



No. 14-170543- -00000-0000

Fecha: 2014-08-05 15:25:37

Tra. 11 PATENTEIYII

Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Eve: 378 FASENACIONALI

Folios: 5



T=F=4

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

DIVISIONAL

21. EXPEDIENTE No.

54. TITULO: COMPOSICIONES ENRIQUECIDAS CON DPA DE
ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 POLIINSATURADOS EN FORMA DE
ÁCIDO LIBRE

51. CLASIFICACION INTRNACIONAL A61K 31/19

71. SOLICITANTE: OMTHERA PHARMACEUTICALS, INC.
Y CHRYSALIS PHARMA AG

DOMICILIO: New Jersey, Estados Unidos de América y
Sachseln, Suiza.

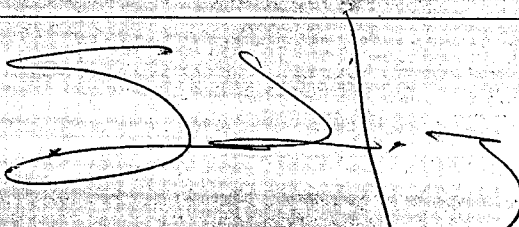
74. APODERADO SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ

22. BOGOTÁ, D.C.

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	Resivo de radicación
		
	No. 14-170543- -00000-0000	
	Fecha: 2014-08-05 15:25:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 5	

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL – PCT

1	TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No. PCT/US2013/020398 Fecha 04 de Enero de 2013			
Publicación Internacional No. WO 2013/103902 A1 Fecha 11 de Julio de 2013			
3	TÍTULO DE LA INVENCIÓN (200 caracteres o espacios máximos)		
COMPOSICIONES ENRIQUECIDAS CON DPA DE ÁCIDOS GRASOS OMEGA 3 POLIINSATURADOS EN FORMA DE ÁCIDO LIBRE			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (CIP) A61K 31/19		
5	SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN
OMTHERA PHARMACEUTICALS, INC. Y CHRYSALIS PHARMA AG			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN: 707 State Road Princeton, y Chilchgasse 8, No. TELÉFONO:			
CIUDAD: New Jersey 08540 y CH-6072 Sachseln, CORREO ELECTRONICO:			
PAÍS DE RESIDENCIA: Estados Unidos de América y Suiza. LUGAR DE CONSTITUCIÓN: Estados Unidos de América y Suiza.			
7	INVENTOR (ES) VER HOJA COMPLEMENTARIA		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO:			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
DIRECCIÓN		CIUDAD	ESTADO
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	☐ REPRESENTANTE LEGAL ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LOPEZ DIAZ		SIVANA MARIA	C.C.22.468.787 T.P. 147463 CSJ
DIRECCIÓN Cra. 11 No. 86 – 53, Piso 6 No. TELÉFONO 6181088			
CIUDAD Bogotá, D.C. CORREO ELECTRÓNICO notificaciones@clarkemodet.com.co			
PAÍS Colombia			
10	DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO		
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO
1. Estados Unidos de América		US	61/583.796
2. Estados Unidos de América		US	61/664.047
3. Estados Unidos de América		US	61/669.940
4. Estados Unidos de América		US	61/680.622
5. Estados Unidos de América		US	61/710.517
6. Estados Unidos de América		US	61/713.388
			(32) FECHA AAA/MM/DD
			2012/01/06
			2012/06/25
			2012/07/10
			2012/08/07
			2012/10/05
			2012/10/12

11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.			
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES		
Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.			
13	REDUCCIÓN DE TASAS		
Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.			
☐ SI ☐ NO			
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.			
Micro, pequeñas y medianas empresas ☐			
Universidades públicas o privadas ☐			
Entidades sin ánimo de lucro ☐			
Debe aportar los documentos que se indican en el numeral 17 de anexos			
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☐ SI ☐ NO		
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de internet.			
15	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 14-070764// 14-070486	Fecha 04/07/2014 03/07/2014
16	FIRMA DEL APODERADO :		
 SILVANA MARIA LOPEZ DIAZ C.C. 22.468.787 T.P. 147463 CSJ			
17	ANEXOS		
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica	
1. ☒ Descripción N° de folios: 132		9. ☐ Poderes, si fuera el caso. Ver expediente original	
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 68		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.	
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios 66		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.	
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. Reducción de tasas	
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		Micro, pequeñas o medianas empresas	
7. ☐ Arte final 12 x 12.		☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.	
8. ☐ Anexo formato digital.		☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.	
		Universidades públicas o privadas	
		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación	
		Entidades sin ánimo de lucro	
		☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
		☐ Hoja de información complementaria.	
		☐ Otros, especificar	
		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.	
		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.	
		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.	
		17. ☒ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.	

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0070764

Bogotá D.C., Julio 04 de 2014 - 11:19:26

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	20233205	04/07/2014	18.750.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNIDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				\$515.000.00
			=====	

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-170543- -00000-0000

Fecha: 2014-08-05 15:25:37
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACIONDep. 2020 DIR. NUEVAS CR
Eve: 378 FASE NACIONAL I
Folios: 5

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 4 de 2014 - 11:19:30

2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0070486

Bogotá D.C., Julio 03 de 2014 - 17:11:00

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	46991	05/05/2014		106.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58492	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58493	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58494	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58495	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58496	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58497	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58498	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58499	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58500	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58501	04/06/2014		520.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO

CONCEPTO

Vr.UNDITARIO

Vr.CONCEPTO

58 50005-01-01 SOLICITUDES

1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA
ADICIONAL A LAS 10 INIC

31.000.00

1.798.000.00

1.798.000.00

SON: **UN MILL&OACUTE;N SETECIENTOS NOVENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 14-170543-00000-0000

Fecha: 2014-08-05 15:25:37

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 411 PRESENTACION

Folios: 5

Sede Centro

Bogotá, D.C. - Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

Julio 3 de 2014 - 17:11:02

M

4

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: 14 / 8 / 5 AAAA MM DD	
		Recorrido: 4	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	14-190543	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD X
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
16	Otro

Observaciones:

El cd anexo contiene un total de Archivos:

(1) Archivos en Formato PDF el cual fue procesado en el Folio (4) correos pendiente

Jaudico 6



No. 14-170543- -00000-0000

Fecha: 2014-08-05 15:25:37 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 5



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE – NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐ MODELO DE UTILIDAD ☐ Art 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☐ MODELO DE UTILIDAD PCT ☐ Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☐	Indicación que se solicita una PCT
☐	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ (Art. 119 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐ (Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

5

ANEXO INVENTORES

- 1.) **MAINES, Timothy, J.**
(13001 North Commons Way Potomac, MD 20854, Estados Unidos de América);
- 2.) **MACHIELSE, Bernardus N M**
(13800 Turkey Foot Road North Potomac, Maryland 20854, Estados Unidos de América);
- 3.) **MEHTA, Bharat M.**
(21 Cromwell Drive Mendham, NJ 07945, Estados Unidos de América);
- 4.) **WISLER, Gerald**
(9713 Green Island Cove Windermere, Florida 34786, Estados Unidos de América);
- 5.) **DAVIDSON, Michael**
(140 Belle Avenue Highland Park, Illinois 60035, Estados Unidos de América);
- 6.) **WOOD, Peter Ralph**
(Glen View Cotherstone County Durham DL12NT, Gran Bretaña).

COMPOSICIONES ENRIQUECIDAS CON DPA DE ÁCIDOS GRASOS
OMEGA 3 POLIINSATURADOS EN FORMA DE ÁCIDO LIBRE

1. Referencia a solicitudes relacionadas

5 Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad según 35 USC 119 (e) de las solicitudes número 61/583.796, presentada el 6 de enero de 2012; 61/664.047, presentada el 25 de junio de 2012; 61/669.940 presentada el 10 de Julio de 2012; 61/680.622, presentada el 7 de agosto de 2012; 61/710.517, presentada el 5 de octubre de 2012 y 61/713.388, presentada el 12 de octubre de 2013, cuyos contenidos se
10 incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad. .

2. Antecedentes

 Las composiciones farmacéuticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados omega 3 ("[omega]-3" o "n-3") (PUFA) se están desarrollando para tratar diversas indicaciones
15 clínicas.

 Estos productos, que proceden de fuentes naturales, habitualmente aceites de pescado, son composiciones heterogéneas y comprenden varias especies de PUFA omega 3, PUFA omega 6 y otros componentes minoritarios, incluyendo ácidos grasos monoinsaturados y saturados. Los efectos clínicos observaos normalmente se atribuyen
20 a la composición como un todo, aunque se cree que las más prevalentes de las especies de PUFA presentes en la mezcla, habitualmente EPA y DHA, contribuyen a una porción sustancial del efecto clínico observado. Dado que son composiciones heterogéneas, los productos se definen para incluir determinadas especies de ácidos grasos poliinsaturados obligados, cada una con un porcentaje de intervalo de tolerancia
25 definido. Las composiciones se definen adicionalmente para limitar determinados componentes no deseados, los que se originan en la fuente natural, tales como determinados contaminantes ambientales, como los creados potencialmente en el proceso de refinado.

 La composición óptima es probable que difiera entre las indicaciones clínicas previstas. No obstante, incluso para la primera indicación clínica aprobada, el
30 tratamiento de la hipertrigliceridemia grave (TG > 500 mg/dl), la composición óptima todavía no se ha definido.

 Por tanto, la primera composición farmacéutica aprobada para el tratamiento de la hipertrigliceridemia grave comprende la especie de PUFA omega 3 ácido
35 eicosapentanoico ("EPA") y ácido docosahexanoico ("DHA") en forma de ésteres de

etilo en porcentajes en peso de aproximadamente 46:38 (EPA:DHA), representando EPA y DHA en conjunto aproximadamente el 84% de todas las especies de PUFA en la composición. Por el contrario, el producto más recientemente aprobado, Vascepa[®] (previamente conocido como AMR101), que está aprobado para la misma indicación clínica, tiene una pureza > 96% de EP en forma de éster etílico, sustancialmente sin DHA. El producto nutracéutico, OMAX3, vendido como suplemento dietético y promocionado en parte para disminuir los niveles de triglicéridos, comprende EPA y DHA en una proporción en peso de aproximadamente 4,1:1, en el que el EPA y el DHA están, asimismo, en forma de éster etílico, teniendo la formulación más del 84% de EPA y DHA en peso y más del 90% de ácidos grasos omega 3 en peso.

Estas amplias variaciones en la composición reflejan una continua incertidumbre en lo que respecta a la composición óptima para esta indicación clínica.

La incertidumbre se debe, en parte, a los objetivos clínicos controvertidos. Por ejemplo, las especies de PUFA omega 3, se sabe que el DHA es más potente respecto a la disminución de los niveles séricos de triglicéridos que el EPA, pero se sabe que tiene una mayor tendencia a incrementar los niveles de LDL, Mori et al., Am. J. Clin. Nutr. 71 :1085 - 94 (2000), Grimsgaard et al., Am. J. Clin. Nutr. 66:649 - 59 (1997); se ha pensado que la elevación de LDL se ve clínicamente desfavorecida en sujetos con riesgo cardiovascular elevado. Aunque clínicamente se suele desear una disminución de la agregación plaquetaria y trombogénesis a través de los PUFA omega 3, el potencial incremento del tiempo de hemorragia ha hecho que algunos autores propongan añadir una cantidad determinada de las especies de PUFA omega-6, ácido araquidónico ("AA"), a las composiciones farmacéuticas que son ricas en PUFA omega-3. Véase la publicación de EE.UU. previa a la concesión nº 2010/0160435.

La dificultad en la definición de una composición óptima también se debe, en parte, a la interconversión enzimática entre ciertas especies de PUFA omega-3 y a la competición entre los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 para las enzimas compartidas en sus respectivas vías biosintéticas de PUFA de cadena media de la dieta (véase la FIG. 1).

Un reto adicional en el diseño de una composición óptima es la variación en la biodisponibilidad de las composiciones PUFA administradas por vía oral. Se sabe que la absorción de los PUFA en forma de ésteres de etilo, por ejemplo, depende de la presencia de lipasa pancreática, que se libera en respuesta a grasas ingeridas. La absorción de ésteres de etilo de PUFA es ineficiente y está sujeta a una sustancial variación, tanto entre los sujetos como en cualquier sujeto individual, en función de la

ingesta de grasas con la dieta. Véase Lawson et al, "Human absorption of fish oil fatty acids as triacylglycerols, free acids, or ethyl esters," *Biochem Biophys Res Commun.* 152:328 - 35 (1988); Lawson et al., *Biochem Biophys Res Commun.* 156:960 - 3 (1988). La absorción está particularmente reducida en sujetos con dietas pobres en grasas, una
 5 dieta dirigida a los sujetos con niveles séricos elevados de triglicéridos o enfermedad cardiovascular.

Para cualquier composición farmacéutica de PUFA específicamente deseada, el proceso de refinado está diseñado para producir un producto final que tenga componentes de ácidos grasos obligados dentro de intervalos de tolerancia en porcentaje
 10 predefinidos y para limitar determinados componentes indeseados a niveles inferiores a determinados límites de tolerancia predefinidos, con un rendimiento suficiente como para hacer que el proceso sea viable comercialmente y sostenible en términos de medio ambiente. Las diferencias en la composición final deseada dictan diferencias en el proceso de refinado.

15 Varias etapas conocidas del proceso presentan intercambios para dificultar la adaptación y la optimización específicas de la composición del proceso de refinado. Por ejemplo, la formación de complejos de inclusión de urea (clatración) en presencia de etanol a menudo se usa para eliminar los ácidos grasos de cadena larga tanto saturados como monoinsaturados, lo que incrementa la proporción relativa de los ácidos grasos
 20 poliinsaturados omega-3 de cadena larga deseados en la composición resultante. Demasiada poca urea reduce el enriquecimiento de PUFA omega-3 de cadena larga. No obstante, el exceso de urea puede conducir a la concentración de componentes indeseados y tiene el potencial de conducir, a cualquier temperatura y tiempo de reacción dados, a un incremento de la producción de carbamato de etilo, un carcinógeno
 25 que no está permitido por encima de determinados límites bajos definidos. No obstante, las alternativas existentes a la formación de complejos de urea presentan otras dificultades.

Por tanto, existe la necesidad de mejores composiciones farmacéuticas ricas en ácidos grasos poliinsaturados omega-3, especialmente para el tratamiento de la
 30 hipertrigliceridemia y dislipidemias mixtas, y de procesos mejores para refinar dichas composiciones a partir del aceite de pescado.

3. Resumen

En un primer aspecto, la presente divulgación proporciona composiciones
 35 farmacéuticas enriquecidas en DPA de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma

de ácido libre. El enriquecimiento en el contenido en DPA fue una consecuencia imprevista e indeseada del proceso de producción a escala comercial. Se ha demostrado que estas composiciones farmacéuticas enriquecidas en DPA tienen una eficacia farmacológica y clínica excepcional en experimentos *in vitro* y en ensayos clínicos en seres humanos.

De acuerdo con lo anterior, en otro aspecto se proporcionan métodos de tratamiento. En una serie de realizaciones del tratamiento se proporcionan métodos de tratar la hipertrigliceridemia grave ($TG > 500$ mg/dl). En otra serie de realizaciones del tratamiento se proporcionan métodos de tratar la hipertrigliceridemia (200 mg/dl – 500 mg/dl) mediante la administración como adyuvante de una estatina y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. Otros métodos de tratamiento incluyen, entre otros, tratamientos para aumentar las proporciones de EPA: AA en plasma, tratamientos para disminuir los niveles de ApoCIII y tratamientos para reducir o prevenir la resistencia a los inhibidores de la agregación plaquetaria.

En el presente documento también se divulgan métodos de preparar las composiciones farmacéuticas a escala comercial, incluidos métodos que incluyen una etapa de formación de complejos de urea en la que los lotes restringidos en términos de la composición de la materia intermedia transesterificada se someten a una etapa de formación de complejos de urea usando cantidades de urea dentro de los intervalos determinados por un algoritmo de proceso nuevo

4. Breve descripción de las figuras

La FIG. 1 muestra las vías humanas conocidas para la biosíntesis de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 a partir de ácidos grasos esenciales de cadena intermedia (media).

La FIG.2 es un diagrama de flujo de un proceso de ejemplo para preparar una materia intermedia de ésteres de etilo de PUFA.

La FIG3A representa la purificación media relativa de clases de ácidos grasos a través de una etapa de formación de complejos de urea en la que las cantidades de urea determinadas por el algoritmo se añaden a la materia intermedia definida por la composición de ésteres de etilo de PUFA.

La FIG. 3B ilustra la purificación media diferencial de especies individuales de ésteres de etilo de PUFA omega-3y omega-6 cuando se añaden cantidades de urea determinadas por el algoritmo a la materia intermedia definida por la composición de ésteres de etilo de PUFA.

La FIG. 4 es un diagrama de flujo del tratamiento que ilustra el diseño del estudio clínico ECLIPSE descrito adicionalmente en el ejemplo 7.

La FIG. 5 compara la biodisponibilidad de EPA + DHA total (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis (4 g) de Lovaza[®] durante los periodos de dietas ricas en grasas y bajas en grasas.

La FIG. 6 compara la biodisponibilidad de EPA + DHA total (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis (4g) de Lovaza[®] ("EE-FA") o Epanova[®], una composición enriquecida de PUFA omega-3 en forma de ácido libre ("FFA") durante el periodo de dietas ricas en grasas.

La FIG. 7 compara las concentraciones plasmáticas totales de EPA + DHA total (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis (4g) de Lovaza[®] o Epanova[®] durante el periodo de dietas pobres en grasas.

La FIG. 8 compara las concentraciones plasmáticas totales de EPA (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis (4 g) de Lovaza[®] o Epanova[®] durante el periodo de dietas pobres en grasas.

La FIG. 9 compara las concentraciones plasmáticas totales de DHA total (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis (4g) de Lovaza[®] o Epanova[®] durante el periodo de dietas pobres en grasas.

Las FIGS. 10Ay 10B presentan respuestas AUC_{0-t} de sujetos individuales durante las dietas pobres en grasas y ricas en grasas expresadas como la proporción (%) entre AUC_{0-t} de pobres en grasas y AUC_{0-t} de ricas en grasas. Las proporciones negativas no se han representado.

La FIG. 11 es un diagrama de flujo del tratamiento que ilustra el diseño del ensayo de biodisponibilidad comparativa de 14 días que se describe adicionalmente en el ejemplo 8 (los tiempos no están a escala).

La FIG. 12A representa las concentraciones medias totales sin ajustar de EPA+DHA frente al tiempo (escala lineal) para el tratamiento con Lovaza[®] frente al tratamiento con Epanova[®] en el ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días que se describe adicionalmente en el ejemplo 8.

La FIG. 12B es un histograma que muestra la diferencia en los valores de EPA + DHA sin ajustar (nmol/ml) para los puntos entre paréntesis en la FIG. 12 A.

La FIG. 13 representa las concentraciones basales medias totales sin ajustar de EPA+DHA frente al tiempo (escala lineal) para el tratamiento con Lovaza[®] frente al tratamiento con Epanova[®] en el ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

La FIG. 14A es un histograma que representa los incrementos desde el momento basal al equilibrio en los niveles en sangre sin ajustar de EPA+DHA en las ramas de tratamiento con Lovaza[®] y con Epanova[®] del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

- 5 La FIG. 14B es un histograma que representa los incrementos desde el momento basal al equilibrio en la C_{avg} sin ajustar de EPA+DHA en las ramas de tratamiento con Lovaza[®] y con Epanova[®] del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

- 10 La FIG. 15A es un histograma que representa los incrementos desde el momento basal al equilibrio para los niveles en sangre totales de DHA en las ramas de tratamiento con Lovaza[®] y con Epanova[®] del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

La FIG. 15B es un histograma que representa los incrementos desde el momento basal al equilibrio para los niveles de C_{avg} de DHA en la cohorte de tratamiento con Epanova[®] comparada con la cohorte de Lovaza[®] del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

- 15 La FIG. 16A es un histograma que representa los incrementos desde el momento basal al equilibrio para los niveles en sangre totales de EPA en las ramas de tratamiento con Lovaza[®] y con Epanova[®] del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

- 20 La FIG. 16B representa los incrementos desde el momento basal al equilibrio para los niveles en C_{avg} de EPA en las cohortes tratadas con Epanova[®] y con Lovaza[®] del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días.

La FIG. 17 proporciona un diagrama de flujo del tratamiento que ilustra el diseño del estudio EVOLVE descrito adicionalmente en el ejemplo 10.

La FIG. 18 resume el diseño del estudio EVOLVE con mayor detalle e identifica además los tiempos de las visitas del estudio.

- 25 La FIG. 19 muestra la disposición de los sujetos en el ensayo EVOLVE.

Las FIGS. 20 A - 20D muestran los niveles plasmáticos medios basales y al final del tratamiento ("EOT") (en $\mu\text{g/ml}$) para EPA (FIG. 20A), DHA (FIG. 20B), DPA (FIG. 20C) y AA (FIG. 20D), para cada una de las ramas de tratamiento en el ensayo EVOLVE.

- 30 La FIG. 20E compara los niveles medios basales y al EOT de EPA para el ensayo ECLIPSE descrito en el ejemplo 7, el estudio de biodisponibilidad de 14 días descrito en el ejemplo 8, un estudio de interacción fármaco-fármaco de estatinas ("STATIN DDI") descrito en el ejemplo 11, cada rama de tratamiento así como la rama control del ensayo EVOLCE descrito en el ejemplo 10 y los valores indicados

anteriormente en la bibliografía para el ensayo JELIS (“JELIS”) no relacionado, que usó una composición de omega-3 diferente.

Las FIGS. 21 A - 21D representa la mediana de los niveles plasmáticos basales y al final del tratamiento (“EOT”) (en $\mu\text{g/ml}$) para EPA (FIG. 21 A), DHA (FIG. 21B),
 5 DPA (FIG. 21C) y AA (FIG. 21D) en el ensayo EVOLVE.

Las FIGS. 22 A – 22B representa el cambio desde el momento basal a EOT en los niveles plasmáticos absolutos (en $\mu\text{g/ml}$) de AA, DHA, EPA y DPA, para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE. La FIG. 22A representa los cambios medios; la FIG. 22B representa la mediana de los cambios.

10 La FIG.23 A representa el cambio medio desde el momento basal a EOT, en forma del porcentaje del valor basal, para AA, DHA, EPA y DPA, para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE. La FIG. 23B representa los cambios medios en porcentaje. La FIG. 23B representa la mediana del cambio en porcentaje desde el momento basal al EOT.

15 Las FIGS. 24 A – 24I representa los niveles plasmáticos medios basales y al EOT (en mg/dl , con la excepción de LpPLA2, mostrado en ng/ml) en el ensayo EVOLVE para los triglicéridos (FIG. 24A), Non-HDL-C (FIG. 24B), HDL-C (FIG. 24C), V-LDL-C (FIG. 24D), LDL-C (FIG. 24E), ApoB (FIG. 24F), ApoCIII (FIG. 24G), RLP (FIG. 24H), LpPLA2 (FIG. 24I).

20 Las FIGS. 25A – 25I representa la mediana de los niveles plasmático basales y al EOT (en mg/dl , con la excepción de LpPLA2, mostrado en ng/ml) en el ensayo EVOLVE para los triglicéridos (FIG. 25 A), Non-HDL-C (FIG. 25B), HDL-C (FIG. 25C), V-LDL-C (FIG. 25D), LDL-C (FIG. 25E), ApoB (FIG. 25F), ApoCIII (FIG. 25G), RLP (FIG. 25H), LpPLA2 (FIG. 25I).

25 Las FIGS. 26 A y 26B representan los cambios desde el momento basal al EOT en los niveles plasmáticos absolutos (en mg/dl) en el ensayo EVOLVE de triglicéridos (“TG”), Non-HDL-C (“NHDLC”), HDL-C, VLDL-C, y LDL-C para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE, representándose en la FIG. 26A el cambio medio y la FIG. 26B la mediana del cambio.

30 La FIG. 27 representa el porcentaje de los sujetos en el ensayo EVOLVE, proporcionado en el eje Y, para los que se redujeron los niveles de triglicéridos en el porcentaje indicado, proporcionado en el eje X, para dosis de 2 g y dosis de 4 g de Epanova[®].

La FIG.28 A representa el cambio medio desde el momento basal a EOT, en
 35 forma del porcentaje del valor basal, para TG, non-HDL-c (“NHDLC”), HDL-C,

VLDL-C, LDL-C, ApoB, ApoCIII, LpLPA2, y RLP en cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE, representando la FIG. 28B la mediana del cambio porcentual desde el momento basal al EOT.

La FIG. 29 representa la velocidad del cambio (en valor absoluto) de la mediana del cambio en porcentaje con respecto al valor basal de los niveles plasmáticos de EPA, DHA, DP A, AA, TG, NHDL-C y HDL-C entre dosis de 2 g y 4 g de Epanova® en el ensayo EVOLVE.

La FIG. 30 ilustra los datos comparativos para Epanova®, medido en el ensayo EVOLVE y los datos notificados por otros para AMR-101 (Vascepa), a las dosis indicadas, con respecto a los niveles de TG.

La FIG. 31 ilustra los datos comparativos para Epanova®, medido en el ensayo EVOLVE, y AMR-101 (Vascepa), con respecto a varios parámetros de lípidos en sangre. Los datos para AMR-101 fueron notificados por otros autores. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor p inferior a 0,01, y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 32 ilustra los datos comparativos para dosis de 2 g y 4 g de Epanova®, determinado en el ensayo EVOLVE, y dosis de 4 g de Lovaza® con respecto a varios parámetros de lípidos en sangre. Los datos para Lovaza® fueron notificados por otros autores. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor p inferior a 0,01, y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 33 ilustra los datos comparativos para dosis de 2 g y 4 g de Epanova®, evaluado en el ensayo EVOLVE, y dosis de 4 g de Lovaza® con respecto a los niveles de TG. Los superíndices indican datos procedentes de (1) ensayo EVOLVE, (2) un metanálisis de la Solicitud de Fármaco Nuevo para Lovaza® ("NDA"), (3) la ficha técnica del producto aprobada por la FDA para Lovaza® y (4) el estudio Takeda. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor p inferior a 0,01, y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 34 representa la correlación entre el cambio porcentual en los niveles de LDL y el cambio porcentual de los niveles de ApoCIII, medido en el ensayo EVOLVE.

La FIG. 35 representa el cambio porcentual de la media por mínimos cuadrados (LS) con respecto al valor basal para la subpoblación de sujetos del ensayo EVOLVE que tiene niveles basales de TG superiores o iguales a 750 mg/dl para las ramas de tratamiento indicadas del estudio EVOLVE, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor p inferior a 0,01 y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 36 representa el cambio porcentual de la media por mínimos cuadrados (LS) con respecto al valor basal para la subpoblación de sujetos con diabetes de tipo II. para las ramas de tratamiento indicadas del estudio EVOLVE, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor o inferior a 0,01 y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 37 representa el cambio porcentual de la media por mínimos cuadrados (LS) con respecto al valor basal para la subpoblación de sujetos en tratamiento concurrente con estatinas para las ramas de tratamiento indicadas del estudio EVOLVE, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor o inferior a 0,01 y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 38 representa la diferencia porcentual de la media de mínimos cuadrados (LS) respecto al control para triglicéridos ("TG"), non-HDL-colesterol ("NHDLC"), HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C y TC/HDL-C, que comparan sujetos del estudio EVOLVE descrito en el ejemplo 10 que han recibido (STATIN) o no (NON-STATIN) tratamiento con estatinas concurrente con el tratamiento con la dosis de 2 g de Epanova[®]. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor p inferior a 0,01, y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 39 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para TG, NHDLC, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C, y TC/HDL-C para la subpoblación de sujetos en tratamiento concurrente con estatinas para las ramas de tratamiento indicadas del estudio EVOLVE, como se describe adicionalmente en el Ejemplo 10. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor o inferior a 0,01 y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 40 proporciona un diagrama de flujo del tratamiento que ilustra el diseño del estudio ESPRIT descrito adicionalmente en el ejemplo 12.

La FIG. 41 muestra la disposición de los sujetos en el ensayo ESPRIT.

Las FIGS. 42A y 42B representan el cambio porcentual de la media LS con respecto al valor basal para EPA (FIG. 42 A) y DHA (FIG. 42B) del estudio ESPRIT, que se describe adicionalmente en el Ejemplo 12. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor o inferior a 0,01 y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 43 representa el cambio porcentual de la media LS con respecto al valor basal para TG, Non-HDL-C y HDL-C. Los datos mostrados proceden del estudio ESPRIT, que se describe adicionalmente en el Ejemplo 12. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor o inferior a 0,01 y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 44 representa el cambio porcentual de la media LS con respecto al valor basal para ApoB, LDL-C, VLDL-C y TC/HDL-C. Los datos mostrados proceden del estudio ESPRIT, que se describe adicionalmente en el Ejemplo 12. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor o inferior a 0,01 y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 45 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para TG, con los sujetos agrupados en terciles por los niveles basales de TG, para los sujetos en el ensayo EPRIT.

La FIG. 46 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para Non-HDL-C, con los sujetos agrupados en terciles por los niveles basales de Non-HDL-C, para los sujetos en el ensayo EPRIT.

La FIG. 47 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para LDL-C, con los sujetos agrupados en terciles por los niveles basales de LDL-C, para los sujetos en el ensayo EPRIT.

La FIG. 48 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para TG para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo ESPRIT, con los sujetos agrupados de acuerdo con la identidad de la estatina tomada en el tratamiento concurrente.

La FIG. 49 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para TG para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo ESPRIT, con los sujetos agrupados en dos grupos de acuerdo con la terapia concurrente con estatinas de potencia baja o alta.

La FIG. 50 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para Non-HDL-C para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo ESPRIT, con los sujetos agrupados de acuerdo con la terapia concurrente con estatinas de potencia baja o alta.

La FIG. 51 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para LDL-C para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo ESPRIT, con los sujetos agrupados en dos grupos de acuerdo con la terapia concurrente con estatinas de potencia baja o alta.

La FIG. 52 representa la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal para TG, agrupando los sujetos en cada rama de tratamiento del ensayo ESPRIT en tres grupos de acuerdo con niveles basales altos de TG, basales altos de EPA o la terapia concurrente con rosuvastatina.

La FIG. 53 representa el cambio porcentual medio de LS en la distribución del tamaño de partículas con respecto al valor basal para las partículas V-LDL agrupadas por tamaño, como se determina en el ensayo ESPRIT. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor p inferior a 0,01, y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

5 La FIG. 54 representa el cambio porcentual medio de LS en la distribución del tamaño de partículas con respecto al valor basal para las partículas LDL agrupadas por tamaño, como se determina en el ensayo ESPRIT. (*) indica un valor p inferior a 0,05, (**) indica un valor p inferior a 0,01, y (***) indica un valor p inferior a 0,001.

La FIG. 55 representa el cambio porcentual medio de LS en el tamaño de
10 partícula de LDL, agrupando los sujetos en tres grupos de acuerdo con los niveles de triglicéridos al EOT del ESPRIT.

La FIG. 56A representa los niveles plasmáticos basales de ácido araquidónico (AA) (en µg/ml) para los sujetos en el ensayo clínico que se describe adicionalmente en el ejemplo 11, agrupándose de acuerdo con el genotipo en el rs 174546 SNP. La FIG.
15 56B represente el cambio porcentual con respecto al valor basal en los niveles plasmáticos de AA el día 15 de tratamiento con Epanova[®], agrupados de acuerdo con el genotipo en el rs174546 SNP. Para cada genotipo, el intervalo intercuartílico se indica con un recuadro, la mediana está indicada por una línea horizontal en el interior del recuadro intercuartílico y la media se representa con un rombo. Las desviaciones se
20 representan con círculos abiertos. Los bigotes extienden al valor mínimo y máximo no desviado. La puntuación 1 identifica los sujetos que son homocigotos en el alelo principal; la puntuación 3 identifica los sujetos homocigotos en el alelo minoritario; y la puntuación 2 representa los heterocigotos.

5. Descripción detallada

25 **5.1: Visión general: Composiciones farmacéuticas de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre que están enriquecidas inesperadamente con DPA y tienen una eficacia clínica excepcional.**

La formación de complejos de inclusión de urea (clatración) es una etapa
30 convencional a menudo usada en el refinado de aceites de pescado para eliminar los ácidos grasos de cadena larga saturada y monoinsaturada, de modo que enriquece en los deseados ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga en la composición resultante. A pesar del uso prolongado y de los estudios diseñados para caracterizar los efectos de varios parámetros fisicoquímicos sobre el proceso, el grado hasta el cual la
35 formación de complejos de urea enriquece las especies individuales de ácidos grasos

poliinsaturados de cadena larga sigue sin ser predecible. Esta impredecibilidad residual en el procedimiento de formación de complejos de urea acoplada al potencial para generar niveles altos no permisibles de carbamato de etilo, lo que obligaría a un procesamiento adicional, militó inicialmente a favor de omitir la formación de complejos de urea del proceso de refinado a escala comercial para usar para la producción de composiciones de calidad farmacéutica de PUFA omega-3 en forma de ácido libre, cumpliendo determinadas especificaciones de composición deseadas.

No obstante, como se describe adicionalmente en el ejemplo 1, los primeros esfuerzos para desarrollar un proceso a escala comercial sin urea pusieron de manifiesto que dichos procesos no podían producir de forma fiable lotes con una composición que cumpliera las especificaciones requeridas. De acuerdo con esto, se buscó un proceso que usara formación de complejos de urea y se descubrió que un estricto control de la composición sobre las especies de PUFA presentes en la material de éster etílico intermedia, acoplado al uso de una cantidad de urea determinada mediante algoritmo podría producir de forma fiable lotes que cumplen las especificaciones requeridas y sin superar los límites de carbamato de etilo aceptables.

Como se describe en el ejemplo 2, se prepararon cuatro lotes de producción de ejemplo de ácidos grasos poliinsaturados en forma de ácido libre usando una etapa de formación de complejos de urea. Se aplicaron estrictos controles de la composición a la materia intermedia de éster de etilo usando solo lotes en los que las especies especificadas de ácidos grasos poliinsaturados estaban dentro de límites de intervalos definidos y se usaron cantidades de urea que estaban dentro del intervalo requerido por el algoritmo calculador de urea. Se determinó que los cuatro lotes de producción de la composición farmacéutica cumplían las especificaciones deseadas de la composición.

Como cabía esperar, la etapa de formación e complejos de urea disminuyó sustancialmente el porcentaje de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos monoinsaturados en la composición resultante, enriqueciendo sustancialmente en ácidos grasos poliinsaturados. Véase la FIG. 3 A. No obstante, inesperadamente, la formación de complejos de urea usando cantidades de urea que entran dentro del límite determinado por el algoritmo tuvo efectos diferenciales sobre el enriquecimiento de especies concretas de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y ácidos grasos poliinsaturados omega-6.

Como se describe más adelante en el ejemplo 3, se encontró que las especies de ácido docosapentaenoico omega-3, DPA (C22:5 n-3), estaban enriquecidas, mientras que las correspondientes especies de omega-6, con longitud de cadena y grado de

insaturación idénticos, ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), se redujeron en términos de prevalencia. El efecto divergente de la formación de complejos de urea sobre el enriquecimiento de estos dos isómeros, junto con diferencias en sus concentraciones relativas en la materia prima intermedia de éster etílico, tuvo como resultado una
5 diferencia de orden log en sus concentraciones en la composición farmacéutica final, ácido libre ("API").

Se prepararon más lotes de producción y, como se describe en el ejemplo 4, el análisis de la composición de 10 lotes de API demostró niveles elevados reproducibles de DPA en la composición final. Como se describe en el ejemplo 5, el análisis de la
10 composición de 21 lotes preparados usando formación de complejos de urea demostró una diferencia reproducible de 10 veces en la concentración de las especies de omega-3, DPA, en comparación con su isómero omega-6, ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6).

A una concentración media de 4,44 % (a/a) en 21 lotes de producción, el DPA es la tercera especie más prevalente de ácidos grasos poliinsaturados en el API, superada
15 solo por EPA y DHA. A este nivel, la concentración de DPA también es aproximadamente 10 veces mayor que la indicada para una composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre, denominada Purepa, en la que se indicó que DPA estaba presente a un nivel de 0,5%. Véase Belluzzi et al, Dig. Dis. Sci. 39(12): 2589 - 2594 (1994).

Aunque el DPA es un intermedio en la vía de biosíntesis de EPA en DHA (véase la FIG. 1), sorprendentemente se conoce poco sobre los efectos biológicos específicos de DPA. Para aclarar la potencial contribución de DPA a la eficacia clínica de la
20 composición farmacéutica se realizaron experimentos de perfil de la expresión génica usando células de hepatocarcinoma HepG2.

Como se describe adicionalmente en el ejemplo 6, los efectos de DPA sobre la expresión génica en las células hepáticas predicen una eficacia clínica mayor de las
25 composiciones enriquecidas en DPA.

Los experimentos de perfil de la expresión génica demostraron que DPA tiene una actividad biológica significativa a concentraciones in vitro relevantes. Estos efectos
30 son marcadamente diferentes de los observados con EPA y con DHA.

A una concentración relevante, se observó que DPA afectaba a la expresión de los genes en múltiples vías metabólicas, incluyendo los genes en categorías que se sabe que son relevantes para los efectos clínicos de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3: los genes implicados en el metabolismo de los lípidos, los genes implicados en la
35 fisiología cardiovascular y los genes implicados en la inflamación. También se predicen

significativos efectos de segundo orden, dados los cambios observados en la expresión de los genes que codifican proteínas que por sí mismas afectan a la expresión génica y en genes que codifican proteínas que afectan a la modificación postranscripcional.

Efectos específicos sobre la expresión de varios genes implicados en el metabolismo de los lípidos sugieren que DPA, a una concentración in vivo análoga, debería contribuir a la mejora de varios parámetros lipídicos clínicamente relevantes. En particular, la regulación por aumento dirigida por DPA observada de ACADSB, la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta/ramificada, predice niveles séricos de triglicéridos más bajos; la regulación por disminución dirigida por DPA de HMGCR, análoga a la inhibición por estatinas de la enzimas HMG-CoA-reductasa codificada, se predeciría que conduce a disminuciones favorables de la proporción colesterol total:HDL; y la regulación por disminución de DPA de SQLE, una etapa limitante de la velocidad en la síntesis de esterol, predice de forma análoga reducciones de los niveles de colesterol total.

Los experimentos de perfil de expresión también demostraron un umbral de dosis para los efectos del DPA. La concentración más baja analizada, elegida de modo que simule la concentración 10 veces menor de DPA en la formulación temprana de omega-3 en ácido libre, Purepa, afectó a la expresión de 10 veces menos genes que la concentración de DPA más alta, elegida para imitar la exposición esperada de las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, lo que demuestra que la concentración de DPA menor proporciona exposición subumbral y cabría esperar que proporcionara una dosis subterapéutica in vivo.

Los ensayos clínicos con seres humanos confirmaron la excepcional eficacia clínica de la composición farmacéutica enriquecida en DPA de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre.

El ejemplo 7 presenta los resultados del ensayo clínico ECLIPSE, un estudio de dosis única, aleatorizado, de 4 vías y de grupos cruzados de comparación de la biodisponibilidad de una dosis de 4 g de Lovaza® con la biodisponibilidad de una dosis de 4 g de la composición farmacéutica enriquecida en DPA de PUFA omega-3 en forma de ácido libre descrita en el presente documento (en lo sucesivo en el presente documento "Epanova®") en condiciones de dietas ricas en grasas y pobres en grasas. De acuerdo con la ficha técnica del producto aprobada por la FDS, cada cápsula de 1 gramo de Lovaza® contiene al menos 900 mg de los ésteres de etilo de los ácidos grasos omega-3 procedentes de aceites de pescado, principalmente una combinación de ésteres de etilo de ácido eicosapentaenoico (EPA, aproximadamente 465 mg) y ácido

docosahexaenoico (DHA, aproximadamente 375 mg). El lote de Epanova usado en el ensayo comprendía 57,3 % (a/a) de EPA, 19,6 % (a/a) de DHA y 6,2 % (a/a) de DPA, cada uno sustancialmente en forma de ácido libre.

El cambio ajustado por el valor basal en los perfiles de absorción (AUC) de EPA+DHA total y EPA y DHA individual con Epanova® (PUFA omega-3 en forma de ácido libre) fue significativamente mayor que con Lovaza® (ésteres etílicos de PUFA omega-3) durante el periodo de dieta rica en grasas y espectacularmente mejor durante el periodo de dieta pobre en grasas. Adicionalmente, se produjo un profundo impacto del contenido en grasas de las comidas sobre la biodisponibilidad de Lovaza®, mientras que la biodisponibilidad de Epanova® fue mucho más predecible, debido a un efecto del alimento únicamente modesto.

La biodisponibilidad superior independiente de grasas de Epanova® sobre Lovaza® es clínicamente importante, en vista de la recomendación de la NCEP ATP III de que los sujetos con hipertrigliceridemia y dislipidemias cumplen una dieta pobre en grasas durante la terapia adyuvante.

El ejemplo 8 presenta resultados de un estudio de biodisponibilidad de 14 días, que demostró que el incremento de la biodisponibilidad observado en el ensayo de dosis única ECLIPSE se mantenía, incluso potenciaba, en 2 semanas de dosificación. Además, los datos específicos de sujetos desagregados demostraron que el sujeto con menor respuesta a Epanova® todavía tenía una Cmax de EPA+DHA a 14 días mayor que el sujeto con mejor respuesta a Lovaza®.

El ejemplo 10 presenta los resultados del ensayo EVOLVE, un estudio de 12 semanas de duración, doble ciego y controlado con aceite de oliva de pacientes seleccionados en base a los niveles altos de triglicéridos, en el intervalo 500 - 2.000 mg/dl (hipertrigliceridemia grave). El criterio de valoración principal del estudio fue el cambio porcentual de los niveles plasmáticos de triglicéridos desde el momento basal al final del tratamiento ("EOT"). El criterio de valoración secundario fue el cambio porcentual de los niveles plasmáticos colesterol no HDL ("non-HDL-C") desde el momento basal al EOT.

Como se puede ver en las FIGS. 20 – 23, el tratamiento de 12 semanas con Epanova® produjo incrementos espectaculares en los niveles de plasma de EPA, DHA y DPA.

Los incrementos en los niveles plasmáticos de EPA, DHA, and DPA se acompañaron de reducciones significativas en los niveles plasmáticos de AA, de modo que el regimen de dosis de 4 g efectúa una reducción media del 18%, una mediana de la

reducción del 25,9% y una reducción de la media de mínimos cuadrados (“LS”) de 23,2%. Estas disminuciones de los niveles plasmáticos de ácido araquidónico se observaron a pesar de la administración de ácido araquidónico exógeno, que estaba presente a 2,446 % (a/a) en el lote de Epanova[®] usado en este ensayo.

5 El incremento en los niveles plasmáticos de EPA con una reducción concomitante en los niveles plasmáticos de AA produjo una mejora significativa en la proporción EPA/AA, de aproximadamente 0,10 en el momento basal a aproximadamente 0,67 (media) y 0,62 (mediana) en el final del tratamiento (“EOT”) a la dosis de 4 g. Se ha notificado que la proporción EPA/AA constituye un factor de
10 riesgo independiente para la aterosclerosis coronaria, Nakamura & Maegawa, Endocrine Abstracts (2012) 29 OC 19,1, con proporciones menores asociadas con la progresión en la aterosclerosis coronaria en pacientes con arteri coronariopatía tratados con estatinas, Nozue et al, Am J Cardiol. 2013 Jan 1;111(1):6 - 1 (publicación electrónica previa a la impresión).

15 Adicionalmente, el tratamiento con Epanova tuvo como resultado reducciones sustanciales de los niveles de triglicéridos (véanse las FIGS. 26A y 26B), reducciones en los niveles de non-HDL-C y VLDL-C, e incrementos en los niveles de HDL-C. LDL-C eran elevados, una observación que se puede atribuir a un incremento del tamaño de partícula de las LDL tras el tratamiento (debatido adicionalmente en el
20 ejemplo 12).

El ensayo EVOLVE también demostró que la apolipoproteína CIII (ApoCIII) se había reducido significativamente mediante el tratamiento con Epanova[®]. Se ha descubierto que los niveles elevados de ApoCIII son un predictor independiente de riesgo de cardiopatía cardiovascular (CHD), mientras que niveles reducidos genéticamente
25 de ApoCIII se han asociado con protección frente a la CHD y también se han correlacionado con un incremento de la longevidad.

La extremadamente elevada biodisponibilidad de los PUFA omega-3 en Epanova[®] reveló diferencias previamente desconocidas, e inesperadas, en la respuesta farmacocinética entre las diversas especies de PUFA.

30 La FIG. 29 representa la velocidad del cambio en la mediana del cambio en porcentaje con respecto al valor basal de los niveles plasmáticos de EPA, DHA, DP A, AA, TG, non-HDL-C y HDL-C (valor absoluto) entre dosis de 2 g y 4 g de Epanova[®]. Con poco o ningún incremento en los niveles plasmáticos de DHA y DPA después de la duplicación de la dosis de Epanova[®] de 2 g a 4 g al día, la velocidad del cambio
35 (pendiente) en la mediana del cambio en porcentaje con respecto al valor basal es casi

cero, lo que predice poco incremento adicional de los niveles plasmáticos de DHA y DPA, se conseguiría si la dosis se incrementara adicionalmente. Se observó una formación de equilibrio similar de la respuesta en los niveles de triglicéridos, niveles de HDL-C y niveles de non-HDL- C (datos no mostrados).

5 Por el contrario, la velocidad de cambio para EPA sigue siendo alta, con una pendiente de 0,59; cabe esperar que se obtengan más incrementos de los niveles plasmáticos de EPA aumentando la dosis de Epanova[®] por encima de 4 g al día. Significativamente, la velocidad del cambio (disminución) en los niveles de AA tras la duplicación de la dosis de Epanova[®] de 2 g a 4 g al día es todavía mayor que la
10 observada para EPA; cabe esperar que se produzcan más reducciones en los niveles plasmáticos de AA a medida que se incrementa la dosis de Epanova[®] por encima de 4 g/día. Por tanto, Epanova[®] exhibe una potencia sin precedentes en cuanto a la capacidad para elevar los niveles de PEA, reducir los niveles de AA y mejorar la proporción EPA:AA.

15 Como se muestra en la FIG. 38, una subpoblación de sujetos en la rama de tratamiento con 2 g del ensayo EVOLVE que estaban recibiendo tratamiento concurrente con estatinas mostró cambios porcentuales de mayor magnitud (diferencia en la media LS), respecto al control, para TG, non-HDL-C, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C y TC/HDL-C, en comparación con los sujetos en la rama de tratamiento con 2
20 g que no recibieron tratamiento concurrente con estatinas. Los sujetos en tratamiento concurrente con estatinas mostraron una respuesta a Epanova[®] dependiente de la dosis, como se indica en los datos comparativos para 2 g de Epanova[®] y para 4 g de Epanova[®] que se muestra en la FIG. 39.

El ejemplo 12 describe el ensayo clínico ESPRIT, que se realizó para estudiar a
25 pacientes en tratamiento basal con estatinas con niveles de triglicéridos entre 200-500 mg/dl, menores que en los pacientes con hipertrigliceridemia grave participantes en el estudio EVOLVE descrito en el Ejemplo 10. en el Ejemplo 10.

Se observaron reducciones de triglicéridos dependientes de la dosis, reducciones en HDL-C e incrementos en HDL-C en comparación con el aceite de oliva usado como
30 placebo (véase la FIG. 43). Adicionalmente, se observaron reducciones dependientes de la dosis en VLDL-C y TC/HDL-C (véase la FIG. 44). En conjunto, los resultados (resumidos en las FIGS. 42-44) demuestran la eficacia de Epanova[®] como auxiliar a la terapia de estatinas en pacientes con niveles de triglicéridos entre 200 – 500 mg/dl.

Las FIGS. 45 – 52 ilustran que Epanova[®] es eficaz como auxiliar a las estatinas
35 tanto de potencia baja como de potencia alta, en una serie de condiciones basales para

los pacientes. Como se observa en la FIG. 48, se observaron reducciones en los niveles de TG para pacientes que recibían tratamiento concurrente con rosuvastatina, atorvastatina y simvastatina. Se observaron efectos estadísticamente significativos sobre los niveles de triglicéridos, non-HDL-C y LDL-C, con independencia de si las estatinas de baja potencia o de alta potencia se había coadministrado, como se muestra en las FIGS. 49 - 51.

5.2 Composiciones de omega-3 enriquecidas en DPA en forma de ácido libre

De acuerdo con lo anterior, en un primer aspecto se proporcionan composiciones mejoradas de ácidos grasos poliinsaturados ("PUFA") en forma de ácido libre. En varias realizaciones, la composición es una composición farmacéutica adecuada para administración oral. En diversas realizaciones, la composición es una composición nutracéutica adecuada para administración oral.

5.2.1 Realizaciones típicas

La composición comprende una pluralidad de especies de PUFA omega-3, cada una presente sustancialmente en forma de ácido libre.

La composición comprende ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) ("EPA," también conocido como ácido timnodónico), ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3) ("DHA," también conocido como ácido cervónico) y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3) ("DP A", también conocido como ácido cludopónico), cada uno sustancialmente en forma de ácido libre.

La composición comprende EPA en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, se al menos 455 ("45 % (a/a)"). En varias realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad de al menos aproximadamente 46 % (a/a) 47 % (a/a), 48 % (a/a), 49 % (a/a), o al menos aproximadamente 50 % (a/a). En determinadas realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad de al menos aproximadamente 51 % (a/a), al menos aproximadamente 52 % (a/a), al menos aproximadamente 53 % (a/a), al menos aproximadamente 54 % (a/a), al menos aproximadamente 55 % (a/a), al menos aproximadamente 56 % (a/a), al menos aproximadamente 57 % (a/a), al menos aproximadamente 58 % (a/a), incluso al menos aproximadamente 59 % (a/a), al menos aproximadamente 60 % (a/a) al menos aproximadamente 61 % (a/a), 62 % (a/a), 63 % (a/a), 64 % (a/a) o 65 % (a/a).

En determinadas realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad de aproximadamente 45 a aproximadamente 65 % (a/a). En realizaciones concretas, la composición comprende EPA en una cantidad de aproximadamente 50 a

aproximadamente 60 % (a/a). En varias realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 52 a aproximadamente 58,0 % (a/a). En algunas realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 55% a aproximadamente 56 % (a/a). En algunas realizaciones, el EPA está presente en una
5 cantidad de aproximadamente 55 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad, calculada como un porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición (" % (m/m)"), de aproximadamente 50 % (m/m) a aproximadamente 60 % (m/m). En determinadas realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente
10 55 % (m/m).

La composición comprende DHA en una cantidad de al menos aproximadamente 13 % (a/a). En varias realizaciones, la composición comprende DHA en una cantidad de al menos aproximadamente 14 % (a/a), al menos aproximadamente 15 % (a/a), al menos aproximadamente 16 % (a/a), al menos aproximadamente 17 %
15 (a/a), al menos aproximadamente 18 % (a/a), al menos aproximadamente 19 % (a/a), o al menos aproximadamente 20 % (a/a). En realizaciones seleccionadas, la composición comprende DHA en una cantidad de al menos aproximadamente 21 % (a/a), al menos aproximadamente 22 % (a/a), al menos aproximadamente 23 % (a/a), al menos aproximadamente 24 % (a/a), incluso al menos aproximadamente 25 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición comprende DHA en una cantidad de aproximadamente 13 % (a/a) a aproximadamente 25% (a/a). En determinadas, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 15 % a aproximadamente 25 % (a/a). En diversas realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 17 % a aproximadamente 23 % (a/a). En determinadas, el DHA está presente en una
20 cantidad de aproximadamente 19 % a aproximadamente 20 % (a/a).
25

En varias realizaciones, la composición comprende DHA en una cantidad de aproximadamente 15 % (m/m) a aproximadamente 25% (m/m). En determinadas, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 17 % (m/m) a aproximadamente 23 % (m/m). En determinadas realizaciones, el DHA está presente en
30 una cantidad de aproximadamente 20 % (m/m).

