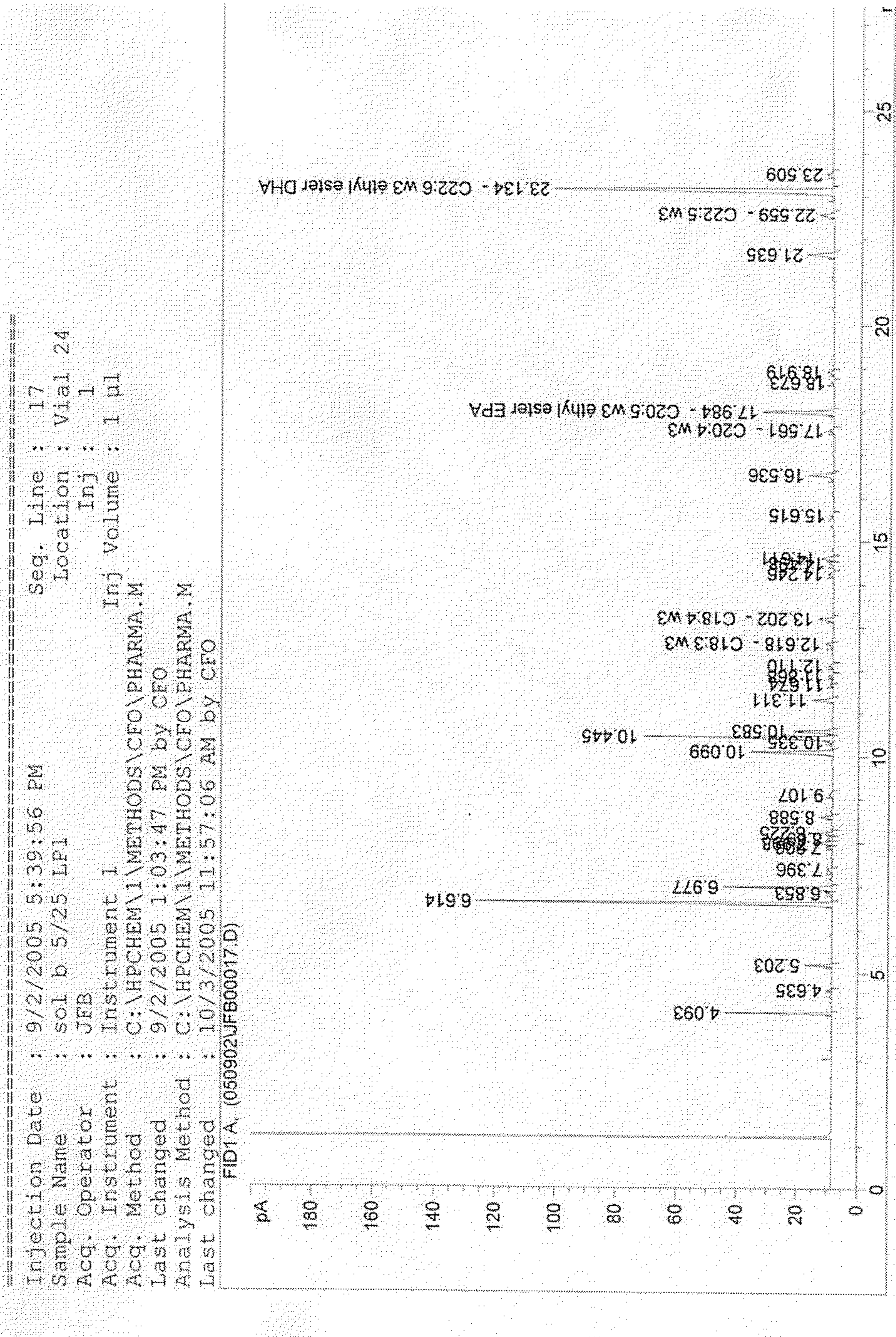


FIGURE 1