La composición comprende DPA en una cantidad de al menos aproximadamente 1 % (a/a). En varias realizaciones, la composición comprende DPA en una cantidad de al menos aproximadamente 1,5 % (a/a) 2 % (a/a), 2,5 % (a/a), 3 % (a/a), 3,5 % (a/a), 4 % (a/a), 4,5 % (a/a), incluso al menos aproximadamente 5 % (a/a). En realizaciones
35 seleccionadas, la composición comprende DPA en una cantidad de al menos

aproximadamente 6 % (a/a), al menos aproximadamente 7 % (a/a), al menos aproximadamente 8 % (a/a) o al menos aproximadamente 9 % (a/a).

En diversas realizaciones, la composición comprende DPA en una cantidad de aproximadamente 1 % (a/a) a aproximadamente 8 % (a/a). En realizaciones determinadas, la composición comprende DPA en una cantidad de aproximadamente 2 % (a/a) a aproximadamente 7 % (a/a). En realizaciones seleccionadas, la composición comprende DPA en una cantidad de aproximadamente 3 % (a/a) a aproximadamente 6 % (a/a). En realizaciones concretas, la composición comprende DPA en una cantidad de aproximadamente 4 % (a/a) a aproximadamente 5 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición comprende DPA, calculada como un porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición, en una cantidad no inferior a aproximadamente 1% (m/m). En varias realizaciones, la composición comprende DPA en una cantidad de aproximadamente 1 % (m/m) a aproximadamente 8 % (m/m). En realizaciones concretas, la composición comprende DPA en una cantidad de no más de aproximadamente 10 % (m/m).

La composición comprende EPA y DHA en una cantidad total de al menos aproximadamente 60 % (a/a). En varias realizaciones, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad total de al menos aproximadamente 61 % (a/a) 62 % (a/a), 63 % (a/a), 64 % (a/a), 65 % (a/a), 66 % (a/a), 67 % (a/a), 68 % (a/a), 69 % (a/a), o al menos aproximadamente 70 % (a/a). En realizaciones concretas, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad total de al menos aproximadamente 71 % (a/a) 72 % (a/a), 73 % (a/a), 74 % (a/a), 75 % (a/a), 76 % (a/a), 77 % (a/a), 78 % (a/a), 79 % (a/a), incluso al menos aproximadamente 80 % (a/a). En determinadas realizaciones, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad total de al menos aproximadamente 81 % (a/a) 82 % (a/a), al menos aproximadamente 83 % (a/a), 84 % (a/a), incluso al menos aproximadamente 85 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad de aproximadamente 70,0 % (m/m) a aproximadamente 80,0 % (m/m). En determinadas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 75 % (m/m) de EPA más DHA.

La composición comprende EPA, DHA y DPA en una cantidad total de al menos aproximadamente 61 % (a/a). En realizaciones típicas, la composición comprende EPA, DHA y DPA en una cantidad total de al menos aproximadamente 62 % (a/a), 63 % (a/a), 64 % (a/a), 65 % (a/a), 66 % (a/a), al menos aproximadamente 67 % (a/a), al menos aproximadamente 68 % (a/a), al menos aproximadamente 69 %

(a/a), o al menos aproximadamente 70 % (a/a). En determinadas realizaciones, la composición comprende EPA, DHA y DPA en una cantidad total de al menos aproximadamente 71 % (a/a), 72 % (a/a), 73 % (a/a), 74 % (a/a), 75 % (a/a), 76 % (a/a), 77 % (a/a), 78 % (a/a), 79 % (a/a), 80 % (a/a), incluso al menos aproximadamente 81 %
 5 (a/a), 82 % (a/a), 83 % (a/a), 84 % (a/a), 85 % (a/a), 86 % (a/a), 87 % (a/a), incluso al menos aproximadamente 88 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición comprende EPA, DHA y DPA en una cantidad total de entre aproximadamente 70 % (a/a) a aproximadamente 90 % (a/a).

En una serie concreta de realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de
 10 aproximadamente 55 % (a/a) a aproximadamente 56% (a/a); el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 29% (a/a) a aproximadamente 20% (a/a) y el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 4% (a/a) a aproximadamente 5% (a/a).

En determinadas realizaciones, la composición comprende adicionalmente una o
 15 más especies de ácido graso poliinsaturado omega-3 seleccionadas del grupo que consiste en: Ácido α -linolénico (C18:3 n-3), ácido moróctico (C18:4 n-3, también conocido como ácido estearidónico), ácido ecosatrienoico (C20:3 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3) y ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3).

En realizaciones concretas, la composición comprende EPA, DHA, DPA, y
 20 ácido moróctico, cada uno sustancialmente en forma de ácido libre. En diversas realizaciones concretas, la composición comprende EPA, DHA, DPA, ácido moróctico y ácido heneicosapentanoico, cada uno sustancialmente en forma de ácido libre. En realizaciones específicas, la composición comprende EPA, DHA, DPA, y ácido moróctico, ácido heneicosapentanoico y ácido eicosatetraenoico, cada uno
 25 sustancialmente en forma de ácido libre. En realizaciones seleccionadas, la composición comprende EPA, DHA, DPA, ácido α -linolénico (C18:3 n-3), ácido moróctico (C18:4 n-3), ácido estearidónico (C20:3 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3) y ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3).

En diversas realizaciones, los ácidos grasos omega-3 totales, definidos como la
 30 suma de ácido alfa-linolénico (C18:3 n-3), ácido moróctico (C18:4 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), ácido eicosapentaenoico (EPA) (C20:5 n:3), ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3), ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3) y ácido docosahexaenoico (DHA) (C22:6 n-3), constituyen de aproximadamente 80 % (a/a) a aproximadamente 95 % (a/a) de todos los
 35 ácidos grasos en la composición. En diversas realizaciones, los ácidos grasos omega-3

totales constituyen de aproximadamente 80 a aproximadamente 95% (m/m) de todos los ácidos grasos en la composición.

En diversas realizaciones, la composición comprende adicionalmente una o más especies de PUFA omega-6, cada uno presente sustancialmente en forma de ácido libre.

5 En determinadas realizaciones, la composición comprende una o más especies de PUFA omega-6 seleccionadas del grupo que consiste ácido linolénico (C18:2 n6), ácido gamma-linolénico (C18:-3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6) ("DGLA"), ácido araquidónico (C20:4 n-6) ("AA") y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6, también conocido como ácido osbond).

10 En realizaciones concretas, la composición comprende ácido linolénico (C18:2 n6), ácido gamma-linolénico (C18:-3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6) ("DGLA"), ácido araquidónico (C20:4 n-6) ("AA") y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), cada uno presente sustancialmente en forma de ácido libre.

15 En varias realizaciones, el AA está presente en una cantidad de no más de aproximadamente 5% (a/a) de los ácidos grasos en la composición. En realizaciones determinadas, el AA comprende no más de aproximadamente 4,5 % (a/a) de los ácidos grasos en la composición. En realizaciones concretas, el AA está presente en una cantidad de no más de aproximadamente 4 % (a/a) de los ácidos grasos en la
20 composición.

En realizaciones determinadas, el AA está presente en una cantidad de no más de aproximadamente 5% (m/m) de los ácidos grasos en la composición. En realizaciones determinadas, el AA comprende no más de aproximadamente 4,5 % (m/m) de los ácidos grasos en la composición. En realizaciones concretas, el AA está presente
25 en una cantidad de no más de aproximadamente 4 % (m/m) de los ácidos grasos en la composición.

En realizaciones determinadas, los ácidos grasos poliinsaturados omega-6 totales, definidos como la suma de ácido linoleico (C18:2 n6), ácido gamma-linolénico (C18:-3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6),
30 ácido araquidónico (C20:4 n-6) ("AA") y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), comprenden no más de aproximadamente 105 (a/a) de los ácidos grasos en la composición. En realizaciones determinadas, los ácidos grasos poliinsaturados omega-6 totales, definidos como la suma de ácido linoleico (C18:2 n6), ácido gamma-linolénico (C18:-3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3
35 n-6), ácido araquidónico (C20:4 n-6) ("AA") y ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6),

comprenden no más de aproximadamente 10% (m/m) de los ácidos grasos en la composición.

En realizaciones específicas, la composición se proporciona en la Tabla 11, en la que cada una de las especies de PUFA identificadas en ella entran dentro del intervalo de aproximadamente -3SD a aproximadamente +3 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, cada especie de PUFA identificada en ella entra dentro del intervalo de aproximadamente -2SD a aproximadamente +2 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, cada especie entra dentro del intervalo de aproximadamente -1SD a aproximadamente +1 SD de la media citada respectivamente.

En realizaciones seleccionadas, la composición se proporciona en la Tabla 13, en la que cada una de las especies de PUFA identificadas en ella entran dentro del intervalo de aproximadamente -3SD a aproximadamente +3 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, cada especie entra dentro del intervalo de aproximadamente -2SD a aproximadamente +2 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, cada especie de PUFA entra dentro del intervalo de aproximadamente -1SD a aproximadamente +1 SD de la media citada respectivamente.

En determinadas realizaciones, los ácidos grasos poliinsaturados aparte de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 están presentes en una cantidad de no más de aproximadamente 5% (a/a). En diversas realizaciones, los ácidos grasos poliinsaturados aparte de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 están presentes en una cantidad de no más de aproximadamente 5% (m/m).

En varias realizaciones, al menos el 90% de cada una de la pluralidad de especies de PUFA omega-3 en la composición está en forma de ácido libre. En determinadas realizaciones, al menos el 91%, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, incluso al menos el 99 % de cada especie de PUFA omega-3 en la composición está presente en forma de ácido libre. En realizaciones de ejemplo, al menos el 90% del contenido total de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en la composición está en forma de ácido libre. En determinadas realizaciones, al menos el 91%, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, incluso al menos el 99 % del contenido total en ácidos poliinsaturados omega-3 en la composición está presente en forma de ácido libre.

En varias realizaciones, al menos el 90% de cada una de la pluralidad de especies de PUFA omega-6 en la composición está en forma de ácido libre. En determinadas realizaciones, al menos el 91%, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, incluso al menos el 99 % de cada especie de PUFA omega-6 en la composición está presente en forma de ácido libre. En realizaciones de ejemplo, al menos el 90% del contenido total de ácidos grasos poliinsaturados omega-6 en la composición está en forma de ácido libre.

En varias realizaciones, al menos el 90% de los ácidos grasos poliinsaturados totales en la composición está en forma de ácido libre. En determinadas realizaciones, al menos el 91%, al menos el 92 %, al menos el 93 %, al menos el 94 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, incluso al menos el 99 % del contenido total en ácidos poliinsaturados totales en la composición está presente en forma de ácido libre.

La composición comprende, en realizaciones típicas, no más de aproximadamente el 3,0% (a/a) de los ácidos grasos saturados y no más de aproximadamente el 5,0% (a/a) de los ácidos grasos monoinsaturados. En varias realizaciones, la composición comprende no más de aproximadamente el 3,0% (m/m) de los ácidos grasos saturados y no más de aproximadamente el 5,0% (m/m) de los ácidos grasos monoinsaturados.

En realizaciones típicas, la composición normalmente comprende además un antioxidante. En ciertas realizaciones, el antioxidante es hidroxianisol butilado (BHA). En algunas realizaciones, el antioxidante es alfa-tocoferol. En algunas realizaciones, el alfa-tocoferol está presente en una cantidad de aproximadamente 0,20 a aproximadamente 0,40 % (m/m). En varias realizaciones, el alfa-tocoferol está presente en una cantidad de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 0,35 % (m/m). En realizaciones concretas, el alfa-tocoferol está presente en una cantidad de aproximadamente 0,27 a aproximadamente 0,33 % (m/m).

En realizaciones típicas, la composición comprende no más de aproximadamente 0,1 ppm de carbamato de etilo. En algunas realizaciones, la composición comprende no más de 0,1 ppm de carbamato de etilo. En varias realizaciones, la composición comprende menos de 0,1 ppm de carbamato de etilo.

5.2.2 Realizaciones adicionales

En determinadas realizaciones adicionales, la composición comprende EPA en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de

todos los ácidos grasos en la composición, de al menos 45,0% (a/a). En determinadas realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 50,0 a aproximadamente 60,0 % (a/a). En varias realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 52,0 a aproximadamente 58,0 % (a/a). En algunas realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 55,0 % (a/a).

En determinadas realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 55,0 a aproximadamente 58,4 % (a/a). En varias realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 55,6 a aproximadamente 57,9 % (a/a). En algunas realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 56,7 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición comprende EPA en una cantidad, calculada como un porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 50,0 - 60,0 % (m/m). En determinadas realizaciones, el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 55 % (m/m).

En determinadas realizaciones adicionales, la composición comprende DHA en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 13,0 a aproximadamente 25,0% (a/a). En determinadas realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 15,0 a aproximadamente 23,0 % (a/a). En varias realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 17,0 a aproximadamente 21,0 % (a/a). En determinadas realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 19,0 a aproximadamente 20,0 % (a/a).

En determinadas realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 17,7 a aproximadamente 22,2 % (a/a). En varias realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 18,4 a aproximadamente 21,4 % (a/a). En determinadas realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 19,9 % (a/a).

En varias realizaciones, las composiciones comprenden DPA, calculada como un porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición, en una cantidad de aproximadamente 15,0 a 25,0 (m/m). En determinadas realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 20,0 % (m/m).

En varias realizaciones adicionales, la composición comprende EPA y DHA en una cantidad total, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 67,0 a aproximadamente 81,0 % (a/a). En determinadas realizaciones, la composición

comprende una cantidad total de EPA y DHA de aproximadamente 69,0 % a aproximadamente 79,0 % (a/a). En varias realizaciones, la composición comprende una cantidad total de EPA más DHA de aproximadamente 71,0 % a aproximadamente 77,0 % (a/a). En determinadas realizaciones, la composición comprende una cantidad
5 total de EPA +DHA de aproximadamente 74,0 a aproximadamente 75,0 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición comprende EPA+DHA en una cantidad total, calculada como un porcentaje en masa de todos los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 70,0 - 80,0 % (m/m). En determinadas realizaciones, la composición comprende aproximadamente 75,0 % (m/m) de EPA más DHA.

10 En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido α -linolénico (C18:3 N-3), el ácido α -linolénico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,07 a aproximadamente 1,10 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido alfa-linolénico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,24 a aproximadamente 0,91 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido alfa-linolénico está
15 presente en una cantidad de aproximadamente 0,40 a aproximadamente 0,80 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido alfa-linolénico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,50 a aproximadamente 0,600 % (a/a).

En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido moróctico (C18:4 N-3), el ácido moróctico está presente en una cantidad de
20 aproximadamente 0,01 a aproximadamente 7,90 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido moróctico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 6,40 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido moróctico está presente en una cantidad de aproximadamente 1,70% a aproximadamente 4,90 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido moróctico está presente en una cantidad de
25 aproximadamente 3,25 % (a/a).

En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,75 a aproximadamente 3,50 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad de aproximadamente 1,20 a
30 aproximadamente 3,00 % (a/a), en varias realizaciones, el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad de aproximadamente 1,60 a aproximadamente 2,60% (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad de aproximadamente 2,10 % (a/a).

En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido
35 eicosatrienoico (C20:4 n-3), el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad de

aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,40 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,30 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,22 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,12 % (a/a).

En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3), el ácido heneicosapentaenoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4,10 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3,20 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido heneicosapentaenoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,60 a aproximadamente 2,35 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico está presente en una cantidad de aproximadamente 1,50 % (a/a).

En varias realizaciones adicionales, el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,90 a aproximadamente 7,60 % (a/a). En diversas realizaciones, el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 2,00 a aproximadamente 6,50 % (a/a). En determinadas realizaciones, el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 3,10 a aproximadamente 5,40 % (a/a). En varias realizaciones, el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 4,25 % (a/a).

En varias realizaciones adicionales, el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 2,13 a aproximadamente 8,48 % (a/a). En determinadas realizaciones, el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 3,19 a aproximadamente 7,42 % (a/a). En algunas realizaciones, el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 4,25 a aproximadamente 6,37 % (a/a). En varias realizaciones, el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 5,31 % (a/a).

En diversas realizaciones, los ácidos grasos omega-3 totales comprenden de aproximadamente 80,0 a aproximadamente 95% (m/m) de todos los ácidos grasos en la composición farmacéutica.

En realizaciones adicionales que comprenden DGLA, el DGLA está presente en una cantidad calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 4,40 % (a/a). En algunas realizaciones, el DGLA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 3,30 % (a/a). En determinadas realizaciones, el DGLA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente

2,20 % (a/a). En algunas realizaciones, el DGLA está presente en una cantidad de aproximadamente 1,10 % (a/a).

En algunas realizaciones, el DGLA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,28 a aproximadamente 0,61 % (a/a). En determinadas realizaciones, el DGLA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,03 a aproximadamente 0,56 % (a/a). En algunas realizaciones, el DGLA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,44 % (a/a).

En realizaciones adicionales que comprenden AA, el AA está presente en una cantidad calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de todos los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 6,90 % (a/a). En varias realizaciones, el AA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 5,40 % (a/a). En determinadas realizaciones, el AA está presente en una cantidad de aproximadamente 0,70 a aproximadamente 3,80 % (a/a). En una serie de realizaciones, el AA está presente en una cantidad de aproximadamente 2,25 % (a/a).

En varias realizaciones, el AA está presente en una cantidad de aproximadamente 1,41 a aproximadamente 4,87 % (a/a). En determinadas realizaciones, el AA está presente en una cantidad de aproximadamente 1,99 a aproximadamente 4,30 % (a/a). En una serie de realizaciones, el AA está presente en una cantidad de aproximadamente 2,57 % a aproximadamente 3,72 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición comprende AA en una cantidad de no más de aproximadamente 4,5% (a/a). En algunas realizaciones, la composición comprende AA en una cantidad de no más de aproximadamente 3,14 % (a/a).

En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido linoleico (C18:2 n-6), el ácido linoleico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,25% a aproximadamente 1,30 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido linoleico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,40% a aproximadamente 1,20 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido linoleico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,60 % a aproximadamente 0,95 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido linoleico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,80 % (a/a).

En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), el ácido gamma-linolénico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,65 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido gamma-linolénico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,51 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido gamma-

linolénico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,15 a aproximadamente 0,40 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido gamma-linolénico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,27 % (a/a).

En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido eicosatrienoico (C20:2 n-6), el ácido eicosatrienoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,3 (a/a). En varias realizaciones, el ácido eicosadienoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,04 % a aproximadamente 0,24 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido eicosadienoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,09 a aproximadamente 0,20 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosadienoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,14 % (a/a).

En las realizaciones adicionales que comprenden adicionalmente ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), el ácido docosapentaenoico está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,95 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,05 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad de aproximadamente 0,056 a aproximadamente 0,71 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,48 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad de aproximadamente 0,24% (a/a).

En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 1,19 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad de aproximadamente 0,16 a aproximadamente 0,98 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) está presente en una cantidad de aproximadamente 0,57 % (a/a).

En realizaciones determinadas, la composición comprende no más de aproximadamente 10,0 % (a/a) de los ácidos grasos omega-6 totales.

La composición comprende, en realizaciones típicas entre estas realizaciones adicionales, no más de aproximadamente el 3,0% (a/a) de los ácidos grasos saturados, no más de aproximadamente el 5,0% (a/a) de los ácidos grasos monoinsaturados y no más de aproximadamente 0,1 pm de carbamato de etilo. En algunas realizaciones, la

composición comprende no más de 0,1 ppm de carbamato de etilo. En varias realizaciones, la composición comprende menos de 0,1 ppm de carbamato de etilo.

5.3. Formas de dosificación unitaria

5 En otro aspecto, la composición farmacéutica o nutracéutica de PUFA omega-3 enriquecidos con DPA en forma de ácido libre descritos en la Sección 5.2 anterior está envasada de forma útil en formas de dosificación unitaria para administración oral.

10 En realizaciones concretas, la forma de dosificación es una cápsula. En determinadas realizaciones, la forma de dosificación es una cápsula de gelatina. En realizaciones concretas, la cápsula de gelatina es una cápsula de gelatina dura. En otras realizaciones, la forma de dosificación es una cápsula de gelatina blanda.

En varias realizaciones, la cápsula comprende gelatina de tipo A. En algunas realizaciones, la cápsula comprende gelatina tanto de tipo A como de tipo B. Las fuentes de colágeno para la producción de gelatina de tipo A o de tipo B incluyen, entre otros, vacas, cerdos y peces.

15 En varias realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de un modo tal que la cápsula se disgrega en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37 °C tras almacenar durante al menos 3 meses a 40 °C. En determinadas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de un modo tal que la cápsula se disgrega en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37°C después de almacenar durante 6 meses a 40°C. En determinadas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de un modo tal que la cápsula se disgrega en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37°C después de almacenar durante 12 meses a 40°C

20

25

En varias realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de un modo tal que la cápsula se disgrega en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37°C tras almacenar durante al menos 3 meses a 30°C. En determinadas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de un modo tal que la cápsula se disgrega en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37°C después de almacenar durante 6 meses a 30°C. En determinadas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende suficiente gelatina de tipo A porcina de un modo tal que la cápsula se disgrega en un

30

periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37°C después de almacenar durante 12 meses a 30°C

En determinadas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda que comprende una mezcla de gelatina de tipo A porcina y una gelatina de tipo B. En varias de estas realizaciones, al menos un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 % incluso al menos aproximadamente 50% (p/p) de la gelatina es gelatina de tipo A porcina. En determinadas realizaciones, al menos aproximadamente un 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 % (p/p) de la gelatina es gelatina de tipo A porcina. En determinadas realizaciones, al menos un 80 %, 85 %, 90 %, incluso un 95 % (p/p) de la gelatina es gelatina de tipo A porcina.

En varias realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina blanda en la que la gelatina consiste esencialmente en gelatina de tipo A porcina.

En algunas realizaciones, la cápsula es una cápsula de gelatina reticulada reducida, como las descritas en la patente de EE.UU. N° 7.485.323, incorporado en el presente documento por referencia en su totalidad.

En determinadas realizaciones, la cápsula comprende gelatina succinilada.

En diversas realizaciones las cápsulas están formadas por sustancias que no son subproductos animales, tales como agar-agar, carragenina, pectina, konjak, goma guar, almidón alimentario, almidón de maíz modificado, almidón de patata y tapioca. Fuentes no animales de materiales que se pueden usar para preparar cápsulas útiles en las formas de dosificación unitaria orales descritas en el presente documento se describen en la publicación de patente de EE.UU. N° 2011/0117180, incorporada en el presente documento por referencia. En algunas realizaciones se usan cápsulas Vegicaps® (Catalent).

En determinadas realizaciones de la forma de dosificación unitaria oral capsular, la cápsula está sin recubrir.

En otras realizaciones de la forma de dosificación unitaria oral capsular, la cápsula está recubierta.

En determinadas realizaciones de cápsulas recubiertas, la composición de ácido graso se libera de un modo dependiente del tiempo. En varias realizaciones no existe una liberación sustancial de la composición de PUFA durante al menos 30 minutos después de la ingestión. En determinadas realizaciones no existe una liberación sustancial de la composición de PUFA durante al menos 30 minutos cuando la liberación se analiza *in vitro*. En determinadas realizaciones no más de aproximadamente un 20% de la composición de PUFA se libera en los primeros 30

minutos cuando se analiza *in vitro*. En realizaciones seleccionadas no más de aproximadamente un 25 %, 30 %, incluso no más de aproximadamente el 35% de la composición de PUFA se libera en los primeros 30 minutos cuando se analiza *in vitro*. En realizaciones concretas, las propiedades de liberación *in Vitro* se evalúan de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente provisional nº 61/749.124, presentada el 4 de enero de 2013, titulada “Método de análisis de la liberación de ácidos grasos poliinsaturados omega-3” de Bharat Mehta, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En realizaciones concretas, cantidades sustanciales de la composición de PUFA se liberan en aproximadamente 60 minutos después de la ingestión. En determinadas realizaciones, cantidades sustanciales de la composición de PUFA se liberan en aproximadamente 60 minutos cuando se analizan *in vitro*. En realizaciones seleccionadas, se libera al menos aproximadamente un 40% de la composición de PUFA en aproximadamente 60 minutos cuando se analizan *in vitro*. En varias realizaciones, se libera al menos aproximadamente un 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, incluso al menos aproximadamente el 65% de la composición de PUFA en aproximadamente 60 minutos cuando se analizan *in vitro*. En realizaciones concretas, las propiedades de liberación *in vitro* se evalúan de acuerdo con los procedimientos descritos en la solicitud de patente provisional nº 61/749.124, presentada el 4 de enero de 2013, titulada “Método de análisis de la liberación de ácidos grasos poliinsaturados omega-3” de Bharat Mehta, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

En determinadas realizaciones, las cápsulas se recubren como se describe en las patentes de EE.UU. Nº 5.792.795 y 5.948.818, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia. En varias realizaciones recubiertas, el recubrimiento es un copolímero de poli(etilacrilato-metacrilato). En algunas realizaciones, el recubrimiento es Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG), que tiene un peso molecular medio de aproximadamente 800.000.

En otras realizaciones de cápsulas recubiertas, la cápsula está recubierta con un recubrimiento entérico que protege la cápsula de la disolución o disgregación en el estómago pero sí se disuelve a valores de pH hallados en el intestino delgado.

En varias realizaciones, la forma de dosificación unitaria oral contiene de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 2.000 mg de la composición PUFA. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral contiene aproximadamente 250 mg de la composición PUFA. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral

contiene aproximadamente 500 mg de la composición PUFA. En determinadas realizaciones, la forma de dosificación oral contiene aproximadamente 750 mg de la composición PUFA. En algunas realizaciones, la forma de dosificación oral contiene aproximadamente 1.000 mg de la composición PUFA. En otras realizaciones, la forma de dosificación oral contiene aproximadamente 1.500 mg de la composición PUFA. En determinadas realizaciones, la forma de dosificación unitaria contiene cantidades en peso no integrales de la composición PUFA entre 100 mg y 2.000 mg.

5.4 Kits de dosificación

En otro aspecto, una pluralidad de formas de dosificación unitaria como se ha descrito anteriormente se puede envasar juntas en un kit de dosificación para aumentar la facilidad de uso y el cumplimiento del paciente.

En determinadas realizaciones, el kit de dosificación es un frasco. En otras realizaciones la pluralidad de las formas de dosificación se envasa en envases de tipo blíster, una pluralidad de los cuales puede envasarse opcionalmente juntos en una caja u otro acondicionamiento. Normalmente, estén en un frasco o en uno o más envases de tipo blíster, la pluralidad de formas de dosificación es suficiente durante 30 días, 60 días o 90 días de dosificación. Por tanto, en realizaciones seleccionadas, la forma de dosificación unitaria es una cápsula que contiene aproximadamente un gramo de la composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente y el kit de dosificación comprende 30, 60, 90, 120, 150, 180, 240, 270 o 300 de estas cápsulas.

En varias realizaciones, la pluralidad de formas de dosificación unitaria se envasa en un gas inerte, tal como nitrógeno o un gas noble, o se envasa al vacío.

5.5. Métodos de tratamiento

En otro aspecto se proporcionan métodos de tratamiento.

5.5.1. Tratamiento de la hipertrigliceridemia grave (> 500 mg/dl)

En una primera serie de realizaciones del tratamiento se proporcionan métodos de tratar la hipertrigliceridemia grave.

Los métodos comprenden administrar por vía oral la composición farmacéutica descrita en la sección 5.2 anterior a un paciente que tiene niveles de triglicéridos en suero o plasma previos al tratamiento ≥ 500 mg/dl, en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos por debajo de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones típicas, cada dosis de la composición farmacéutica se administra como una o como una pluralidad de las formas de dosificación unitaria descritas en la Sección 5.3 anteriormente.

En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente 5 %, 6 %, 7 %, 8 % o al menos aproximadamente 9% por debajo de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 % o 19 % por debajo de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones concretas, la composición se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente un 20 % por debajo de los niveles previos al tratamiento. En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, incluso al menos aproximadamente 50 % por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En una serie de realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente 50 mg/dl, 60 mg/dl, 70 mg/dl, 80 mg/dl, 90 mg/dl, incluso al menos aproximadamente 100 mg/dl. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente 110 mg/dl, 120 mg/dl, 130 mg/dl, 140 mg/dl, incluso al menos aproximadamente 150 mg/dl. En realizaciones específicas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente 160 mg/dl, 170 mg/dl, 180 mg/dl, incluso al menos aproximadamente 190 mg/dl o 200 mg/dl.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para disminuir los niveles de non-HDL-C en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, incluso al menos un 10% por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles de HDL-C en al menos aproximadamente un 1 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para aumentar los niveles de HDL-C en al menos

aproximadamente 2 %, 3 %, 4 %, incluso al menos un 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 % por encima de los niveles previos al tratamiento.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la proporción de colesterol total:HDL-C ("TC/HDL") en al menos aproximadamente un 1 % por debajo de los niveles previos al tratamiento. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir la proporción TC/HDL en al menos aproximadamente 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, incluso al menos aproximadamente un 9% o al menos aproximadamente un 10% por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para disminuir los niveles de VLDL-C en al menos aproximadamente 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 % o al menos aproximadamente 10% por debajo de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para disminuir los niveles de VLDL-C en al menos aproximadamente 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, o incluso al menos aproximadamente 18 %, 19 %, o 20 % por debajo de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones concretas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para disminuir los niveles de VLDL-C en al menos aproximadamente 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, incluso al menos aproximadamente 25 % por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En diversas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para disminuir los niveles de ApoCIII. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para disminuir los niveles de ApoCIII en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, o incluso al menos aproximadamente 8 %, 9 %, o 10 % por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos un 100 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos aproximadamente 200 %, 250 %, 300 %, incluso al menos un 350 %, 400 %, 450 %, o al menos aproximadamente un 500 % por encima de los niveles previos al tratamiento.

En realizaciones seleccionadas, la composición farmacéutica se administra durante un tiempo y en una cantidad eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos aproximadamente 550 %, 600 %, 650 %, incluso al menos aproximadamente un 700 %, por encima de los niveles previos al tratamiento.

- 5 En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DHA en al menos aproximadamente un 50 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones concretas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DHA en al menos
- 10 aproximadamente 55 %, 60 %, 65 %, 70%, incluso al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 % o 90% por encima de los niveles previos al tratamiento.

- En una serie de realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente un 50 % por encima de los niveles previos al tratamiento.
- 15 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente 55 %, 60 %, 65 %, 70%, 75 %, incluso al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90%, 95 % o 100 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones seleccionadas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad
- 20 y durante un tiempo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente 110 %, 120 %, incluso al menos aproximadamente un 125 %, por encima de los niveles previos al tratamiento.

- En una serie de realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido
- 25 araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente un 5 % por debajo de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, incluso al menos aproximadamente un 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, incluso al menos aproximadamente un 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, o
- 30 21 %, 22 %, 23 %, 24 % incluso al menos aproximadamente un 25% por debajo de los niveles previos al tratamiento.

- En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido
- 35 araquidónico en plasma en plasma en al menos aproximadamente 25 µg/ml.. En algunas

realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles de AA en plasma en al menos aproximadamente 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 65 µg/ml, incluso al menos aproximadamente 70 µg/ml, 75 µg/ml, 80µg/ml, 85 µg/ml, 90 µg/ml, incluso al menos
5 aproximadamente 95 µg/ml o 100 µg/ml.

En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz es de al menos aproximadamente 2g al día. En varias realizaciones, la cantidad eficaz es de al menos aproximadamente 3g al día. En realizaciones concretas, la cantidad eficaz es de al menos aproximadamente 4g al día. En realizaciones típicas, la cantidad eficaz es de
10 aproximadamente 2g al día. En determinadas realizaciones, la cantidad eficaz es de aproximadamente 4g al día.

En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se administra durante al menos 30 días. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra durante al menos 60 días. En realizaciones concretas, la composición
15 farmacéutica se administra durante al menos 90 días, 120 días, 180 días, 240 días o al menos 360 días. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra de forma indefinida.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra diariamente. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra en días alternos.

20 En realizaciones concretas, la dosis diaria de la composición farmacéutica se administra en una única dosis diaria. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra en dosis divididas, con la dosis diaria dividida en dos administraciones, tres administraciones o incluso cuatro administraciones durante el transcurso del día.

25 En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra con alimentos. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra con una comida pobre en grasas. En otras realizaciones, la composición farmacéutica se administra sin alimentos. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en ayunas.

30 Los métodos en determinadas realizaciones, que además comprenden administrar una estatina. En realizaciones concretas, la estatina se selecciona del grupo que consiste en: pravastatina, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina, tenivastatina y pitavastatina.

5.5.2. Tratamiento de la hipertrigliceridemia 200 - 500 mg/dl)

En otra serie de realizaciones del tratamiento se proporcionan métodos de tratar a los pacientes que tienen niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos previos al tratamiento de aproximadamente 200 mg/dl a aproximadamente 500 mg/dl. En determinadas realizaciones, los pacientes ya están en tratamiento con estatinas; en estos

5 pacientes, los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos previos al tratamiento son aquellos medidos durante el tratamiento con estatinas, antes de la administración de las composiciones farmacéuticas descritas en la Sección 5.2 anteriormente.

El método comprende administrar por vía oral una cantidad eficaz de una estatina y administrar después la composición farmacéutica descrita en la Sección 5.2 en

10 el presente documento, por vía oral, en una cantidad y durante un periodo suficiente para disminuir los niveles séricos y plasmáticos de triglicéridos por debajo de los niveles medidos antes del tratamiento con la composición farmacéutica descrita en el presente documento. La composición farmacéutica descrita en la Sección 5.2 y la estatina no se tienen que administrar al mismo tiempo, con el mismo régimen de

15 dosificación, ni siquiera los mismos días. Basta con que las dos se administren con una proximidad temporal suficiente para que el paciente reciba el beneficio terapéutico de ambas de forma concurrente.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en la Sección 5.2 se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir

20 los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente un 5 % por debajo de los niveles previos al tratamiento. En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos en al menos aproximadamente un 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, incluso al menos

25 aproximadamente un 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o al menos aproximadamente un 20 % por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica descrita en la Sección 5.2 en el presente documento se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles de non-HDL- colesterol en al menos aproximadamente un 1 %,

30 al menos aproximadamente un 2%, al menos aproximadamente un 3 %, 4 %, 5 %, incluso al menos aproximadamente un 7 %, 8 %, 9% o al menos aproximadamente un 10% por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En una serie de realizaciones, la composición farmacéutica descrita en la Sección 5.2 en el presente documento se administra en una cantidad y durante un

periodo suficiente para aumentar los niveles de HDL-C en al menos aproximadamente un 1 %, 2 %, 3 % o más por encima de los niveles previos al tratamiento.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos un 100 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos aproximadamente 200 %, 250 %, 300 %, incluso al menos un 350 %, 400 %, 450 %, o al menos aproximadamente un 500 % por encima de los niveles previos al tratamiento.

En realizaciones seleccionadas, la composición farmacéutica se administra durante un tiempo y en una cantidad eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos aproximadamente 550 %, 600 %, 650 %, incluso al menos aproximadamente un 700 %, por encima de los niveles previos al tratamiento.

En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DHA en al menos aproximadamente un 50 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones concretas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DHA en al menos aproximadamente 55 %, 60 %, 65 %, 70%, incluso al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 % o 90% por encima de los niveles previos al tratamiento.

En una serie de realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente un 50 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente 55 %, 60 %, 65 %, 70%, 75 %, incluso al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90%, 95 % o 100 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones seleccionadas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un tiempo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente 110 %, 120 %, incluso al menos aproximadamente un 125 %, por encima de los niveles previos al tratamiento.

En una serie de realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente un 5 % por debajo de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición

farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, incluso al menos aproximadamente un 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, incluso al menos aproximadamente un 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, o
 5 21 %, 22 %, 23 %, 24 % incluso al menos aproximadamente un 25% por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico en plasma en plasma en al menos aproximadamente 25 µg/ml. En algunas
 10 realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles de AA en plasma en al menos aproximadamente 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 65 µg/ml, incluso al menos aproximadamente 70 µg/ml, 75 µg/ml, 80µg/ml, 85 µg/ml, 90 µg/ml, incluso al menos aproximadamente 95 µg/ml o 100 µg/ml.

15 En varias realizaciones, la composición farmacéutica descrita en la Sección 5.2 en el presente documento se administra en formas de dosificación unitaria como se describe en la Sección 5.3 anteriormente.

En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 1 g al día. En algunas realizaciones, la
 20 composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 2 g/día. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 3 g/día. En realizaciones concretas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 4 g al día. En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se administra en una
 25 cantidad de al menos aproximadamente 2 g al día. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de aproximadamente 3g al día o aproximadamente 4 g al día.

5.5.3. Tratamiento para incrementar las proporciones en plasma de EPA:AA

30 También se proporcionan métodos para aumentar la proporción EPA:AA sin considerar los niveles plasmáticos de triglicéridos del paciente previos al tratamiento. Los métodos comprenden administrar la composición farmacéutica descrita en la Sección 5.2 en el presente documento a un paciente que tiene una proporción EPA:AA por debajo de aproximadamente 0,25, en una cantidad y durante un periodo suficiente
 35 para aumentar la proporción EPA:AA del paciente a al menos aproximadamente 0,25.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para aumentar la proporción EPA:AA del paciente a al menos aproximadamente 0,3, al menos aproximadamente 0,35, al menos aproximadamente 0,40, al menos aproximadamente 0,45, al menos aproximadamente 0,50, incluso hasta un nivel de al menos aproximadamente 0,55, 0,60, 0,61, 0,62, 0,63, 0,64 o 0,65

En determinadas realizaciones, el método comprende administrar la composición farmacéutica en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos un 100 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos aproximadamente 200 %, 250 %, 300 %, incluso al menos un 350 %, 400 %, 450 %, o al menos aproximadamente un 500 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones seleccionadas, la composición farmacéutica se administra durante un tiempo y en una cantidad eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de EPA en al menos aproximadamente 550 %, 600 %, 650 %, incluso al menos aproximadamente un 700 %, por encima de los niveles previos al tratamiento.

En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DHA en al menos aproximadamente un 50 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones concretas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DHA en al menos aproximadamente 55 %, 60 %, 65 %, 70%, incluso al menos aproximadamente un 75 %, 80 %, 85 % o 90% por encima de los niveles previos al tratamiento.

En una serie de realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente un 50 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente 55 %, 60 %, 65 %, 70%, 75 %, incluso al menos aproximadamente un 80 %, 85 %, 90%, 95 % o 100 % por encima de los niveles previos al tratamiento. En realizaciones seleccionadas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un tiempo eficaz para aumentar los niveles plasmáticos de DPA en al menos aproximadamente 110 %, 120 %, incluso al menos aproximadamente un 125 %, por encima de los niveles previos al tratamiento.

En una serie de realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente un 5 % por debajo de los niveles previos al tratamiento. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, incluso al menos aproximadamente un 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, incluso al menos aproximadamente un 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, o 21 %, 22 %, 23 %, 24 % incluso al menos aproximadamente un 25% por debajo de los niveles previos al tratamiento.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico en plasma en plasma en al menos aproximadamente 25 µg/ml. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles de AA en plasma en al menos aproximadamente 50 µg/ml, 55 µg/ml, 60 µg/ml, 65 µg/ml, incluso al menos aproximadamente 70 µg/ml, 75 µg/ml, 80µg/ml, 85 µg/ml, 90 µg/ml, incluso al menos aproximadamente 95 µg/ml o 100 µg/ml.

En varias realizaciones, la composición farmacéutica descrita en la Sección 5.2 en el presente documento se administra en formas de dosificación unitaria como se describe en la Sección 5.3 anteriormente.

En varias realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 1 g al día. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 2 g/día. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 3 g/día. En realizaciones concretas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 4 g al día. En realizaciones típicas, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de al menos aproximadamente 2 g al día. En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad de aproximadamente 3g al día o aproximadamente 4 g al día.

5.5.4. Tratamiento para disminuir los niveles séricos o plasmáticos de ApoCIII

También se proporcionan métodos para aumentar los niveles séricos y plasmáticos de ApoCIII, sin considerar los niveles plasmáticos de triglicéridos del

paciente previos al tratamiento. Los métodos comprenden administrar por vía oral la composición farmacéutica descrita en la sección 5.2 en el presente documento a un paciente que necesite niveles menores de ApoCIII, en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles séricos o plasmáticos de ApoCIII del paciente. En realizaciones típicas, el paciente está en riesgo de cardiopatía cardiovascular.

En determinadas realizaciones, la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo suficiente para disminuir los niveles de ApoCIII en al menos aproximadamente 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, o incluso al menos aproximadamente 8 %, 9 %, o 10 % por debajo de los niveles previos al tratamiento.

10 **5.5.5. Otros métodos de tratamiento**

En otro aspecto, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento se usan para tratar otros trastornos, incluyendo uno o más de esteatohepatitis no alcohólica (NASH), hiperlipoproteinemia, incluida la hiperlipoproteinemia de tipo III y el síndrome metabólico.

15 En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica se usa para reducir la resistencia a los inhibidores de la agregación plaquetaria, tales como Plavix, incluido el uso en los métodos descritos en la solicitud de patente de EE.UU. n° 13 13/620.312, cuya divulgación se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

5.6. Procedimiento

20 En otro aspecto se presenta un procedimiento mejorado para refinar aceite de pescado en composiciones farmacéuticas que comprenden PUFA en forma de ácido libre y, en particular, para refinar aceite de pescado en las composiciones farmacéuticas descritas en la Sección 5.2 en el presente documento.

5.6.1. Preparación de la materia intermedia

25 La materia intermedia se prepara mediante transesterificación del aceite corporal obtenido de peces, por ejemplo peces de las familias Engraulidae, Clupeidae y Scombridae, mediante técnicas estándar bien conocidas en la técnica, con los parámetros del procedimiento ajustados para alcanzar una composición que entra dentro de las tolerancias descritas en la sección 5.6.2 indicada inmediatamente después.

30 Las etapas del procedimiento estándar adecuadas se describen en, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 5.656.667; 5.719.302; 5.945.318; 6.204.401; 6.518.049; 6.528.669; 7.491.522; 7.550.613; 7.678.930; 7.718.698; 7.732.488 y en las patentes de EE.UU. N° Nos. 5.472.705; 5.750.572; 5.776.978; 5.869.714; 7.541.480; 7.553.870; y 7.619.002, que se incorporan en el presente documento por referencia.

En un procedimiento de ejemplo se extrae de un pez un aceite de triglicéridos bruto, tal como anchoas, sardinas, caballa y sábalo. El aceite de triglicéridos bruto se refina con álcali, por ejemplo usando hidróxido sódico, y se desodoriza, pule y seca. Después, los PUFA se convierten en ésteres, tales como ésteres de metilo o ésteres de etilo, mediante transesterificación. La transesterificación se puede realizar mediante, por ejemplo, etanolisis en presencia de etanol y etóxido sódico para producir ésteres de etilo. A la transesterificación le sigue al menos una ronda, normalmente una pluralidad de rondas, de destilación.

En otro procedimiento de ejemplo, el aceite de triglicéridos se refina con álcali y se desodoriza, se transesterifica con etanol, como, por ejemplo, mediante etanolisis, en presencia de etanol y epóxido sódico, y después se somete a una o más rondas de destilación fraccional.

La FIG.2 presenta un diagrama de flujo de un proceso de ejemplo para producir la materia intermedia. En este procedimiento, los peces se cocinan en agua y la mezcla resultante de líquidos y sólidos se filtra y la porción líquida se centrifuga para eliminar la fase acuosa. La fracción oleosa restante de la etapa precedente se trata con álcali para neutralizar cualquier ácido graso libre presente, seguido de lavado con agua. Después, el aceite de pescado refinado con álcali en forma de triglicérido se desodoriza y los contaminantes ambientales se reducen mediante, por ejemplo, destilación. El aceite de pescado desodorizado seco se convierte en la forma de éster de etilo usando reacción con etanol, se cataliza mediante el uso de etóxido sódico. Después de finalizar la reacción, el exceso de etanol se elimina mediante destilación y los ésteres de etilo se lavan con una solución de ácido cítrico y después con agua. En este procedimiento de ejemplo, los ésteres de etilo se destilan para alcanzar la concentración requerida de éster de etilo de EPA (EPA-EE) y éster de etilo de DHA (DHA-EE) para usar como materia intermedia. En algunas realizaciones se realizan múltiples rondas de destilación. Las condiciones exactas usadas se ajustan dependiendo de la composición de la composición de éster de etilo de entrada con el fin de alcanzar la concentración requerida de EPA-EE y DHA-EE para la materia intermedia, como se detalla en la sección 5.6.2 inmediatamente a continuación.

Alternativas a estas etapas de procedimiento son bien conocidas y se pueden usar según sea adecuado siempre que la composición de la materia intermedia resultante entre dentro de las tolerancias definidas en la sección 5.6.2 inmediatamente a continuación.

5.6.2. Composición de la materia intermedia

5.6.2.1. Realizaciones típicas

La composición de la materia intermedia comprende una pluralidad de especies de PUFA omega-3, cada una presente sustancialmente en forma de un éster de etilo.

5 La composición de la materia intermedia comprende EPA, DHA y DPA, , cada una presente sustancialmente en forma de un éster de etilo.

En varias realizaciones, la composición de la materia intermedia comprende éster de etilo de EPA ((EPA-EE), DHA-EE y DPA-EE, en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de CG de todos los ésteres de etilo de
10 ácidos grasos en la composición, que entran dentro del intervalo de -3SD a +3 SD de las medias, respectivamente, citadas en la Tabla 9. En determinadas realizaciones, cada uno de EPA-EE, DHA-EE y DPA-EE entra dentro de -2SD a +2 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, cada uno de EPA-EE, DHA-EE y DPA-EE entra dentro de -1SD a +1 SD de la media citada respectivamente. En
15 determinadas realizaciones, la composición de la materia intermedia comprende EPA-EE, DHA-EE y DPA-EE dentro del intervalo fijado por sus respectivos porcentajes del área mínimos y máximos entre los lotes descritos en la Tabla 8.

En determinadas realizaciones, la composición comprende uno o más ácidos grasos poliinsaturados omega-3, cada uno sustancialmente en forma del éster de etilo,
20 seleccionados del grupo que consiste en: ácido α -linolénico (C18:3 n-3), ácido moróctico (C18:4 n-3, ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3) y ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3). En varias realizaciones, la una o más especies de omega-3-EE, si está presente, está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de CG de todos los ésteres de etilo de
25 ácidos grasos en la composición, que entran dentro del intervalo de -3SD a +3 SD de las medias, respectivamente, citadas en la Tabla 9. En determinadas realizaciones, cada especie entra dentro de -2SD a +2 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, cada especie entra dentro de -1SD a +1 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, la una o más especies de omega-
30 3-EE, si está presente, está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de CG de todos los ésteres de etilo de ácidos grasos en la composición, que entran dentro del intervalo fijado por sus respectivos porcentajes del área mínimos y máximos entre los descritos en la Tabla 8.

En determinadas realizaciones, la composición de la materia intermedia también
35 comprende al menos una especie de PUFA omega-6. En diversas realizaciones, la

composición comprende ésteres de etilo de uno o más ácidos grasos poliinsaturados omega-6 seleccionadas del grupo que consiste en: ácido linolénico (C18:2 n6), ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), ácido eicosadienoico (C20:2 n6), ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6) ("DGLA"), ácido araquidónico (C20:4 n-6) ("AA") y
 5 ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6). Cada especie de PUFA omega-6 está presente sustancialmente en forma de éster de etilo.

En varias realizaciones, la una o más especies de omega-6-EE, si está presente, está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de CG de todos los ésteres de etilo de ácidos grasos en la composición,
 10 que entran dentro del intervalo de -3SD a +3 SD de las medias, respectivamente, citadas en la Tabla 9. En determinadas realizaciones, cada especie entra dentro de -2SD a +2 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, cada especie entra dentro de -1SD a +1 SD de la media citada respectivamente. En determinadas realizaciones, la una o más especies de omega-3-EE, si está presente, está presente en
 15 una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de CG de todos los ésteres de etilo de ácidos grasos en la composición, que entran dentro del intervalo fijado por sus respectivos porcentajes del área mínimos y máximos entre los descritos en la Tabla 8.

5.6.2.2. Realizaciones adicionales

En varias realizaciones adicionales, la composición de la materia intermedia comprende éster de etilo de EPA (EPA-EE) en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de todos los ésteres de etilo de los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 45,0% a aproximadamente 53,0% (a/a). En determinadas realizaciones, el EPA-EE está presente en una cantidad de
 20 aproximadamente 48,40 a aproximadamente 50,04 % (a/a). En varias realizaciones, el EPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 48,67 a aproximadamente 49,77 % (a/a). En algunas realizaciones, la composición de la materia intermedia comprende EPA-EE en una cantidad de aproximadamente 48,95 % a aproximadamente 49,49 % (a/a). En determinadas realizaciones, la composición de la materia intermedia
 25 comprende EPA-EE en una cantidad de aproximadamente 49,22 % (a/a).

En varias realizaciones, el EPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 44,20 % (a/a) a aproximadamente 46,92 % (a/a). En algunas realizaciones, el EPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 45,56 % (a/a).

En varias realizaciones, el EPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 425 - 460 mg/g.

En varias realizaciones adicionales, la composición de la materia intermedia comprende éster de etilo de DHA (DHA-EE) en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de todos los ésteres de etilo de los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 13,0 a aproximadamente 20,0 % (a/a). En varias realizaciones, el DHA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 16,43 a aproximadamente 18,28 % (a/a). En varias realizaciones, la materia comprende DHA-EE en una cantidad de aproximadamente 16,74 % a aproximadamente 17,98 % (a/a). En algunas realizaciones, la composición de la materia intermedia comprende DHA-EE en una cantidad de aproximadamente 17,05 % a aproximadamente 17,67 % (a/a). En determinadas realizaciones, la materia intermedia comprende DHA-EE en aproximadamente 17,4 % (a/a).

En algunas realizaciones, la materia intermedia comprende DHA en una cantidad de aproximadamente 14,77 % (a/a) a aproximadamente 17,87 % (a/a). En algunas realizaciones, la materia intermedia comprende DHA en una cantidad de aproximadamente 16,32 % (a/a).

En algunas realizaciones, la materia intermedia comprende DHA en una cantidad de 150 - 170 mg/g.

En varias realizaciones adicionales, el DPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 4,10 a aproximadamente 6,74 % (a/a). En algunas realizaciones, el DPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 4,54 a aproximadamente 6,30 % (a/a). En varias realizaciones, el DPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 4,98 a aproximadamente 5,86 % (a/a). En determinadas realizaciones, el DPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 5,42 % (a/a).

En varias realizaciones, el DPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,41 a aproximadamente 0,70 % (a/a). En determinadas realizaciones, el DPA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,56 % (a/a).

En varias realizaciones, la composición de la materia intermedia también comprende el éster de etilo de ácido araquidónico (C20:4 n-6). En varias realizaciones, el AA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,72 a aproximadamente 2,81 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,9 a aproximadamente 2,63 % (a/a). En varias realizaciones adicionales, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad de

aproximadamente 2,09 a aproximadamente 2,45 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 2,27 % (a/a).

En determinadas realizaciones, el ácido araquidónico-EE está presente en una cantidad de no más de 3,0 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido araquidónico-EE
5 está presente en una cantidad de no más de 4,0 % (a/a).

En dichas realizaciones de la materia intermedia que comprende además éster etílico de ácido α -linolénico, un EE de ácido α -linolénico está presente, en determinadas realizaciones en una cantidad de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 0,45 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido alfa-linolénico-EE
10 está presente en una cantidad de aproximadamente 0,4 % (a/a).

En algunas realizaciones, el ácido α -linolénico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,24 % (a/a) – 0,62% (a/a).

En algunas realizaciones, el ácido alfa-linolénico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,43 % (a/a).

En determinadas de dichas realizaciones de la materia intermedia que comprenden además éster etílico de ácido moróctico (C18:4 n-3), el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad, calculada como un porcentaje por área en el cromatograma de GC de todos los ésteres de etilo de los ácidos grasos en la composición, de aproximadamente 0,60 - aproximadamente 2,03 % (a/a). En algunas
15 realizaciones, el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,84 a aproximadamente 1,80 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,10 a aproximadamente 1,60 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,32 % (a/a).
20

En varias realizaciones, el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,64% a aproximadamente 1,93 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido moróctico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,28 % (a/a).
25

En diversas de dichas realizaciones de la materia intermedia que comprende adicionalmente éster etílico del ácido eicosatrienoico (C20:3 n-3), el ácido eicosatrienoico-EE está presente en una cantidad de menos de aproximadamente 0,1 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatrienoico-EE está presente en una cantidad de menos de aproximadamente 0,4 % (a/a).
30

En realizaciones de la materia intermedia que comprende además éster etílico de ácido eicosatetraenoico (C20:4 n-3), ácido eicosatetraenoico-EE está presente, en determinadas realizaciones, en una cantidad de aproximadamente 1,57 a
35

aproximadamente 2,10 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,66 a aproximadamente 2,02 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,75 a aproximadamente 1,93 % (a/a). En realizaciones
5 específicas, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,84 % (a/a).

En determinadas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,42 a aproximadamente 2,49 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido eicosatetraenoico-EE está presente en una cantidad de
10 aproximadamente 1,95 % (a/a).

En diversas realizaciones de la materia intermedia que comprende adicionalmente éster etílico del ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3), el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 2,25 a aproximadamente 2,36% (a/a). En varias realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico-
15 EE está presente en una cantidad de aproximadamente 2,27 a aproximadamente 2,34 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 2,29 a aproximadamente 2,32 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 2,31 % (a/a).

20 En algunas realizaciones, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,42 a aproximadamente 2,76 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido heneicosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 2,09 % (a/a).

En una serie de realizaciones de la materia intermedia que comprende adicionalmente éster etílico del PUFA omega-6, ácido linoleico (C18:2 n-6), el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,53 a aproximadamente 0,56 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,53 a aproximadamente 0,55 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad de
25 aproximadamente 0,54 a aproximadamente 0,55 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,54 % (a/a).
30

En algunas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,38 a aproximadamente 0,83 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido linoleico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,60 % (a/a).

En realizaciones de la materia intermedia que comprende adicionalmente el éster etílico del ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), el ácido gamma-linolénico-EE está presente, en realizaciones de ejemplo, en una cantidad de menos de 0,1 % (a/a). En realizaciones de la materia intermedia que comprende adicionalmente el éster etílico del ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6), el ácido gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad de menos de 0,4 % (a/a).

En realizaciones de la materia intermedia que comprende además éster etílico de ácido eicosadienoico (C20:2 n-6), el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,00 a aproximadamente 0,63 % (a/a) en varias realizaciones de ejemplo. En algunas realizaciones, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,00 a aproximadamente 0,45 % (a/a). En determinadas realizaciones, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,00 a aproximadamente 0,27 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,09 % (a/a).

En determinadas realizaciones, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,00 a aproximadamente 0,54 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido eicosadienoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,25 % (a/a).

En una pluralidad de realizaciones de la materia intermedia que comprende adicionalmente éster etílico del ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6), el DGLA-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,35 a aproximadamente 0,68 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido dihomo-gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,41 a aproximadamente 0,63 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido dihomo-gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,46 a aproximadamente 0,57 % (a/a).

En algunas realizaciones, el ácido dihomo-gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,26 a aproximadamente 0,55 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido dihomo-gamma-linolénico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,40 % (a/a).

Determinadas realizaciones adicionales de la materia intermedia comprenden adicionalmente ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) en forma del éster etílico. En varias de estas realizaciones, el ácido docosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,54 a aproximadamente 0,80 % (a/a). En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de

aproximadamente 0,59 a aproximadamente 0,76 % (a/a). En varias realizaciones, el ácido docosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,63 % a aproximadamente 0,72 % (a/a). En realizaciones concretas, el ácido docosapentaenoico-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 0,67 % (a/a).

5 En algunas realizaciones, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6)-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 1,45 a aproximadamente 7,21 % (a/a). En algunas realizaciones concretas, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6)-EE está presente en una cantidad de aproximadamente 4,33 % (a/a).

5.6.3. Formación de complejos de urea

10 La materia transesterificada intermedia que tiene una composición como se ha definido anteriormente se somete a formación de complejos de inclusión de urea. En realizaciones típicas, la cantidad de urea usada para la formación de complejos entra dentro de un intervalo determinado por medio de un algoritmo.

Por tanto, en otro aspecto se presenta un procedimiento mejorado para refinar
15 aceite de pescado en composiciones farmacéuticas que comprenden PUFA en forma de ácido libre, en particular para refinar aceite de pescado en las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento. La mejora comprende someter una materia intermedia del aceite de pescado transesterificado que comprende los ésteres de etilo de varias especies de PUFA omega-3 y omega-6 en intervalos de porcentajes
20 definidos a una etapa de formación de complejos de inclusión, en el que la cantidad de urea usada para la formación de complejos está dentro del intervalo calculado de acuerdo con (i) fórmula 1 (a) o (ii) de acuerdo con la fórmula 1 (b) o (iii) de acuerdo con la fórmula 1(a) y la fórmula 1 (b) con la cantidad de urea fijada en un valor dentro del intervalo fijado por, e incluidos, los resultados de las fórmulas 1(a) y 1(b), tal como
25 una media del mismo, en el que las fórmulas son las siguientes:

$$[\text{Urea}] = F_{\text{enriquecimiento-DHA}} * ((\text{DHA}_{\text{diana}} - \text{DHA-EE}_{\text{entrada}}) / \text{DHA-EE}_{\text{entrada}})) \quad (1a)$$

$$[\text{Urea}] = F_{\text{enriquecimiento-EPA}} * ((\text{EPA}_{\text{diana}} - \text{EPA-EE}_{\text{entrada}}) / \text{EPA-EE}_{\text{entrada}})) \quad (1b).$$

Los valores diana de DHA y EPA se seleccionan en base a la composición final deseada. Los factores de enriquecimiento, $F_{\text{enriquecimiento-DHA}}$ y $F_{\text{enriquecimiento-EPA}}$
30 pueden ser iguales o diferentes. En una realización típica, $F_{\text{enriquecimiento-DHA}}$ y $F_{\text{enriquecimiento-EPA}}$ son iguales, con un valor de aproximadamente 100/0,34 o aproximadamente 300.

El uso de la cantidad de urea determinada por un algoritmo, la formación de complejos se realiza de acuerdo con técnicas estándar. Véase, por ejemplo, las patentes
35 de EE.UU. N° 4.377.526, 5.106.542, 5.243.046; 5.679.809, 5.945.318, 6.528.669,

6.664.405, 7.541.480, 7.709.668 y 8.003.813, cuyas divulgaciones se incorporan en el presente documento por referencia.

En una realización de ejemplo, la materia intermedia se mezcla con una solución de urea en etanol. La formación de complejos se lleva a cabo a 60° C - 80° C, la mezcla se enfría y, después, la mezcla se filtra o se centrifuga para eliminar los complejos de urea. El etanol se elimina mediante destilación y el aceite se lava varias veces con agua.

5.6.4. Acabado tras la formación de complejos

Tras la eliminación de los complejos de urea, los ésteres de PUFA que no están en forma de complejos se hidrolizan en ácidos grasos libres mediante técnicas estándar. La composición se purifica adicionalmente mediante destilación, antes o después de la hidrólisis, y se termina además usando una o más de las siguientes técnicas estándar: tratamiento con carbono activo, purificación cromatográfica, eliminación del disolvente, blanqueamiento, por ejemplo con tierra de blanqueo, y extracción supercrítica. Se añaden antioxidantes, tales como BHA o α -tocoferol.

6. Ejemplos

6.1. Ejemplo 1: Es necesaria la formación de complejos de urea para una producción fiable de composiciones de PUFA omega-3 en forma de ácido libre que cumpla los requisitos de la especificación

La formación de complejos de inclusión de urea (clatración) es una etapa estándar a menudo usada en el refinado de aceites de pescado para eliminar los ácidos grasos de cadena larga saturados y monoinsaturados, de modo que enriquece en ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga deseados en la composición resultante. No obstante, a pesar del uso prolongado (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 4.377.526) y los estudios diseñados para caracterizar los efectos de varios parámetros fisicoquímicos en el procedimiento (véase, por ejemplo, Hayes et al, "Triangular Phase Diagrams To Predict The Fractionation Of Free Fatty Acid Mixtures Via Urea Complex Formation," Separation Sci. Technol. 36(1):45- 58 (2001) y Hayes, "Purification of Free Fatty Acids via Urea Inclusion Compounds," en Handbook of Functional Lipids (Taylor & Francis Group) (2005)), el grado hasta el cual la formación de complejos de urea enriquece las especies individuales de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, incluyendo especies de PUFA omega-3 y PUFA omega-6, permanece impredecible. Esta impredecibilidad residual en el procedimiento de formación de complejos de urea acoplada al potencial para generar niveles altos no permisibles de carbamato de etilo, lo que obligaría a un procesamiento adicional, militó inicialmente a favor de omitir la

formación de complejos de urea del proceso de refinado a escala comercial para usar para la producción de composiciones de calidad farmacéutica de PUFA omega-3 en forma de ácido libre, cumpliendo las especificaciones expuestas en la Tabla 1 a continuación.

5

Tabla 1 Especificaciones iniciales de la diana	
Parámetro (todas las especies estarán presentes como el ácido libre)	Límite de especificación
EPA	50,0 - 60,0% (m/m)
DHA	15,0 - 25,0% (m/m)
EPA + DHA	70,0 - 80,0% (m/m)
Ácidos grasos omega-3 totales	80,0 - 90,0% (m/m)
Ácido araquidónico	nmq 4,5% (a/a)
Ácidos grasos saturados	nmq 3,0% (a/a)
Ácidos grasos monoinsaturados	nmq 5,0% (a/a)
Ácidos grasos omega-6	nmq 10,0% (a/a)
Otros ácidos grasos insaturados	nmq 5,0% (a/a)
Total de los no identificados anteriormente 0,1%	nmq 2,0% (a/a)

"(m/m)" -- porcentaje, en peso, de todos los ácidos grasos en la composición

"(a/a)" -- porcentaje por área en el cromatograma de gases de todos los ácidos grasos en la composición

"nmq" -- "no más que".

10

No obstante, los primeros esfuerzos para desarrollar un procedimiento sin urea demostraron que dichos procedimientos no podían producir de forma composiciones farmacéuticas a escala comercial que cumplieran la especificación de la composición diana requerida. En la Tabla 2, a continuación, se presentan datos de estos dos lotes. Los valores que se salen del intervalo de la especificación deseado están subrayados.

15

Tabla 2					
Parámetro (todas las especies estarán presentes como el ácido libre)	Límite de especificación	Lote 1 (no acondicionado para el invierno)		Lote 2 (acondicionado para el invierno)	
		(m/m)	(a/a)	(m/m)	(a/a)
EPA	50,0 - 60,0% (m/m)	<u>49,0</u>	51,5	<u>49,8</u>	53,0

Tabla 2					
		Lote 1 (no acondicionado para el invierno)		Lote 2 (acondicionado para el invierno)	
Parámetro (todas las especies estarán presentes como el ácido libre)	Límite de especificación	(m/m)	(a/a)	(m/m)	(a/a)
DHA	15,0 - 25,0% (m/m)	19,6	20,3	19,6	20,9
EPA + DHA	70,0 - 80,0% (m/m)	<u>68,3</u>	71,8	<u>69,4</u>	73,9
Ácidos grasos omega-3 totales	80,0 - 90,0% (m/m)	<u>78,0</u>	81,2	<u>79,3</u>	83,7
Ácido araquidónico	nmq 4,5% (a/a)	2,8	2,8	2,9	2,8
Ácidos grasos saturados	nmq 3,0% (a/a)	1,9	2,6	0,6	0,5
Ácidos grasos monoinsaturados	nmq 5,0% (a/a)	<u>6,6</u>	5,1	<u>6,7</u>	5,1
Ácidos grasos omega-6	nmq 10,0% (a/a)	4,2	5,3	4,3	5,2
Otros ácidos grasos insaturados	nmq 5,0% (a/a)	2,7	0,3	2,1	0,4
Total de los no identificados anteriormente 0,1%	nmq 2,0% (a/a)	<u>5,4</u>	<u>5,5</u>	<u>6,3</u>	<u>5,4</u>

De acuerdo con esto, se buscó un proceso que usara formación de complejos de urea y se descubrió que un estricto control de la composición sobre las especies de PUFA presentes en la material de éster etílico intermedia, acoplado al uso de cantidades de urea dentro de los intervalos fijados mediante algoritmo, podría producir de forma fiable composiciones farmacéuticas que cumplan las especificaciones que se exponen en la Tabla 1 sin superar los límites aceptables de carbamato de etilo.

Los requisitos de las composiciones para la materia de éster de etilo intermedia se presentan en la Sección 5.6.2 y Ejemplos 2 y 4. Véanse las Tablas 3 - 6, 8 - 9.

La cantidad óptima de urea necesaria se encontró que estaba determinada por (i) la fórmula I(a) o (ii) de acuerdo con la fórmula I(b) o (iii) de acuerdo con la fórmula I(a) y la fórmula I(b), fijando la cantidad de urea fijada a un valor dentro del intervalo fijado por, e incluidos, los resultados de las fórmulas I(a) e I(b), tal como la media de los dos resultados, en las que las fórmulas son las siguientes:

$$[Urea] = F_{\text{enriquecimiento-DHA}} * ((DHA_{\text{diana}} - DHA_{\text{EE}_{\text{entrada}}})/DHA_{\text{EE}_{\text{entrada}}})) \quad (1a)$$

$$[Urea] = F_{\text{enriquecimiento-EPA}} * ((EPA_{\text{diana}} - EPA_{\text{EE}_{\text{entrada}}})/EPA_{\text{EE}_{\text{entrada}}})) \quad (1b)$$

Los factores de enriquecimiento, $F_{\text{enriquecimiento-DHA}}$ y $F_{\text{enriquecimiento-EPA}}$ pueden ser iguales o diferentes. Un valor típico, usando los lotes de materia intermedia descritos en los ejemplos 2 y 4, se ha hallado que es de aproximadamente 100/0,34 (es decir, aproximadamente 300) para ambos.

5 **6.2. Ejemplo 2: El análisis de la composición de cuatro lotes de producción de ejemplo producidos usando formación de complejos de urea controlado confirman que se cumplieron los requisitos de la especificación**

10 Se prepararon cuatro lotes de producción de ejemplo de ácidos grasos poliinsaturados en forma de ácido libre. Se aplicaron estrictos controles de la composición a la materia intermedia de éster de etilo usando solo lotes en los que las especies especificadas de ácidos grasos poliinsaturados estaban dentro de límites de intervalos definidos y se usaron cantidades de urea que estaban dentro del intervalo requerido por el algoritmo calculador de urea. Las cantidades de urea que se van a usar
15 para la formación de complejos a escala de producción se determinaron primero empíricamente a escala de laboratorio usando lotes de ensayo pequeños de la materia prima éster de etilo y variando la concentración de urea, modificando de este modo la proporción aceite:urea:etanol. La concentración óptica sugerida por las determinaciones a escala de ensayo se confirmó que entraba dentro del intervalo requerido por el
20 algoritmo descrito en el ejemplo 1 y se usó para la fabricación a escala de producción.

 La composición de la materia transesterificada intermedia y la composición farmacéutica final (“ingrediente farmacéutico activo” o “API”) se determinaron mediante cromatografía de gases. Los resultados se recopilan en las Tablas 3-6 a continuación.

Tabla 3			
Especie de PUFA		Materia intermedia	API
(denominación común)	(identidad)	(ésteres de etilo transesterificados) (% a/a)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,54	0,55
Ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,00	0,15
Ácido α -linolénico	18:3 n-3	0,45	0,39
Ácido moróctico	18:4 n-3	1,52	1,70
Ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,00	0,10
Ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 n-6	0,47	0,35
Ácido araquidónico (AA)	20:4 n-6	2,11	2,43
Ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,00	0,15
Ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	1,78	2,18
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	49,42	57,25
Ácido heneicosapentaenoico	21:5n-3	2,32	2,79
Ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,71	0,83
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	5,80	6,23
Ácido docosahexaenoico (DBA)	22:6 n-3	17,09	19,58
Métrica de los agregados			
	Total %	99,41	98,43
	% de PUFA	82,77	96,30
	Omega-3 total	78,37	90,26
	Omega-6 total	3,83	4,41

Tabla 3			
Especie de PUFA		Materia intermedia	API
(denominación común)	(identidad)	(ésteres de etilo transesterificados) (% a/a)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
	PUFA restantes	0,57	1,63
	% de Saturados	4,34	0,35
	% de monoinsaturados	12,30	1,34
	% de desconocidos	0,60	0,42

Tabla 4

Tabla 4			
Especie de PUFA		Materia intermedia	API
(denominación común)	(identidad)	(ésteres de etilo transesterificados) (% a/a)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,54	0,49
Ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,00	0,14
Ácido α -linolénico	18:3 n-3	0,45	0,34
Ácido moróctico	18:4 n-3	1,52	1,67
Ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,00	0,13
Ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 n-6	0,47	0,39
Ácido araquidónico (AA)	20:4 n-6	2,11	2,45
Ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,00	0,25
Ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	1,78	2,02
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	49,42	57,64
Ácido heneicosapentaenoico	21:5 n-3	2,32	2,75
Ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,71	0,79
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	5,80	6,22
Ácido docosahexaenoico (DBA)	22:6 n-3	17,09	19,65
Métrica de los agregados			
	Total %	99,41	98,6
	% de PUFA	82,77	96,35
	Omega-3 total	78,37	90,54

Tabla 4

Tabla 4			
Especie de PUFA		Materia intermedia	API
(denominación común)	(identidad)	(ésteres de etilo transesterificados) (% a/a)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
	Omega-6 total	3,83	4,38
	PUFA restantes	0,57	1,43
	% de Saturados	4,34	0,31
	% de monoinsaturados	12,3	1,25
	% de desconocidos	0,60	0,69

Tabla 5			
Especie de PUFA		Materia intermedia	API
(denominación común)	(identidad)	(ésteres de etilo transesterificados) (% a/a)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,54	0,59
Ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,00	0,12
Ácido ###-linolénico	18:3 n-3	0,38	0,38
Ácido moróctico	18:4 n-3	1,09	1,16
Ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,00	0,12
Ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 n-6	0,57	0,45
Ácido araquidónico	20:4 n-6	2,42	2,84
Ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,00	0,22
Ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	1,97	2,11
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	49,20	55,81
Ácido heneicosapentaenoico	21:5n-3	2,30	2,72
Ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,64	0,13
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	5,06	5,46
Ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 n-3	17,64	19,45
Métrica de los agregados			
	Total %	99,60	98,76
	% de PUFA	82,48	93,77
	Omega-3 total	77,64	87,31

Tabla 5			
Especie de PUFA		Materia intermedia	API
(denominación común)	(identidad)	(ésteres de etilo transesterificados) (% a/a)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
	Omega-6 total	4,36	4,24
	PUFA restantes	48,00	2,22
	% de Saturados	5,15	0,24
	% de monoinsaturados	11,98	2,97
	% de desconocidos	40,00	1,79

Tabla 6			
Especie de PUFA		Materia intermedia	API
(denominación común)	(identidad)	(ésteres de etilo transesterificados) (% a/a)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,55	0,55
Ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,00	0,12
Ácido ###-linolénico	18:3 n-3	0,38	0,37
Ácido moróctico	18:4 n-3	1,13	1,26
Ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,36	0,00
Ácido dihomo-gamma-linolénico	20:3 n-6	0,56	0,42
Ácido araquidónico (AA)	20:4 n-6	2,43	2,86
Ácido eicosatrienoico	20:3 n3	0,00	0,16
Ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	1,82	2,09
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	48,84	57,08
Ácido heneicosapentaenoico	21:5n-3	2,28	2,78
Ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,63	0,10
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	5,02	5,49
Ácido docosahexaenoico (DHA)	22:6 n-3	17,61	20,00
Métrica de los agregados			
	Total %	99,49	98,74

Tabla 6

Tabla 6			
Especie de PUFA		Materia intermedia	API
(denominación común)	(identidad)	(ésteres de etilo transesterificados) (% a/a)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
	% de PUFA	82,11	94,94
	Omega-3 total	77,09	89,22
	Omega-6 total	4,53	4,05
	PUFA restantes	0,49	1,67
	% de Saturados	5,42	0,40
	% de monoinsaturados	11,96	1,57
	% de desconocidos	0,51	1,84

Se determinó que los cuatro lotes de producción de API cumplían las especificaciones de la composición indicadas en la Tabla 1, anterior.

6.3. Ejemplo 3: La formación controlada de complejos de urea enriquece de forma diferencial especies seleccionadas de omega-3 y omega-6

Como cabía esperar, la etapa de formación e complejos de urea disminuyó sustancialmente el porcentaje de ácidos grasos saturados y de ácidos grasos monoinsaturados en la composición resultante, enriqueciendo sustancialmente en ácidos grasos poliinsaturados. Véanse las Tablas 3 – 6 y la FIG. 3 A. No obstante, inesperadamente, la formación de complejos de urea usando cantidades de urea que entran dentro del límite determinado por el algoritmo tuvo un efecto diferencial sobre el enriquecimiento de especies individuales de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y ácidos grasos poliinsaturados omega-6.

La Tabla 7 proporciona una evaluación cualitativa del enriquecimiento de varias especies de ácidos grasos poliinsaturados, comparando la prevalencia en la materia intermedia de éster de etilo con la del API en ácido libre, promediada en los cuatro lotes de producción descritos en las Tablas 3-6. Véase también la FIG. 3B.

Tabla 7	
Especie de ácido graso poliinsaturado	Efecto cualitativo de la formación controlada de complejos de urea
Ácido linoleico (C18:2 n-6)	Neutro
Ácido gamma-linolénico (C18:3 n-6)	Enriquecido
Ácido α -linolénico (C18:3 n-3)	Reducido
Ácido moróctico (C18:4 n-3)	Enriquecido
Ácido eicosadienoico (C20:2 n-6)	Neutro
Ácido dihomo-gamma-linolénico (C20:3 n-6)	Reducido
Ácido araquidónico (C20:4 n-6) (AA)	Enriquecido
Ácido eicosadienoico (C20:3 n-3)	Enriquecido
Ácido eicosadienoico (C20:4 n-3)	Enriquecido
Ácido eicosapentaenoico (C20:5 n-3) (EPA)	Enriquecido
Ácido heneicosapentaenoico (C21:5 n-3)	Enriquecido
Ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6)	Reducido
Ácido docosapentaenoico (C22:5 n-3) (DPA)	Enriquecido
Ácido docosahexaenoico (C22:6 n-3) (DHA)	Enriquecido

Aunque los ácidos grasos poliinsaturados omega-3, como clase, están sustancialmente enriquecidos, el efecto de la formación de complejos de urea sobre los PUFA omega-6, como clase, no es tan predecible. De media, las especies omega-6 DGLA y ácido docosapentaenoico se reducen en términos de prevalencia; el ácido gamma-linolénico y el ácido araquidónico aumentan y existe poco o ningún efecto sobre el ácido linolénico y el ácido eicosadienoico.

Los autores han observado, en particular, que la especie de ácido docosapentaenoico omega-3, DPA (C22:5 n-3), está enriquecida, mientras que la correspondiente especie de omega-6, con longitud de cadena y grado de insaturación idénticos, el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6) se redujo en términos de prevalencia. El efecto divergente de la formación de complejos de urea sobre el enriquecimiento de estos dos isómeros, junto con diferencias en sus concentraciones relativas en la materia prima intermedia de éster etílico, tuvo como resultado una diferencia de orden log en sus concentraciones en el API final, ácido libre. Promediando los cuatro lotes de API presentados en las Tablas 3-6, la especie de ácido docosapentaenoico omega-3, DPA, está presente en el API final a 5,85 % (a/a), mientras que la especie ácido docosapentaenoico omega-6 está presente a una concentración media de 0,46% (a/a).

A una concentración media de 5,85 % (a/a), el DPA es la tercera especie más prevalente de ácido graso poliinsaturado en el API, superada solo por EPA y DHA. A este nivel, la concentración de DPA también es 10 veces mayor que la indicada para una composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre, denominada Purepa, en la que se indicó que DPA estaba presente a un nivel de 0,5%. Véase Belluzzi et al, Dig. Dis. Sci. 39(12): 2589 - 2594 (1994).

6.4. Ejemplo 4: El análisis de la composición de diez (10) lotes de producción de ejemplo de API demuestra reproduciblemente niveles elevados de DPA

Otros lotes de producción se prepararon de acuerdo con los métodos descritos en el ejemplo 2.

Los datos de diez (10) lotes de API, incluidos los cuatro lotes descritos en las Tablas 3-6) en el Ejemplo 2, producidos a partir de ocho (8) lotes diferentes de materia intermedia transesterificada (éster de etilo) se presentan en las tablas siguientes. La composición de cada uno de los lotes de materia prima intermedia se muestra en la Tabla 8. La Tabla 9 presenta el promedio ("AVG"), la desviación estándar ("STDEV", "SD") y Delta ("Δ", la diferencia absoluta entre +1 SD y -1 SD, +2 SD y -2 SD, etc.) a través de los 8 lotes de materia intermedia para cada una de las especies enumeradas

(éster de etilo). La composición de cada uno de los diez lotes del API final se muestra en la Tabla 10, más adelante; la Tabla 11 presenta el promedio, la desviación estándar y los valores de delta para cada una de las especies enumeradas (ácido libre) a través de los 10 lotes de API.

Tabla 8
Lotes de materia intermedia (éster de etilo)

		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8
	Nº BV	319021	319553	319554	320613	320766	320941	320824	320862
	Nº ONC	22581	24876	24906	27008	27824	27824	28069	28139
Identidad	Denominación común	% área	% área	% área	% área	% área	% área	% área	% área
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,552	0,516	0,522	0,571	0,689	0,712	0,657	0,611
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,166	0,146	0,141	0,157	0,253	0,218	0,283	0,159
C18:3(n-3)	Ácido α -linolénico	0,379	0,368	0,351	0,422	0,516	0,498	0,419	0,491
C18:4(n-3)	Ácido moróctico	1,403	0,991	1,008	1,100	1,432	1,462	1,372	1,505
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,156	0,181	0,194	0,167	0,423	0,366	0,274	0,212
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,314	0,384	0,421	0,376	0,415	0,473	0,446	0,398
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	1,977	2,362	2,316	2,805	2,867	2,884	3,306	2,152
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,171	0,200	0,216	0,181	0,270	0,223	0,220	0,245
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	1,855	1,908	1,870	1,653	2,159	2,142	1,896	2,132
C20:5(n-3)	EPA	46,131	45,698	44,908	45,317	45,131	45,675	45,416	46,185
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,239	2,105	2,156	2,165	1,763	1,761	2,140	2,407
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,658	0,575	0,556	0,508	0,535	0,524	0,509	0,572
C22:5(n-3)	DPA	5,341	4,634	4,598	5,178	2,858	2,874	4,324	4,834
C22:6(n-3)	DHA	15,875	16,102	15,997	15,700	16,861	17,046	16,128	16,852

Tabla 9
Estadística de 8 lotes de material intermedia (éster de etilo)

Identidad	Denominación común	AVG	SD	-3SD	-2SD	-1SD	+1SD	+2SD	+3SD	1SD Δ	2SD Δ	3SD Δ
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,60	0,08	0,38	0,45	0,53	0,68	0,76	0,83	0,15	0,30	0,45
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,19	0,05	0,03	0,08	0,14	0,24	0,30	0,35	0,11	0,22	0,32
C18:3(n-3)	Ácido ###-linolénico	0,43	0,06	0,24	0,30	0,37	0,49	0,56	0,62	0,13	0,26	0,38
C18:4(n-3)	Ácido moróctico	1,28	0,21	0,64	0,86	1,07	1,50	1,71	1,93	0,43	0,86	1,28
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,25	0,10	-0,05	0,05	0,15	0,35	0,45	0,54	0,20	0,40	0,60
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,40	0,05	0,26	0,31	0,36	0,45	0,50	0,55	0,10	0,19	0,29
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	2,58	0,45	1,23	1,68	2,13	3,03	3,48	3,93	0,90	1,80	2,70
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,22	0,03	0,12	0,15	0,18	0,25	0,28	0,31	0,07	0,13	0,19
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	1,95	0,18	1,42	1,60	1,77	2,13	2,31	2,49	0,36	0,71	1,07
C20:5(n-3)	EPA	45,56	0,45	44,20	44,65	45,10	46,01	46,46	46,92	0,91	1,81	2,72
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,09	0,22	1,42	1,64	1,87	2,32	2,54	2,76	0,45	0,90	1,34
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,56	0,05	0,41	0,46	0,51	0,60	0,65	0,70	0,10	0,20	0,30
C22:5(n-3)	DPA	4,33	0,96	1,45	2,41	3,37	5,29	6,25	7,21	1,92	3,84	5,76
C22:6(n-3)	DHA	16,32	0,52	14,77	15,29	15,80	16,84	17,36	17,87	1,04	2,07	3,10

Tabla 10
Lotes de API (ácido libre) finales

		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Lote 10
	Nº de lote de API	36355	36395	37225	37289	38151	38154	38157	38300	38303	38306
	Nº de lote Intermedio	1	1	2	3	4	4	5	7	8	6
Identidad	Denominación común	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,55	0,49	0,59	0,55	0,60	0,61	0,78	0,62	0,53	0,72
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,15	0,14	0,12	0,12	0,17	0,16	0,16	0,22	0,15	0,15
C18:3(n-3)	Ácido ###-linolénico	0,39	0,34	0,38	0,37	0,45	0,45	0,55	0,41	0,44	0,50
C18:4(n-3)	Ácido moróctico	1,70	1,67	1,16	1,26	1,37	1,37	1,87	1,65	1,77	1,81
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,10	0,13	0,12	0,09	0,10	0,10	0,27	0,12	0,11	0,12
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,35	0,39	0,45	0,42	0,42	0,45	0,52	0,51	0,42	0,51
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	2,43	2,45	2,84	2,86	3,50	3,50	3,64	4,02	2,57	3,60
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,15	0,25	0,22	0,16	0,20	0,17	0,25	0,18	0,17	0,23
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	2,18	2,02	2,11	2,09	1,96	1,90	2,64	2,13	2,34	2,54
C20:5(n-3)	EPA	57,25	57,64	55,81	57,08	56,25	56,38	56,88	56,30	56,72	57,15
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,79	2,75	2,72	2,78	2,68	2,60	2,15	2,57	2,88	2,18
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,20	0,17	0,72	0,71	0,61	0,62	0,66	0,63	0,71	0,66

Tabla 10 Lotes de API (ácido libre) finales											
		Lote 1	Lote 2	Lote 3	Lote 4	Lote 5	Lote 6	Lote 7	Lote 8	Lote 9	Lote 10
	N° de lote de API	36355	36395	37225	37289	38151	38154	38157	38300	38303	38306
	N° de lote Intermedio	1	1	2	3	4	4	5	7	8	6
Identidad	Denominación común	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %	Área %
C22:5(n-3)	DPA	6,23	6,22	5,46	5,49	6,12	5,97	3,41	5,15	5,59	3,43
C22:6(n-3)	DHA	19,58	19,65	19,45	20,00	19,16	18,79	20,60	20,10	20,97	21,01

Tabla 11
Estadística de 10 lotes de API (ácido libre) finales

Identidad	Denominación común	AVG	SD	-3 SD	-2 SD	-1 SD	+1 SD	+2 SD	+3 SD	1SD Δ	2SD Δ	3SD Δ
CI8:2(n-6)	Ácido linoleico	0,61	0,09	0,34	0,43	0,52	0,69	0,78	0,87	0,18	0,35	0,53
CI8:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,15	0,03	0,07	0,10	0,13	0,18	0,21	0,24	0,06	0,11	0,17
CI8:3(n-3)	Ácido ###-linolénico	0,43	0,06	0,23	0,30	0,36	0,49	0,56	0,62	0,13	0,26	0,39
CI8:4(n-3)	Ácido moróctico	1,56	0,25	0,81	1,06	1,31	1,81	2,06	2,31	0,50	1,00	1,50
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,13	0,05	-0,03	0,02	0,07	0,18	0,23	0,29	0,11	0,21	0,32
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,44	0,06	0,28	0,33	0,39	0,50	0,56	0,61	0,11	0,22	0,33
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	3,14	0,58	1,41	1,99	2,57	3,72	4,29	4,87	1,15	2,30	3,46
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,20	0,04	0,08	0,12	0,16	0,24	0,28	0,32	0,08	0,16	0,24
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	2,19	0,24	1,46	1,71	1,95	2,43	2,68	2,92	0,49	0,97	1,46
C20:5(n-3)	Ácido eicosapentaenoico (EPA)	56,74	0,56	55,07	55,63	56,19	57,30	57,86	58,42	1,12	2,23	3,34
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,61	0,25	1,85	2,11	2,36	2,86	3,12	3,37	0,51	1,01	1,52
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,57	0,21	-0,05	0,16	0,36	0,78	0,98	1,19	0,41	0,83	1,24
C22:5(n-3)	Ácido docosapentaenoico (DPA)	5,31	1,06	2,13	3,19	4,25	6,37	7,42	8,48	2,12	4,23	6,35
C22:6(n-3)	Ácido docosahexaenoico (DHA)	19,93	0,75	17,68	18,43	19,18	20,68	21,43	22,18	1,50	2,99	4,49

Como es evidente a partir de la Tabla 11, la diferencia del orden log en la concentración relativa en el API de la especie de ácido docosapentaenoico omega-3, DPA ((C22:5 n-3) y el isómero de ácido docosapentaenoico omega-6 (C22:5 n-3) se mantiene en 5,31% (a/a) para DPA (C22:5 n-3) frente a 0,57% (a/a) para el ácido docosapentaenoico (C22:5 n-6), que es el incremento por 10 en la concentración de DPA en comparación con la formulación anterior de ácido libre omega-3 Purepa notificado en Belluzzi et al. (5,31 frente a 0,5 %).

6.5. Ejemplo 5: El análisis de la composición de 21 lotes de producción de ejemplo demuestra reproduciblemente niveles elevados de DPA

Ahora se ha observado una elevada concentración absoluta y relativa del ácido docosapentaenoico omega-3, DPA, en 21 lotes de API producidos usando formación de complejos de urea, como se resume en las Tablas 12 y 13, más adelante.

Tabla 12 Estadística de 21 lotes de API (ácido libre) finales				
Identidad	Denominación común	Min % (a/a)	Máx % (a/a)	AVG % (a/a)
C18:2(n-6)	Ácido linoleico	0,49	1,00	0,74
C18:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,12	0,52	0,24
C18:3(n-3)	Ácido ###-linolénico	0,34	0,83	0,54
C18:4(n-3)	Ácido estearidónico (moróctico)	1,16	5,83	2,83
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,10	0,27	0,15
C20:3(n-6)	Ácido dihomogamma-linolénico	0,24	0,52	0,40
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico (AA)	2,32	4,02	3,17
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,10	0,25	0,16
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	1,40	2,82	2,13
C20:5(n-3)	Ácido eicosapentaenoico (timnodónico) (EPA)	48,61	57,64	55,40
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	1,81	2,88	2,33
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,17	0,73	0,58
C22:5(n-3)	Ácido docosapentaenoico (DPA)	2,77	6,23	4,44
C22:6(n-3)	Ácido cervónico (DHA)	15,99	21,78	19,35

Tabla 13 Estadística de 21 lotes de API (ácido libre) finales												
Identidad	Denominación común	AVG % (a/a)	SD	-3SD	-2SD	-1SD	+1SD	+2SD	+3SD	1SD Δ	2SD Δ	3SD Δ
CI8:2(n-6)	Ácido linoleico	0,74	0,16	0,26	0,42	0,58	0,90	1,07	1,23	0,32	0,65	0,97
CI8:3(n-6)	Ácido gamma-linolénico	0,24	0,11	-0,09	0,02	0,13	0,35	0,46	0,58	0,22	0,44	0,66
CI8:3(n-3)	Ácido ###-linolénico	0,54	0,15	0,09	0,24	0,39	0,69	0,84	0,99	0,30	0,60	0,90
CI8:4(n-3)	Ácido estearidónico (moróctico)	2,83	1,49	-1,63	-0,15	1,34	4,31	5,80	7,28	2,97	5,94	8,92
C20:2(n-6)	Ácido eicosadienoico	0,15	0,04	0,02	0,07	0,11	0,20	0,24	0,28	0,09	0,17	0,26
C20:3(n-6)	Ácido dihomo-gamma-linolénico	0,40	0,07	0,18	0,25	0,32	0,47	0,55	0,62	0,15	0,30	0,45
C20:4(n-6)	Ácido araquidónico	3,17	0,51	1,65	2,16	2,67	3,68	4,19	4,70	1,01	2,03	3,04
C20:3(n-3)	Ácido eicosatrienoico	0,16	0,05	0,01	0,06	0,11	0,21	0,26	0,31	0,10	0,20	0,31
C20:4(n-3)	Ácido eicosatetraenoico	2,13	0,41	0,92	1,32	1,73	2,54	2,94	3,35	0,81	1,62	2,43
C20:5(n-3)	Ácido timnodónico (EPA)	55,40	2,13	49,00	51,13	53,27	57,53	59,66	61,80	4,26	8,53	12,79
C21:5(n-3)	Ácido heneicosapentaenoico	2,33	0,34	1,29	1,64	1,98	2,67	3,02	3,36	0,69	1,38	2,07
C22:5(n-6)	Ácido docosapentaenoico	0,58	0,16	0,11	0,27	0,43	0,74	0,90	1,06	0,31	0,63	0,94
C22:5(n-3)	Ácido docosapentaenoico (DPA)	4,44	1,16	0,98	2,13	3,29	5,60	6,75	7,91	2,31	4,62	6,93
C22:6(n-3)	Ácido cervónico (DHA)	19,35	1,69	14,28	15,97	17,66	21,04	22,73	24,42	3,38	6,76	10,14

6.6. Ejemplo 6: Los efectos del DPA sobre la expresión génica en células hepáticas predicen una mayor eficacia clínica de las composiciones enriquecidas en DPA

El DPA es la tercera especie de ácido graso poliinsaturado más prevalente en las composiciones farmacéuticas analizadas en los ejemplos anteriores y está presente a una concentración 10 veces la de Purepa, una composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre. Aunque el DPA es un intermedio en la vía de biosíntesis de EPA en DHA (véase la FIG. 1), sorprendentemente se conoce poco sobre los efectos biológicos específicos de DPA. Véase Kaur y col., "Docosapentaenoic acid (22:5n-3): a review of its biological effects," Prog. Lipid Res. 50:28 - 34 (2011). Para aclarar la potencial contribución de DPA a la eficacia clínica de la composición farmacéutica se realizaron experimentos de perfil de la expresión génica.

6.6.1. Métodos

Cultivo celular y tratamiento- Se cultivaron células de hepatocarcinoma HepG2 en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) sin suero (Sigma-Aldrich) CON 4,5 g/l de glucosa, 1-glutamina, NaHCO_3 y piridoxina HCl suplementado con 1% (vol/vol) de aminoácidos no esenciales, 1% de Na-piruvato, 1% de penicilina/estreptomicina y 10% (vol/vol) de seroalbúmina bovina (BSA) sin ácidos grasos, todos adquiridos en Gibco BRL.

Los cultivos celulares se transfirieron semanalmente mediante digestión con tripsina y se incubaron a 37 °C en un incubador humidificado que contiene 5% de CO_2 . Tras 5 semanas de cultivo celular, EPA (ácido eicosapentaenoico, lote nº 0439708 - 2, Cayman Chemicals), DPA (ácido docosapentaenoico, lote 163481 - 26, Cayman Chemicals) y DHA (ácido docosahexanoico, lote 0437083 - 5, Cayman Chemicals) diluidos inmediatamente antes de usar en DMEM sin suero se añadieron por triplicado a pocillos (250.000 células/pocillo) a las concentraciones eficaces finales expuestas en la Tabla 14 a continuación.

Las proporciones de EPA (a 100 μM), DHA (a 40 μM) y DPA (a 11 μM) se eligieron para aproximar las proporciones de EPA, DHA y DPA en las composiciones farmacéuticas (API) descritas en la Sección 5.2 y el Ejemplo 5 (véanse las Tablas 12 y 13). Las concentraciones absolutas se eligieron de modo que se aproximaran mejor, dentro de las restricciones impuestas por las proporciones deseadas de la composición y las restricciones impuestas por las condiciones de cultivo, a los intervalos plasmáticos observados en las ramas de tratamiento de 2 g y 4 g del ensayo EVOLVE (véase el

- Ejemplo 10). La menor concentración de DPA (1 μM) se eligió para aproximar a la exposición sistémica de lo que cabría esperar por el uso de la composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre, denominada Purepa, en la que se notificó que había DPA presente a un nivel de 1/10 el observado en la composición farmacéutica actual.

Las células HepG2 se incubaron con el ácido graso identificado (EPA, DHA, DPA o mezclas especificadas) durante un total de 48 horas antes de la recolección celular y de la extracción de ARN.

Tabla 14				
Nº de muestra	Especie de PUFA	Concentración final por pocillo	Pocillo	Calidad del ARN (260/280)
GL 01	EPA	30 μM	a	2,0
GL 02	EPA	30 μM	b	2,1
GL 03	EPA	30 μM	c	2,0
GL 04	EPA	100 μM	a	1,98
GL 05	EPA	100 μM	b	2,05
GL 06	EPA	100 μM	c	2,0
GL 07	DHA	12 μM	a	2,0
GL 08	DHA	12 μM	b	2,04
GL 09	DHA	12 μM	c	2,0
GL 10	DHA	40 μM	a	2,0
GL 11	DHA	40 μM	b	2,0
GL 12	DHA	40 μM	c	2,11
GL 13	DPA	0,3 μM	a	2,07
GL 14	DPA	0,3 μM	b	2,0
GL 15	DPA	0,3 μM	c	2,0
GL16	DPA	3,0 μM	a	2,09
GL 17	DPA	3,0 μM	b	2,0
GL 18	DPA	3,0 μM	c	1,99
GL 19	DPA	1 μM	a	2,20
GL 20	DPA	1 μM	b	2,03
GL 21	DPA	1 μM	c	2,03
GL 22	DPA	11 μM	a	2,0

Tabla 14				
Nº de muestra	Especie de PUFA	Concentración final por pocillo	Pocillo	Calidad del ARN (260/280)
GL 23	DPA	11 µM	b	2,08
GL 24	DPA	11 µM	c	2,06
GL 25	EPA:DHA:DPA 100:40: 1(50:20:0,5)	total 200 µM	a	2,05
GL26	EPA:DHA:DPA 100:40: 1(50:20:0,5)	total 200 µM	b	2,0
GL27	EPA:DHA:DPA 100:40: 1(50:20:0,5)	total 200 µM	c	2,0
GL28	EPA:DHA:DPA 100:40:11 (50:20:5,5)	total 200 µM	a	2,0
GL29	EPA:DHA:DPA 100:40: 11 (50:20:5,5)	total 200 µM	b	2,06
GL30	EPA:DHA:DPA 100:40:11 (50:20:5,5)	total 200 µM	c	2,07
GL31	EPA:DHA:DPA 30: 12:0,3 (50:20:0,5)	total 60 µM	a	2,07
GL32	EPA:DHA:DPA 30: 12:0,3 (50:20:0,5)	total 60 µM	b	2,13
GL33	EPA:DHA:DPA 30: 12:0,3 (50:20:0,5)	total 60 µM	c	2,05
GL34	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	total 60 µM	a	2,0
GL35	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	total 60 µM	b	2,12
GL 36	EPA:DHA:DPA 30:12:3 (50:20:5,5)	total 60 µM	c	2,01
GL 37	BSA (ácido graso libre)		a	2,03
GL 38	BSA (ácido graso libre)		b	2,0
GL 39	BSA(ácido graso libre)		c	2,0

Recolección celular y aislamiento de ARN- El ARN total se aisló usando TRIzol, de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen). La calidad del ARN se evaluó con un espectrofotómetro Nanodrop 8000 (Thermo Scientific). Como se expone en la Tabla 14, anteriormente, cada una de las extracciones de ARN para cada

5 tratamiento tenía una proporción de 260/280 entre 2,0 y 2,2. El ARN se purificó adicionalmente con columnas de Qiagen RNeasy. De 300 ng del ARN total por preparación, se usó el kit de amplificación de ARN Illumina Total (Ambion) para generar ARNc biotinilado amplificado tras transcripción inversa mediante el procedimiento de Eberwine. Los alícuotas de las muestras de ARN tratadas y control se

10 enviaron a un laboratorio central de expresión génica para su análisis. El resto de las muestras de ARN total se almacenó a -70 °C.

Ensayo de expresión y análisis de datos. Los transcritos específicos en el ARNc biotinilado se midieron mediante obtención de imágenes fluorescentes tras hibridación directa en matrices de esferas Illumina HT-12, v. 4.0. Los datos de expresión génica se

15 analizaron usando el software Ingenuity® iReport™ (Ingenuity Systems, Redwood City, CA).

6.6.2. Resultados

6.6.2.1. El perfil de expresión demuestra que el DPA tiene efectos biológicos diferentes de EPA y DHA

20

Aunque el DPA es un intermedio en la vía de biosíntesis de EPA en DHA y aunque se sabe que el DPA se vuelve a convertir en EPA in vivo Kaur y col. Prog. Lipid Res. 50:28 - 34 (2011), los inventores observaron efectos marcadamente diferentes sobre la expresión génica en células hepáticas después de incubar con DPA, en

25 comparación con los efectos observados con EPA y con DHA.

Para una evaluación de alto nivel de las similitudes y diferencias en los efectos sobre la expresión génica, los inventores usaron el software Ingenuity® iReport™ para consultar los datos de expresión génica para las 5 primeras respuestas, clasificadas por el algoritmo Ingenuity® iReport™, observados tras la exposición a cada uno de EPA

30 (100 µM), DHA (40 µM) y DPA (11 µM), en varias categorías curadas de genes. Los resultados se resumen en la Tabla 15 siguiente. En la Tabla 16 siguiente se presenta una evaluación análoga usando una clasificación diferente. Los símbolos usados son: “|” – el atributo es único de las especies de ácidos grasos especificadas; “¶” – el atributo se comparte con otra especie de ácido graso; y “♦” – el atributo se observó habitualmente

35 con las 3 especies de ácidos grasos.

Tabla 15			
	EPA	DHA	DPA
<i>Enfermedades y trastornos</i>			
Cáncer	♦	♦	♦
Trastornos del tejido conjuntivo			
Enfermedades y afecciones dermatológicas		¶	¶
Trastorno del desarrollo			
Enfermedad hematológica			
Enfermedad inmunológica			
Enfermedad infecciosa	♦	♦	♦
Enfermedad inflamatoria			
Enfermedad renal y urológica			
Enfermedad del sistema reproductor			
<i>Funciones moleculares y celulares</i>			
Compromiso celular			
Muerte y supervivencia celular	¶	¶	
Desarrollo celular	♦	♦	♦
Función y mantenimiento celular			
Crecimiento y proliferación celular	♦	♦	♦
Movimiento celular			
Señalización e interacción célula-células		¶	¶
Expresión génica			
Modificación postranscripcional de ARN			
<i>Desarrollo y función del sistema fisiológico</i>			
Desarrollo y función del tejido conjuntivo			
Desarrollo y función del sistema hematológico	¶		¶
Hematopoyesis			
Tráfico de células inmunitarias			
Estructura y desarrollo de tejido linfoide			
Desarrollo y función del sistema reproductor	¶	¶	
Desarrollo y función del sistema esquelético y muscular			
Desarrollo tisular		¶	¶
Morfología tisular			

Tabla 15			
	EPA	DHA	DPA
Enfermedades y trastornos			
Cáncer	♦	♦	♦
Morfología tumoral	♦	♦	♦
Vías canónicas principales			
Señalización CD27 en linfocitos			
Señalización de IL-17A en células de las vías respiratorias		¶	¶
Señalización de IL-17A en células gástricas		¶	¶
Señalización de IL -8			
Señalización IMLP de neutrófilos			
Papel de IL-17F en enfermedades inflamatorias alérgicas de las vías respiratorias			
Papel de IL-17A en artritis	♦	♦	♦
Papel de IL-17A en psoriasis		¶	¶
Papel de macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en la artritis reumatoide			
Señalización TREM1			

Tabla 16			
	EPA	DHA	DPA
Listas toxicidades			
Hipertrofia cardíaca			
Colestasis hepática	♦	♦	♦
Activación de las células estrelladas hepáticas			
Incremento del potencial transmembrana de la mitocondria y la membrana mitocondrial			
Necrosis hepática/Muerte celular			
Proliferación hepática	¶	¶	
Mecanismo de regulación génica por los proliferadotes de peroxisoma mediante PPAR α			
Activación de PPAR α /RXR α		¶	¶
Panel de biomarcadores de glomerulonefritis primaria (humana)			
Necrosis renal/Muerte celular	¶		¶

Tabla 16			
	EPA	DHA	DPA
Química clínica y hematología			
Niveles incrementados de albúmina			
Niveles incrementados de creatinina	♦	♦	♦
Niveles incrementados de hematocrito			
Niveles incrementados de eritrocitos	¶	¶	
Cardiotoxicidad			
Arritmia cardíaca			
Daños cardíacos			
Disfunción cardíaca			
Fibrosis cardíaca	¶	¶	
Hipertrofia cardíaca	♦	♦	♦
Inflamación cardíaca	♦	♦	♦
Necrosis cardíaca/Muerte celular	¶		¶
Proliferación cardíaca			
Anomalía cardíaca congénita			
Hepatotoxicidad			
Hiperplasia biliar			
Colestasis hepática	♦	♦	♦
Daños hepáticos			
Hepatomegalia		¶	¶
Hepatitis		¶	¶
Inflamación hepática	♦	♦	♦
Necrosis hepática/Muerte celular			
Proliferación hepática	¶	¶	
Nefrotoxicidad			
Daños renales	¶	¶	
Hidronefrosis renal			
Inflamación renal	♦	♦	♦
Necrosis renal/Muerte celular	♦	♦	♦
Nefritis renal	♦	♦	♦
Proliferación renal	♦	♦	♦

Los datos destacan las diferencias marcadas en los efectos de DPA, EPA y DHA en múltiples categorías. Las diferencias en los efectos sobre la expresión génica también se observaron usando un análisis diferente, en el que se identificaron los genes específicos más significativamente regulados por aumento y regulados por disminución por cada uno de EPA (100 μ M), DHA (40 μ M) y DPA (11 μ M). Los datos se recopilan, respectivamente, en las Tablas 17 (genes regulados por aumento) y 18 (regulados por disminución) a continuación. Los símbolos usados son: " $\rightarrow$ " –expresión afectada en ambas concentraciones de DPA; " ¶ " expresión regulada en común con otra especie de ácido graso, identificada entre paréntesis; " ♦ " gen regulado por las tres especies de ácido graso.