2/2

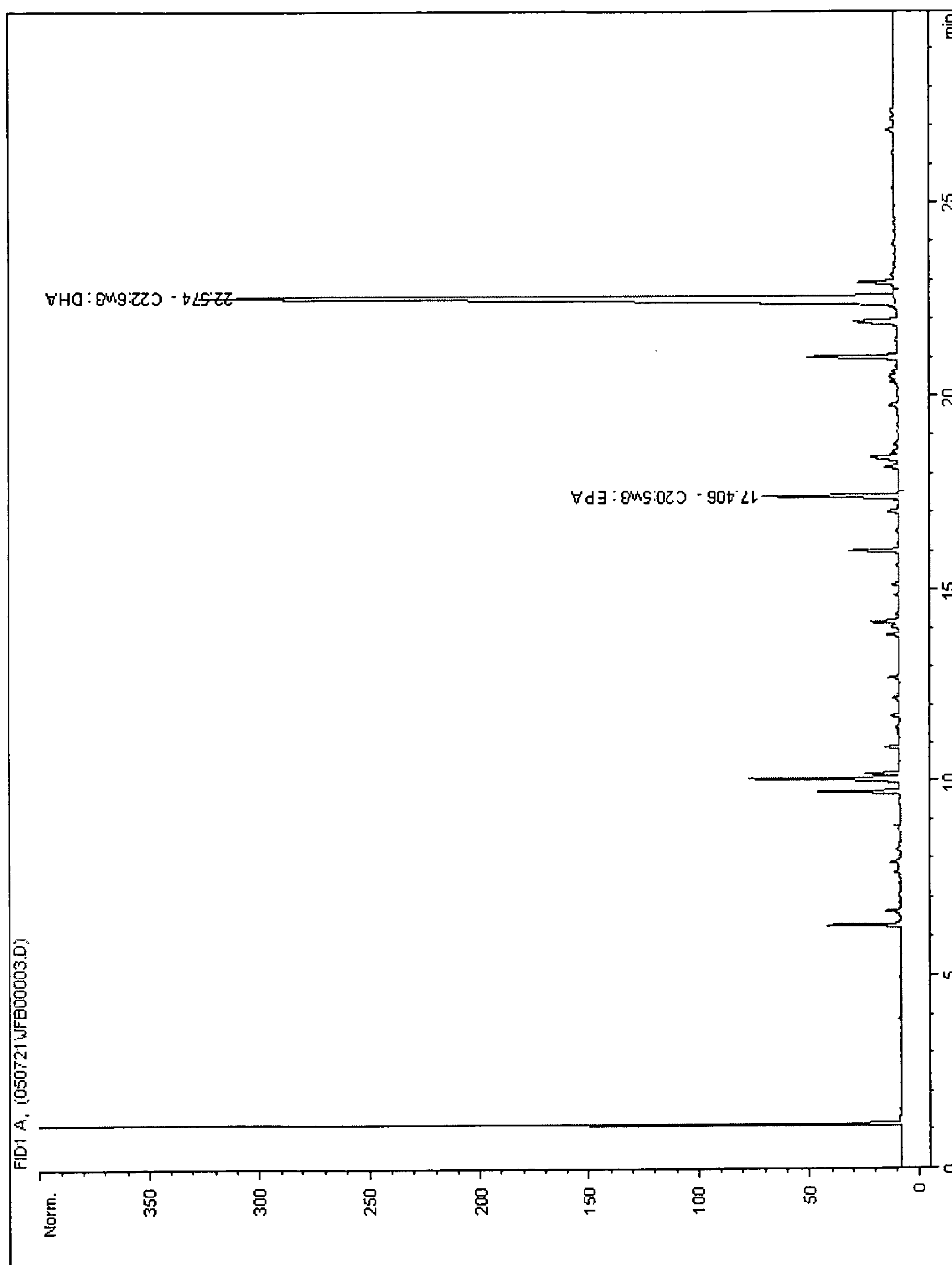


FIGURE 2