Tabla 17				
Genes principales regulados por aumento				
Especie de ácido graso	Conc. μM	Genes		
DPA	11	↑	MST1 (incluye EO:15235)	¶ (DHA)
		↑	MOC16121	$\rightarrow$
		↑	AMT	$\rightarrow$
		↑	AHSA2	$\rightarrow$ ♦
		↑	SRSF1	¶ (EPA)
		↑	HNRNPA2B1	
		↑	ALDOC	
		↑	TOP3B	
		↑	STK36	
		↑	SRSF5	
DHA	40	↑	HIST2H2AA3IHIST2H2AA4	¶ (EPA)
		↑	AHSA2	♦
		↑	MTIX	
		↑	SNORA62	
		↑	HIST1H3A (incluye otros)	
		↑	MST1 (incluye EO:15235)	¶ (DPA)
		↑	HIST2H2AC	
		↑	LOX	¶ (EPA)
		↑	LSMDI	
		↑	MRPS34	

Tabla 17 Genes principales regulados por aumento		
Especie de ácido graso	Conc. μM	Genes
EPA	100	↑ HIST2H2BE (incluye otros) ↑ AHSA2+ ↑ SRSFI ¶ (DPA) ↑ ROS2 (incluye EO: 19735) ↑ HIST2H2AA3IHIST2H2AA4 ¶ (DHA) ↑ MAT2A ↑ ZNF91 ↑ HIST1H3A (incluye otros) ¶ (DHA) ↑ LOX ¶ (DHA) ↑ GNAI3

Tabla 18 Genes principales regulados por disminución		
Especie de ácido graso	Conc. μM	Genes
DPA	11	↓ IL8 + ↓ CDKN2AIPNL + ↓ CATSPER2 →◆ ↓ CCBE1 ¶ (DHA) ↓ ALPP ¶ (DHA) ↓ CCL20 + ↓ DDX51 ¶ (DHA) ↓ QRFPR ↓ ZNF14 ↓ RELB ¶ (EPA)
DHA	40	↓ CATSPER2 + ↓ IL8 + ↓ CCL20 + ↓ CDKN2AIPNL + ↓ MAP2K2 ↓ DDX51 ¶ (DHA)

Tabla 18		
Genes principales regulados por disminución		
Especie de ácido graso	Conc. μM	Genes
		↓ CCBE1 ¶ (DHA) ↓ JOSD1 ↓ ALPP ¶ (DHA) ↓ ZNF652
EPA	100	↓ IL8 + ↓ CCL20 + ↓ NFKBIA ↓ IER3 ↓ RELB ¶ (DHA) ↓ CATSPER2 + ↓ CDKN2AIPNL + ↓ GOS2 ↓ ZFP38 ↓ HERDSPUD1

Las diferencias en los efectos de DPA, EPA y DHA también se observaron fácilmente mediante la comparación de los genes cuya expresión está afectada de forma única por cada una de las especies de PUFA omega-3.

5

Tabla 19			
Genes principales regulados de forma única por DPA (11 μM)			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. ALDOC			↑
2. AMT			↑
3. HNRNPA2B1			↑
4. MGC16121			↑
5. PRKCD			←
6. RELA (inhibido)			←
7. SRSF5			↑
8. STK36			↑
9. TLR7 (inhibido)			↑

10. TOP3B			←
11. QRFPR			↓
12. ZNF14			↑

Tabla 20 Genes principales regulados de forma única por DHA (40 μ M)			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. FOXO3		←	
2. LSMDI		↑	
3. MAP2K2		↓	
4. MRPS34		↑	
5. MTIX		↑	
6. NFKB1		←	
7. SNORA62		↑	
8. TNFSF11		←	
9. ZNF652		↓	

Tabla 21 Genes principales regulados de forma única por EPA (100 μ M)			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. Beta-estradiol (inhibido)	←		
2. GNAI3	↑		
3. GOS2	↓		
4. HERPUD1	↓		
5. HIST2H2BE (incluye otros)	↑		
6. IL2 (inhibido)	←		
7. IER3	↓		
8. Lipopolisacárido (inhibido)	←		
9. MAT2A	↑		
10. NFkB (complejo) (inhibido)	←		
11. NFKBIA	↓		
12. RGS2 (incluye EG:19735)	↑		

Las diferencias en los efectos de DPA, EPA y DHA sobre la expresión génica también se pueden observar mediante la comparación de los genes cuya expresión está afectada más significativamente por al menos dos de las especies de ácidos grasos poliinsaturados.

5

Tabla 22 Genes principales regulados comúnmente por DHA y DPA			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. AHSA2	↑	↑	↑
2. ALPP		↓	↓
3. CATSPER2	↓	↓	↓
4. CCL20	↓	↓	↓
5. CDKN2AIPNL	↓	↓	↓
6. CCBE		↓	↓
7. DDX51		↓	↓
8. IL8	↓	↓	↓
9. MSTI (incluye EG:15235)	↑	↑	↑

Tabla 23 Genes principales regulado de forma única por EPA y DPA			
Gen	EPA	DHA	DPA
1. AHSA2	↑	↑	↑
2. CATSPER2	↓	↓	↓
3. CCL20	↓	↓	↓
4. CDKN2AIPNL	↓	↓	↓
5. IL8	↓	↓	↓
6. RELB	↓		↓
7. SRSFI	↑		↑

Estos análisis demuestran de forma colectiva que existen diferencias marcadas en los efectos de EPA, DHA y DPA en múltiples categorías fisiológicas, farmacológicas y bioquímicas. EPA, DHA y DPA no son idénticos en el efecto; las especies concretas que estén presente en una composición de PUFA omega-3 son claramente importantes para los efectos fisiológicos que tendrá la composición sobre la administración.

10

6.6.2.2. DPA tiene una actividad significativa a concentración mayor, pero no a menor

Se evaluaron dos concentraciones de DPA. Como se ha indicado anteriormente, se eligió la mayor concentración de DPA (a 11 μ M) de modo que las proporciones de EPA (a 100 μ M), DHA (a 40 μ M) y DPA (a 11 μ M) se aproximen a las proporciones de EPA, DHA y DPA en las composiciones farmacéuticas (API) descritas en la Sección 5.2 y el Ejemplo 5, con las concentraciones absolutas escogidas para aproximarse, dentro de las restricciones impuestas por la proporción de la composición deseada y las restricciones impuestas por las condiciones de cultivo, a los intervalos plasmáticos observados en las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE (véase el Ejemplo 10). La menor concentración de DPA (1 μ M) se eligió para aproximar a la exposición sistémica de lo que cabría esperar por el uso de la composición farmacéutica anterior de ácidos grasos poliinsaturados omega-3 en forma de ácido libre, denominada Purepa, en la que se notificó que había DPA presente a un nivel de 1/10 el observado en la composición farmacéutica actual.

En general, 310 genes respondieron de forma única al nivel más alto de DPA pero no al más bajo. El gran número de genes que muestran cambios estadísticamente significativos en la expresión génica predice que el DPA tendrá efectos biológicos significativos cuando se alcance la mayor concentración *in vivo*. Por el contrario, la menor concentración de DPA es, claramente, una dosis subumbral, al menos con respecto a la regulación de estos 310 genes y, mucho menos, cabría esperar una respuesta a esta menor concentración plasmática *in vivo*.

Cuando se evaluaron los efectos sobre los genes que se clasifican ampliamente mediante el software iReportTM y afectan a la función molecular y celular, dos subcategorías aparecen de forma única dentro de las 5 principales, clasificadas mediante el algoritmo Ingenuity[®] iReportTM, a la concentración mayor, pero no a la menor, de DPA, las implicadas en la expresión génica y las que afectan a la modificación postranscripcional del ARN. Dado el potencial de efectos pleiotrópicos de segundo orden causado por los cambios en la expresión de genes que codifican proteínas que afectan ellas mismas a la expresión génica y en los genes que codifican proteínas que afectan a la modificación postranscripcional, estos resultados sugieren que el DPA es capaz de modular un gran número de vías metabólicas a la concentración más alta, pero no a la más baja.

El efecto de la dosis umbral también se pueden observar centrándose en tres categorías de genes que se sabe que son relevantes para los efectos clínicos de los

ácidos grasos poliinsaturados omega-3: genes implicados en el metabolismo de los lípidos, genes implicados en la fisiología cardiovascular y genes implicados en la inflamación (asignación de los genes a las categorías identificadas realizada de forma automática por el software iReportTM. Los resultados se resumen en la Tabla 24 siguiente.

Tabla 24			
	Respuestas génicas totales	Respuestas génicas totales	Respuestas génicas en común
	Baja [DPA]	Alta [DPA]	
Metabolismo de los lípidos	2	22	0
Cardiovascular	10	51	6
Inflamatoria	18	22	4

Como se muestra en la Tabla 24, solo 2 genes implicados en el metabolismo de los lípidos respondieron a la concentración 1 μM del DPA, mientras que 22 genes del metabolismo de los lípidos respondieron de forma única con cambios estadísticamente significativos en la expresión tras la incubación en presencia de DPA 11 mM. Centrados en el metabolismo de los lípidos DPA 1 μM es, claramente, una dosis subumbral, mientras que 11 μM tiene efectos significativos.

Se demostró que un mayor número de genes respondía a la dosis 1 μM de DPA en la categoría de fisiología cardiovascular y los inventores observaron un incremento por cinco (en lugar de por 10) en el número de genes afectados a 11 μM de DPA. Un número todavía mayor de genes implicados en las vías inflamatorias respondieron a 1 μM de DPA, observándose únicamente un incremento minoritario en el número de genes a 11 μM .

La concentración 11 μM *in vitro* es menor que la concentración plasmática ~ 90 μM observada en los pacientes de EVOLVE que recibieron 4 g/día. Véase el Ejemplo 10, por tanto, los resultados predicen que una dosis clínicamente relevantes de las composiciones enriquecidas en DPA descritas en la Sección 5.2 y el Ejemplo 5 (véanse las Tablas 12 y 13) tendrán efectos metabólicos significativos, incluyendo efectos sobre el metabolismo de los lípidos, la fisiología cardiovascular y la inflamación. Cabría

esperar pocos de estos efectos específicos de DPA, si alguno, a los niveles de DPA 10 veces menores observados en la preparación anterior de Purepa.

6.6.2.3. El DPA, a una concentración más alta, afecta a la expresión de múltiples genes del metabolismo lipídico.

- 5 Los 22 genes del metabolismo de los lípidos que muestran cambios estadísticamente significativos en la expresión a la concentración 11 μM de DPA pero no a la concentración 1 μM , se identifican en la Tabla 25, a continuación.

Tabla 25
Genes del metabolismo lipídico respondedores a DPA 11 μ M

Símbolo	Nombre en Entrez Gene	ID en Entrez Gene para seres humanos	Nº de cambios	Fármaco(s) que se sabe que afectan a la expresión
APOA2	Apolipoproteína A-II	336	-1,229	
CD83	Molécula CD83	9308	-1,629	
DGAT1	Diacilglicerol O-aciltransferasa 1	8694	1,602	omacor
DNAJBI	DnaJ (Hsp40), homólogo, subfamilia B, miembro 1	3337	-1,489	
FGFR3	receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos	2261	1,336	pazopanib
GNAI3	Proteína de unión al nucleótido guanina (proteína G), polipéptido 3 de actividad de inhibición alfa	2773	1,455	
IL8	Interleucina 8	3576	-2,535	
IL32	Interleucina 32	9235	-1,629	
IL18 (includes EG:16173)	Interleucina 18 (factor inductor de interferón-gamma)	3606	-1,347	
IP6K1	Inositol hexakisfosfato quinasa 1	9807	-1,242	
IP6K2	Inositol hexakisfosfato quinasa 2	51447	1,319	
KIT	Homólogo del encogen viral del sarcoma felino 4 v-kit Hardy-Zuckerman	3815	1,239	dasatinib, sunitinib, pazopanib, tivozanib, OSI-930, telatinib,

Tabla 25
Genes del metabolismo lipídico respondedores a DPA 11 μ M

Símbolo	Nombre en Entrez Gene	ID en Entrez Gene para seres humanos	Nº de cambios	Fármaco(s) que se sabe que afectan a la expresión
				tandutinib, imatinib, sorafenib
NFKB1	Factor nuclear del potenciador de genes polipeptídicos de la cadena ligera kappa en linfocitos B 1	4790	-1,386	
PDPN (incluye EG:10630)	podoplanina	10630	-1,307	
PGF	Factor de crecimiento de la placenta	5228	-1,284	aflibercept
PIP4K2B	Fosfatidilinositol-5-fosfato-4 quinasa, tipo II, beta	8396	-1,578	
PLA2G16	Fosfolipasa A2, grupo XVI	11145	-1,337	
PUNS	perilipina 5	440503	-1,371	
PTGR2	prostaglandina reductasa 2	145482	-1,416	
PTX3	pentraxina 3, larga	5806	-1,536	
RGS2 (incluye EG:19735)	regulador de la señalización de proteína G 2, 24 kDa	5997	1,289	
STIPI	Fosfoproteína 1 inducida por estrés	10963	-1,469	

Los efectos sobre la expresión de varios de estos genes sugieren que el DPA, a una concentración análoga *in vivo*, debería conducir a la mejora de varios parámetros lipídicos clínicamente relevantes.

Por ejemplo, el DPA a 11 μ M regula por aumento la **ACADSB**, la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta/ramificada. El producto del gen ACADSB está implicado en la degradación de los triglicéridos; cabría esperar que la regulación por aumento tuviera como resultado menores niveles de triglicéridos en suero. **HMGCR**, que está regulado por disminución, codifica la HMG-CoA reductasa, la enzima limitante de la dosis para la síntesis de colesterol y la diana para la inhibición de las estatinas. Por tanto, de forma análoga a la acción de las estatinas, la regulación por disminución de la expresión del gen HMGCR por el DPA debería conducir a disminuciones favorables en la proporción colesterol total:HDL. **SQLE**, que también está regulado por disminución, codifica la escualeno epoxidasa, que cataliza la primera etapa de oxigenación en la biosíntesis de esterol y se piensa que es una de las enzimas limitantes de la velocidad en esta vía. La regulación por disminución de SQLE también debería conducir a niveles reducidos de colesterol total.

6.6.2.4. Resumen de los resultados de los experimentos de perfiles de expresión

Los experimentos de perfiles de expresión usando una línea de células hepáticas demuestran que el DPA tiene una actividad biológica significativa a una concentración cercana a los niveles plasmáticos observados en pacientes humanos a los que se ha administrado una dosis diaria de 4 g de un lote de ejemplo de la composición farmacéutica enriquecida en DPA.

A esta concentración, el DPA afecta a la expresión de los genes en múltiples vías metabólicas, incluyendo los genes en categorías que se sabe que son relevantes para los efectos clínicos de los ácidos grasos poliinsaturados omega-3: los genes implicados en el metabolismo de los lípidos, los genes implicados en la fisiología cardiovascular y los genes implicados en la inflamación. Cabe esperar que se produzcan significativos efectos de segundo orden, dados los cambios observados en la expresión de los genes que codifican proteínas que por sí mismas afectan a la expresión génica y en genes que codifican proteínas que afectan a la modificación postranscripcional.

Efectos específicos sobre la expresión de varios genes implicados en el metabolismo de los lípidos sugieren que DPA, a una concentración *in vivo* análoga, debería contribuir a la mejora de varios parámetros lipídicos clínicamente relevantes. En particular, los inventores observaron regulación por aumento dirigida por DPA de

ACADSB, la acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta/ramificada, que cabe esperar que de lugar a niveles séricos de triglicéridos más bajos; la regulación por disminución de **HMGCR** que, como el tratamiento con estatinas, debería conducir a disminuciones favorables de la proporción colesterol total:HDL; y la regulación por disminución de **SQLE**, que debería conducir de forma análoga a niveles menores de colesterol total.

Estos efectos se pueden distinguir de los observados con EPA y con DHA.

Los experimentos de los inventores demostraron efectos dependientes de la dosis estadísticamente significativos para DPA, con la concentración menor, elegida para imitar la concentración 10 veces menor de DPA en una formulación de ácido graso omega-3 anterior, que afecta a 10 veces menos genes que la concentración más alta de DPA, elegida para imitar la exposición en plasma observada en un ensayo clínico de las composiciones farmacéuticas enriquecidas con DPA descritas anteriormente. Al menos con respecto a los 300 genes regulados de forma única por la concentración más alta de DPA, que notablemente incluye genes que afectan de forma beneficiosa al metabolismo de los lípidos, la concentración menor de DPA proporciona una exposición subumbral, y cabría esperar que proporcione una dosis subterapéutica *in vivo*.

6.7. Ejemplo 7: Ensayo clínico ECLIPSE

6.7.1. AGENTES FARMACOLÓGICOS

Lovaza[®] - Las cápsulas de prescripción Lovaza[®] se adquirieron a través de fuentes comerciales de EE.UU. De acuerdo con la ficha técnica del producto aprobada por la FDS, cada cápsula de 1 gramo de Lovaza[®] contiene al menos 900 mg de los ésteres de etilo de los ácidos grasos omega-3 procedentes de aceites de pescado, principalmente una combinación de ésteres de etilo de ácido eicosapentaenoico (EPA, aproximadamente 465 mg) y ácido docosahexaenoico (DHA, aproximadamente 375 mg). No se realizó un análisis de la composición independiente.

FÁRMACO DEL ESTUDIO (Epanova[®]) – Se prepararon cápsulas de gelatina blanda porcina de tipo A recubiertas con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG), cada una con un gramo de una composición de PUFA en la que los ácidos grasos poliinsaturados están presentes en forma de ácidos grasos libres (“API”. El API encapsulado tenía la composición expuesta en la Tabla 26.

Tabla 26	
Especie de PUFA	API

(denominación común)	(longitud de la cadena de carbonos: número de dobles enlaces, serie omea)	(composición final de ácidos grasos libres) (% a/a)
ácido linoleico	18:2 n-6	0,55
Ácido gamma-linolénico	18:3 n-6	0,15
Ácido α -linolénico	18:3 n-3	0,39
Ácido moróctico	18:4 n-3	1,70
Ácido eicosadienoico	20:2 n-6	0,10
Ácido dihomo-gamma-linolénico (DGLA)	20:3 n-6	0,35
Ácido araquidónico (AA)	20:4 n-6	2,43
Ácido eicosatrienoico	20:3 n-3	0,15
Ácido eicosatetraenoico	20:4 n-3	2,18
Ácido eicosapentaenoico (EPA)	20:5 n-3	57,25
Ácido heneicosapentaenoico	21:5 n-3	2,79
Ácido docosapentaenoico	22:5 n-6	0,83
Ácido docosapentaenoico (DPA)	22:5 n-3	6,23
Ácido docosahexaenoico (DBA)	22:6 n-3	19,58
	Total %	98,43
	% de PUFA	96,30
	Omega-3 total	90,26
	Omega-6 total	4,41
	PUFA restantes	1,63
	% de Saturados	0,35
	% de monoinsaturados	1,35
	% de desconocidos	0,42

6.7.2. Diseño del estudio

Un estudio abierto, de dosis única, aleatorizado y de 4 grupos cruzados de biodisponibilidad se realizó con dos tratamientos diferentes: 4 gramos de Epanova® o 4 g de Lovaza®, cada uno administrado con una comida pobre en grasas y rica en grasas a 54 adultos sanos. La FIG. 4 proporciona un diagrama de flujo del tratamiento que ilustra

el diseño del estudio: Brevemente, después de un periodo de lavado se aleatorios a los sujetos a una de dos secuencias de tratamiento:

- (i) Epanova (pobre en grasas) → Lovaza (pobre en grasas) → Epanova (rico en grasas) → Lovaza (rico en grasas), o
- 5 (ii) Lovaza[®] (pobre en grasas) → Epanova[®] (pobre en grasas) → Lovaza[®] (rico en grasas) → Epanova[®] (rico en grasas).

Comidas de periodos pobres en grasas (periodos 1 y 2): Sin desayuno (ayunas); almuerzo sin grasas (0 g de grasas; 600 kcal) tras la extracción de sangre de 4 horas; cena pobre en grasas (9 g de grasas; 900 kcal) tras la extracción de sangre de 12 horas.

10 Los artículos alimentarios pobres en grasas fueron: yogur sin grasas, taza de fruta, Fig Newtons sin grasas, comida Lean Cuisine. Comidas de periodos ricos en grasas (periodos 3 y 4): desayuno rico en grasas (20 g de grasas; 600 kcal) inmediatamente después de la extracción de sangre de 0,5 horas; almuerzo rico en grasas (30 g de grasas; 900 kcal) tras la extracción de sangre de 4 horas; y cena rica en grasas (30 g de grasas; 900 kcal) tras la extracción de sangre de 12 horas. Los artículos alimentarios ricos en

15 grasas fueron: Para desayuno sándwich y donuts pequeños recubiertos con espolvoreado; pizza con queso; patatas fritas y panini de jamón y queso.

Los requisitos de lavado previos antes de la selección fueron: 60 días para el aceite de pescado, suplementos de EPA o DHA o alimentos reforzados; 7 días para

20 aceites de pescado, semilla de lino, semilla de perilla, cáñamo, espirulina o grosella negra, estatinas, secuestrantes de ácido biliar, inhibidores de la absorción de colesterol o fibratos. El periodo de lavado cruzado fue de al menos 7 días.

La tarde anterior a la visita a la clínica, los sujetos consumieron una cena pobre en grasas 12 horas antes del tiempo 0 de cada periodo de tratamiento (9 g de grasas; 900 kcal).

25 Se administró el producto experimental ((Epanova[®] o LOVAZA[®]) la mañana después de las extracciones de sangre antes de la dosis (tiempo 0). Obtención de muestras de sangre para farmacocinética para cada periodo de tratamiento de 2 días a 1,0, -0,5 y 0 horas (antes de la dosis) y después de la dosis a 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10 y 12 horas ((+/- 5 minutos) para el 1^{er} día y a las 24 horas (+/- 15 min) para el 2^o día.

30 **6.7.3. ANÁLISIS FARMACOCINÉTICOS Y ESTADÍSTICOS:**

Se calcularon los siguientes parámetros farmacocinéticos para las concentraciones en plasma de EPA y DHA para el cambio ajustado para el valor basal en las concentraciones totales e individuales de EPA y DHA mediante métodos no compartimentales estándar: AUC_{0-t} , AUC_{0-inf} , C_{max} y T_{max} .

Los principales determinantes de la biodisponibilidad: Área transformada por $\ln$ bajo la curva concentración plasmática respecto al tiempo (AUC_t) y la concentración plasmática máxima medida en un intervalo de 24 horas para el cambio ajustado por el valor basal en las concentraciones totales e individuales de EPA y DHA.

5 Las concentraciones plasmáticas se ajustaron por el valor basal antes del cálculo de los parámetros farmacocinéticos. Las cifras se representan para el cambio ajustado por el valor basal en la media geométrica (transformada $\ln$).

Se usó el análisis de la varianza (ANOVA) para evaluar los parámetros farmacocinéticos transformados $\ln$ para las diferencias debidas a los tratamientos, el periodo, la secuencia de las dosis y los sujetos en la secuencia.

Las proporciones de las medias se calcularon usando la media de mínimos cuadrados para la AUC_{0-t} , AUC_{0-inf} y la C_{max} .

Las proporciones de las medias y sus intervalos de confianza al 90% deben residir por encima del límite superior de 125,00% para la AUC_{0-t} , AUC_{0-inf} y la C_{max} con el fin de mostrar que Epanova[®] tiene una biodisponibilidad relativa superior en comparación con Lovaza[®] con respecto a la dieta.

6.7.4. Resultados

Población del estudio- En el estudio participaron 54 adultos sanos, 41 varones (75,9%) y 13 mujeres (24,1%) de entre 21 y 77 años de edad. Todos los periodos de tratamiento fueron completados por 51 sujetos (94,4%), completando 53 sujetos (97,1%) la parte pobre en grasas del estudio. La población fue, predominantemente, de raza negra o afroamericanos (66,7%), con un 31,5% de raza blanca y 1,8% asiáticos.

Biodisponibilidad. La FIG. 5 compara la biodisponibilidad de EPA + DHA total (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis (4g) de Lovaza[®] durante los periodos de dietas ricas en grasas y bajas en grasas (condiciones de dosis en ayunas), lo que confirma que la biodisponibilidad de Lovaza[®] disminuye significativamente con la dieta pobre en grasas. El cambio ajustado por el valor basal en los niveles plasmáticos totales de EPA+DHA muestra que la AUC_t para Lovaza[®] en el periodo de comidas pobres en grasa disminuye en un 83,3% en comparación con Lovaza[®] en el periodo de comidas ricas en grasas: 661,6 frente a 3959,5 nmol-h/ml, respectivamente ($p < 0,0001$) (datos de medios LS en la Tabla 27, a continuación). La C_{MAX} de Lovaza[®] en el periodo pobre en grasas disminuyó en un 80,6 % en comparación con el periodo rico en grasas ($p < 0,0001$) y la T_{max} aumentó en un 62% en el periodo pobre en grasas en comparación con el periodo rico en grasas (10,0 frente a 6,3 h, respectivamente; $p = 0,0001$).

Tabla 27							
	Media de mínimos cuadrados					Límites del intervalo de confianza del 90 % (%)	
Parámetro de biodisponibilidad	Pobre en grasas	Rico en grasas	Proporción de las medias (%)	Valor p ^a	% C.V. intrasujetos ^b	Inferior	Superior
Cambio ajustado por el valor basal							
AUC _t (nmol.h/ml)	661,63	3959,52	16,7	< 0,0001	69,1	3,47	29,95
C _{máx} (nmol/ml)	86,89	448,63	19,4	< 0,0001	70,7	5,5	33,23
T _{máx} (h)	10,19	6,28	162,3	0,0001	54,5	138,32	186,24
Datos del cambio ajustado por el valor basal (transformado Ln) (media geométrica)							
Ln AUC _t (nmol.h/ml)	652,06	3468,17	18,8	< 0,0001	55,3	15,72	22,49
Ln C _{máx} : (nmol.h/ml)	60,61	398,07	15,2	< 0,0001	69,2	12,35	18,78

N= 53

^a el valor p es para la diferencia media de mínimos cuadrados (LS) entre Epanova y Lovaza del modelo ANOVA

5 ^b % covarianza

La FIG. 6 compara la biodisponibilidad de la EPA+DHA total (cambio ajustado por el valor basal) durante el periodo rico en grasas tras una única dosis (4 g) de Lovaza[®] frente a una única dosis (4 g) de Epanova[®], lo que demuestra que en los periodos de comidas ricas en grasas, en los que se confirmó que la biodisponibilidad de Lovaza[®] era la más alta, no obstante, la biodisponibilidad de EPA + DHA fue significativamente mayor cuando se administran en forma de ácidos grasos libres (Epanova[®]) que la correspondiente composición de éster de etilo omega-3 (Lovaza[®]) (p< 0,0007).

La FIG. 7 compara la biodisponibilidad de EPA + DHA total (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis de Epanova[®] frente a Lovaza[®] durante el periodo de dietas pobres en grasas, lo que demuestra que el cambio ajustado por el valor basal en los niveles plasmáticos de EPA+DHA muestran una AUC_t 4,6 veces mayor para Epanova que para Lovaza durante los periodos de comidas pobres en grasas: 3077,8 frente a 668,9 nmol-h/ml, respectivamente (p<0,0001) (datos de las medias LS

en la Tabla 28, a continuación). La Cmax de Epanova[®] es 3,2 veces mayor que la de Lovaza[®] ($p < 0,0001$) y la Tmax es un 20% más corta que la de LOVAZA[®] (8 frente a 10 horas, respectivamente; $p = 0,0138$).

Tabla 28								
	Media de mínimos cuadrados						Límites del intervalo de confianza del 90 % (%)	
Parámetro de biodisponibilidad	Epanova [®]	Lovaza [®]	Proporción de las medias (%)	Valor p ^a	% C.V. intrasujetos ^b	% C.V. entre sujetos ^b	Inferior	Superior
Cambio ajustado por el valor basal								
AUC _t (nmol.h/ml)	3077,83	668,95	460,1	< 0,0001	62,9	253	402,77	517,42
C _{máx} (nmol/ml)	277,58	86,35	321,46	< 0,0001	71,6	48,9	27236	370,56
T _{máx} (h)	8,08	10,21	79,23	0,0138	45,8	24,6	65,6	92,86
Datos del cambio ajustado por el valor basal (transformado Ln) (media geométrica)								
Ln AUC _t (nmol.h/ml)	2651,41	658,09	402,9	< 0,0001	63,9	243	329,71	492,33
Ln C _{máx} (nmol/ml)	225,79	60,7	371,95	< 0,0001	66,3	42,7	304,37	454,53

^a el valor p es para la diferencia media por mínimos cuadrados (LS) entre Epanova[®] y Lovaza[®] del modelo ANOVA

^b % covarianza

La FIG. 8 compara la biodisponibilidad de EPA (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis de Epanova[®] frente a Lovaza[®] durante el periodo de dietas pobres en grasas, lo que demuestra una AUC_t 13,5 veces mayor para Epanova[®] que para Lovaza[®] durante los periodos de comidas pobres en grasas: 578,2 frente a 42,7 $\mu\text{g} \cdot \text{h}/\text{ml}$, respectivamente ($p < 0,0001$) (los datos de las medias LS se presentan en la Tabla 29 a continuación). La C_{max} de Epanova[®] es 5,6 veces mayor que la de Lovaza[®] ($p < 0,0001$) y la Tmax es un 12 % más corta que la de Lovaza[®] (8 frente a 9 horas, respectivamente; $p = 0,2605$).

Tabla 29								
	Media de mínimos cuadrados						Límites del intervalo de confianza del 90 % (%)	
Parámetro de biodisponibilidad	Epanova®	Lovaza®	Proporción de las medias (%)	Valor p ^a	% C.V. intrasujetos ^b	% C.V. entre sujetos ^b	Inferior	Superior
Cambio ajustado por el valor basal								
AUC _t (µg.h/ml)	578,22	42,67	1355,1	<0,0001	80,8	18,2	1163,8	1546,4
C _{máx} (µg/ml)	52,64	9,45	557,0	<0,0001	83,9	49,8	467,32	646,68
T _{máx} (h)	8,06	9,13	88,28	2605	54,7	25,8	71,02	105,54
Datos del cambio ajustado por el valor basal (transformado Ln) (media geométrica)								
Ln AUC _t (µg.h/ml)	495,66	48,65	457,09	<0,0001	93	23,5	713,46	1283,9
Ln C _{máx} (µg/ml)	39,02	4,66	837,53	<0,0001	102,1	52,3	630,85	1111,9
N=53								
^a el valor p es para la diferencia media por mínimos cuadrados (LS) entre Epanova® y Lovaza® del modelo ANOVA								
^b % covarianza								

La FIG. 9 compara la biodisponibilidad de DHA (cambio ajustado con respecto al valor basal) tras una única dosis de Epanova[®] frente a Lovaza[®] durante el periodo de dietas pobres en grasas, lo que demuestra una AUC_t 2,2 veces mayor para Epanova[®] que para Lovaza[®] durante los periodos de comidas pobres en grasas: 383,1 frente a 173,4 nmol.h/ml, respectivamente ($p < 0,0001$) (datos de las medias LS en la Tabla 30, a continuación). La C_{max} de Epanova[®] es 1,9 veces mayor que la de Lovaza[®] ($p < 0,0001$) y la T_{max} es un 21 % más corta que la de Lovaza[®] (8 frente a 11 horas, respectivamente; $p = 0,0148$). La biodisponibilidad de DHA 2,2 veces mayor en Epanova[®] frente a Lovaza[®] se produjo a pesar de haber un 42% menos de DHA en la formulación de Epanova[®].

Tabla 30								
	Media de mínimos cuadrados						Límites del intervalo de confianza del 90 % (%)	
Parámetro de biodisponibilidad	Epanova®	Lovaza®	Proporción de las medias (%)	Valor p ^a	% C.V. intrasujetos ^b	% C.V. entre sujetos ^b	Inferior	Superior
Cambio ajustado por el valor basal								
AUC _t (µg.h/ml)	383,06	173,4	220,91	< 0,0001	55,2	32,1	192,1	249,72
C _{máx} (µg/ml)	35,5	19,19	185,02	< 0,0001	66	48,3	154,43	215,61
T _{máx} (h)	8,45	10,72	78,84	0,0148	47,3	24	64,82	92,87
Datos del cambio ajustado por el valor basal (transformado Ln) (media geométrica)								
Ln AUC _t (µg.h/ml)	337,09	162,19	207,84	< 0,0001	61	21,4	171,98	251,17
Ln C _{máx} (µg/ml)	30,17	15,0	201,14	< 0,0001	53	42,2	170,73	236,96

N = 53

^a el valor p es para la diferencia media por mínimos cuadrados (LS) entre Epanova® and Lovaza® del modelo ANOVA

^b % covarianza

Las FIGS. 10A y 10B presentan respuestas AUC_{0-t} de sujetos individuales durante las dietas pobres en grasas y ricas en grasas expresadas como la proporción (%) entre AUC_{0-t} de pobres en grasas y AUC_{0-t} de ricas en grasas. Las proporciones negativas no se han representado. Los datos muestran que durante el periodo de dieta pobre en grasas, 30 de 54 (56%) sujetos en tratamiento con Epanova® (ácidos grasos libres) frente a 3 de 52 (6%) en tratamiento con Lovaza® (ésteres de etilo) mantuvieron una AUC_t que era >50 % de la respectiva AUC_t del periodo de dieta rica en grasas.

Se notificaron un total de 51 acontecimientos adversos en 29 sujetos. Los acontecimientos adversos más frecuentes fueron cefaleas (10 sujetos) y heces sueltas o diarrea (9 sujetos). Todos los acontecimientos adversos fueron de gravedad leve y ninguno fue grave. No se produjeron cambios clínicamente significativos en las evaluaciones de laboratorio, constantes vitales y físicas.

6.7.5. Conclusiones

El cambio ajustado por el valor basal en los perfiles de absorción (AUC) de EPA+DHA total y EPA y DHA individual con Epanova® (PUFA omega-3 en forma de ácido libre) fue significativamente mayor que con Lovaza® (ésteres etílicos de PUFA omega-3) durante el periodo de dieta rica en grasas y espectacularmente mejor durante el periodo de dieta pobre en grasas. Adicionalmente, se produjo un impacto muy profundo del contenido en grasas de las comidas sobre la biodisponibilidad de Lovaza®, mientras que la biodisponibilidad de Epanova® fue mucho más predecible, debido a un efecto del alimento únicamente modesto. La mayor biodisponibilidad independiente de las grasas de Epanova® frente a Lovaza® es clínicamente importante, ya que los sujetos con niveles de triglicéridos muy elevados requieren una dieta muy pobre en grasas. Estos hallazgos demuestran una ventaja terapéutica significativa de la composición de ácidos grasos libres omega-3 para el tratamiento de la hipertrigliceridemia grave en vista de la recomendación de la NCEP ATP III de que estos sujetos cumplan una dieta pobre en grasas durante la terapia adyuvante.

6.8. Ejemplo 8: Ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días

Para determinar si los efectos observados después de una única dosis se mantenían después de una dosis repetida se realizó un estudio a más largo plazo. La FIG. 11 es un diagrama de flujo del tratamiento que ilustra el diseño del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días, en el que el fármaco del estudio (Lovaza® o Epanova®) se consumió con un desayuno bajo en grasas. Por el contrario, las dosis se

administraron en ayunas en la rama con niveles bajos de grasas del ensayo ECLIPSE original descrito en el Ejemplo 7.

Tabla 31					
Estudios previos de terceros					
Fármaco	Estudio	Nº de sujetos	N de semanas ^o	Δ EPA (%)	Δ DHA(%)
Éster de etilo omega-3	CK85-013	17	8	276	34
	CK85-014	54	12	300	50
	CK85-017	29	12	300	50
	CK85-019	26	12	200	29
	CK85-022	30	12	233	23
	CK85-023	28	12	139	11
	CK85-95014	30	24	260	54
	CK85-95009	22	16	173	-10*
	CK85-94010	20	6	202	77**
	CK85-95011	49	12	361**	59
	CK85-95012	6	6	156*	40

5 Intervalo de EPA (% Δ): (156*- **209**- 361**)

Intervalo de DHA (% Δ): (-10* **34** 77**)

10 La FIG. 12A representa las concentraciones medias totales sin ajustar de EPA+DHA frente al tiempo (escala lineal) tanto para el tratamiento con Lovaza[®] como para el tratamiento con Epanova[®]. La FIG. 12B es un histograma que muestra la diferencia en los valores de EPA + DHA sin ajustar (nmol/ml) para los puntos de tiempo entre paréntesis en la FIG. 12 A. Las FIGS. 12A y 12B demuestran que tras 14 días de dosis, la acumulación de EPA+DHA de Epanova[®] fue 2,6 veces mayor que en Lovaza[®] en sujetos mantenidos con una dieta pobre en grasas.

15 La FIG. 13 representa las concentraciones plasmáticas totales medias de EPA+DHA ajustadas por el valor basal frente al tiempo (escala lineal) para el tratamiento con Lovaza[®] frente al tratamiento con Epanova[®] en el estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días, lo que demuestra que tras 14 días de dosis

con una comida pobres en grasas, los niveles de EPA+DHA (AUC_{0-24}) de Epanova[®] fueron 5,8 veces mayores que con Lovaza[®] en sujetos mantenidos con una dieta pobre en grasas.

La FIG. 14A es un histograma que representa los incrementos desde el valor basal al equilibrio en los niveles sanguíneos no ajustados para EPA + DHA en las ramas de tratamiento con Lovaza[®] y Epanova[®] del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días, lo que demuestra que los niveles en sangre de EPA + DHA aumentaron un 316% desde el momento basal al equilibrio en la cohorte tratada con Epanova[®] en comparación con el 66% en la cohorte tratada con Lovaza[®]. La FIG. 14B es un histograma que representa los incrementos desde el valor basal al equilibrio en la C_{avg} sin ajustar para EPA + DHA en las ramas de tratamiento con Lovaza[®] y Epanova[®] del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días, lo que demuestra que los niveles de concentración media (C_{avg}) de EPA+DHA aumentaron un 448% desde el momento basal al equilibrio en la cohorte tratada con Epanova[®] en comparación con el 90% en la cohorte tratada con Lovaza[®].

La FIG. 15A es un histograma que representa los incrementos desde el momento basal al equilibrio para los niveles en sangre totales de DHA en las ramas de tratamiento con Lovaza[®] y con Epanova[®] del ensayo de biodisponibilidad comparativo de 14 días, lo que demuestra que los niveles de DHA aumentaron un 19% desde el momento basal al equilibrio en la cohorte tratada con Epanova[®] en comparación con el 34% en la cohorte tratada con Lovaza[®]. La FIG. 15B representa los incrementos desde el momento basal al equilibrio para los niveles de C_{avg} de DHA en la cohorte tratada con Epanova[®] en comparación con la cohorte tratada con Lovaza[®] en el estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días y demuestra los niveles de concentración media (C_{avg}) de DHA aumentó un 157% con respecto al valor basal en la cohorte tratada con Epanova[®] en comparación con el 47% en la cohorte tratada con Lovaza[®].

La FIG. 16A es un histograma que representa los incrementos desde el valor basal al equilibrio en los niveles sanguíneos de EPA total en las ramas de tratamiento con Lovaza[®] y Epanova[®] del estudio de biodisponibilidad comparativo de 14 días y que demuestra que los niveles de EPA aumentaron un 1.021 % desde el momento basal al equilibrio en la cohorte tratada con Epanova[®] en comparación con el 210 % en la cohorte tratada con Lovaza[®]. La FIG. 16B representa los incrementos en la concentración media desde el valor basal al equilibrio y demuestran que los niveles de C_{avg} de EPA aumentaron un 1.465 % con respecto al valor basal en la cohorte tratada con Epanova[®] en comparación con el 297 % en la cohorte tratada con Lovaza[®].

Los datos demuestran que el incremento de la biodisponibilidad observado tras una única dosis en el ensayo ECLIPSE se mantiene, incluso se potencia, durante un periodo mayor (2 semanas). Además, los datos específicos de sujetos desagregados (no mostrados) demuestran que el sujeto con menor respuesta a Epanova[®] todavía tenía una C_{max} de EPA+DHA a 14 días mayor que el sujeto con mejor respuesta a Lovaza[®].

La C_{avg} incrementada y los niveles sanguíneos totales de las especies de PUFA omega-3 clínicamente relevantes alcanzados con Epanova[®] en comparación con Lovaza[®] predice una eficacia significativamente mejorada en cuanto a la disminución de los niveles séricos de triglicéridos y en la reducción del riesgo cardiovascular.

10

6.9. Ejemplo 9: Estudio de 13 semanas en ratas

Este estudio comparó la exposición a omega-3 y su efectos sobre los niveles séricos de lípidos en ratas tratadas con dosis equivalentes de Epanova[®] o LOVAZA[®] durante 13 semanas.

La rata Sprague Dawley se seleccionó para este estudio porque era la cepa de rata usada en el programa de toxicología realizado con Lovaza[®] y, por tanto, permitió una comparación directa de los datos del presente estudio con Epanova[®] con los datos de toxicidad en ratas disponibles públicamente en la Base Resumen para la Aprobación de Lovaza[®]. El diseño del estudio proporcionó una sólida evaluación de la toxicología de Epanova[®] con selecciones de la dosis basadas en los datos de toxicidad en ratas disponibles públicamente para Lovaza[®] (dosis máxima tolerada = 2.000 mg/kg). Las ratas Sprague Dawley proporcionan un modelo que se ha reconocido que predice los efectos de los PUFA omega-3 sobre los cambios lipídicos para triglicéridos y de colesterol total en sujetos humanos. Los resultados a 13 semanas se muestran en la tabla 32 siguiente.

25

Tabla 32							
Tratamiento	Sexo	Exposición a DHA ^a		Exposición a EPA ^a		TG (% de la diferencia con respecto al control)	Colesterol (% de diferencia con respecto al control)
		AUC _(0-t) (µg.h/ml)	C _{máx} (µg/ml)	AUC _(0-t) (µg.h/ml)	C _{máx} (µg/ml)		
Epanova®	M	15,56	1,82	14,02	2,15	-32	-45
	F	13,00	2,05	9,50	1,38	-53	-41
	Ambos	14,28	1,94	11,76	1,77	-43	-43
Lovaza®	M	6,55	0,47	7,57	0,73	-14	-25
	F	4,97	0,40	6,04	0,55	-38	-36
	Ambos	5,76	0,43	6,81	0,64	-26	-31

AUC₍₀₋₄₎ Área bajo la curva de la concentración plasmática - tiempo hasta el tiempo de la última muestra. Medida de la exposición sistémica

C_{máx} Concentración plasmática máxima.

^a Valores normalizados de la dosis en base a las dosis estimadas de DHA y EPA

Como se muestra en la Tabla 32, Epanova[®] no solo proporcionó concentraciones plasmáticas máximas marcadamente mayores de DHA y EPA que con Lovaza[®], sino que también proporcionó AUC_(0-t) marcadamente mayor para las dos especies de omega-3; la AUC_(0-t) es una medida de la exposición sistémica. La mayor biodisponibilidad y exposición sistémica a largo plazo de estas dos especies de PUFA omega-3 con el tratamiento con Epanova[®] tuvo como resultado diferencias a largo plazo en la eficacia en lo que respecta a la disminución de lípidos, donde Epanova[®] efectuó reducciones sustancialmente mayores en los niveles de triglicéridos en plasma y de colesterol total que los observados con LOVAZA[®]. Las composiciones descritas en el presente documento proporcionan de este modo una eficacia mayor con respecto a dos parámetros cardiovasculares clínicamente importantes.

6.10. Ejemplo 10: Ensayo EVOLVE

6.10.1. AGENTES FARMACOLÓGICOS

FÁRMACO DEL ESTUDIO (Epanova[®]) – Se prepararon cápsulas de gelatina blanda porcina de tipo A recubiertas con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG), cada una con un gramo (1 g) de una composición de PUFA que comprende 3 PUFA omega-3 en forma de ácido libre (“API”). Las cápsulas se recubrieron con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). El API tenía la composición indicada en el lote 2 de la Tabla 10 (véase el ejemplo 4 anterior).

PLACEBO – Se prepararon cápsulas que contenían aceite de oliva para usar como control.

6.10.2. Diseño del estudio

Se realizó un estudio doble ciego, de 12 semanas de duración controlado con aceite de oliva en EE.UU., Dinamarca, Hungría, India, Países Bajos, Rusia y Ucrania. Los sujetos se seleccionaron en base a los niveles altos de triglicéridos en el intervalo de 500-2.000 mg/dl. Los sujetos se seleccionaron aleatoriamente para recibir 2, 3 o 4 gramos de Epanova[®] o 4 gramos de aceite de oliva como placebo. El diseño del ensayo general se ilustra en la FIG. 17 y en la FIG. 18 se proporciona un diagrama de flujo más detallado que identifica adicionalmente la cronología de las visitas del estudio. El criterio de valoración principal del estudio fue el cambio porcentual de los niveles plasmáticos de triglicéridos desde el momento basal al final del tratamiento (“EOT”). El criterio de valoración secundario fue el cambio porcentual de los niveles plasmáticos de colesterol no HDL (“no-HDL-C”) desde el momento basal al EOT.

6.10.3. Resultados

La FIG. 19 muestra la disposición de todos los sujetos, donde “AA” es la abreviatura de “acontecimiento adverso” y “AAG” es la abreviatura de “acontecimiento adverso grave”.

Un total de 1.356 sujetos se sometieron a detección selectiva inicial y, de estos, se seleccionó a 399 para participar en el estudio. De los 399 sujetos, 99 recibieron aceite de oliva como placebo, 100 recibieron 2 g/día de Epanova[®], 101 recibieron 3 g/día de Epanova[®] y 99 recibieron 4 g/día de Epanova[®]. La Tabla 22 muestra los niveles promedio de triglicéridos (TG) y colesterol para los sujetos en el momento de la aleatorización (antes del tratamiento) en comparación con los niveles deseables, como se describe en el Tercer Informe del Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de niveles altos de colesterol en sangre en Adultos (Panel de tratamiento de adultos III), producido por el National Heart Lung and Blood Institute.

Tabla 33					
Parámetro	Deseable (mg/dl) ¹	Pacientes aleatorizados para el ensayo			
		4 g/día	-{- 3 g/día	2 g/día	Aceite de oliva
TG	< 150	655	715	717	686
HDL-C	> 40	29	28	27	29
LDL-C	< 100	90	81	77	78
No-HDL-C	< 130	225	215	205	215
VLDL-C	< 30	126	124	123	125

¹NCEP ATP III, Septiembre de 2002

De los pacientes que recibieron aceite de oliva, un total de cinco se retiraron del estudio por las siguientes razones: retirada del consentimiento (1), pérdida para el seguimiento (1) y otras razones (3). De los pacientes que recibieron Epanova[®] 2 g/día, un total de siete se retiraron del estudio por las siguientes razones: efectos adversos (5), retirada del consentimiento (1) y otras razones (3). De los pacientes que recibieron Epanova[®] 3 g/día, un total de 14 se retiraron debido a: efectos adversos (7), incumplimiento (2), retirada del consentimiento (1), perdidos para el seguimiento (3) y otras razones (1). De los pacientes que recibieron Epanova[®] 4 g/día, 9 se retiraron debido a: efectos adversos (5), incumplimiento (1), retirada del consentimiento (2) y otras razones (1).

Epanova® alcanzó el criterio de valoración principal de reducción de triglicéridos y el criterio de valoración secundario de reducción de no-HDL-Colesterol (niveles de colesterol total menos el nivel de HDL-colesterol) (“no-HDL-C”) a todas las dosis y produjo reducciones estadísticamente significativas en múltiples marcadores establecidos de aterogenicidad: Apo B, Apo CIII, RLP y LpPLA2. En pacientes en tratamiento concomitante con estatinas, Epanova® proporcionó una eficacia aditiva sobre los parámetros lipídicos principales: TG; no-HDL-C; HDL-C; colesterol total (TC) y TC/HDL-C.

Los niveles plasmáticos de EPA, DHA, and DP A , las tres especies de PUFA omega 3 de cadena larga de mayor abundancia en Epanova®, se midieron en el momento basal y al final del tratamiento (EOT), así como los niveles plasmáticos del PUFA omega-6 de cadena larga, ácido araquidónico. La Tabla 34 siguiente tabula por separado los niveles plasmáticos basales promedio, basales mediana, promedio al final del tratamiento (EOT) y mediana EOT para EPA, DHA, DP A y AA, así como TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C y LDL-C.

Los niveles plasmáticos basales de EPA, DHA, DPA y AA indican una aleatorización eficaz de los sujetos entre las ramas de tratamiento. Las proporciones de EPA:AA basales fueron de aproximadamente 0,10 (véase la Tabla 37, a continuación).

Las FIGS. 20A - 20E representan los niveles plasmáticos promedio basales y al final del tratamiento (“EOT”) (en µg/ml) para EPA (FIG. 20A), DHA (FIG. 20B), DPA (FIG. 20C) y AA (FIG. 20D), para cada una de las ramas de tratamiento en el ensayo EVOLVE. La FIG. 20E compara los niveles promedio basales y de EOT a EPA para cada rama de tratamiento y la rama control (aceite de oliva) a valores notificados anteriormente para ECLIPSE (véase el Ejemplo 7), estudio de biodisponibilidad de 14 días (véase el Ejemplo 8), un estudio de interacción fármaco-fármaco estatina (Estatina DDI) y el ensayo no relacionado JELIS realizado por otros investigadores con una formulación de PYFA omega-3 diferente (“JELIS”. Observe que los sujetos japoneses del ensayo JELIS tenían niveles basales de EPA más altos. Las FIGS. 21 A - 21D representan la mediana de los niveles plasmáticos basales y al final del tratamiento (EOT) (en µg/ml) para EPA (FIG. 21 A), DHA (FIG. 21B), DPA (FIG. 21C) y AA (FIG. 21D).

Tabla 34 (niveles plasmáticos absolutos basales y en EOT)					
		Basal (Promedio)	EOT (Promedio)	Basal (Mediana)	EOT (Mediana)
EPA (µg/ml)	2g	36,6	126,8	26,7	104
	3g	41,4	174,7	30,7	141,9
	4g	38,9	199,7	25,7	170
DHA (µg/ml)	2g	106,6	159,9	93,5	148,3
	3g	113,7	183,6	97,4	156,9
	4g	104,8	188,8	91,8	169,1
DPA (µg/ml)	2g	37,6	61,77	35,23	54,59
	3g	38,71	69,36	34,71	58,56
	4g	36,84	69,73	32,53	66,03
AA (µg/ml)	2g	377,9	327,4	358,4	279,2
	3g	394,9	344	368,8	313,8
	4g	393,9	298,1	363,4	274,2
TG (mg/dl)/	2g	760,1	608,7	669	554
	3g	766,9	754,5	612	560,8
	4g	730,5	557,2	631	511
No-HDL-C (mg/dl)	2g	219,6	208,2	205,3	209,3
	3g	223,4	221,5	215,3	197
	4g	230,7	214,1	225	211
HDL-C (mg/dl)	2g	28	30,7	27,3	29
	3g	29,1	30,4	28	28
	4g	29,9	32,2	28,7	29
V-LDL-C (mg/dL)	2g	138,1	106,9	123,3	98
	3g	143	121,5	124	93,8
	4g	143,9	100,7	126	87
LDL-C (mg/dl)	2g	83,1	101,3	77,3	93,3
	3g	84,9	99,7	81	95
	4g	90,4	113,4	90,3	109,5
ApoB (mg/dl)	2g	115,6	121,1	114	120
	3g	114,5	116	112	115
	4g	119,3	126,6	118	121,5

Tabla 34 (niveles plasmáticos absolutos basales y en EOT)					
		Basal (Promedio)	EOT (Promedio)	Basal (Mediana)	EOT (Mediana)
ApoCIII (mg/dl)	2g	26,5	24,3	22	21
	3g	27,8	25	27	21
	4g	27,5	22,7	27	21
RLP (mg/dl)	2g	55,5	49,7	49,7	37
	3g	62,7	54,4	54,4	34,5
	4g	58,1	43,4	43,4	33
LpPLA2 (ng/ml)	2g	270,6	236,7	266	225
	3g	271,2	241,4	244,5	223,5
	4g	266,9	223,2	249	208

La Tabla 35 siguiente tabula el cambio promedio y la mediana del cambio en los niveles plasmáticos absolutos desde el momento basal hasta el EOT para EPA, DHA, DP A y AA, así como TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C y LDL-C.

Tabla 35									
	AA (µg/ml)	EPA (µg/ml)	DPA (µg/ml)	DHA (µg/ml)	TG (mg/dl)	no-HDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
Cambio promedio desde el momento basal al EOT									
2 g	-50,5	90,2	24,2	53,3	-183,6	-13,3	2,6	-31,2	18,0
3g	-50,9	133,3	30,7	69,9	-69,0	-6,1	1,7	-21,9	15,5
4g	-95,8	160,8	32,9	84,0	-220,2	-21,9	2,1	-42,5	21,7
Mediana del cambio desde el momento basal al EOT									
2g	-79,2	77,3	19,4	54,8	-172,2	-16,0	1,7	-31,5	14,8
3g	-55,0	111,2	23,9	59,5	-150,1	-6,7	1,8	-25,3	11,9
4g	-89,2	144,3	33,5	77,3	-178,0	-17,0	1,7	-37,7	22,3

Las FIGS. 22A, 22B, 26 A y 26B representan los datos en la tabla anterior, que muestra el cambio desde el momento basal al EOT en los niveles plasmáticos absolutos (en $\mu\text{g/ml}$) de AA, DHA, EPA y DPA, para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE; la FIG. 22A los cambios promedio y la FIG. 22B muestra la mediana de los cambios con respecto al valor basal.

La Tabla 36A siguiente tabula por separado el cambio porcentual en los niveles plasmáticos basales promedio, mediana y media de mínimos cuadrados , promedio al final del tratamiento (EOT) y mediana de EPA, DHA, DPA y AA, así como TG, NHDL-C, HDL-C, VLDL-C y LDL-C, para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE.

La Tabla 21B, siguiente, tabula por separado el cambio porcentual desde el momento basal al EOT y el cambio medio por LS en los niveles plasmáticos promedio y mediana de ApoB, ApoCIII, LpPLA2 y RLP, para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE.

15

Tabla 36A									
	AA (µg/ml)	EPA (µg/ml)	DPA (µg/ml)	DHA (µg/ml)	TG (mg/dl)	non-HDL-C (mg/dl)	HDL-C (mg/dl)	VLDL-C (mg/dl)	LDL-C (mg/dl)
Cambio promedio desde el momento basal al EOT									
2g	-10,5	410,8	86,08	69	-21,2	-5,4	10	-21,2	25,6
3g	-11,2	538,1	96,59	88,4	-14,1	-3,4	5,6	-18,6	20
4g	-18	778,3	131,66	106	-25,2	-8	7,2	-27,5	26,2
Medianta del cambio desde el momento basal al EOT									
2g	-15,6	253,9	75,3	61,2	-25,8	-7,7	7	-24,7	21,4
3g	-17,9	317	68,6	61,9	-21,7	-3,2	6,2	-21,5	15,5
4g	-25,9	404,8	74,87	65,5	-30,7	-7,7	5	-34,7	26,2
Media LS del cambio en porcentaje									
2g	-15,14	267,04	--	56,72	-26,47	-7,77	7,46	-27,05	19,35
3g	-15,98	331,86	--	64,07	-24,38	-6,49	3,33	-25,62	13,94
4g	-23,2	406,32	--	71,77	-31,1	-9,76	5,71	-33,23	19,36

Tabla 36B				
	ApoB	ApoCIII	LpPLA2	RLP
Cambio porcentual promedio desde el momento basal al EOT				
2g	5,9	-8,3	-11,3	-0,9
3g	4,6	-8,5	-8,8	-6,9
4g	5,7	-9,8	-14,1	-10
Mediana del cambio porcentual desde el momento basal al EOT				
2g	6,3	-8,7	-11,3	-20,2
3g	5,6	-12,8	-9,5	-16,2
4g	5,7	-15	-14,6	-28,2
Media LS del cambio (%)				
2g	3,84	-10,87	-14,93	-20,67
3g	2,28	-12,16	-11,06	-22,63
4g	3,78	-14,39	-17,17	-27,52

La FIG.23A representa el cambio medio desde el momento basal a EOT, en forma del porcentaje del valor basal, para AA, DHA, EPA y DPA en cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE y la FIG. 23B representa la mediana del cambio porcentual desde el momento basal al EOT.

La Tabla 37 siguiente presenta las proporciones de EPA/AA al principio y al final del tratamiento para cada una de las ramas de tratamiento del ensayo EVOLVE.

Tabla 37		
Proporciones EPA/AA		
	Basal	EOT
promedio		
2 g	0,096851	0,387294
3 g	0,104837	0,507849
4 g	0,098756	0,669909
mediana		
2 g	0,074498	0,372493
3 g	0,083243	0,452199
4 g	0,070721	0,619985

Como se puede ver en las Tablas 35 y 36A y las FIGS. 20 – 23, el tratamiento de 12 semanas con Epanova[®] produjo espectaculares incrementos en los niveles plasmáticos de EPA, DHA, and DP A. Por ejemplo, a la dosis de 2 g, el cambio porcentual promedio desde el momento basal a EOT en los niveles plasmáticos de EPA fue de 411%; a la dosis de 4 g fue de 778%. La mediana del cambio porcentual en los niveles plasmáticos de EPA fueron, respectivamente, 254 % y 405 %. A la dosis de 2 g, el cambio porcentual promedio desde el momento basal a EOT en los niveles plasmáticos de DHA fue del 69%; a la dosis de 4 g, el cambio porcentual promedio fue de 106%. La mediana del cambio porcentual en los niveles plasmáticos de DHA parece menos espectacular, con un cambio del 61,2% a 2 g de Epanova[®] y un cambio del 65,5% a 4 g.

Los incrementos en los niveles plasmáticos de EPA, DHA y DPA se acompañaron de reducciones significativas en los niveles plasmáticos de AA, de modo que el régimen de dosis de 4 g efectúa una reducción media de 95,8 µg/ml y una mediana de la reducción de 89,2 µg/ml, que corresponden a una reducción porcentual promedio del 18%, una mediana del cambio porcentual del 25,9% y un cambio medio LS de 23,2%. Cabe destacar que la disminución de los niveles plasmáticos de ácido araquidónico se observaban a pesar de la administración de ácido araquidónico exógeno, que estaba presente a 2,446 % (a/a) en el lote de Epanova[®] usado en este ensayo.

El incremento en los niveles plasmáticos de EPA y la reducción concomitante en los niveles plasmáticos de AA producen una mejora significativa en la proporción EPA/AA, como se muestra en la Tabla 37, de aproximadamente 0,10 en el momento basal a aproximadamente 0,67 (promedio) y 0,62 (mediana) en el EOT a la dosis de 4 g.

Adicionalmente, el tratamiento con Epanova[®] tuvo como resultado sustanciales reducciones de los niveles de TG, como se muestra en la FIG. 26A y la FIG. 26B, que representan el promedio y la mediana, respectivamente, para el cambio absoluto con respecto al valor basal. La FIG. 27 ilustra el porcentaje de sujetos que exhibieron una reducción de 0-10% de los niveles de TG, una reducción de 10-20% de los niveles de TG, una reducción de 20-30% de los niveles de TG, una reducción de 30-40% de los niveles de TG, una reducción de 40-50% de los niveles de TG y una reducción superior al 50% en los niveles de TG, para las dosis de 2 g y 4 g de Epanova[®].

Las FIG. 26A and FIG. 26B también muestran que los niveles de no-HDL-C y VLDL-C se habían reducido, mientras que los niveles de HDL-C estaban elevados. Los niveles de LDL-C también estaban elevados, una medición que es probable que se deba a un incremento del tamaño de partícula de LDL tras el tratamiento (que se trata más

adelante en el ejemplo 12). El promedio y la mediana de los cambios porcentuales se muestran en la FIG. 28A y la FIG. 28B, respectivamente.

Los niveles promedio absolutos basales y al EOT se representan en las FIGS. 24A – 24I para TG (FIG. 24A), Non-HDL-C (FIG. 24B), HDL-C (FIG. 24C), V-LDL-C (FIG. 24D), LDL-C (FIG. 24E), ApoB (FIG. 24F), ApoCIII (FIG. 24G), RLP (FIG. 24H) y LpPLA2 (FIG. 24I). La mediana de los niveles absolutos basales y al EOT se representan en las FIGS. 25A – 25I para TG (FIG. 25A), No-HDL-C (FIG. 25B), HDL-C (FIG. 25C), V-LDL-C (FIG. 25D), LDL-C (FIG. 25E), ApoB (FIG. 25F), ApoCIII (FIG. 25G), RLP (FIG. 25H) y LpPLA2 (FIG. 25I).

La extremadamente elevada biodisponibilidad de los PUFA omega-3 en Epanova[®] reveló diferencias en la respuesta farmacocinética entre las diversas especies en plasma. La FIG. 29 representa la velocidad del cambio en la mediana del cambio en porcentaje con respecto al valor basal de los niveles plasmáticos de EPA, DHA, DPA, AA, TG, no-HDL-C y HDL-C (valor absoluto) entre las dosis de 2 g y 4 g de Epanova[®]. La Tabla 38 siguiente tabula los resultados:

Tabla 38 (velocidad del cambio en la mediana del cambio porcentual con respecto al valor basal) (valor absoluto)						
EPA	DHA	DPA	AA	TG	non-HDL-C	HDL-C
0,59432847	0,07026143	0,00571049	0,66025641	0,189922	0	0,285714

Con poco o ningún incremento en los niveles plasmáticos de DHA y DPA después de la duplicación de la dosis de Epanova[®] de 2 g a 4 g al día, la velocidad del cambio (pendiente) en la mediana del cambio en porcentaje con respecto al valor basal es casi cero, lo que predice que se observará poco incremento adicional de los niveles plasmáticos de DHA y DPA tras un incremento adicional de la dosis. Se observa una formación de equilibrio similar de la respuesta en los niveles de triglicéridos, niveles de HDL-C y niveles de non-HDL- C (datos no mostrados).

Por el contrario, la velocidad de cambio para EPA sigue siendo alta, con una pendiente de 0,59; cabe esperar que se obtengan más incrementos de los niveles plasmáticos de EPA aumentando la dosis de Epanova[®] por encima de 4 g al día. Significativamente, la velocidad del cambio en los niveles de AA tras la duplicación de la dosis de Epanova[®] de 2 g a 4 g al día es todavía mayor que la observada para EPA; cabe esperar que se produzcan más reducciones en los niveles plasmáticos de AA a medida que se incrementa la dosis de Epanova[®] por encima de 4 g/día. Por tanto,

Epanova[®] exhibe una potencia sin precedentes en la capacidad para reducir los niveles de AA.

Un resumen de los resultados del ensayo EVOLVE se tabula en la Tabla 39 que figura a continuación.

Tabla 39														
	OO (n=98) 2		gramos (n=99)				3 gramos (n=97)				4 gramos (n=99)			
	Basal (mg/dl)	%A	Basal (mg/dl)	%A	Valor p	LSM Respecto A	Basal (mg/dl)	%A	Valor p	LSM Diferencia Respecto A	Basal (mg/dl)	%A	Valor p	LSM respecto a
TG	686,3	-10,4	717	-25,8	0,003	-22,1	715	-21,7	0,021	-20	655	30,7	< 0,001	-26,7
No-HDL-C	214,5	-0,9	205,3	-7,7	0,018	-10,3	215,3	-3,2	0,042	-9	225	-7,7	0,002	-12,2
HDL-C	28,7	2,2	27,3	7	0,088	5,5	28	6,2	0,127	1,4	28,7	5	0,127	3,7
TC/HDL-C	8,8	-1,9	8,8	-9,5	0,024	-11,8	8,8	-7,2	0,137	-7,7	9	-14,1	0,004	-12,9
LDL-C	78,2	9,8	77,3	21,4	0,003	16,2	81	15,5	0,092	10,8	90,3	26,2	< 0,001	16,3
VLDL-C	124,5	-11,3	123,3	-24,7	0,006	-18,4	124	-21,5	0,017	-17	126	-34,7	< 0,001	-24,6
ApoB	110	2,3	114	6,3	0,344	3	112	5,6	0,834	1,4	118	5,7	0,449	2,9

El ensayo EVOLVE también demostró que la apolipoproteína CIII (ApoCIII) se había reducido significativamente mediante el tratamiento con Epanova[®]. La ApoCIII inhibe la actividad de lipoproteína lipasa y la captación hepática de lipoproteínas ricas en triglicéridos. Se ha descubierto que los niveles elevados de ApoCIII son un predictor independiente de riesgo cardiopatía cardiovascular (CHD), mientras que niveles reducidos genéticamente de ApoCIII se asocian con protección frente a la CHD.

Se ha demostrado que las formulaciones de ácido graso omega-3 que contienen DHA aumentan los niveles de LDL-C en pacientes con hipertrigliceridemia grave (Kelley y col., 2009, J Nutrition, 139(3):495- 501). Este efecto sobre LDL-C se ha postulado como un resultado del incremento del tamaño de las partículas de lipoproteínas (Davidson y col., 2009, J Clin. Lipidology, 3(5):332 - 340). Los datos clínicos sugieren que el ácido eicosapentaenoico (EPA) solo, a una dosis que disminuye los niveles de triglicéridos en una medida similar a EPA + DHA, no eleva los niveles de LDL-C y tampoco disminuye los niveles de ApoCIII (Homma y col., 1991, Atherosclerosis, 91 (1): 145- 153).

La FIG. 34 muestra la correlación entre el cambio porcentual en los niveles de LDL y el cambio porcentual de los niveles de ApoCIII para datos procedentes del ensayo EVOLVE. Se obtuvo un coeficiente de correlación de Pearson de -0,28 cuando estos datos se ajustaron usando una regresión lineal, lo que demuestra que los incrementos de los niveles de LDL se correlacionaban con disminuciones de los niveles de ApoCIII tras el tratamiento con Epanova[®]. Estos resultados son consistentes con informes previos de incrementos de LDL tras la administración de DHA, una observación que se puede atribuir al incremento del tamaño de partícula de las lipoproteínas. Los efectos de Epanova[®] sobre el tamaño de partícula de las lipoproteínas se tratan adicionalmente más adelante en el Ejemplo 12.

Una subpoblación de sujetos, mostrada en la Tabla 40, exhibió un incremento mayor del 800% de EPA con una disminución menor del 5% en los niveles de triglicéridos. Este fracaso en la respuesta puede atribuirse, probablemente, a una deficiencia o defecto funcional en la enzima lipoproteína lipasa (LPL) de tipo 1. La LPL hidroliza triglicéridos presentes en los quilomicrones en ácidos grasos libres y se sabe que la alteración de la LPL está asociada con una hipertrigliceridemia grave (Fojo y Brewer, 1992, J. of Int. Med. 231 :669 - 677). Los sujetos que exhiben un incremento sustancial de EPA tras el tratamiento con Epanova[®] acompañado de un cambio minoritario en los parámetros clínicos, tales como los niveles de triglicéridos, los

niveles de AA etc., se pueden clasificar como no respondedores. Dichos sujetos se pueden retirar del tratamiento con Epanova[®].

Tabla 40										
PAIS del sujeto	Dosis	IM C	TG BASALES (mg/dl)	TG EOT (mg/dl)	% cambio de TG con respecto al valor basal	EPA BASAL (mcg/ml)	EPA EPT (mcg/ml)	Cambio % de EPA con respecto a al valor basal	Basal HbA1c	EOTHbA1c
Hungría	2	32,4	778	831	6,8	18,4	171,4	832	7,3	8,1
Hungría	2	33,4	924	937	1,4	11,4	133,6	1067	5,9	6,2
Hungría	2	36,2	782	803	2,6	12,5	173,6	1288	6	5,6
Rusia	2	31,2	857	1723	101,1	22,1	243,7	1001	5,6	6,2
Países Bajos	2	27,1	511	589	15,2	15,4	257,4	1572	5	5
India	2	25,1	460	544	18,4	4,6	79,9	1632	6,7	6,6
EE.UU.	3	34,6	1047	1077	2,8	16,7	273,7	1543	6	5,6
EE.UU.	3	36	622	687	10,3	16,4	193,8	1080	6,6	7,2
EE.UU.	3	31	838	870	3,8	14,3	151,2	961	5,6	6,1
EE.UU.	3	40,8	888	995	12	61,8	650,6	953	8	8,7
Hungría	3	36,3	484	463	-4,3	10,1	185,3	1740	6,1	6
Hungría	3	29,6	647	627	-3,1	8,6	110,3	1177	6,2	6,3
Hungría	3	36,6	851	1016	19,3	10,4	94,4	811	8,2	8,6
Hungría	3	28,6	707	730	3,2	8,3	408,5	4827	5,8	6

Tabla 40										
PAIS del sujeto	Dosis	IM C	TG BASALES (mg/dl)	TG EOT (mg/dl)	% cambio de TG con respecto al valor basal	EPA BASAL (mcg/ml)	EPA EPT (mcg/ml)	Cambio % de EPA con respecto a al valor basal	Basal HbA1c	EOTHbA1c
Hungría	3	32,8	2158	2273	5,3	24,5	480,1	1863	5,6	5,1
Hungría	3	31,7	1034	992	-4,1	10,6	280,5	2538	5,3	5,5
Hungría	3	34,8	976	1110	13,7	22,4	224,8	905	7,3	7,9
Hungría	3	28,8	728	1210	66,1	22,4	289	1071	7,1	7,9
Ucrania	3	36,2	1664	10317	520,1	91,9	1238,8	1248	8,1	10,8
Hungría	4	30,1	714	702	-1,7	11,1	256,7	2214	5,1	5,4
Hungría	4	31,7	785	1300	65,6	11,7	466	3886	8,5	10,9
Hungría	4	27,3	513	527	2,6	16,6	198,3	1093	7,8	8
Hungría	4	31,9	508	625	23,2	3,5	198,4	5504	6	7,3
Ucrania	4	33,6	563	589	-2,5	34,9	327,9	841	7	7,3
Rusia	4	29,7	664	702	5,7	38,2	795,2	1984	5,5	5,1
Rusia	4	41,6	483	504	4,3	10,9	231,1	2026	6,2	6,3
India	4	32,8	839	1721	105	13,8	1066,6	7624	5,6	5,2

6.11. Ejemplo 11: Ensayo de interacción fármaco-fármaco estatina

6.11.1. AGENTES FARMACOLÓGICOS

FÁRMACO DEL ESTUDIO (Epanova[®]) – Se prepararon cápsulas de gelatina blanda porcina de tipo A recubiertas con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG),
 5 cada una con un gramo (1 g) de una composición de PUFA que comprende 3 PUFA omega-3 en forma de ácido libre (“API”). Las cápsulas se recubrieron con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). El API tenía la composición indicada en el lote 3 de la Tabla 9 (véase el ejemplo 4 anterior).

FÁRMACO DEL ESTUDIO ((Zocor[®]) – los comprimidos de 40 mg de
 10 simvastatina producidos por Merck Sharp & Dohme Ltd. se obtuvieron de una fuente comercial.

FÁRMACO DEL ESTUDIO (Aspirin[®]) – los comprimidos con recubrimiento entérico producidos por Bayer HealthCare Pharmaceuticals se obtuvieron de una fuente comercial.

15 6.11.2. Diseño del estudio

Se diseñó un estudio abierto, aleatorizado, con grupos cruzados de 2 vías para evaluar el efecto de múltiples dosis de Epanova[®] sobre la farmacocinética de múltiples dosis de simvastatina en sujetos normales sanos. En ambas ramas del estudio también se administraron a diario dosis bajas de aspirina (81 mg).

20 La condición de tratamiento “A” consistió en la coadministración de una dosis oral de 40 mg de simvastatina (1 comprimido), 81 mg de aspirina (1 comprimido) y 4 g (4 cápsulas) de Epanova[®], una vez al día (cada 24 horas) con 240 ml de agua por la mañana los días 1 a 14, para un total de 14 dosis, en condiciones de ayuno. La condición de tratamiento “B” consistió en la administración de una dosis oral de 40 mg
 25 de simvastatina (1 comprimido) y 81 mg de aspirina (1 comprimido) una vez al día (cada 24 horas) con 240 ml de agua por la mañana los días 1 a 14, para un total de 14 dosis, en condiciones de ayuno. Se produjo un lavado de 14 días entre tratamientos.

Se reclutó y aleatorizó con respecto al orden de tratamiento a un total de 52 sujetos. De estos, 46 participantes eran hispanos.

30 Se extrajo sangre para medir los niveles plasmático de ácidos grasos (EPA, DHA, AA) en el momento de la entrada (día -1) y de la salida (día 15) tras la rama de tratamiento con Epanova[®] (tratamiento “A”). El genotipado se realizó en varios SNP identificados anteriormente, incluyendo SNP en el gen FADS1 (p. ej., rs174546), incluyendo un SNP asociado con la conversión de DGLA en AA (SNP rs174537), el gen
 35 FADS2 y el gen Scd-1

6.11.3. Resultados

Los niveles plasmáticos promedio basales y al final del tratamiento ("EOT") (en $\mu\text{g/ml}$) para los niveles de EPA se muestran en la FIG. 20E.

La FIG. 56 muestra los niveles plasmáticos de ácido araquidónico (AA) para los sujetos agrupados de acuerdo con el genotipo en el SNP rs 174546, en el momento basal (A) en $\mu\text{g/ml}$ y (B) el día 15 de tratamiento con Epanova® (en cambio porcentual con respecto al valor basal). Para cada genotipo, el intervalo intercuartílico se indica con un recuadro, la mediana está indicada por una línea horizontal en el interior del recuadro intercuartílico y la media se representa con un rombo. Las desviaciones se representan con círculos abiertos. Los bigotes extienden al valor mínimo y máximo no desviado. La puntuación 1 identifica los sujetos que son homocigotos en el alelo principal; la puntuación 3 identifica los sujetos homocigotos en el alelo minoritario; y la puntuación 2 representa los heterocigotos.

Antes del tratamiento, la población hispana tenía una prevalencia mayor de homocigotos TT (41%) en comparación con los homocigotos CC (24%) para el SNP rs174546. Esto correspondió a niveles significativamente diferentes de EPA (CC= 18 $\mu\text{g/ml}$; CT=11 $\mu\text{g/ml}$; TT=7 $\mu\text{g/ml}$, $p<0,0001$) y ácido araquidónico (AA) (CC=266 $\mu\text{g/ml}$; CT=202 $\mu\text{g/ml}$; TT=167 $\mu\text{g/ml}$, $p<0,0001$) en los genotipos.

En respuesta al tratamiento con Epanova® se observó un incremento sustancial en EP y el incremento porcentual más elevado en el genotipo TT (TT: 1054 %, CT:573 %, CC:253 %).

6.12. Ejemplo 12: Ensayo ESPRIT

6.12.1. AGENTES FARMACOLÓGICOS

FÁRMACO DEL ESTUDIO (Epanova®) – Se prepararon cápsulas de gelatina blanda porcina de tipo A recubiertas con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG), cada una con un gramo (1 g) de una composición de PUFA que comprende 3 PUFA omega-3 en forma de ácido libre ("API"). Las cápsulas se recubrieron con Eudragit NE 30-D (Evonik Industries AG). El API tenía la composición indicada en el lote 3 de la Tabla 9 (véase el ejemplo 4 anterior).

PLACEBO – Se prepararon cápsulas que contenían aceite de oliva para usar como control.

6.12.2. Diseño del estudio

Como se muestra en la FIG. 38, una subpoblación de sujetos en la rama de tratamiento con 2 g del ensayo EVOLVE que estaban recibiendo tratamiento concurrente con estatinas mostró cambios porcentuales de mayor magnitud (diferencia

en la media LS), respecto al control, para TG, non-HDL-C, HDL-C, LDL-C, TC, VLDL-C y TC/HDL-C, en comparación con los sujetos en la rama de tratamiento con 2 g que no recibieron tratamiento concurrente con estatinas. Los sujetos en tratamiento concurrente con estatinas mostraron una respuesta a Epanova[®] dependiente de la dosis, como se indica en los datos comparativos para 2 g de Epanova[®] y para 4 g de Epanova[®] que se muestra en la FIG. 39.

Como un seguimiento de la eficacia potenciada observada para Epanova[®] junto con tratamiento con estatinas, el ensayo clínico ESPRIT se realizó con pacientes del estudio en tratamiento basal con estatinas. Como se muestra en la FIG. 40, se seleccionó a los pacientes para el estudio ESPRIT en base a los niveles de TG entre 200 - 500 mg/dl y tratamiento basal con estatinas. De los 660 pacientes seleccionados para el ensayo, 220 fueron tratados con aceite de oliva como placebo, 220 fueron tratados con dosis de 2 g de Epanova[®] y 220 fueron tratados con dosis de 4 g de Epanova[®]. Todos los tratamientos de placebo y Epanova[®] se administraron además del tratamiento basal con estatinas.

La Tabla 41, a continuación, muestra los niveles basales de TG, HDL-C, LDL-C, no-HDL-C y VLDL-C para los sujetos del ensayo ESPRIT en comparación con los niveles deseables, como se describe en el Tercer Informe del Panel de Expertos sobre Detección, Evaluación y Tratamiento de niveles altos de colesterol en sangre en Adultos (Panel de tratamiento de adultos III), producido por el National Heart Lung and Blood Institute.

Tabla 41				
	Deseable (mg/dl)	2 g/día	4 g/día	Aceite de oliva (OO)
TG	< 150	265	265	269
HDL-C	>40	38	37	38
LDL-C	< 100	92	91	87
Non-HDL-C	< 130	139	135	132
VLDL-C	< 30	42	43	42

6.12.3. Resultados

La FIG. 41 ilustra la disposición de los pacientes para el ensayo ESPRIT, que muestra que 6 pacientes se retiraron de la rama de placebo, 6 pacientes se retiraron de la rama de tratamiento de 2 g y 12 pacientes se retiraron de la rama de tratamiento de 4 g.

El número de pacientes que experimentaron efectos adversos (AA) fue bajo en general, con 2 en la rama de placebo, 3 en la rama de tratamiento con 2 g y 7 en la rama de tratamiento con 4 g.

Los pacientes en el ensayo ESPRIT exhibieron cambios porcentuales
5 significativos en los niveles plasmáticos de EPA y DHA, como se muestra en las FIG. 42A y FIG. 42B, respectivamente. Estos pacientes también demostraron reducciones dependientes de la dosis de TG, reducciones de no-HDL-C e incrementos en HDL-C en comparación con el aceite de oliva usado como placebo (véase la FIG. 43). Adicionalmente, se observaron reducciones dependientes de la dosis en VLDL-C y
10 TC/HDL-C (véase la FIG. 44). En conjunto, los resultados de las FIGS. 42-44 demuestran eficacia de Epanova[®] como adyuvante al tratamiento con estatinas.

Detalles adicionales de los resultados del ensayo ESPRIT se presentan en las FIGS. 45 - 52, en que se demuestra que Epanova[®] es eficaz como adyuvante de las estatinas tanto de baja potencia como de alta potencia, en un intervalo de condiciones
15 basales de los pacientes. La FIG. 45 muestra los resultados de la mediana del cambio porcentual de TG con respecto al valor basal para tres terciles de pacientes, repartido en niveles basales de TG. La FIG. 46 muestra los resultados para la mediana del cambio porcentual de no-HDL-C con respecto al valor basal para tres terciles de pacientes, repartidos en niveles basales de no-HDL-C. La FIG. 47 muestra los resultados para la
20 mediana del cambio porcentual de LDL-C con respecto al valor basal para tres terciles de pacientes, repartidos en niveles basales de LDL-C.

Como se observa en la FIG. 48, se observaron reducciones en los niveles de TG para pacientes que recibían tratamiento concurrente con rosuvastatina, atorvastatina y simvastatina. Se observaron efectos estadísticamente significativos sobre los niveles de
25 triglicéridos, non-HDL-C y LDL-C, con independencia de si las estatinas de baja potencia o de alta potencia se habían coadministrado, como se muestra en las FIGS. 49 - 51.

La FIG. 52 compara la mediana de los cambios porcentuales con respecto al valor basal para triglicéridos para (A) pacientes que tienen niveles basales de TG más
30 altos (> 294 mg/dl), (B) pacientes que tienen niveles EOT de EPA altos (> 26,58 µg/ml), y (C) pacientes que reciben tratamiento concurrente con rosuvastatina. Los resultados muestran que la dosis de 2 g de Epanova funciona de forma similar a la dosis de 4 g en las poblaciones de pacientes mostradas en la FIG. 52.

Los niveles incrementados de LDL-C observados tras el tratamiento con
35 Epanova[®] fueron consistentes con el tamaño de partícula de lipoproteínas aumentado.

Se midieron los tamaños de VLDL grande, VLDL medio, VLDL pequeño, VLDL total y VLDL para el placebo y cada una de las ramas de tratamiento del ensayo ESPRIT. Los resultados se muestran en la FIG. 53 y muestran que el tratamiento con Epanova[®] tenía como resultado cantidades mayores de partículas de VLDL grandes y las correspondientes cantidades disminuidas de partículas de VLDL pequeñas. Se observó disminución de las partículas de VLDL, junto con incrementos del tamaño de partícula de las LDL, como se muestra en la FIG. 54. En la FIG. 55 se muestran, a medida que disminuyen los niveles de TG al final del tratamiento, que los incrementos en porcentaje del tamaño de LDL-P eran mayores. En conjunto, las FIGS. 53 - 55 demuestran que el tratamiento Epanova[®] tuvo como resultado un incremento del tamaño de partícula de las lipoproteínas, una observación puede representar el incremento observado de LDL-C.

La Tabla 42 siguiente resume los resultados del ensayo ESPRIT.

Tabla 42														
		Aceite de oliva (OO)			4 g/día *					2 g/día				
		Base:	EOT	%Δ	Base:	EOT	%Δ	Valor p	dif.	Base:	EOT	%Δ	Valor p	dif.
No-HDL-C	mediana	132	134	1	135	129	-6	< 0,001	-6	139	133	-3	< 0,001	-3
	media	135	136	1	139	132	-5			140	136	-2		
TG	mediana	269	260	-4	265	215	-21	< 0,001	-15	265	222	-15	< 0,001	-9
	media	280	268	-3	287	233	-18			284	224	-14		
HDL-C	mediana	38	38	2	37	38	3	0,988	1	38	39	2	0,988	0
	media	39	40	3	39	40	4			39	40	3		
LDL-C	mediana	87	91	2	91	92	1	0.647	0	92	95	5	0.647	4
	media	92	93	4	94	94	4			92	97	6		
VLDL-C	mediana	42	41	-3	43	33	-20	< 0,001	-16	42	37	-12	< 0,001	-8
	media	46	44	3	47	38	-14			47	40	-10		
TC	mediana	174	174	1	170	167	-4	< 0,001	-4	177	174	-1	< 0,001	-2
	media	174	176	1	178	172	-3			179	176	-1		
TC/ HDL-C	mediana	5	5	-2	5	4	-7	< 0,001	-5	5	-4	-4	< 0,001	-3
	media	5	5	-1	5		-6			5	-3	-3		

Todas las publicaciones, patentes, solicitudes de patentes y otros documentos citados en esta solicitud se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad para todos los fines en la misma medida que si cada publicación, patente, solicitud de patente u otro documento estaban individualmente indicados para su
5 incorporación por referencia para todos los fines.

Aunque se han ilustrado y descritos varias formas de realización específicas, se apreciará que se pueden realizar varios cambios sin desviarse del espíritu y alcance de la(s) invención(es).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

5 EPA, sustancialmente en forma de ácido libre, en una cantidad de al menos aproximadamente 50 % (a/a);

DHA, sustancialmente en forma de ácido libre, en una cantidad de al menos aproximadamente 15 % (a/a);

10 DPA, sustancialmente en forma de ácido libre, en una cantidad de al menos aproximadamente 1 % (a/a);

2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que: el DPA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 2 % (a/a).

15 3. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que: el DPA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 2,5 % (a/a).

4. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que: el DPA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 3 % (a/a).

20 5. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que: el DPA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 3,5 % (a/a).

25 6. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que: el EPA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 51 % (a/a).

7. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que: el EPA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 52 % (a/a).

30 8. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que: el EPA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 53 % (a/a).

9. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que: el EPA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 54 % (a/a).

10. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que:

el DHA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 16 % (a/a).

11. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por
5 que:

el DHA está presente en una cantidad de al menos aproximadamente 17 % (a/a).

12. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que:

10 el EPA está presente en una cantidad de aproximadamente 55% a aproximadamente 56 % (a/a).

el DHA está presente en una cantidad de aproximadamente 19 % (a/a) a aproximadamente 20 % (a/a); y

15 el DPA está presente en una cantidad de aproximadamente 4 % (a/a) a aproximadamente 5 % (a/a).

13. Una composición farmacéutica que comprende:

20 EPA, sustancialmente en forma de ácido libre, en una cantidad de aproximadamente 50% (m/m) a aproximadamente 60 % (m/m); DHA, sustancialmente en forma de ácido libre, en una cantidad de aproximadamente 15 % (m/m) a aproximadamente 25 % (m/m); y DPA, sustancialmente en forma de ácido libre, en una cantidad de no menos de aproximadamente 1% (m/m).

14. La composición farmacéutica según la reivindicación 13, caracterizada por
25 que:

EPA y DHA están presentes en una cantidad de aproximadamente 70 % (m/m) a aproximadamente 80 % (m/m).

15. La composición farmacéutica según la reivindicación 14, caracterizada por
30 que:

los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 están presentes en una cantidad total de 80% (m/m) a aproximadamente 95% (m/m).

16. La composición farmacéutica según la reivindicación 15, caracterizada por
35 que:

los ácidos grasos poliinsaturados omega-6 están presentes en una cantidad total de no más de aproximadamente 10% (m/m).

5 17. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, caracterizada por que:

el carbamato de etilo, si está presente, está presente en una cantidad de no más de aproximadamente 0,1 ppm de carbamato de etilo.

10 18. Una forma de dosificación unitaria para administración oral, que comprende: una cápsula,
en que la cápsula encapsula al menos 250 mg de la composición farmacéutica de la reivindicación 1.

15 19. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 18, caracterizada por que:

la cápsula encapsula al menos 500 mg de la composición farmacéutica de la reivindicación 1.

20 20. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 18, caracterizada por que:

la cápsula encapsula al menos 1.000 mg de la composición farmacéutica de la reivindicación 1.

25 21. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 18, caracterizada por que la cubierta de la cápsula comprende gelatina.

22. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 21, caracterizada por que la cápsula es una cápsula de gelatina blanda.

30 23. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 22, caracterizada por que la cubierta de la cápsula de gelatina blanda comprende gelatina porcina de tipo A.

35 24. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 23, caracterizada por que la cubierta de la cápsula de gelatina blanda comprende suficiente gelatina de

tipo A porcina de forma que la cápsula se disgregue en un periodo de tiempo de no más de 30 minutos en agua purificada a 37°C tras almacenamiento durante al menos 3 meses a 40°C.

5 25. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 23, caracterizada por que la gelatina de la cubierta de la cápsula de gelatina blanda comprende al menos un 5% de la gelatina porcina de tipo A.

10 26. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 23, caracterizada por que la gelatina de la cubierta de la cápsula de gelatina blanda comprende al menos un 25 % de la gelatina porcina de tipo A.

15 27. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 26, caracterizada por que la cubierta de la cápsula de gelatina blanda comprende al menos un 50% de gelatina porcina de tipo A.

 28. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 22, caracterizada por que la cápsula de gelatina blanda tiene un recubrimiento exterior.

20 29. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 28, caracterizada por que el recubrimiento no es sensible al pH.

25 30. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 29, caracterizada por que el recubrimiento comprende un copolímero de poli(acrilato-metilmecrilato).

 31. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 30, caracterizada por que el copolímero de poli(acrilato-metilmecrilato) es EudragitNE-30D.

30 32. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 29, caracterizada por que no hay una liberación sustancial de la composición farmacéutica encapsulada antes de 30 minutos después de la ingestión.

35 33. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 32, caracterizada por que existe una liberación sustancial de la composición farmacéutica encapsulada en aproximadamente 60 minutos después de la ingestión.

34. La forma de dosificación unitaria según la reivindicación 28, caracterizada por que el recubrimiento es un recubrimiento entérico dependiente del pH.

5 35. Un kit de dosificación, que comprende:
una pluralidad de formas de dosificación unitaria según la reivindicación 18.

36. El kit de dosificación según la reivindicación 35, caracterizado por que:
el kit de dosificación comprende al menos 60 formas de dosificación unitaria.

10 37. El kit de dosificación según la reivindicación 35, caracterizado por que:
el kit de dosificación comprende al menos 120 formas de dosificación unitaria.

38. Un método para tratar la hipertrigliceridemia grave, que comprende:
15 administrar por vía oral la composición farmacéutica según la reivindicación 1 a
un paciente que tiene niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos previos al
tratamiento >500 mg/dl,
 en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir niveles séricos o
plasmáticos de triglicéridos inferiores a los previos al tratamiento.

20 39. El método de la reivindicación 38, en el que la cantidad eficaz es de al
menos aproximadamente 2g al día.

40. El método según la reivindicación 38, caracterizado por que la cantidad
25 eficaz es de al menos aproximadamente 3g al día.

41. El método de la reivindicación 38, en el que la cantidad eficaz es de al
menos aproximadamente 4g al día.

30 42. El método de la reivindicación 38, en el que la cantidad eficaz es de
aproximadamente 2g al día.

43. Un método para tratar la hipertrigliceridemia grave, que comprende:
administrar por vía oral la composición farmacéutica según la reivindicación 13 a un

paciente que tiene niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos previos al tratamiento >500 mg/dl,

en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos inferiores a los previos al tratamiento.

5

44. El método de la reivindicación 43, en el que la cantidad eficaz es de al menos aproximadamente 2g al día.

10

45. El método según la reivindicación 38, caracterizado por que la composición farmacéutica se administra diariamente durante al menos 30 días.

46. El método según la reivindicación 43, caracterizado por que la composición farmacéutica se administra diariamente durante al menos 30 días.

15

47. El método según la reivindicación 38, caracterizado por que la composición farmacéutica se administra en forma de una o más formas de dosificación según la reivindicación 20.

20

48. El método según la reivindicación 38, que además comprende:
administrar por vía oral una cantidad eficaz de una estatina.

25

49. El método según la reivindicación 48, caracterizado porque la estatina se selecciona del grupo que consiste en: pravastatina, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, fluvastatina, rosuvastatina, y pitavastatina.

30

50. Un método de tratamiento de pacientes que tienen niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos de aproximadamente 200 mg/dl a aproximadamente 500 mg/dl en tratamiento con estatinas, caracterizado por que comprende:

administrar por vía oral una cantidad eficaz de una estatina y administrar por vía oral una cantidad eficaz de la composición farmacéutica según la reivindicación 1.

35

51. Un método de tratamiento de pacientes en tratamiento con estatinas que tienen niveles séricos o plasmáticos de triglicéridos de aproximadamente 200 mg/dl a aproximadamente 500 mg/dl, comprendiendo la mejora: administrar de forma adyuvante una cantidad eficaz de la composición farmacéutica según la reivindicación 1.

52. El método según la reivindicación 50, caracterizado por que la cantidad de la composición farmacéutica según la reivindicación 1 es de al menos aproximadamente 2 g al día.

5 53. El método según la reivindicación 50, caracterizado por que la cantidad de la composición farmacéutica según la reivindicación 1 es de al menos aproximadamente 3g al día.

10 54. El método según la reivindicación 50, caracterizado por que la cantidad de la composición farmacéutica según la reivindicación 1 es de al menos aproximadamente 4g al día.

15 55. El método según la reivindicación 50, caracterizado por que la cantidad de la composición farmacéutica según la reivindicación 1 es de aproximadamente 2 g al día.

56. Un método de tratamiento de un paciente con niveles elevados de triglicéridos séricos o plasmáticos previos al tratamiento, comprendiendo el método:
administrar la composición farmacéutica según la reivindicación 1 en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente un 5 %.

25 57. El método según la reivindicación 56, caracterizado por que la composición farmacéutica se administra una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente un 10 %.

30 58. El método según la reivindicación 56, caracterizado por que la composición farmacéutica se administra una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico (AA) en plasma en al menos aproximadamente un 20 %.

59. Un método de tratamiento de un paciente con niveles elevados de triglicéridos séricos o plasmáticos previos al tratamiento, comprendiendo el método:

administrar la composición farmacéutica según la reivindicación 1 en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración de ácido araquidónico en plasma en al menos aproximadamente

5 50 µg/ml.

60. El método según la reivindicación 59, caracterizado por que la composición farmacéutica se administra en una cantidad y durante un periodo eficaz para reducir la concentración en plasma de ácido araquidónico en al menos aproximadamente 75 µg/ml.
10

61. Un método de tratamiento de un paciente con niveles elevados de triglicéridos séricos o plasmáticos previos al tratamiento, comprendiendo el método:

administrar la composición farmacéutica según la reivindicación 1 en una
15 cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar la proporción EPA/AA en plasma en al menos aproximadamente 0,25.

62. El método según la reivindicación 61, caracterizado por que la composición farmacéutica se administra una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar la
20 proporción EPA/AA en plasma.

63. El método según la reivindicación 62, caracterizado por que la composición farmacéutica se administra una cantidad y durante un periodo eficaz para aumentar la proporción EPA/AA en plasma en al menos aproximadamente 0,65.
25

64. Un método para disminuir los niveles séricos o plasmáticos de ApoCIII, que comprende administrar la composición farmacéutica según la reivindicación 1 en una cantidad y durante un periodo suficiente para reducir los niveles séricos o plasmáticos de ApoCIII con respecto a los niveles previos al tratamiento.
30

65. Un método de realizar una composición farmacéutica de ácidos grasos poliinsaturados en forma de ácido libre, comprendiendo la mejora:
someter una materia intermedia de aceite de pescado transesterificado, que comprende los ésteres de etilo de
35 EPA en una cantidad de al menos aproximadamente 44 % (a/a),

DHA, en una cantidad de al menos aproximadamente 14 % (a/a), y
 DPA, en una cantidad de al menos aproximadamente 1 % (a/a),
 a una etapa de formación de complejos de inclusión de urea,
 caracterizado por que la cantidad de urea usada para la formación de complejos
 5 se calcula de acuerdo con la fórmula I(a) o de acuerdo con la fórmula 1(b) o de acuerdo
 con la fórmula 1(a) y la fórmula 1(b), en que la cantidad de urea se fija a un valor dentro
 del intervalo fijado por, e incluidos, los resultados de las fórmulas 1(a) y 1(b),

$$[\text{Urea}] = F_{\text{enriquecimiento-DHA}} * ((\text{DHA}_{\text{diana}} - \text{DHA-EE}_{\text{entrada}}) / \text{DHA-EE}_{\text{entrada}})$$

$$[\text{Urea}] = F_{\text{enriquecimiento-EPA}} * ((\text{EPA}_{\text{diana}} - \text{EPA-EE}_{\text{entrada}}) / \text{EPA-EE}_{\text{entrada}}) \text{ (1b),}$$
 10 en que $F_{\text{enriquecimiento-DHA}}$ y $F_{\text{enriquecimiento-EPA}}$ son cada uno de aproximadamente
 100/0,34.

66. El método según la reivindicación 65, caracterizado por que
 EPA-EE está presente en la materia intermedia en una cantidad de al menos
 15 aproximadamente 45 % (a/a),
 DHA-EE está presente en la materia intermedia en una cantidad de al menos
 aproximadamente 15 % (a/a), y
 DPA-EE está presente en la materia intermedia en una cantidad de al menos
 aproximadamente 2,5 % (a/a).

20 67. El método según la reivindicación 65, caracterizado porque la composición
 farmacéutica es una composición farmacéutica según la reivindicación 1.

25 68. Una composición farmacéutica según la reivindicación 1, preparada
 mediante un proceso según la reivindicación 66.

RESUMEN

5 Se presentan composiciones farmacéuticas enriquecidas en DPA de ácidos grasos poliinsaturados en forma de ácido libre, métodos terapéuticos para su uso y procesos para refinar las composiciones de aceite de pescado. También se proporcionan métodos de tratar la hipertrigliceridemia (200 mg/dl – 500 mg/dl) mediante la administración como adyuvante de una estatina y las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento.

10 Métodos de tratamiento adicionales incluyen, entre otros, tratamientos para aumentar las proporciones EPA:AA en plasma, tratamientos para reducir los niveles de ApoCIII y tratamientos para reducir o prevenir la resistencia a los inhibidores de la agregación plaquetaria.

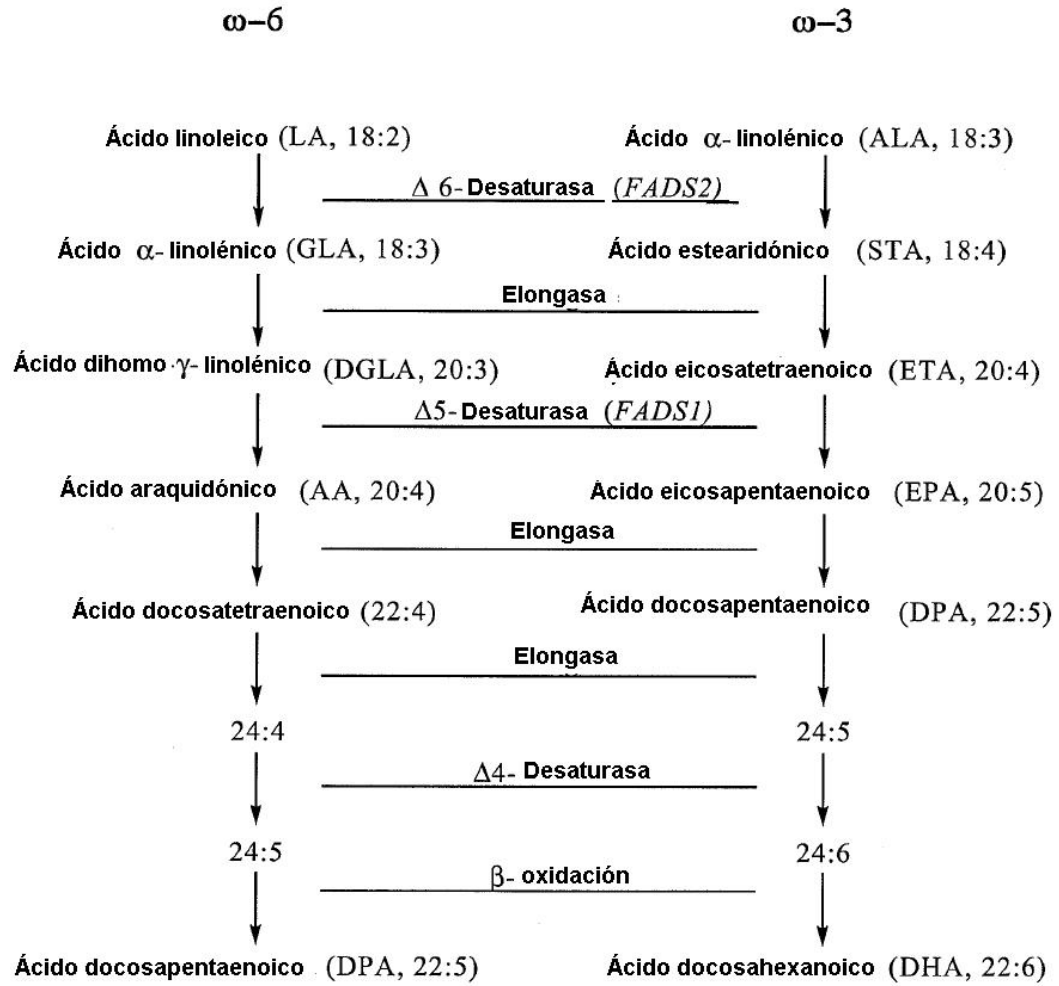


FIG. 1

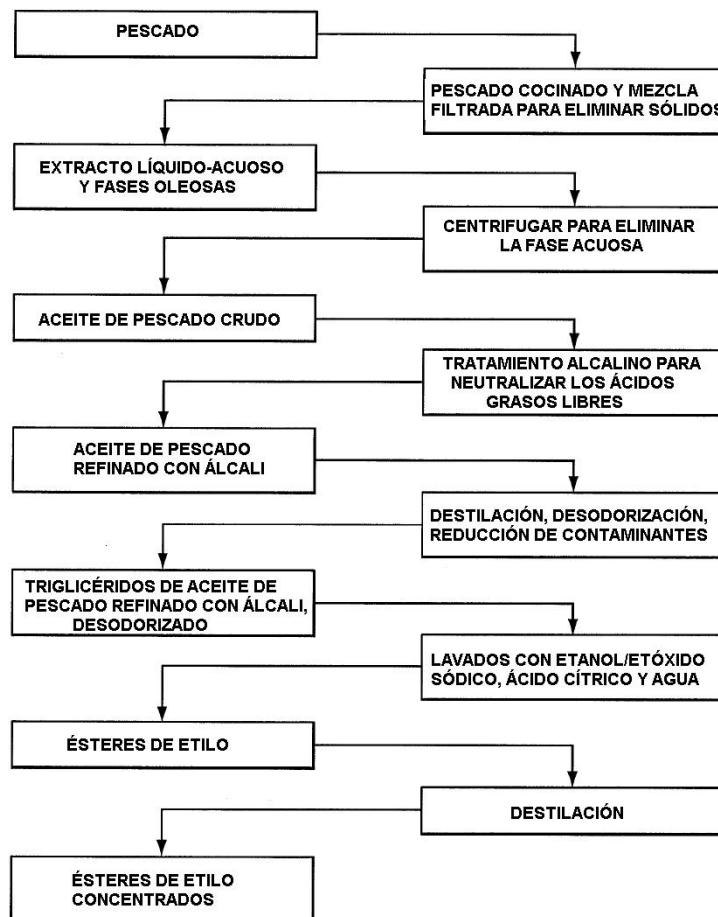
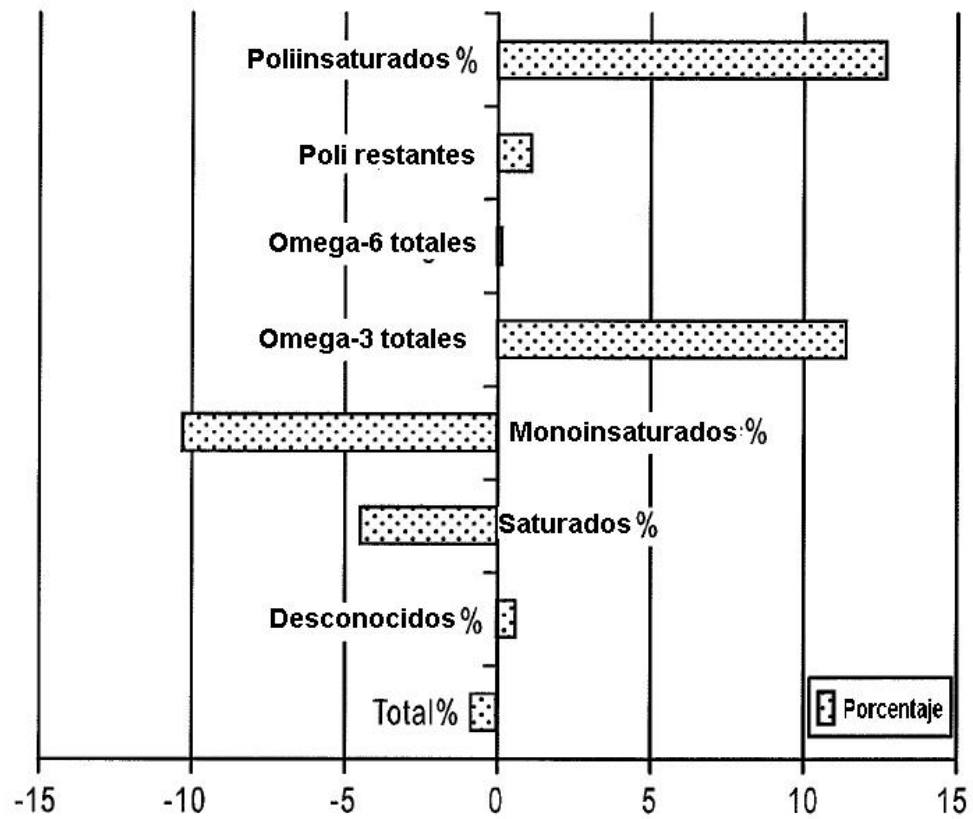


FIG. 2

Efecto global de la clatración de urea sobre el intermedio EE**FIG. 3A**

**Efecto de la formación de complejos de urea sobre
especies de ácidos grasos omega-3 y omega-6**

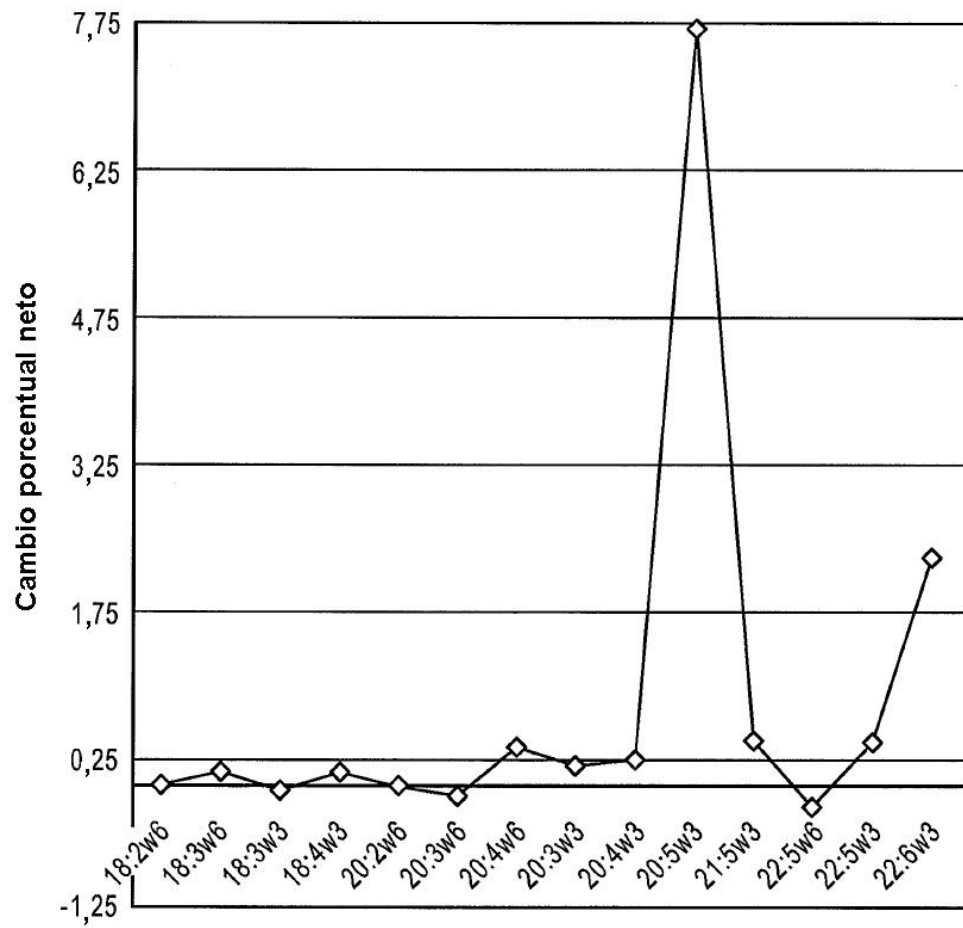


FIG. 3B

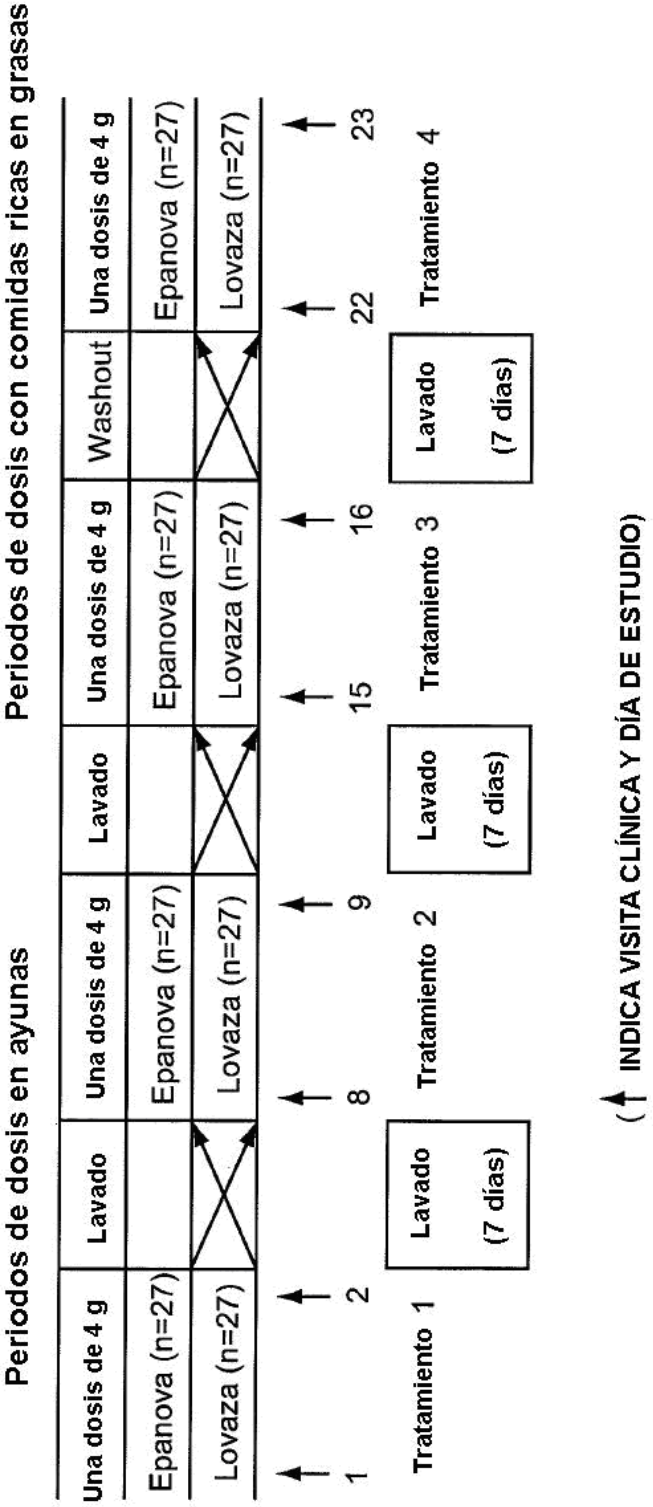


FIG. 4

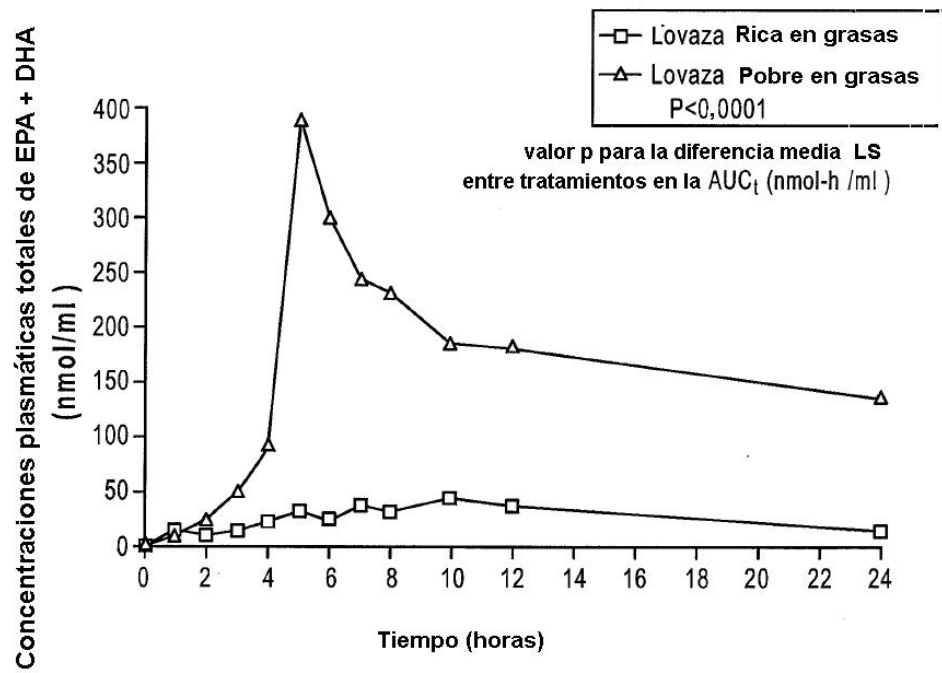


FIG. 5

EPA + DHA, biodisponibilidad de AGL en comida rica en grasas
significativamente mayor que EE-FA ($p < 0,0007$)

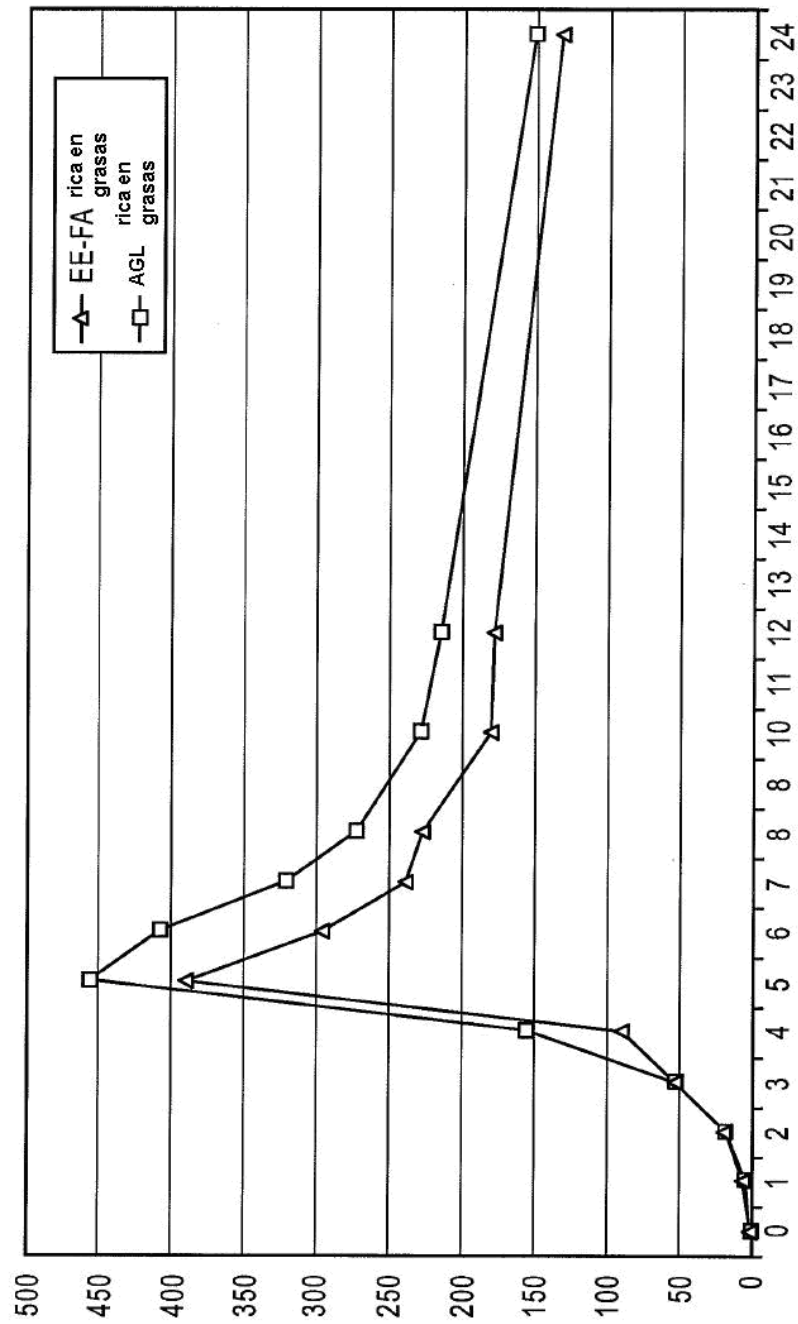


FIG. 6

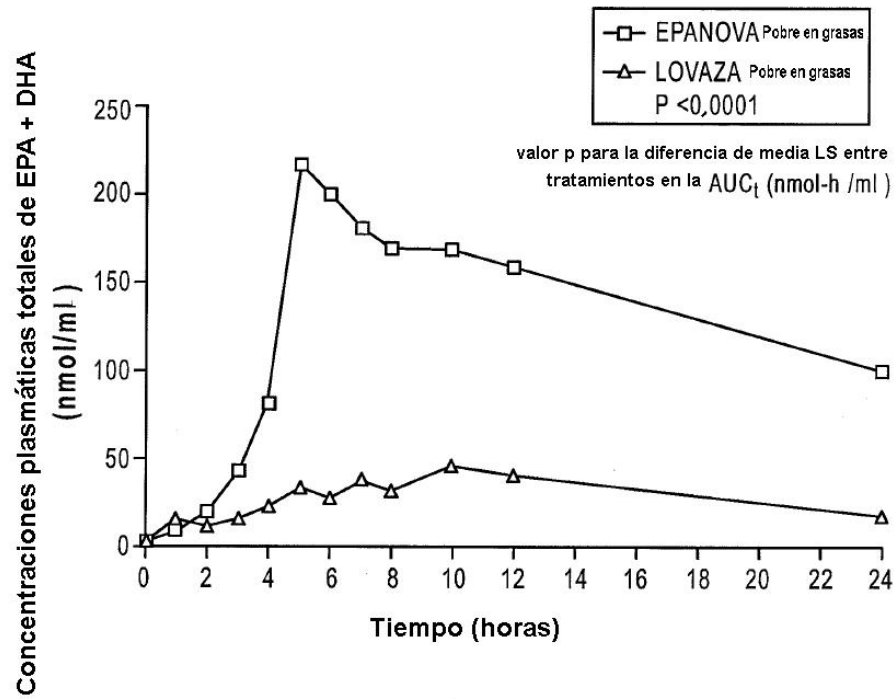


FIG. 7

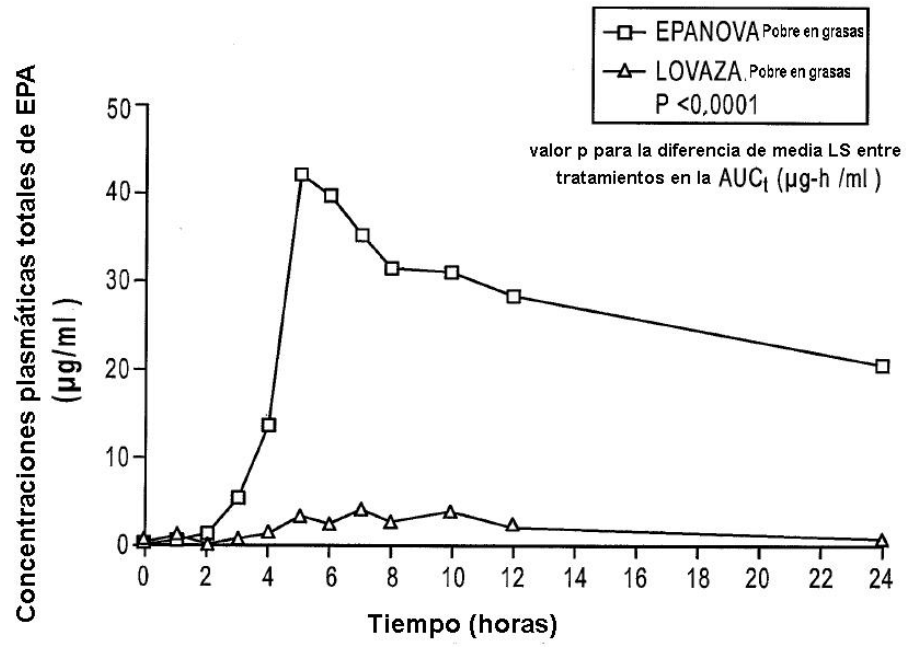


FIG. 8

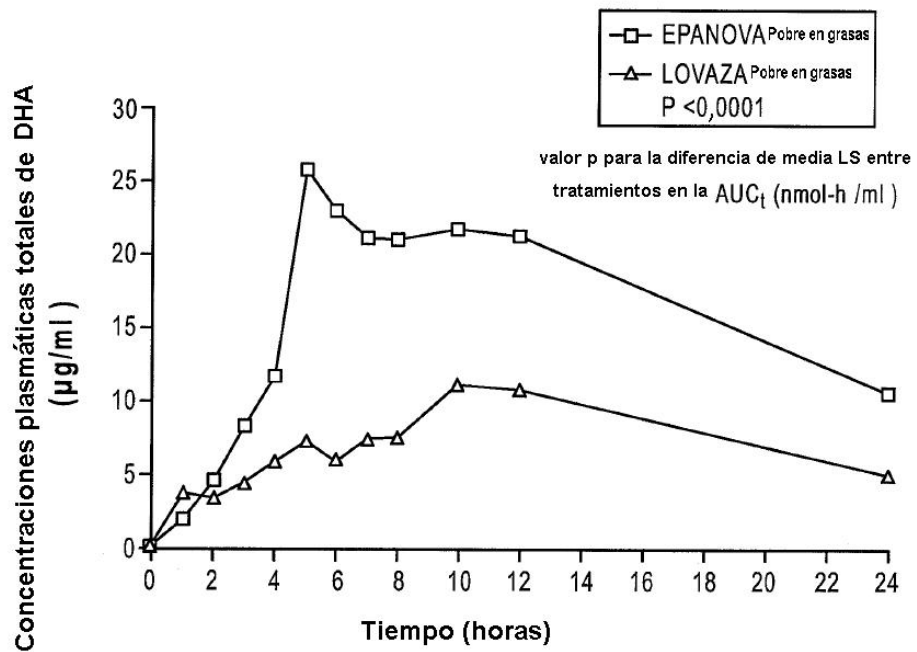
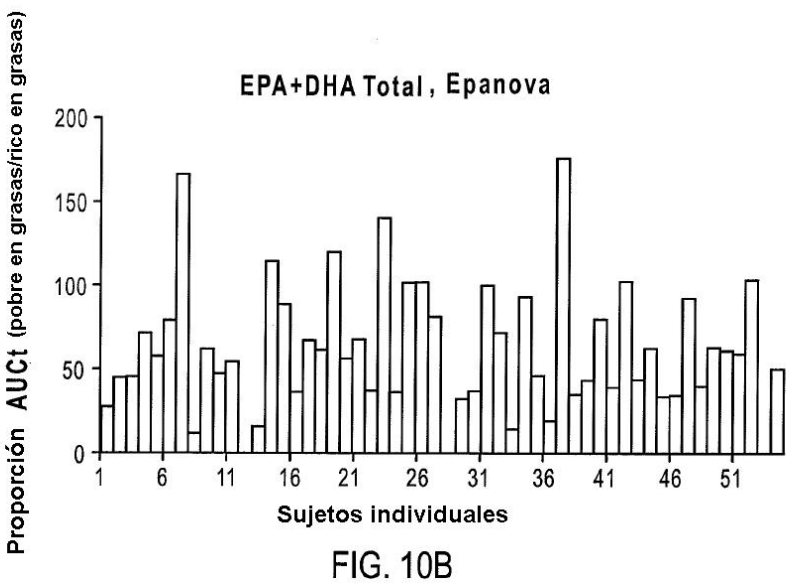
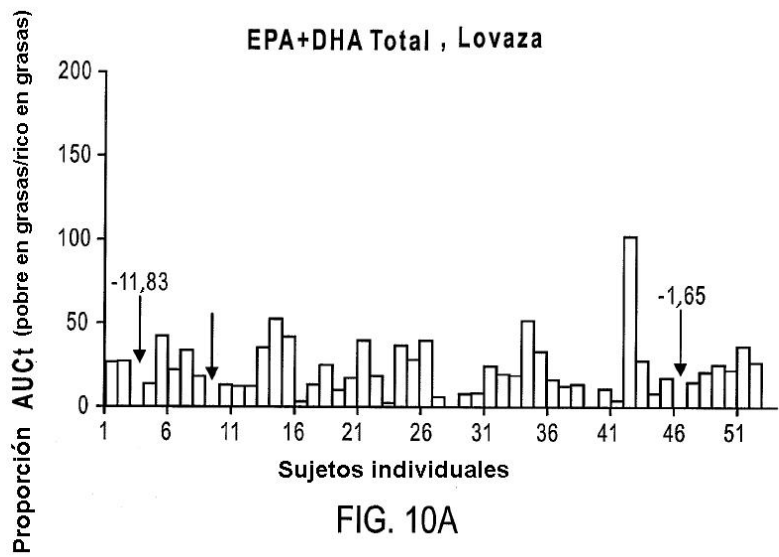


FIG. 9

11/66



12/66

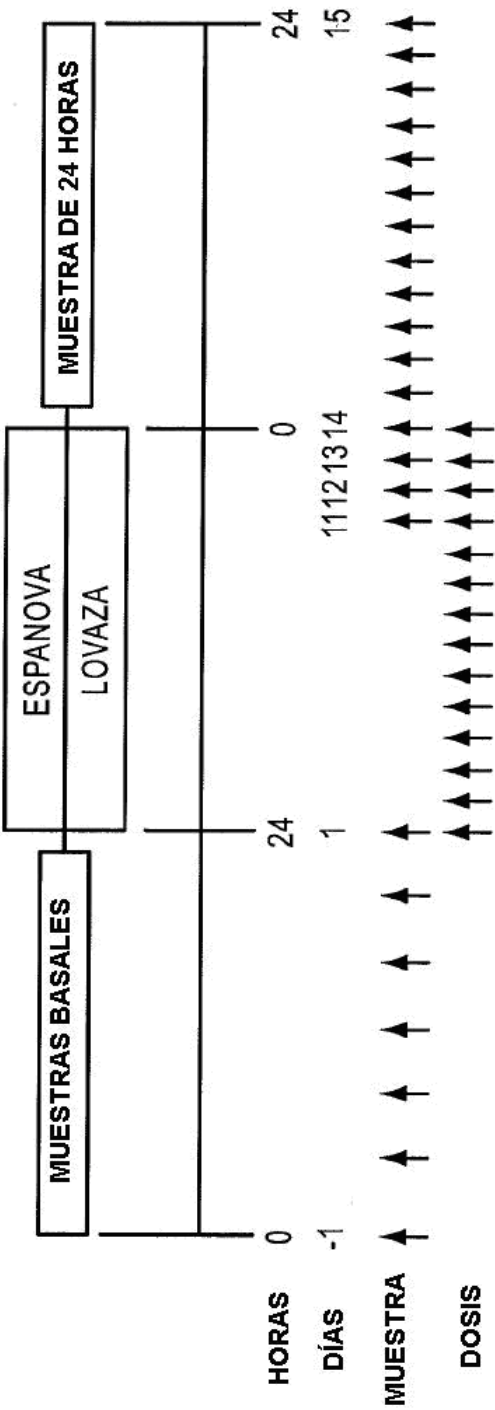


FIG. 11

13/66

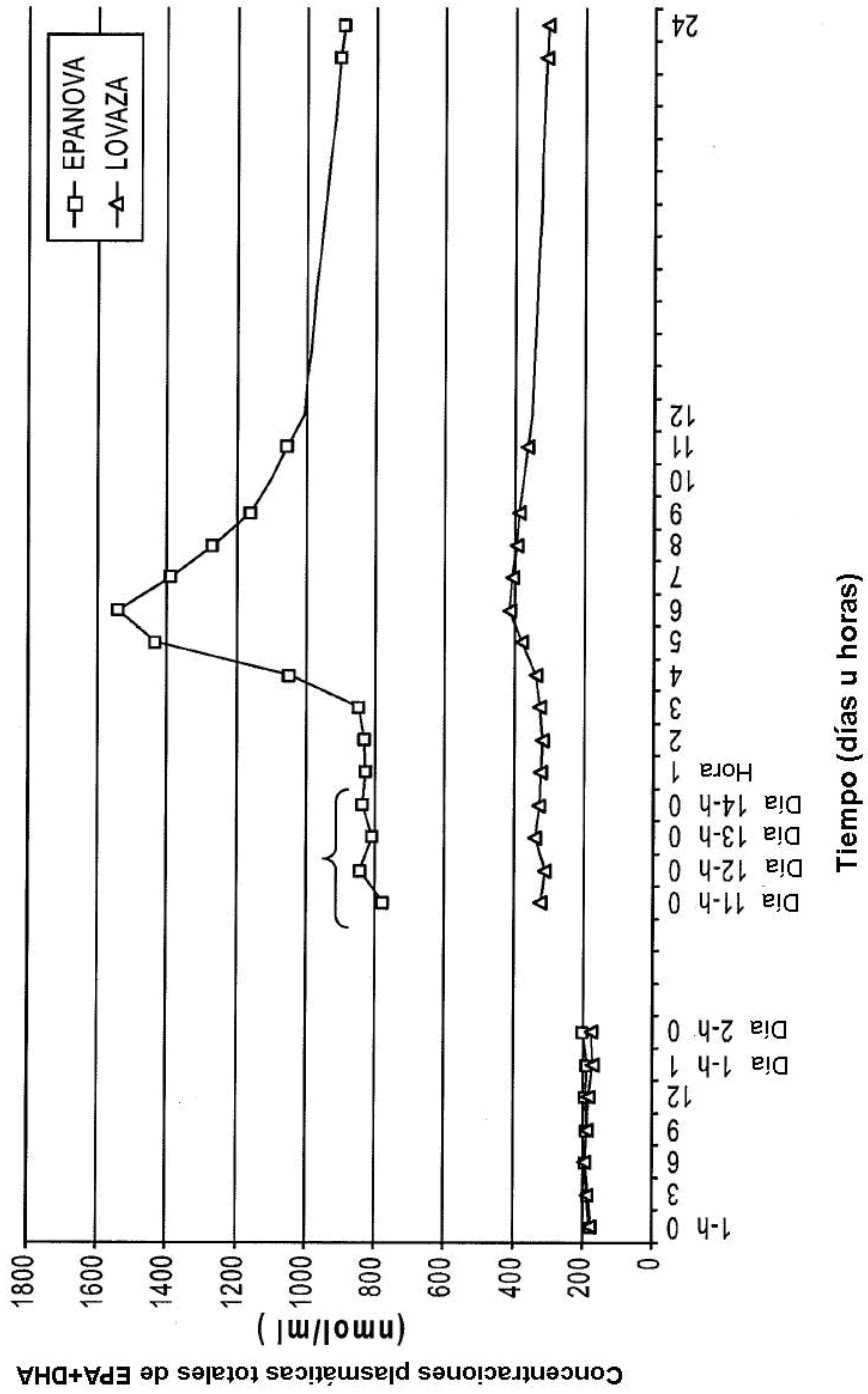


FIG. 12A

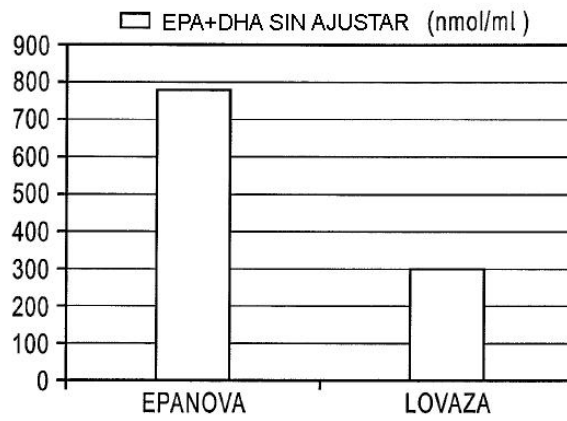


FIG. 12B

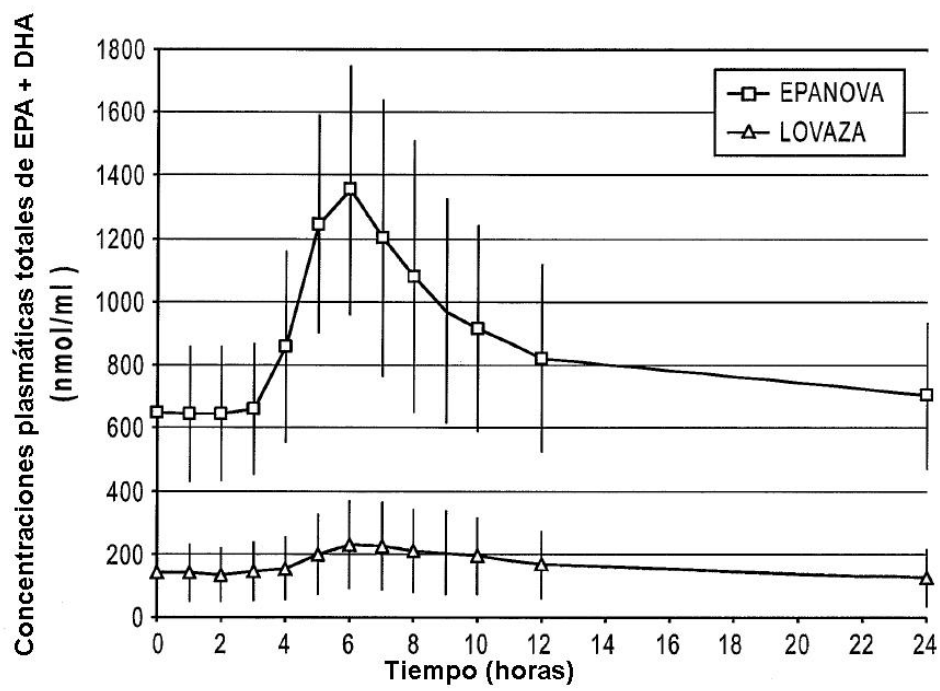


FIG. 13

15/66

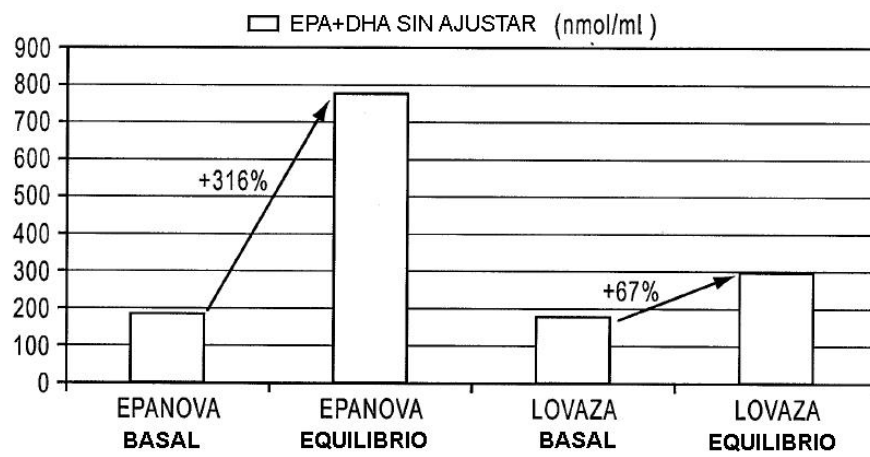


FIG. 14A

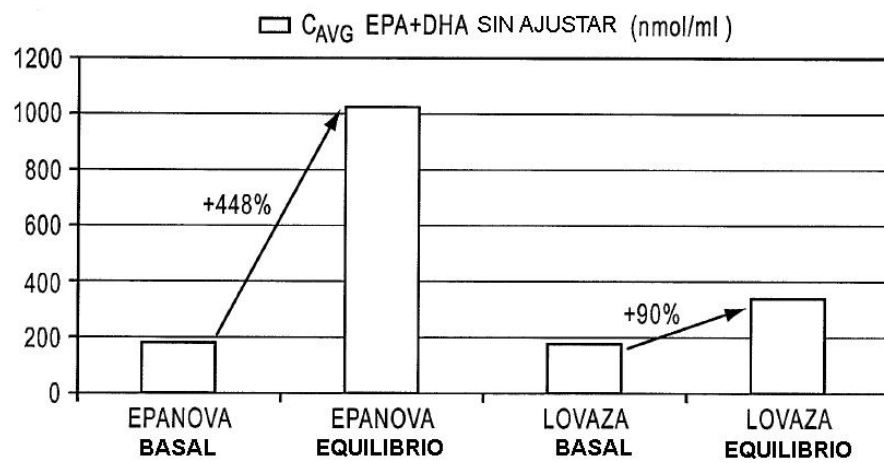


FIG. 14B

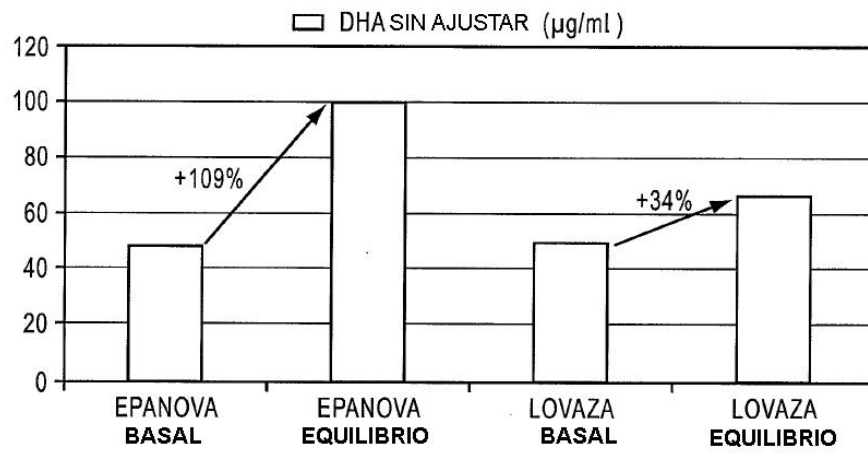


FIG. 15A

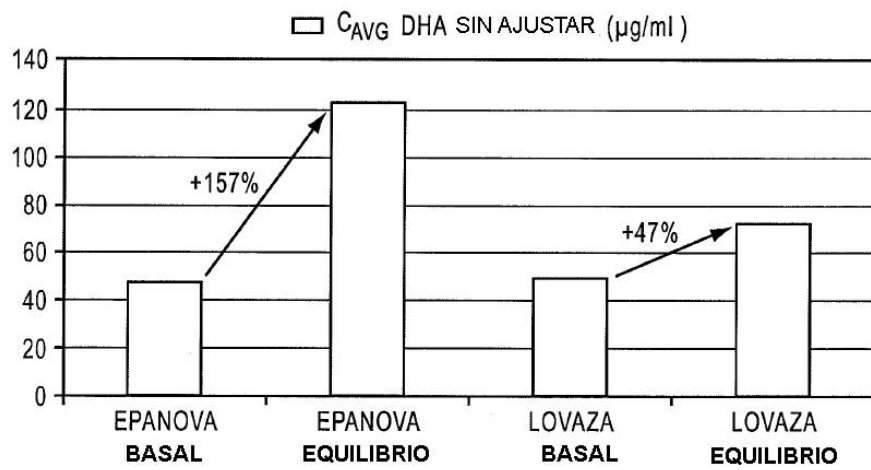


FIG. 15B

17/66

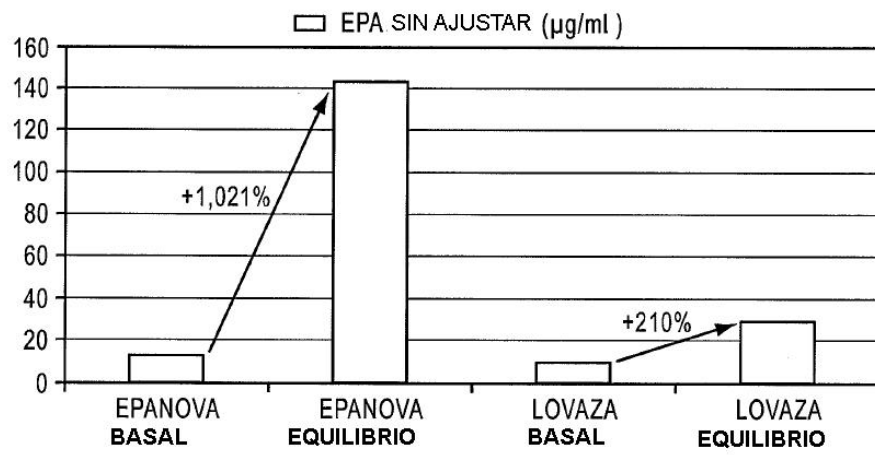


FIG. 16A

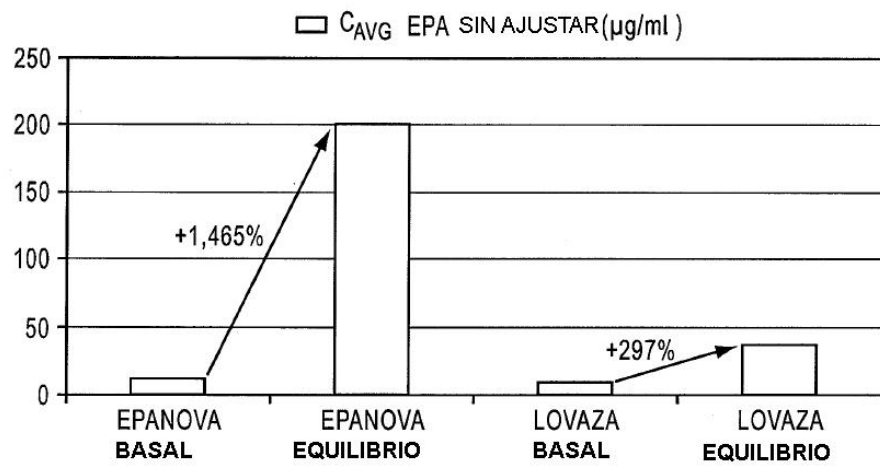


FIG. 16B

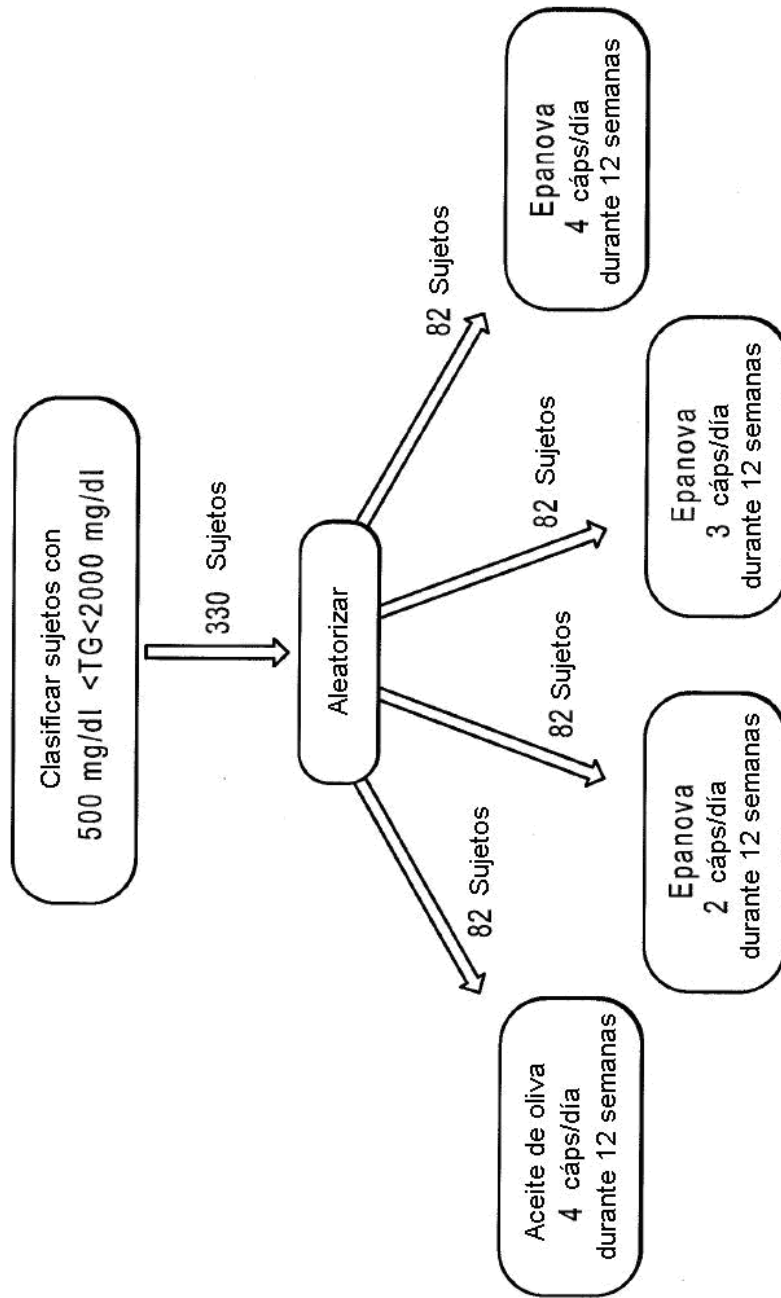


FIG. 17

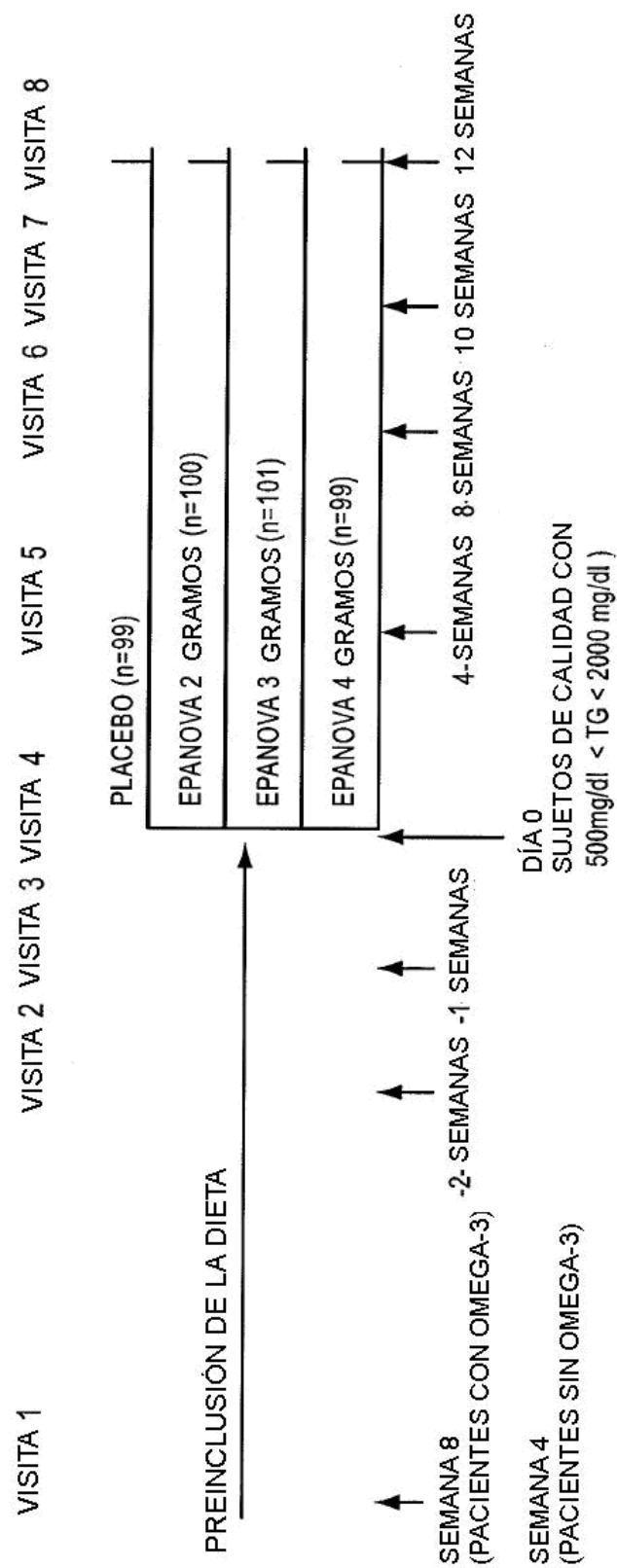


FIG. 18

20/66

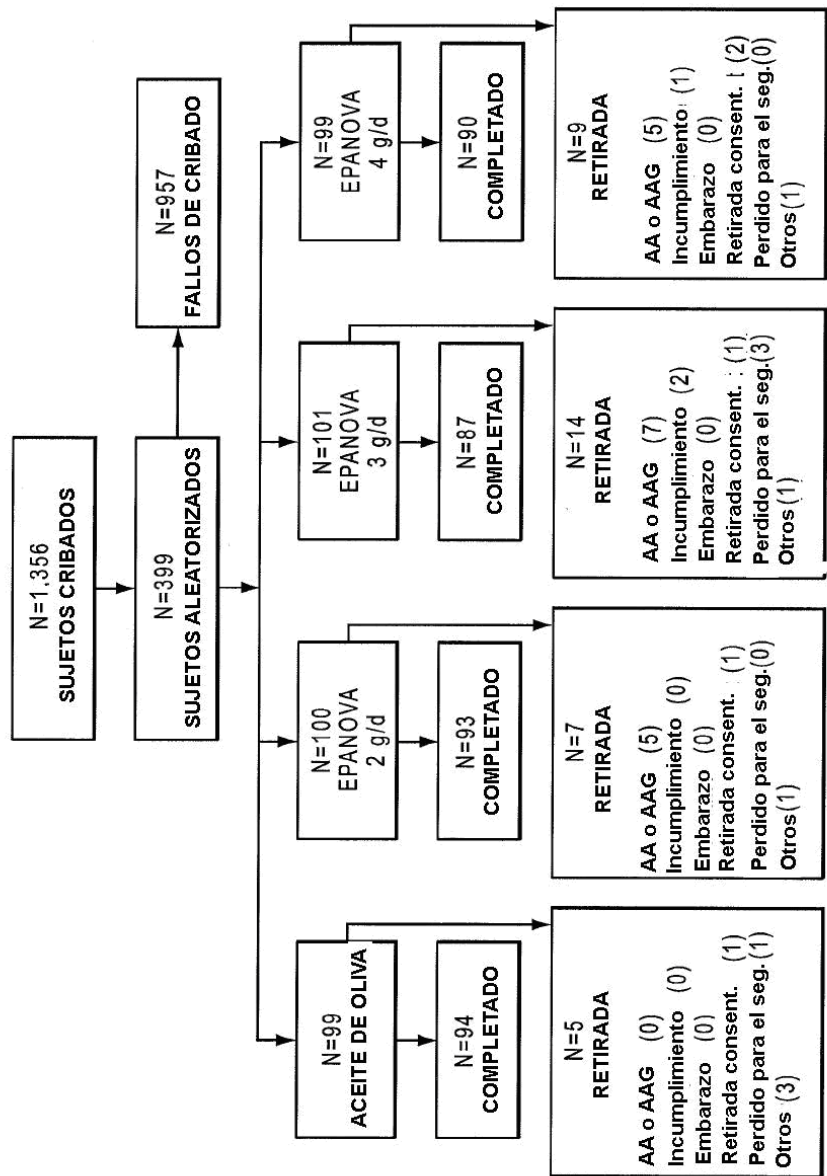
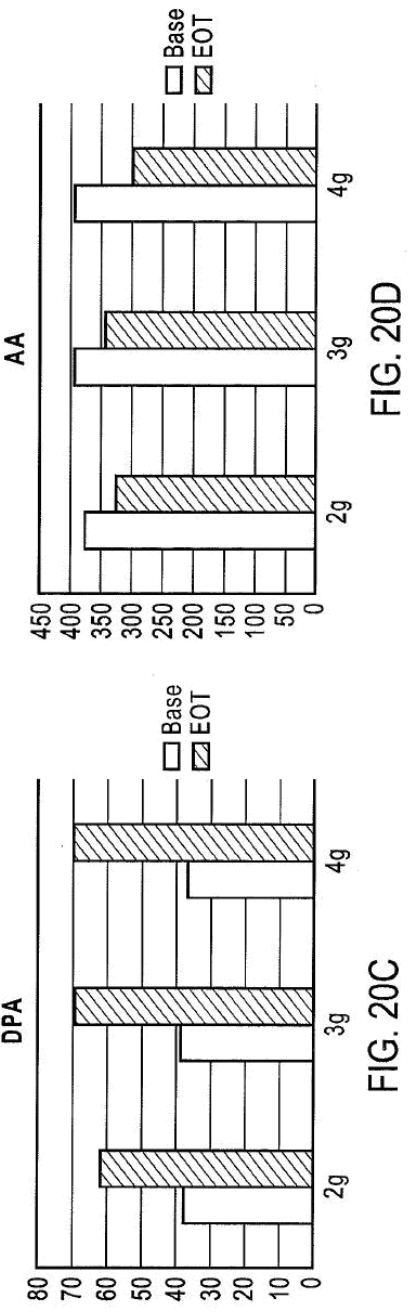
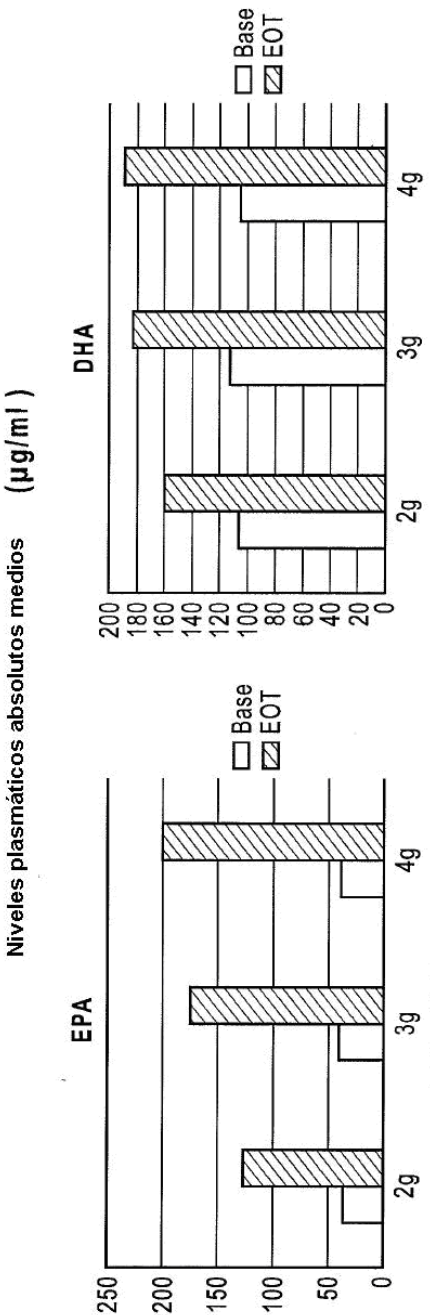


FIG. 19

21/66



22/66

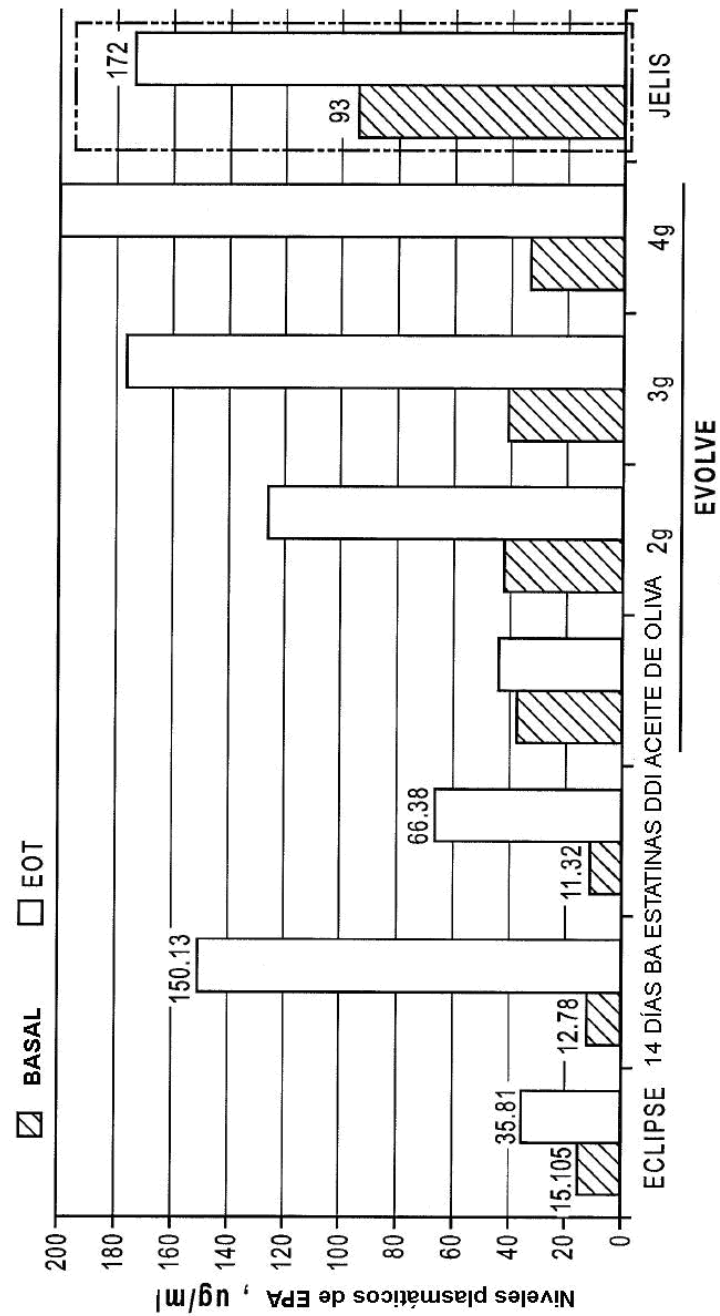


FIG. 20E

Mediana de los niveles plasmáticos absolutos (µg/ml)

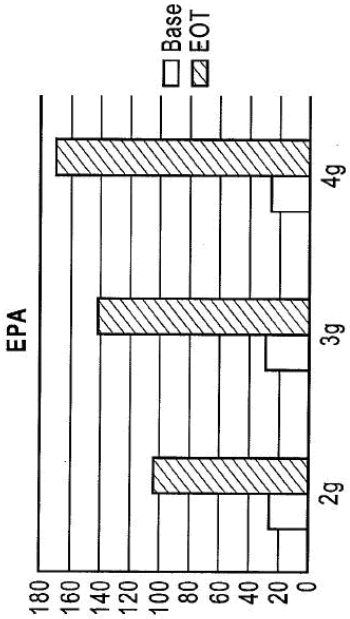


FIG. 21A

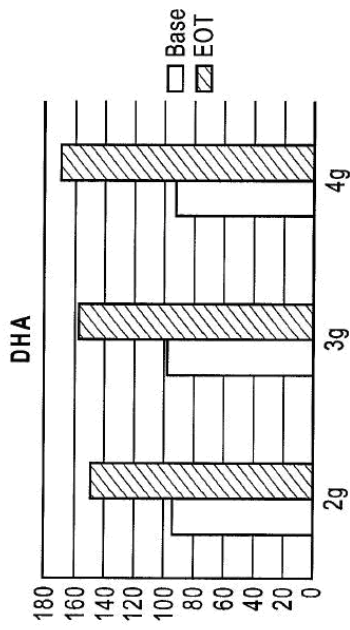


FIG. 21B

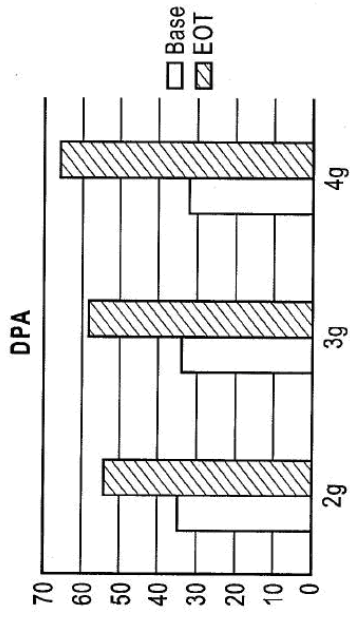


FIG. 21C

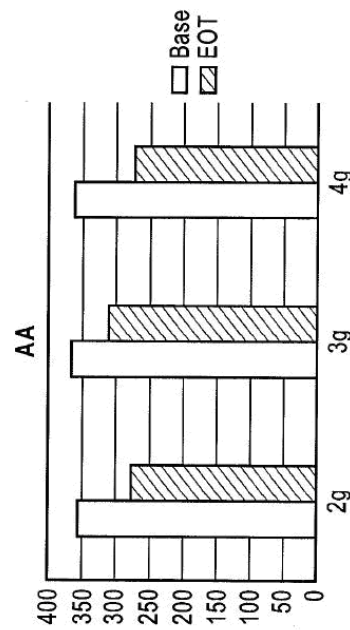


FIG. 21D

24/66

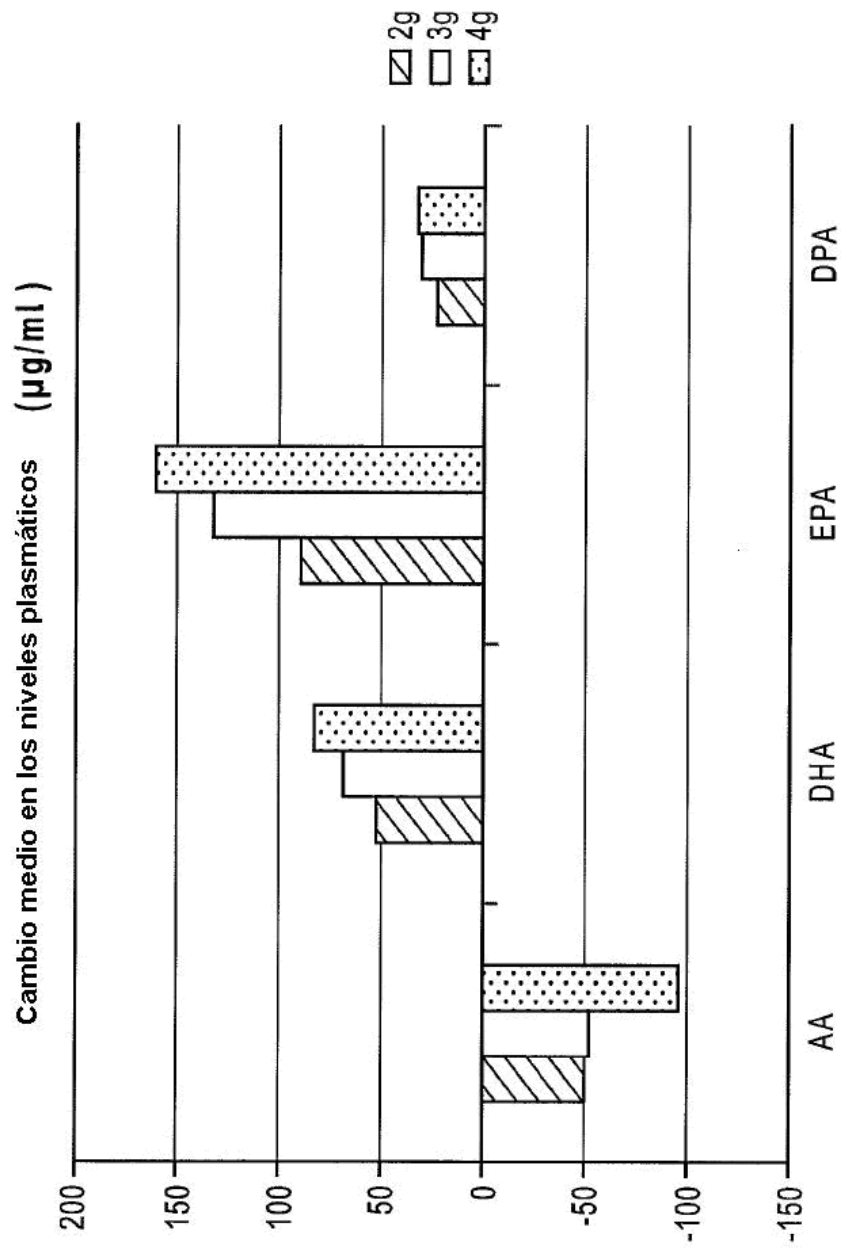


FIG. 22A

25/66

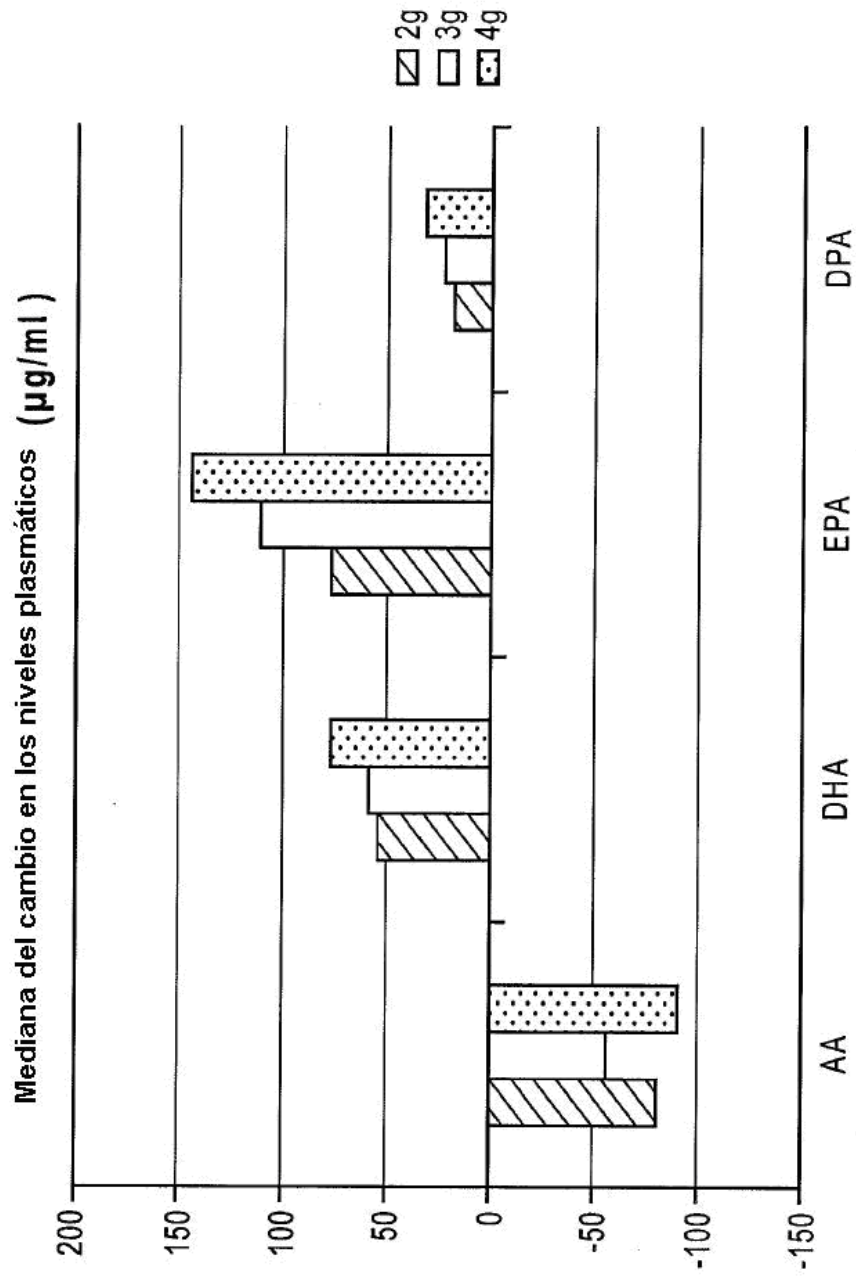


FIG. 22B

26/66

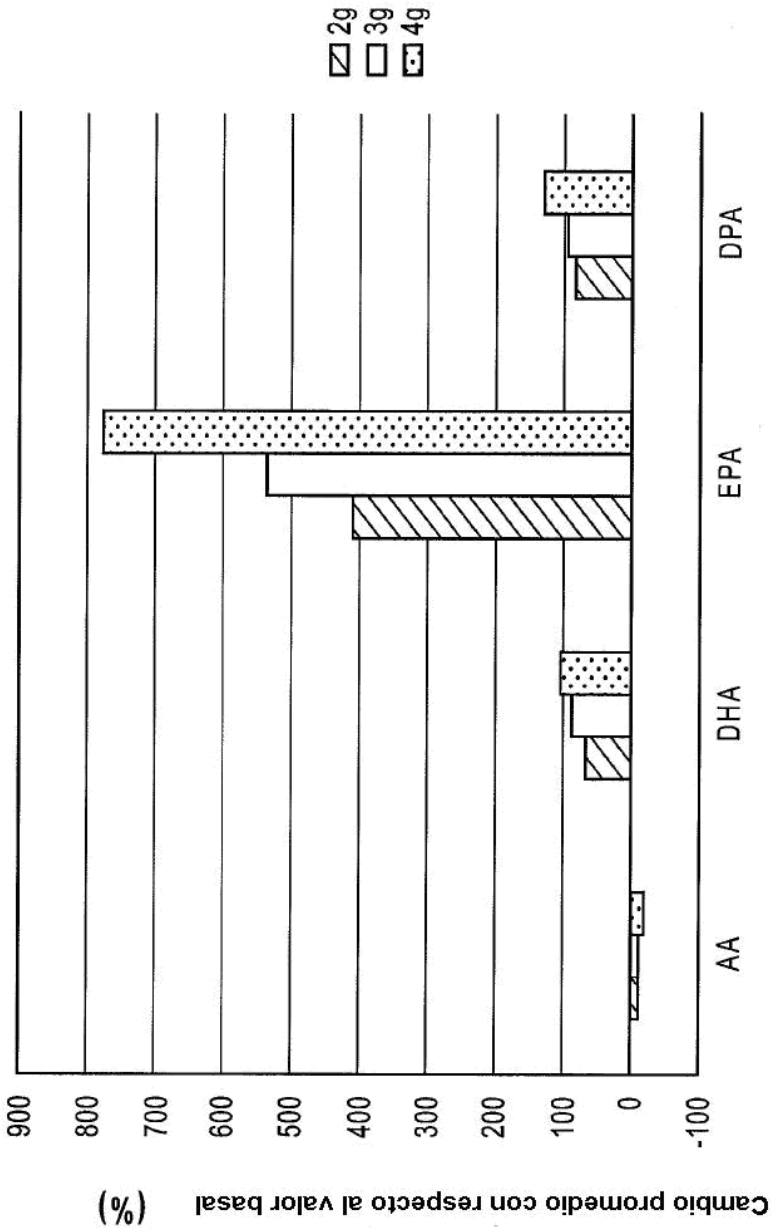


FIG. 23A

27/66

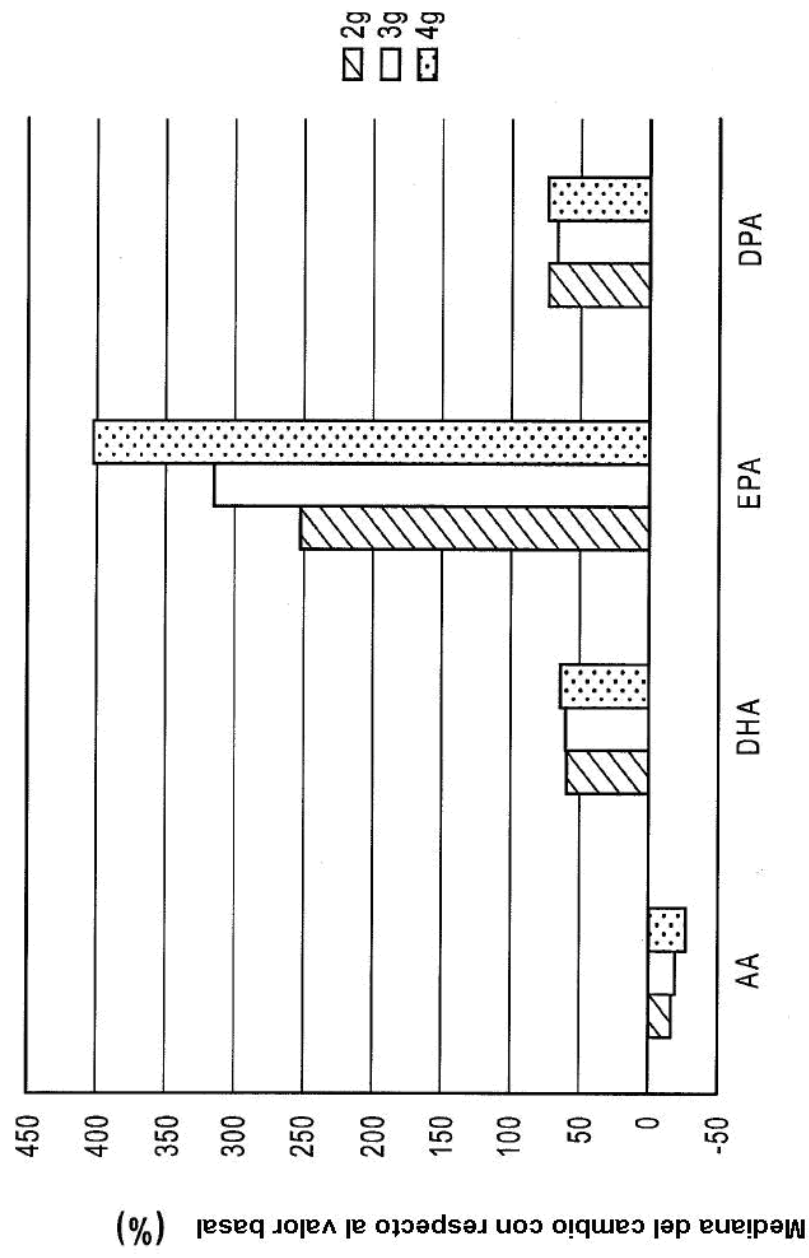
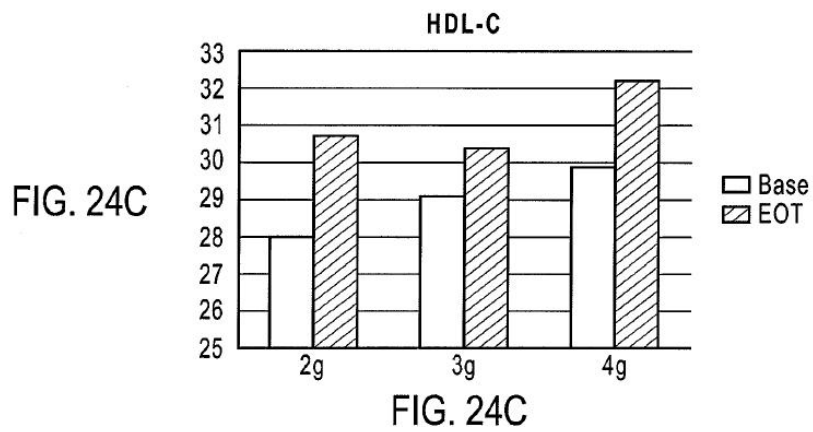
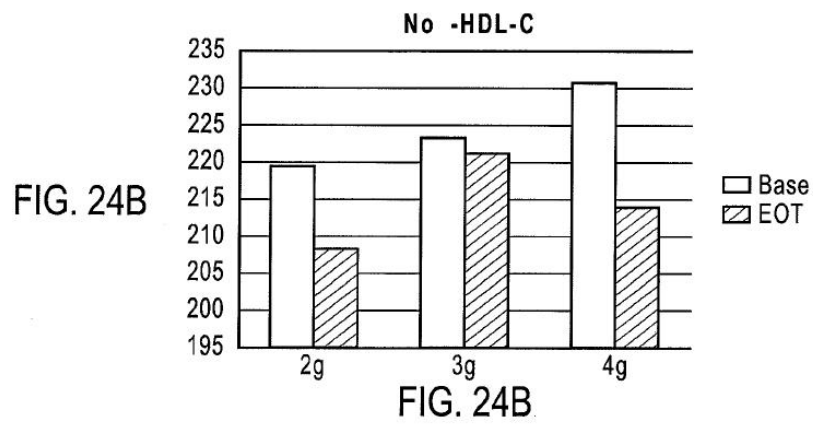
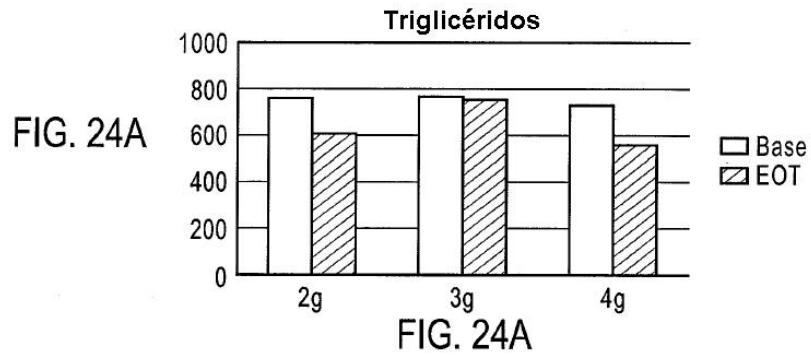


FIG. 23B

Niveles plasmáticos absolutos promedio (mg/dl)



29/66

Niveles plasmáticos absolutos promedio (mg/dl)

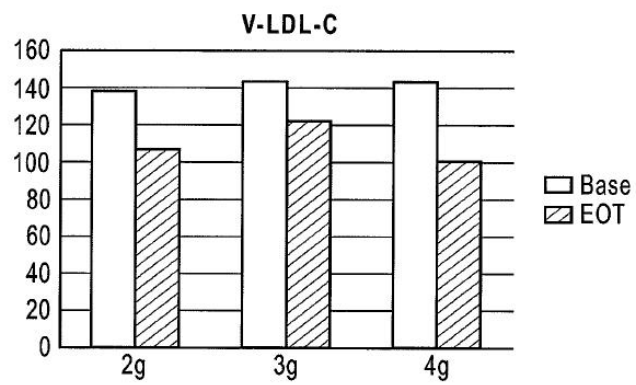


FIG. 24D

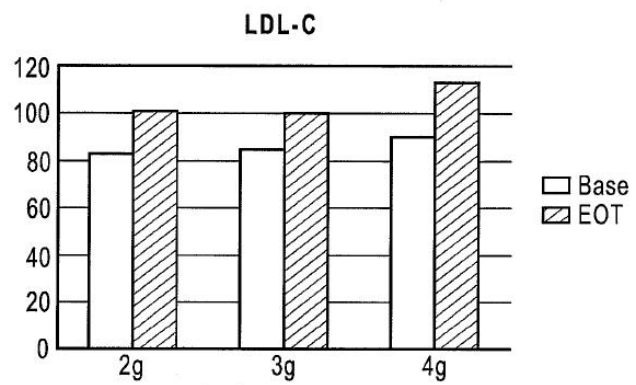


FIG. 24E

Niveles plasmáticos absolutos promedio (mg/dl)

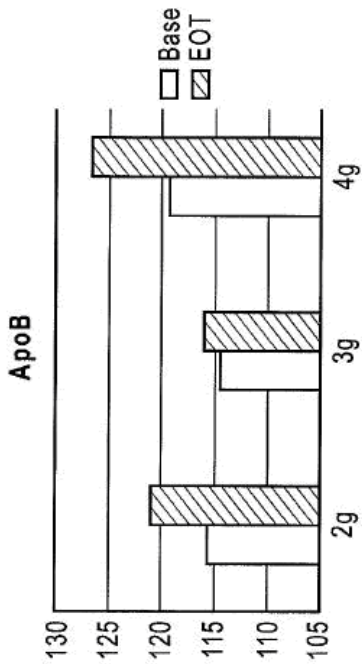


FIG. 24F

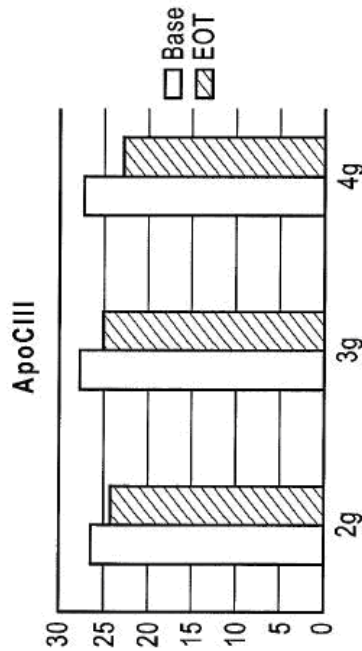


FIG. 24G

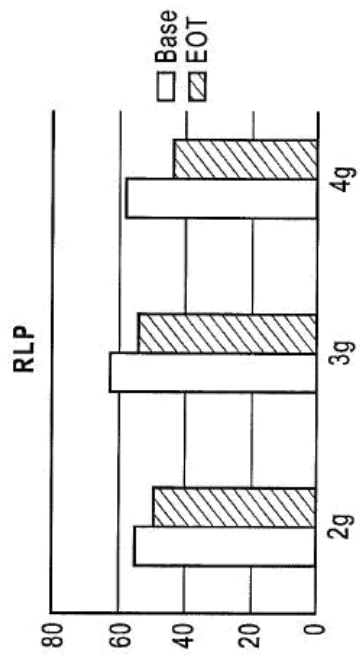


FIG. 24H

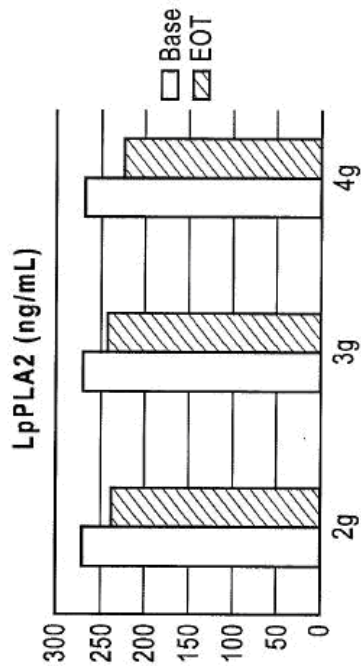


FIG. 24I

31/66

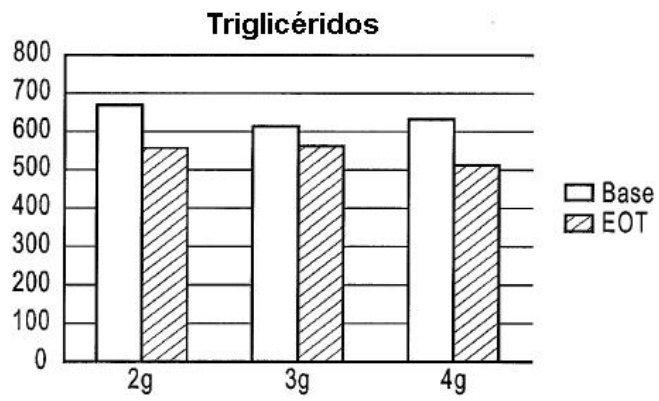
Mediana de los niveles plasmáticos absolutos (mg/dl)

FIG. 25A

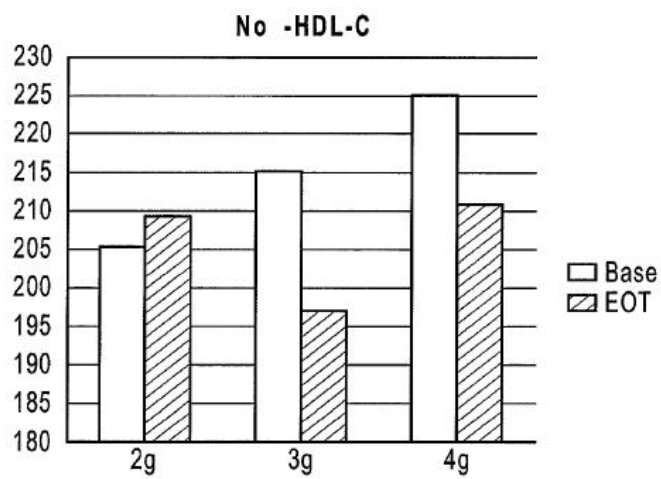
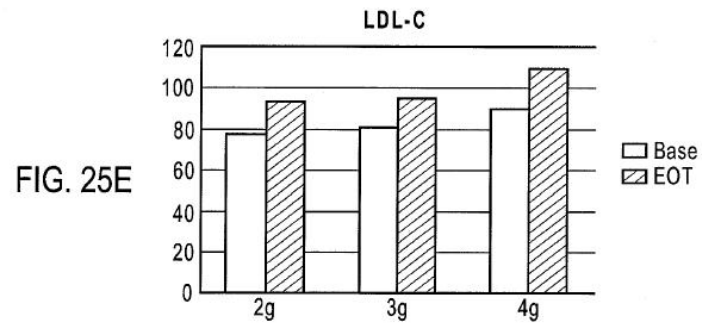
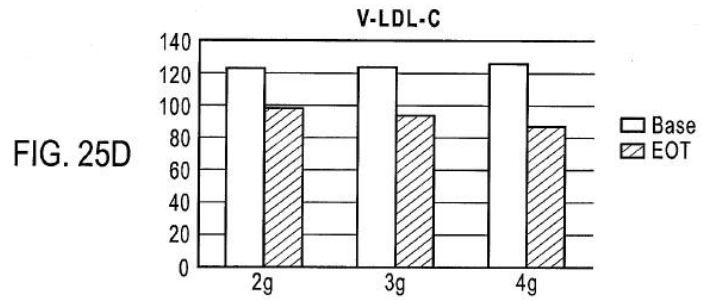
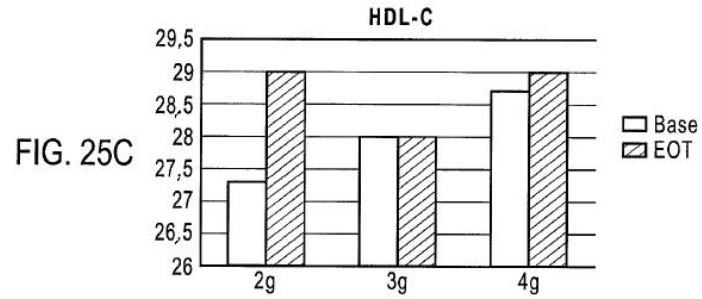
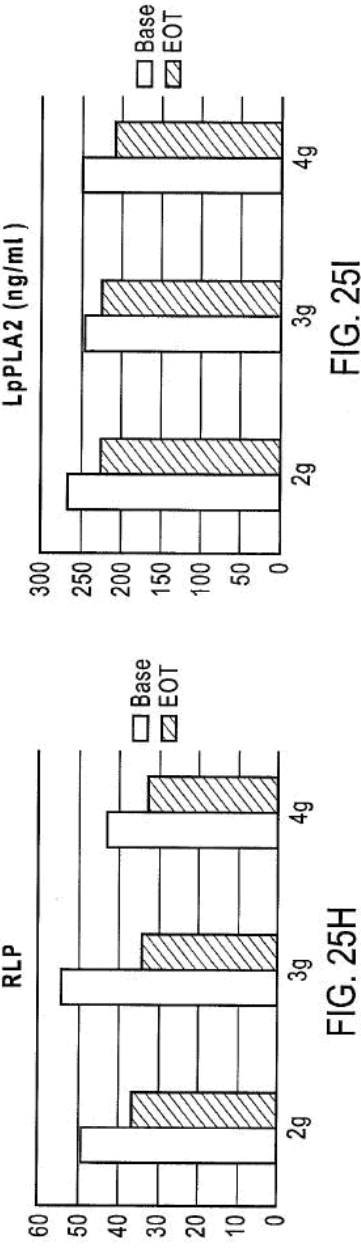
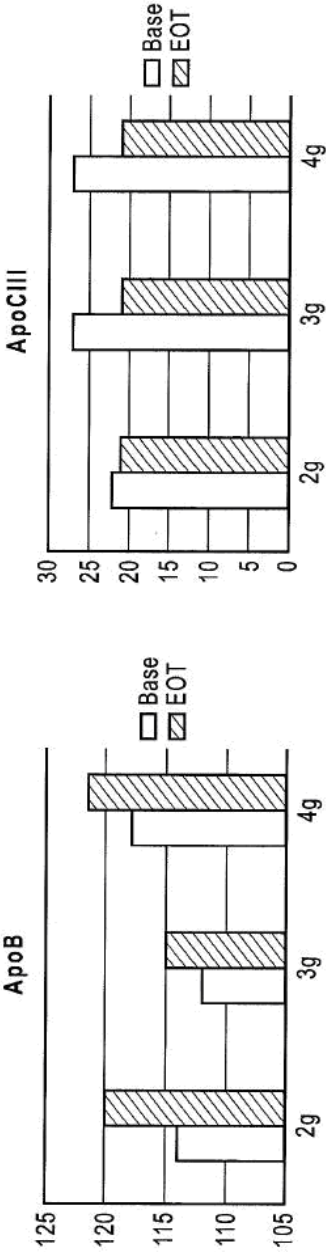


FIG. 25B

Mediana de los niveles plasmáticos absolutos (mg/dl)

Mediana de los niveles plasmáticos absolutos (mg/dl)



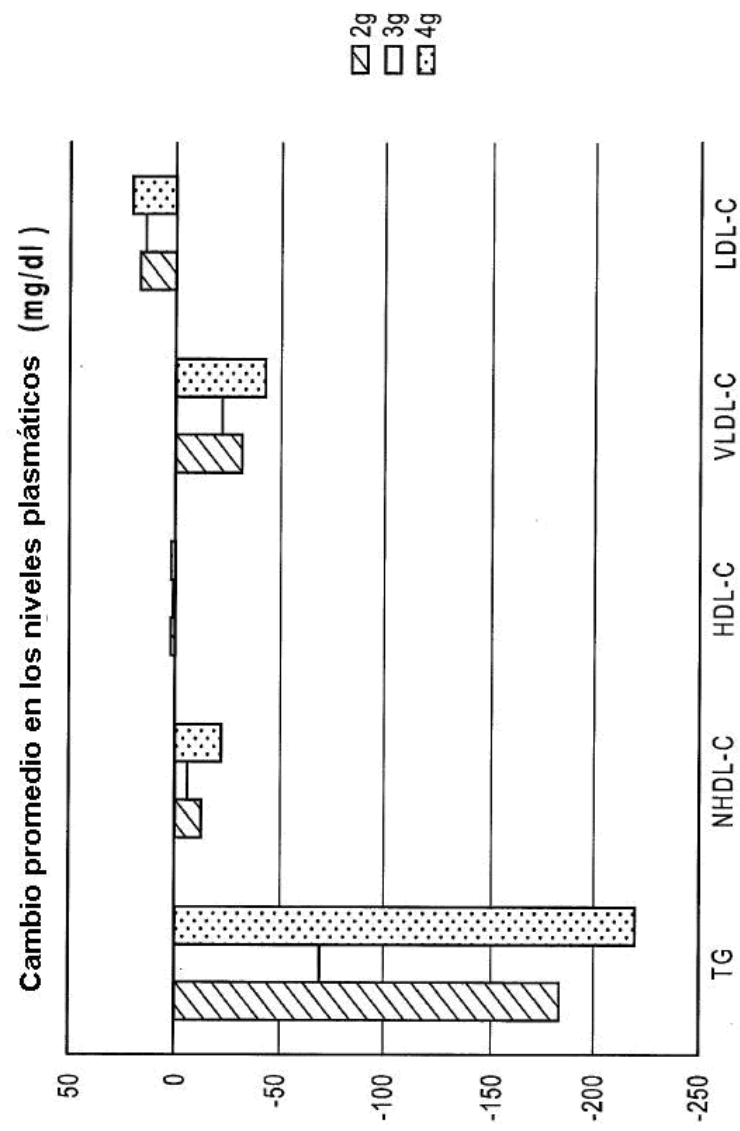


FIG. 26A

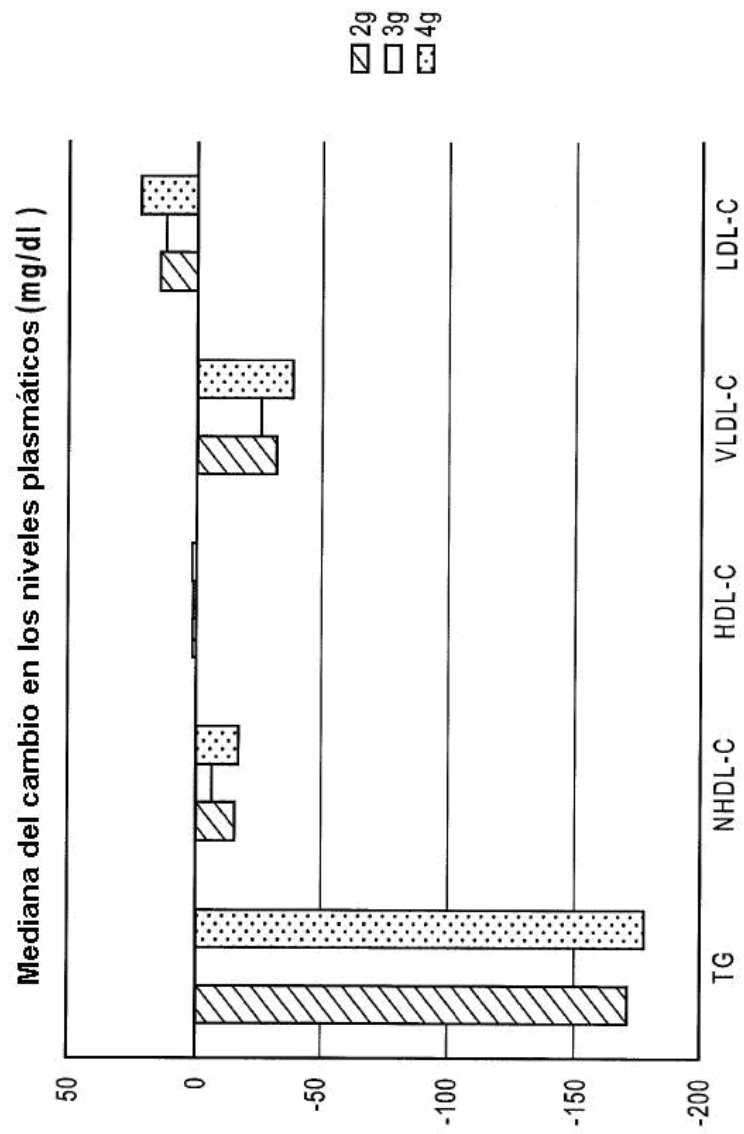


FIG. 26B

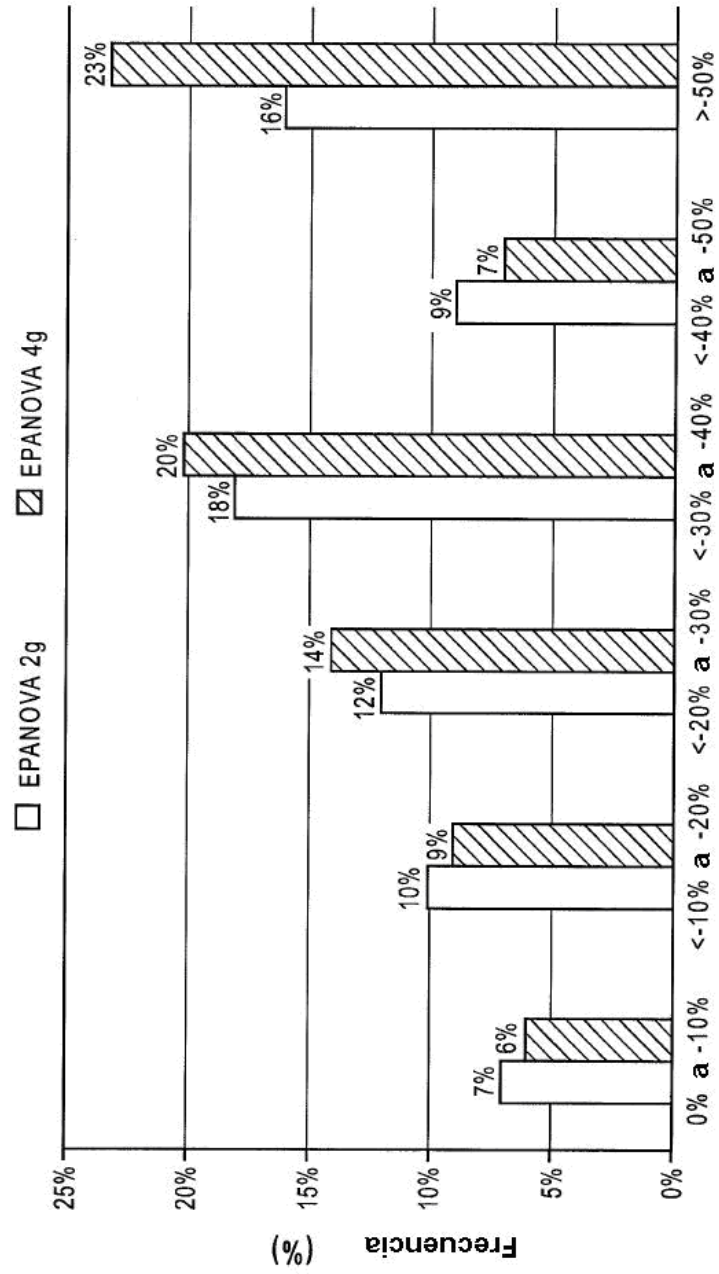


FIG. 27

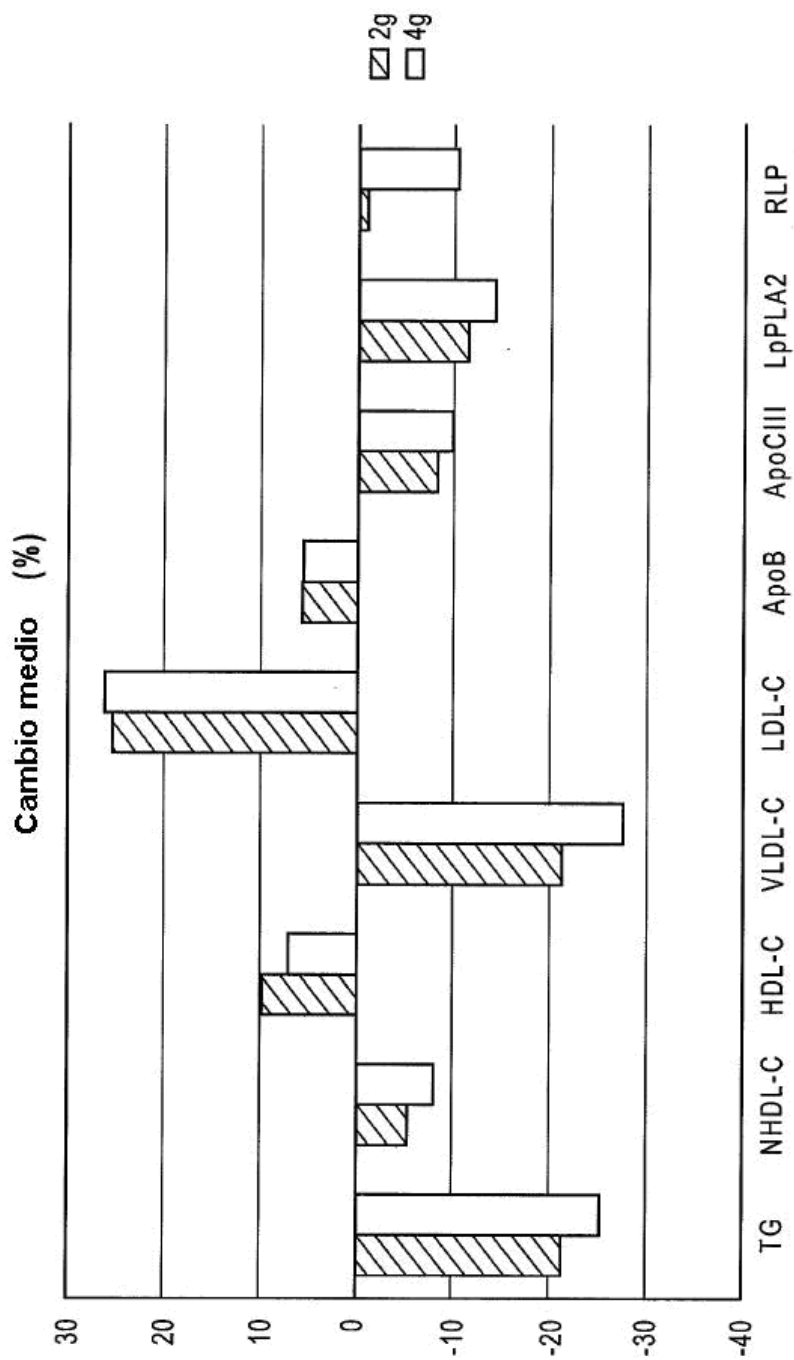


FIG. 28A

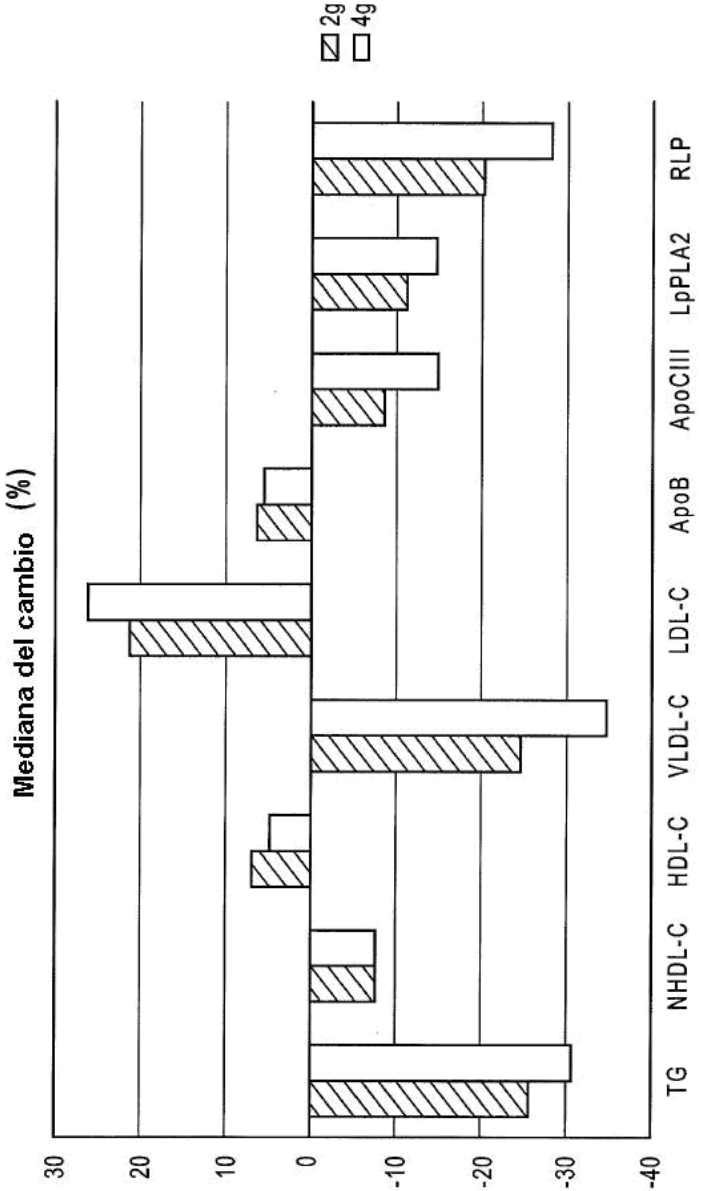


FIG. 28B

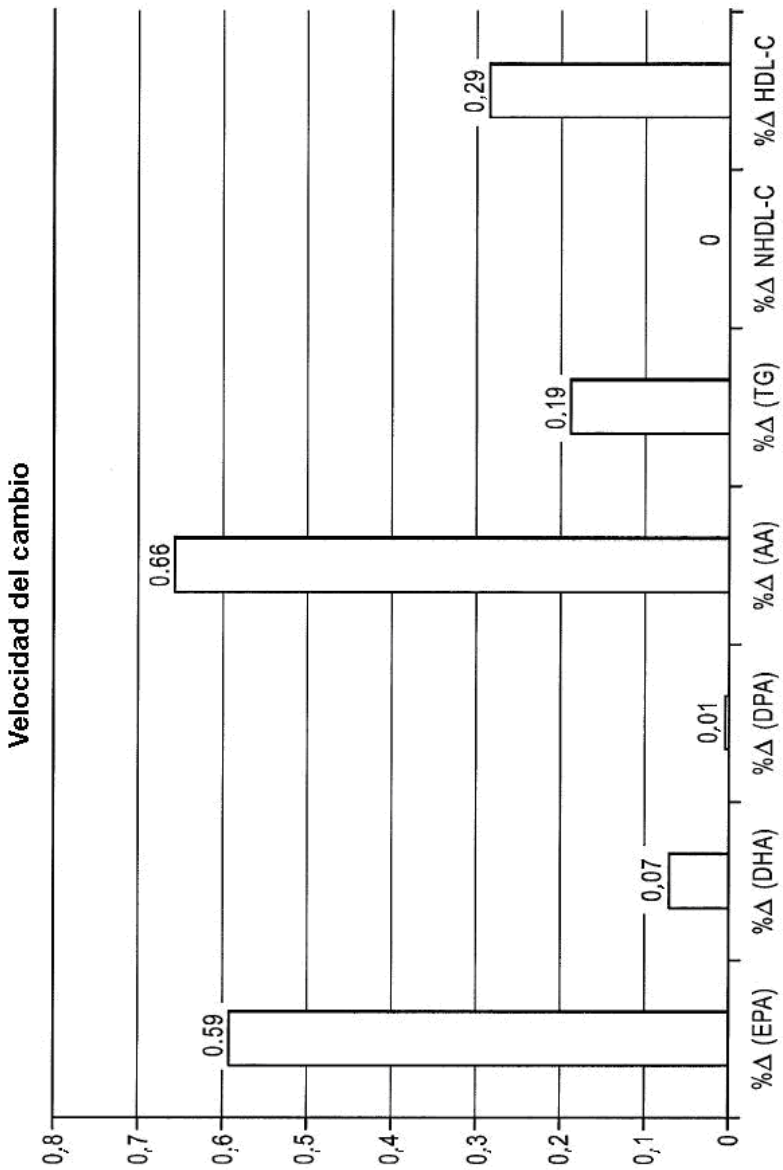
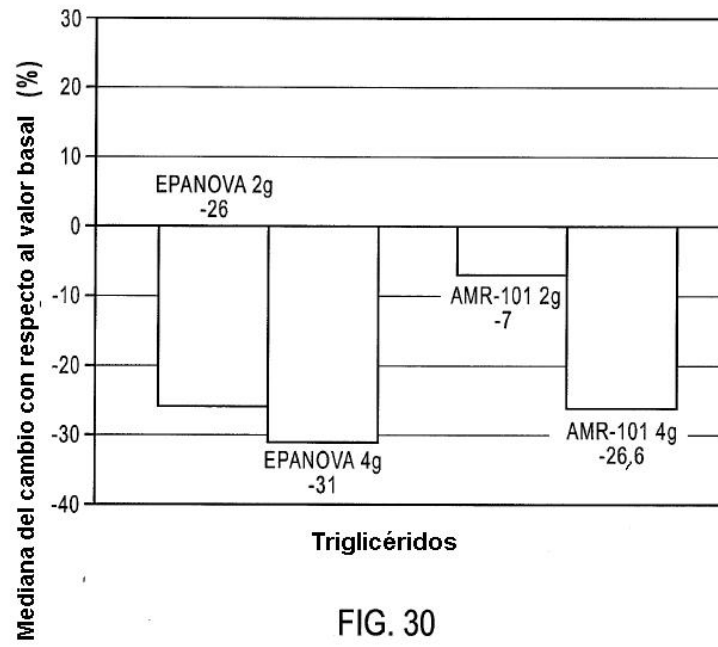


FIG. 29



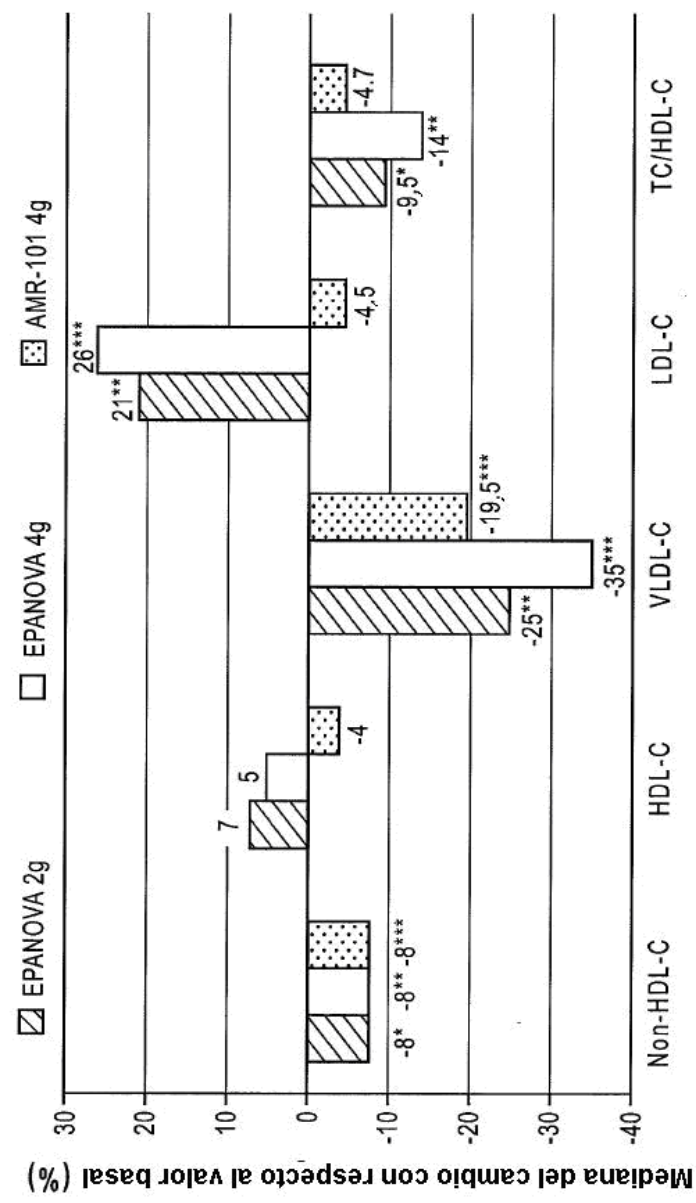


FIG. 31

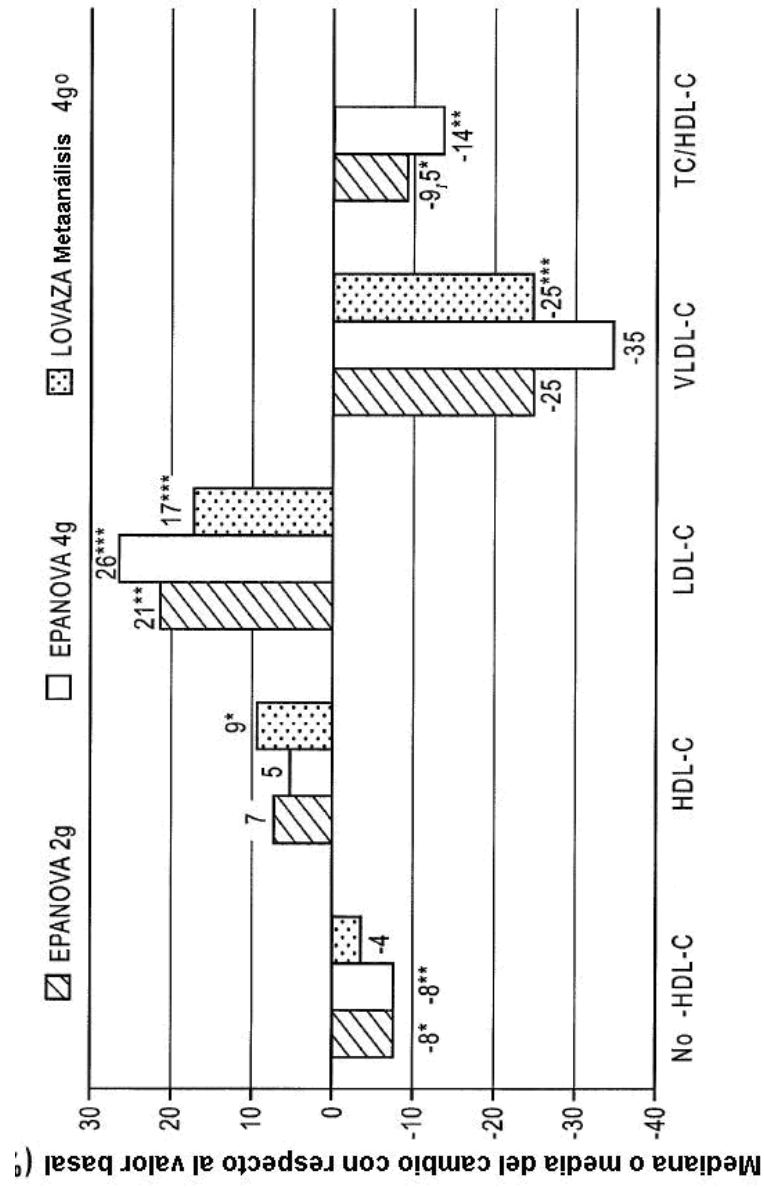


FIG. 32

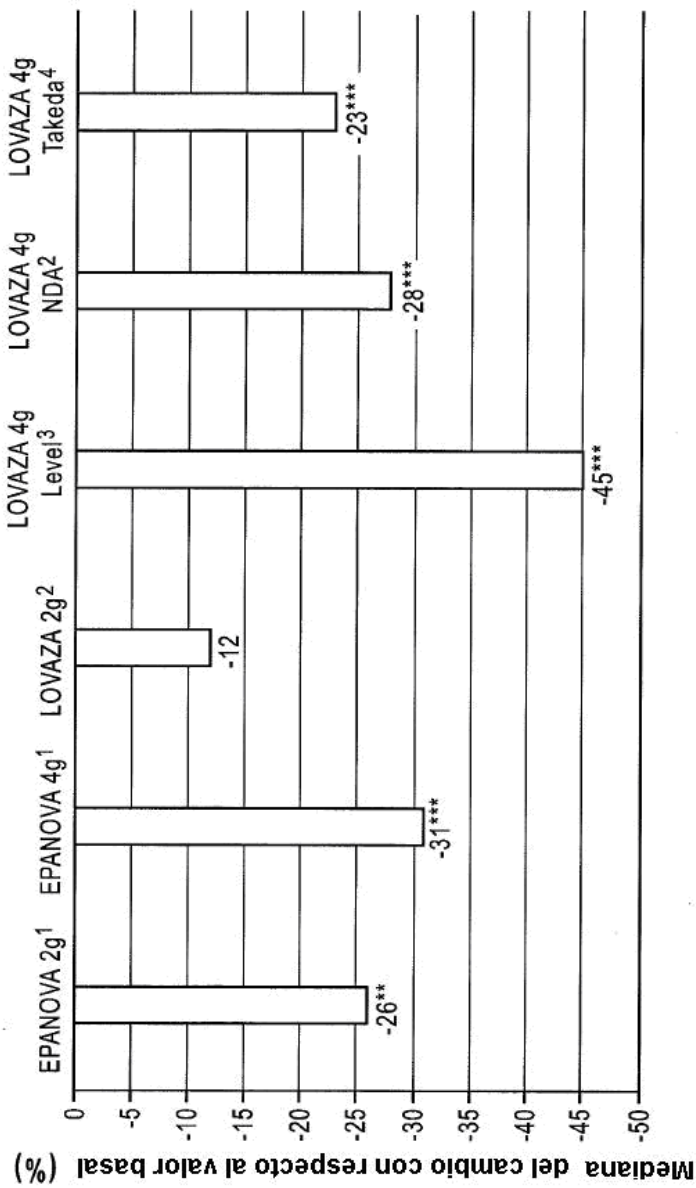
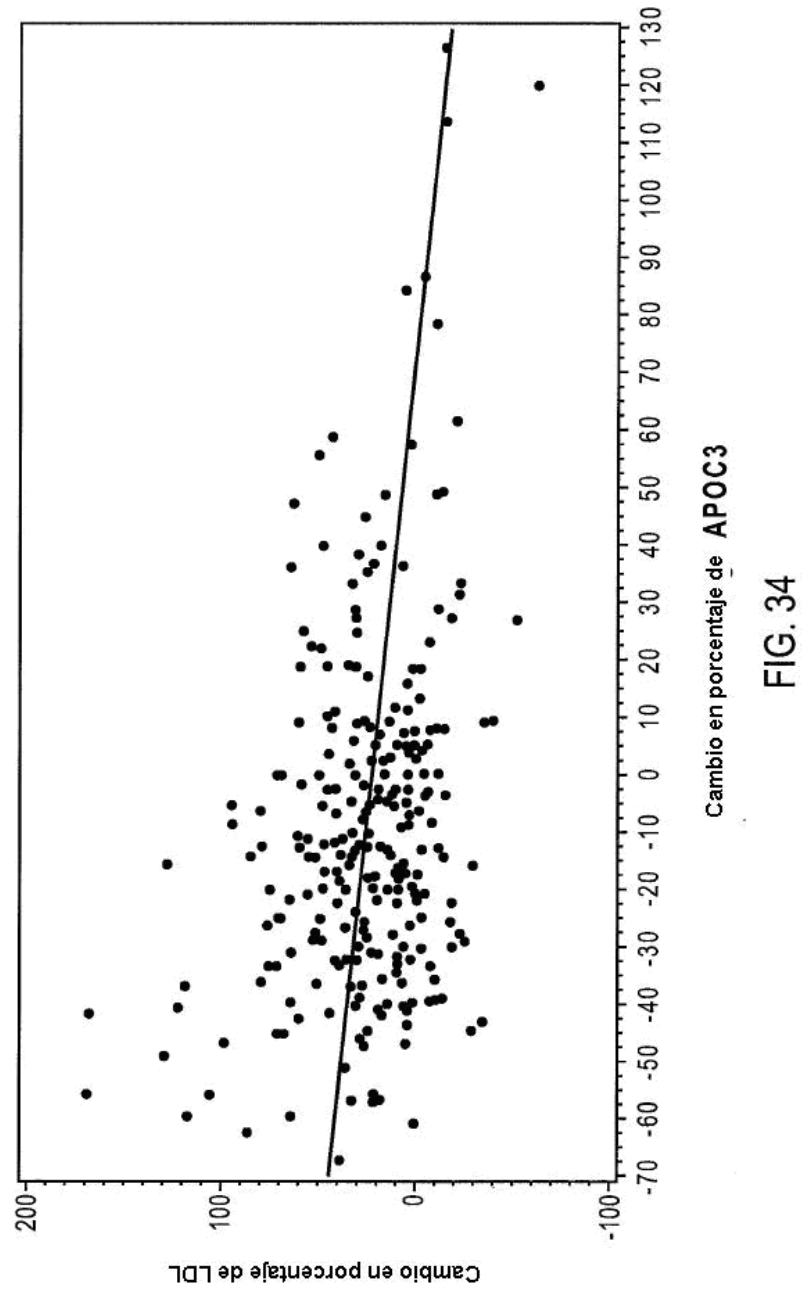


FIG. 33



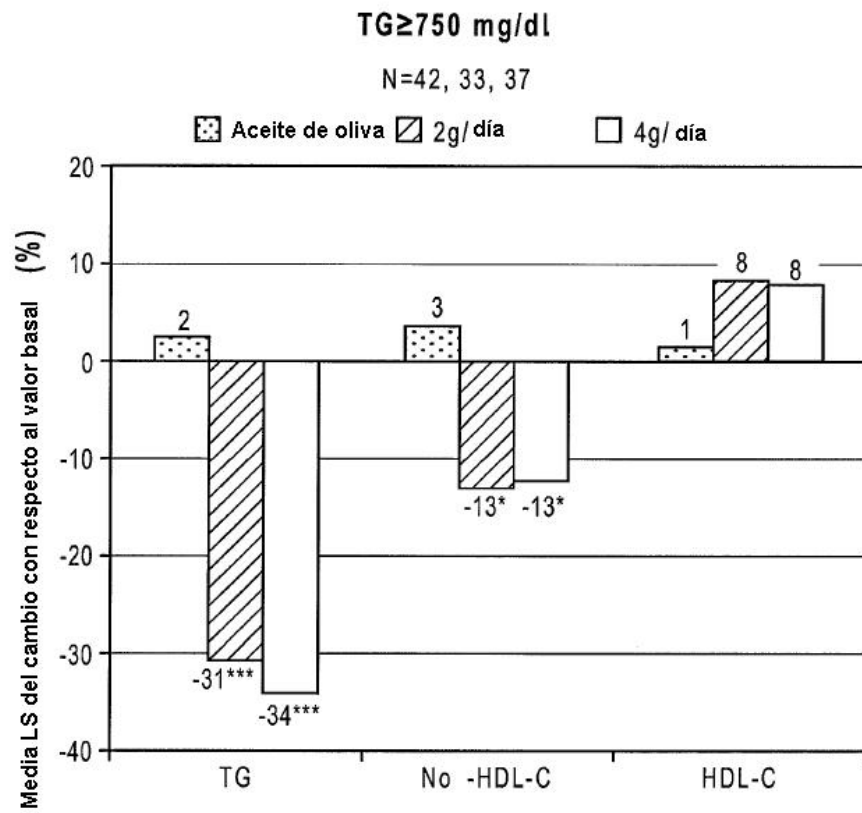


FIG. 35

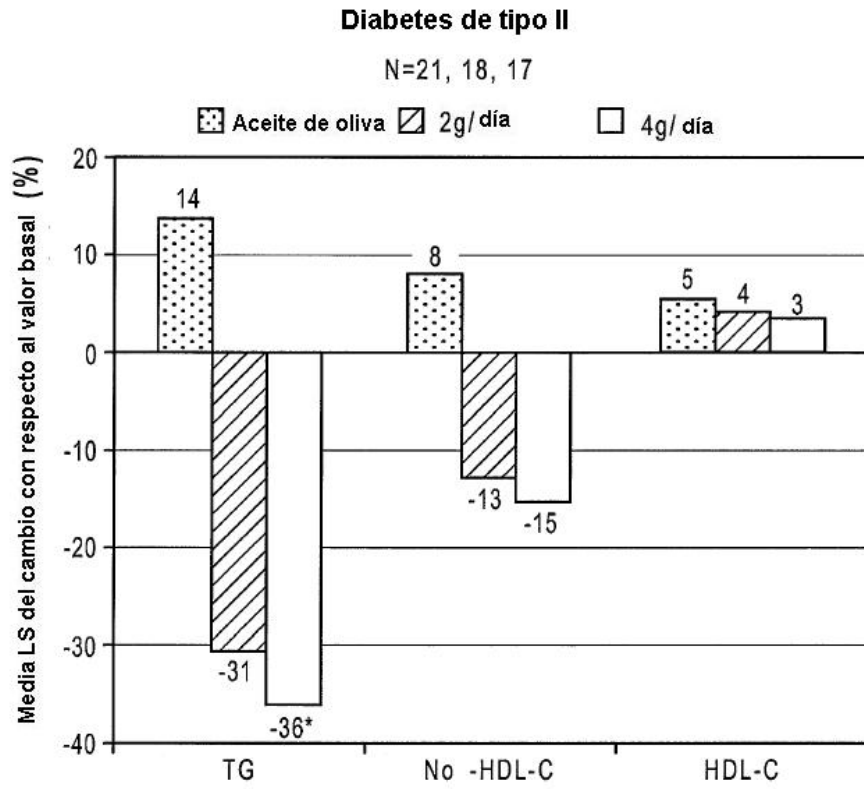


FIG. 36

47/66

Estatinas

N=33, 34, 30

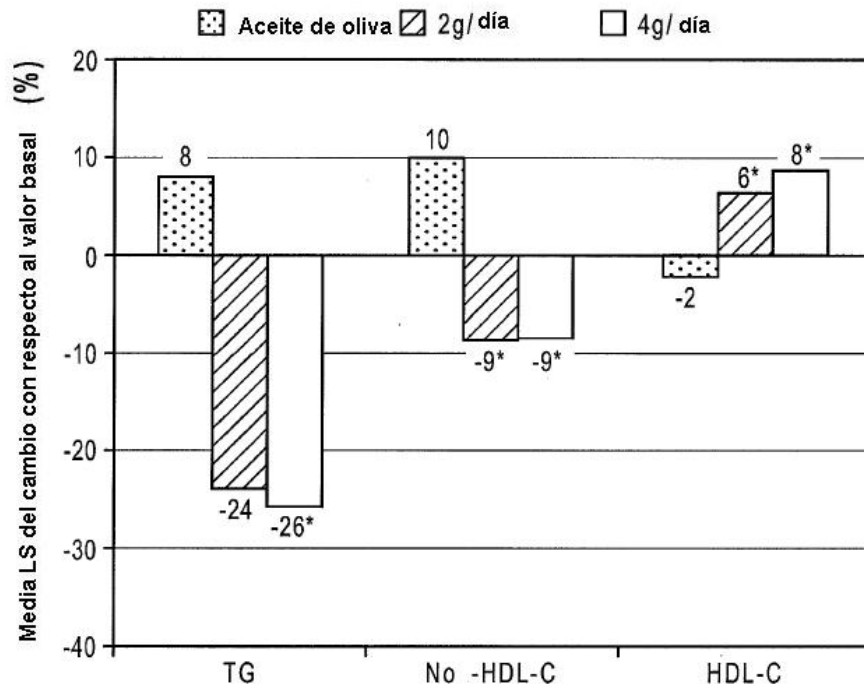


FIG. 37

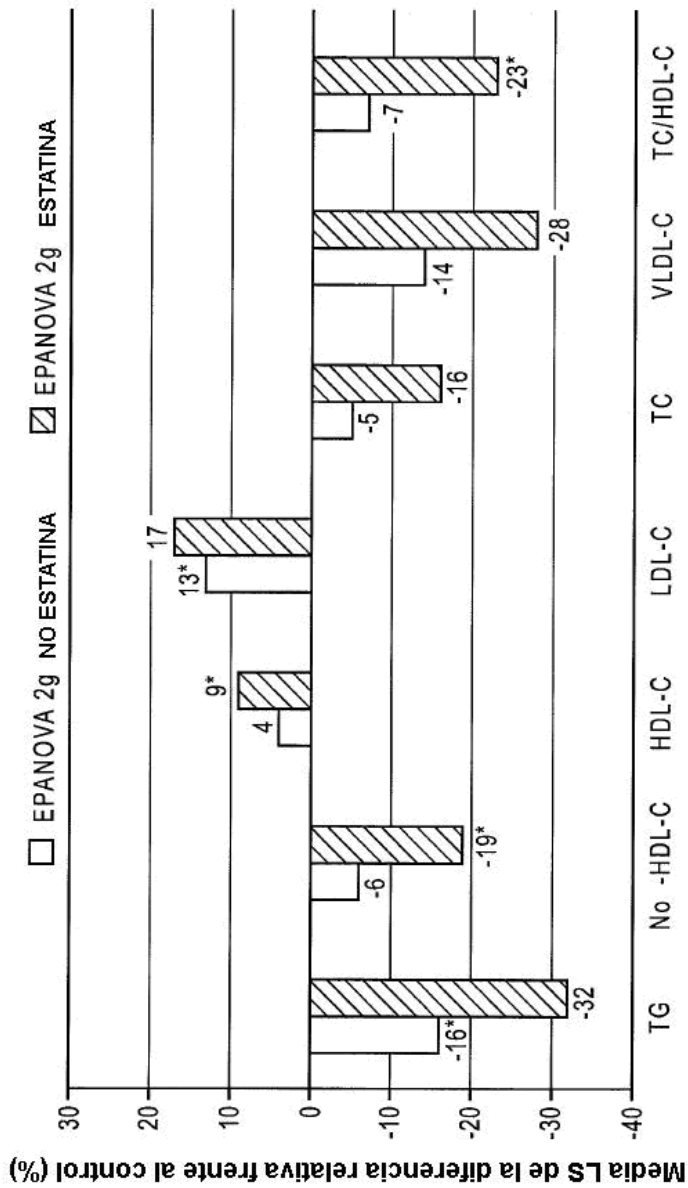


FIG. 38

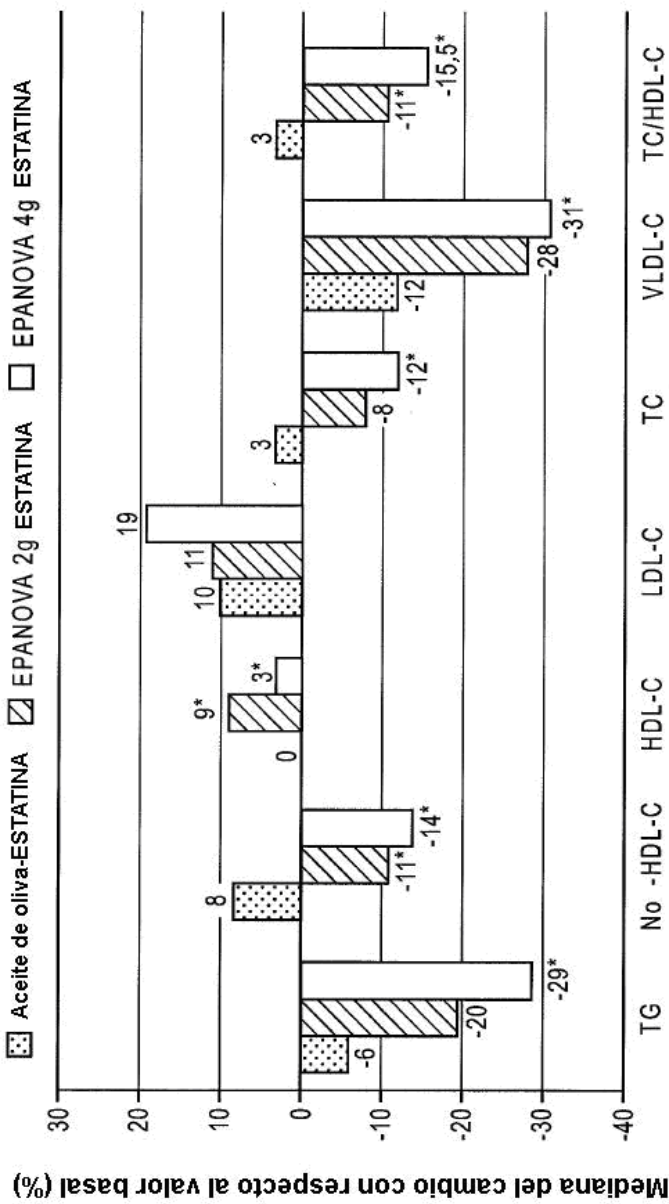


FIG. 39

50/66

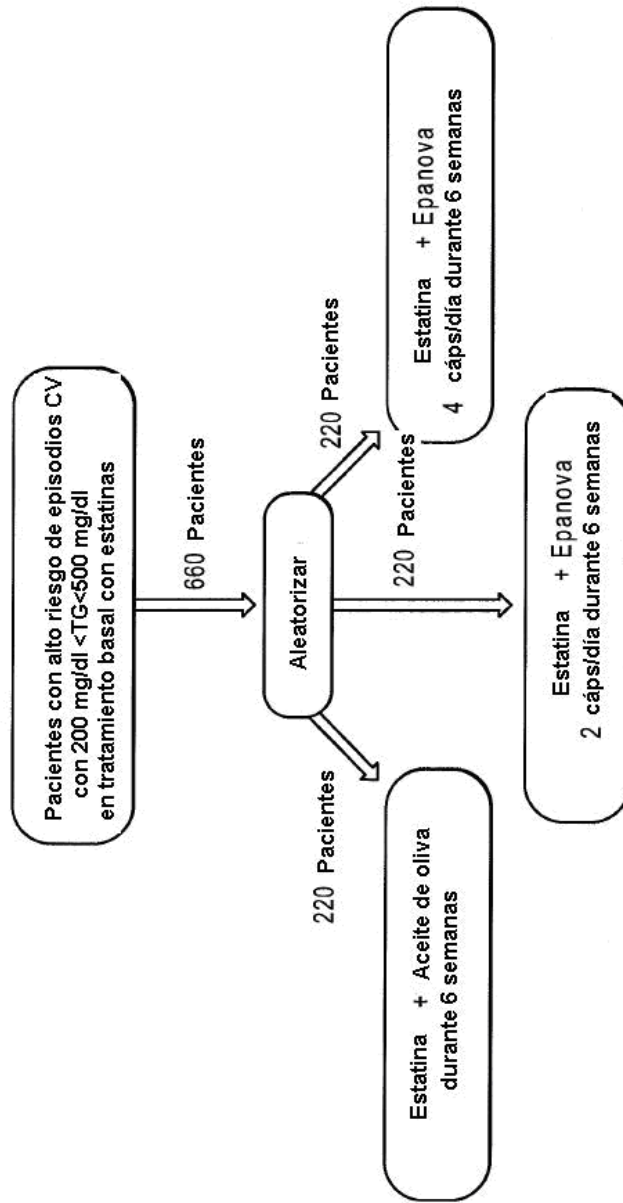


FIG. 40

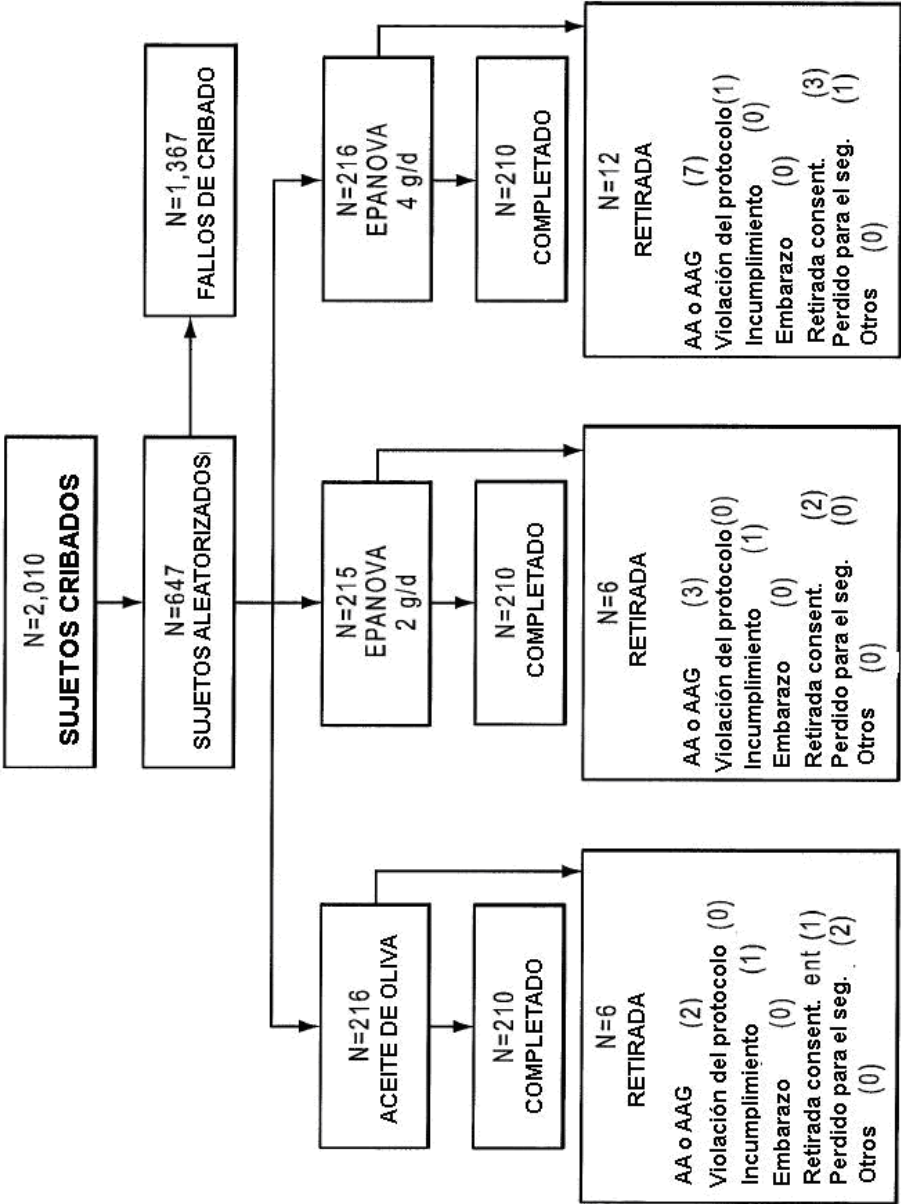
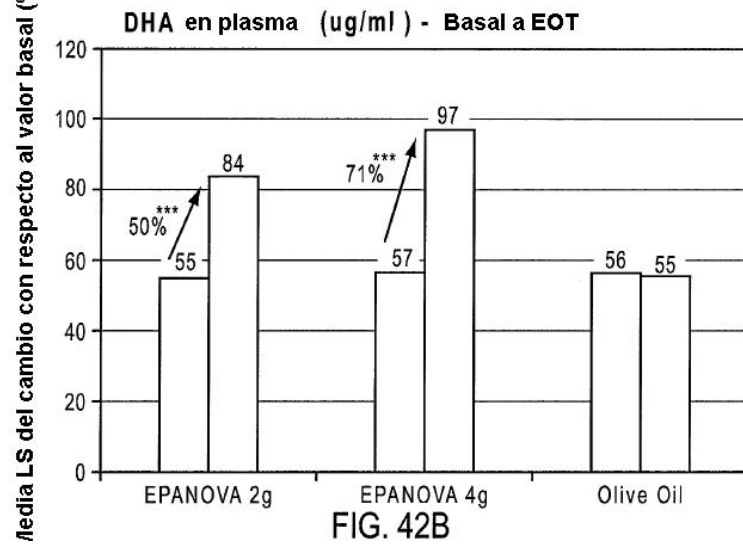
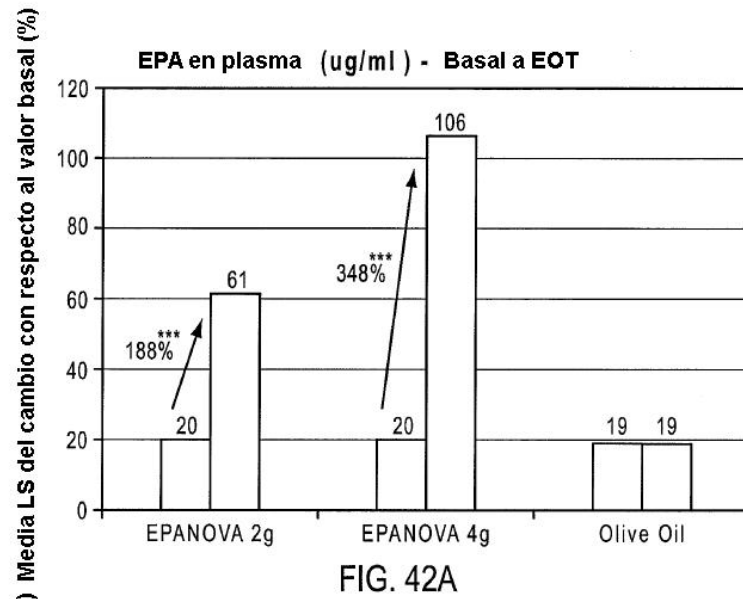
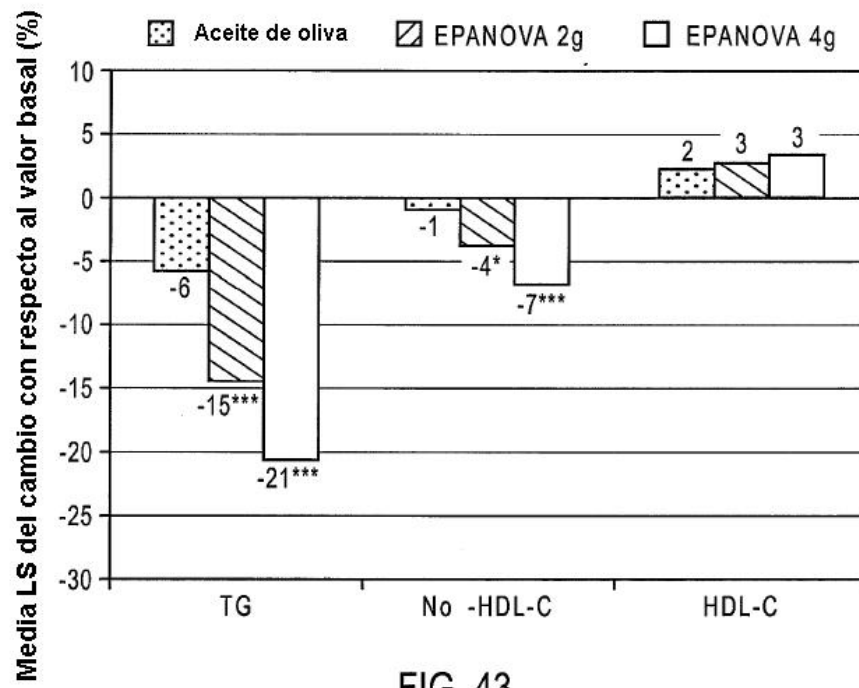


FIG. 41





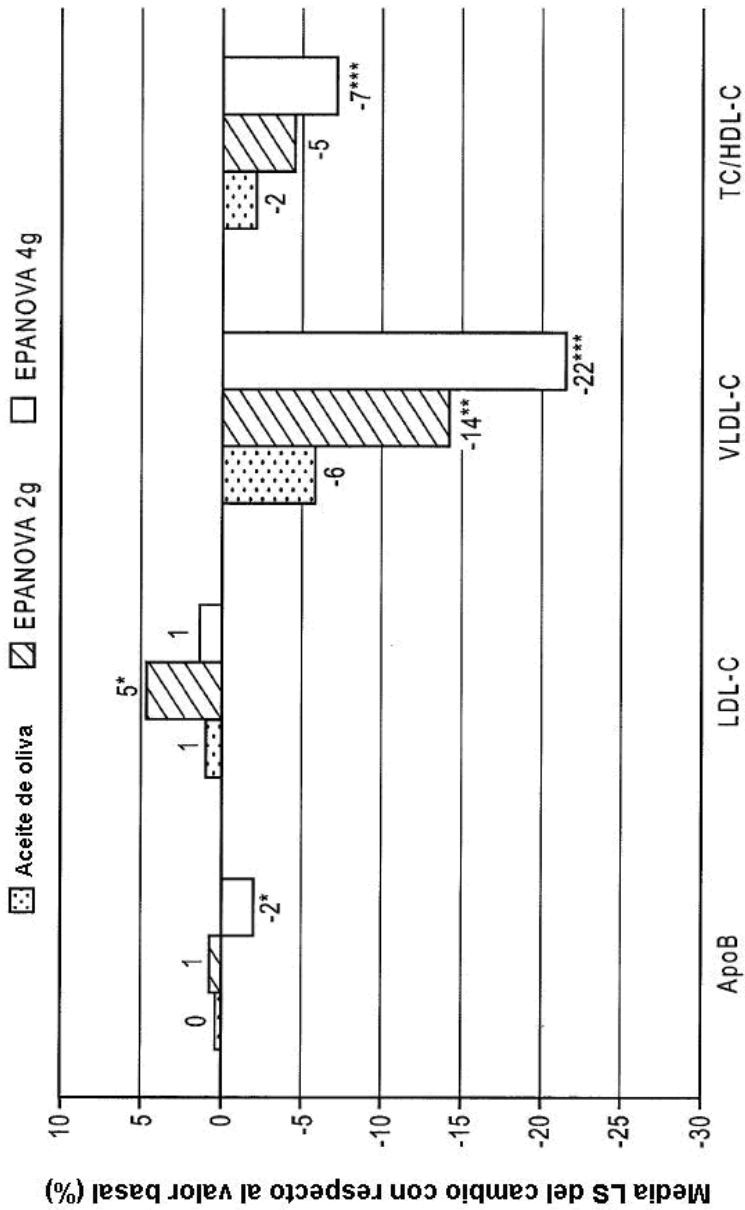


FIG. 44

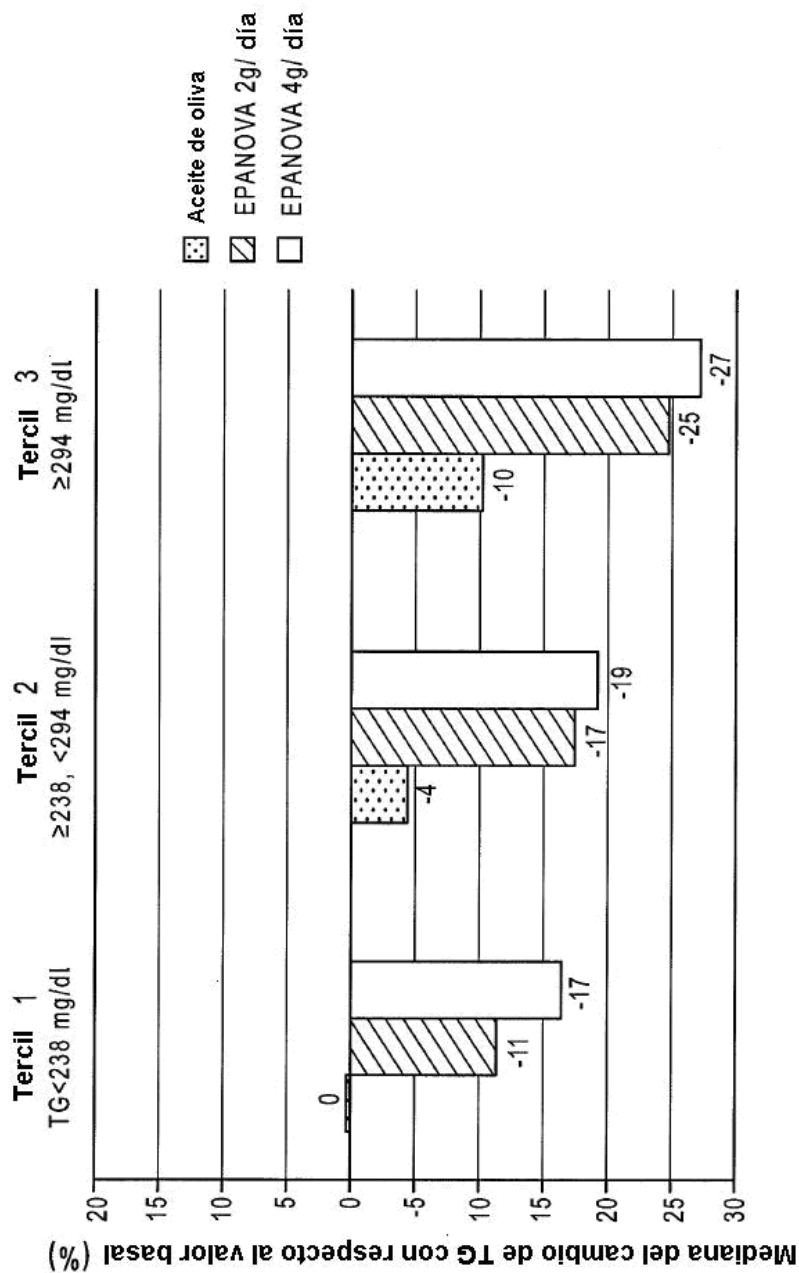


FIG. 45

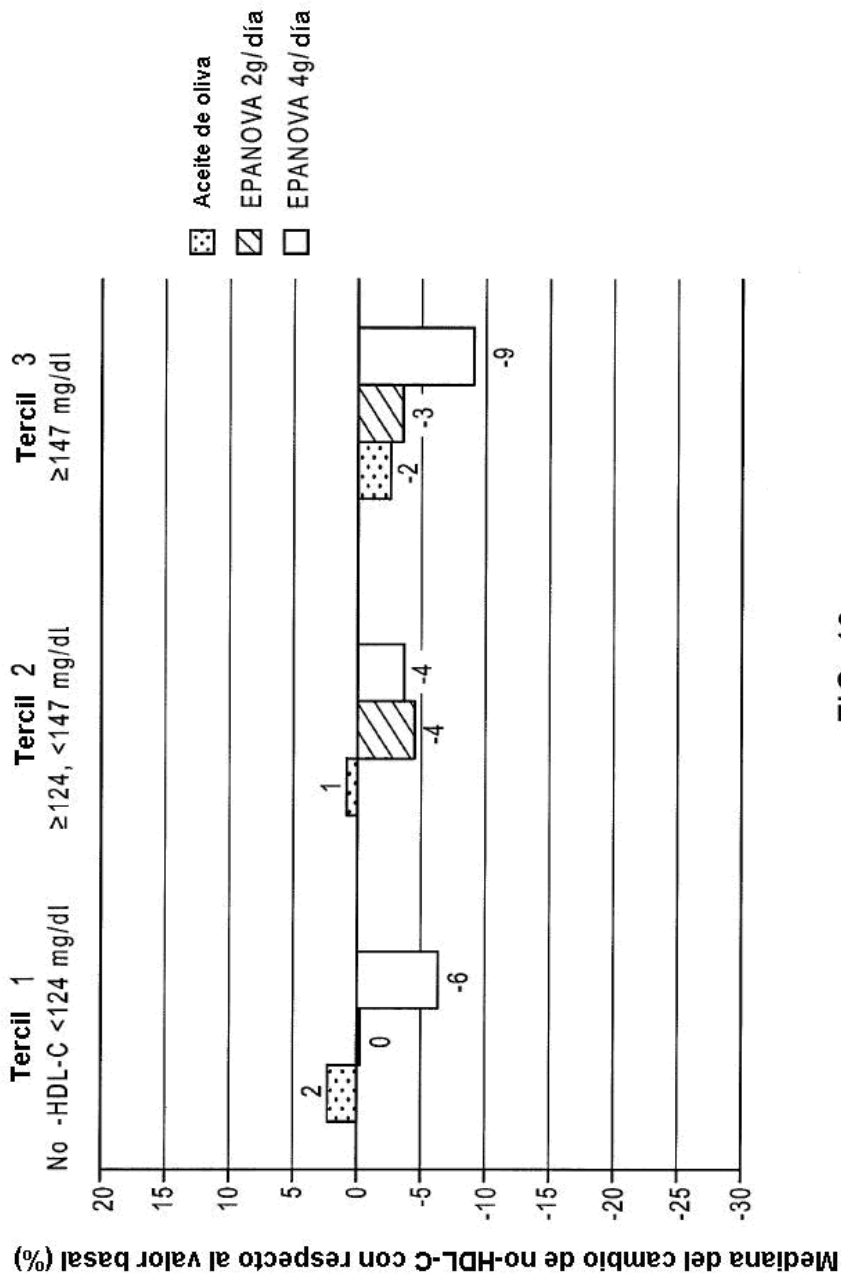


FIG. 46

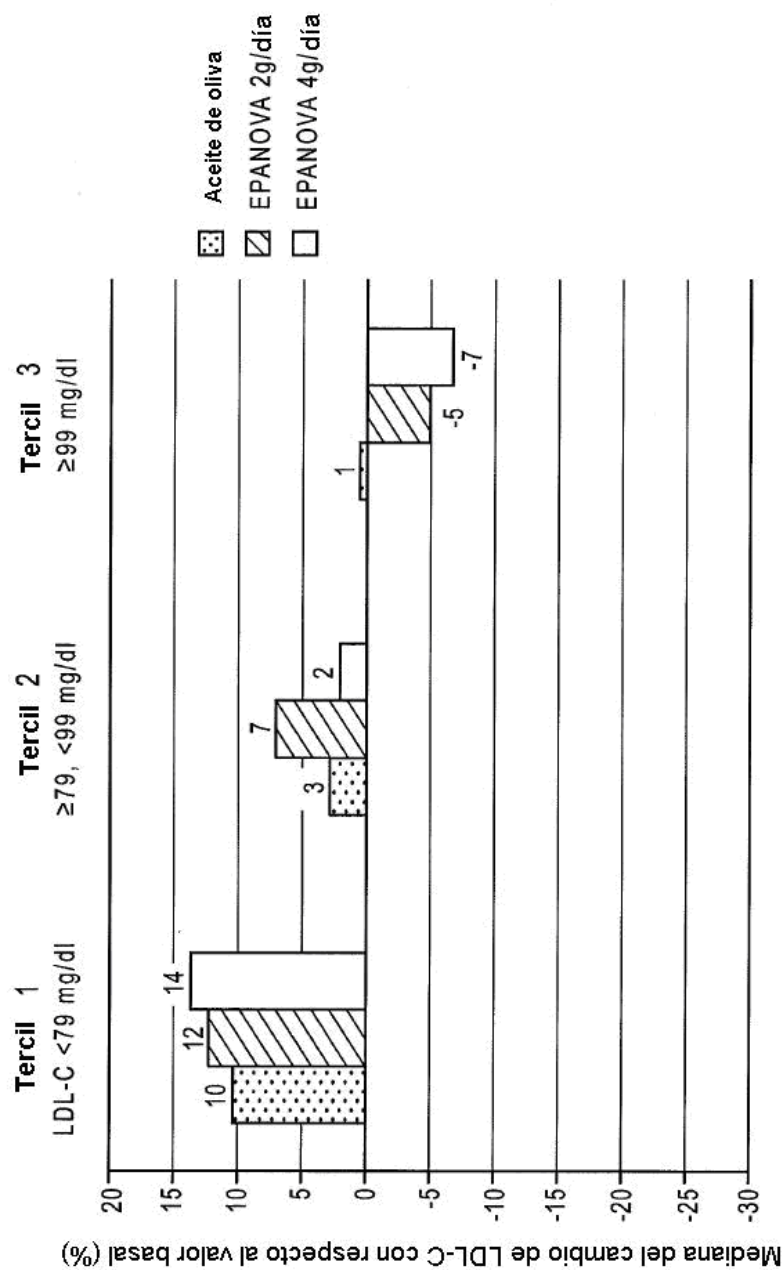


FIG. 47

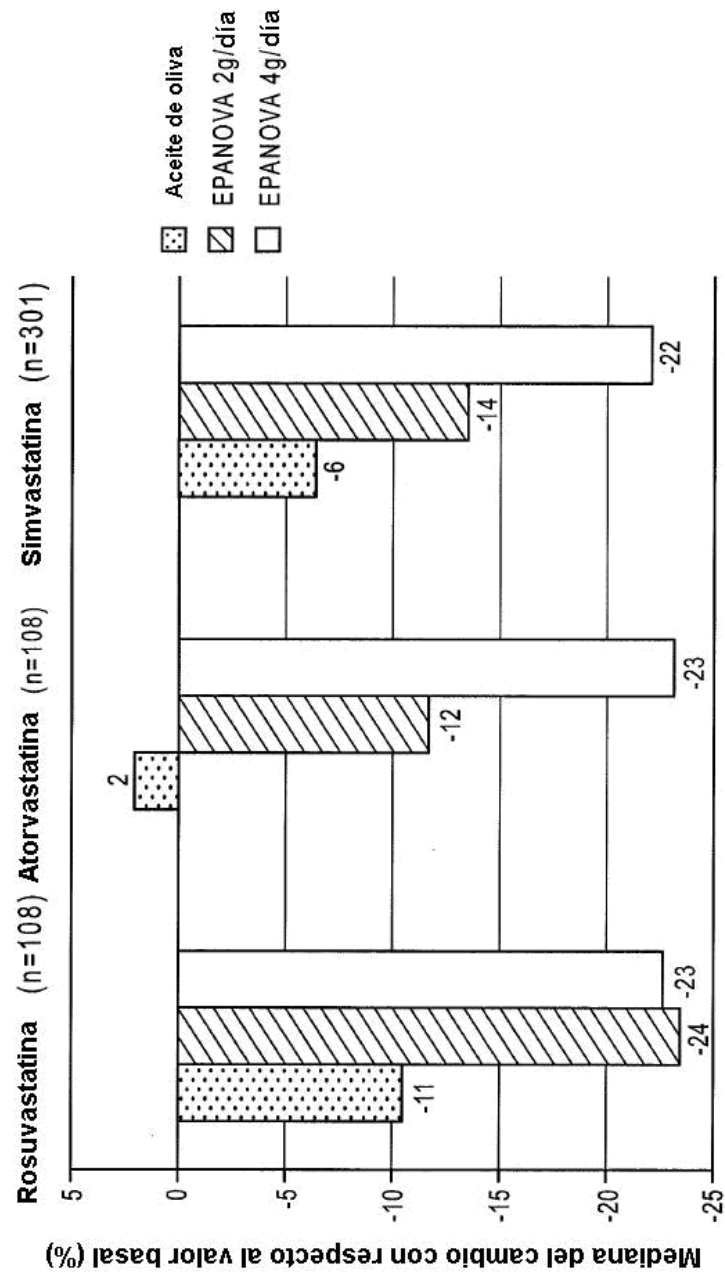


FIG. 48

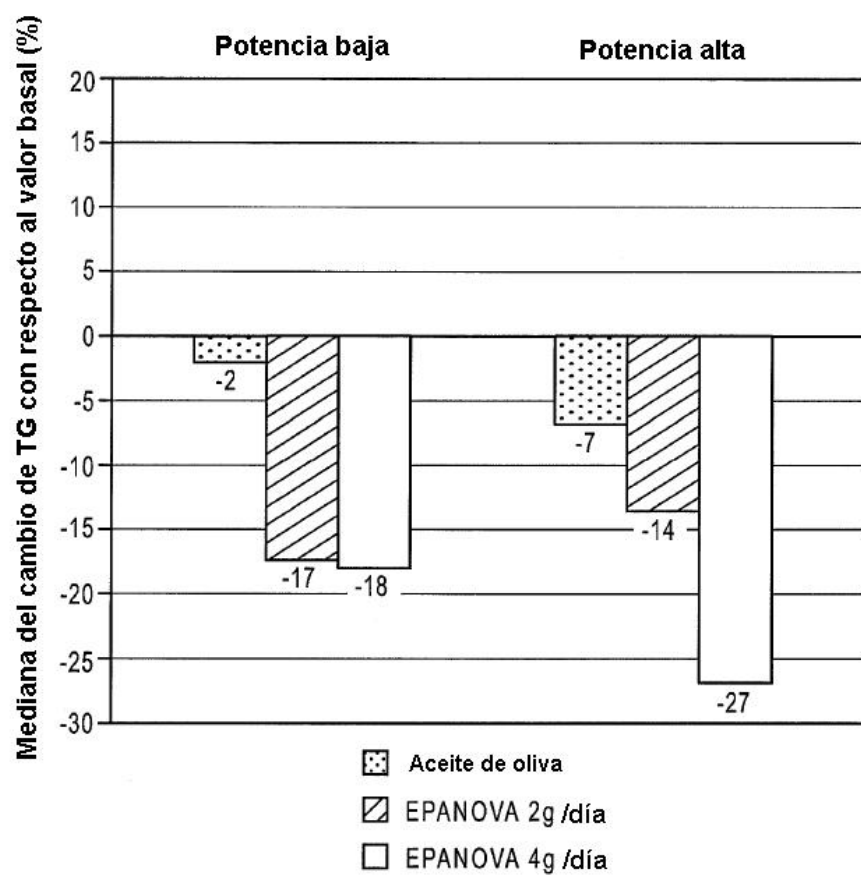


FIG. 49

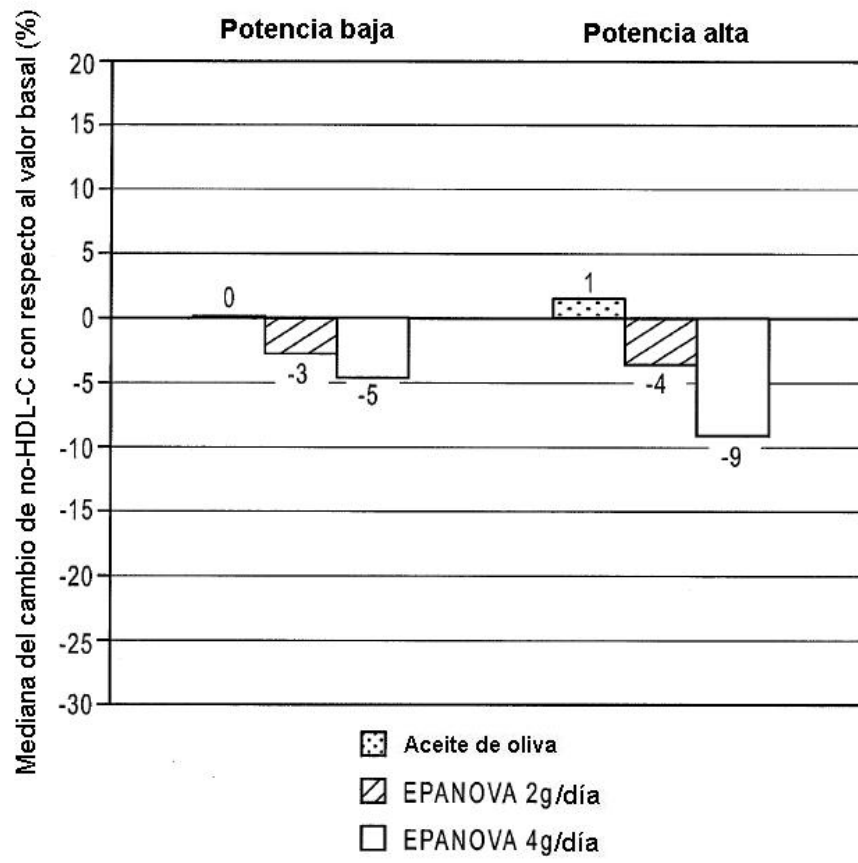


FIG. 50

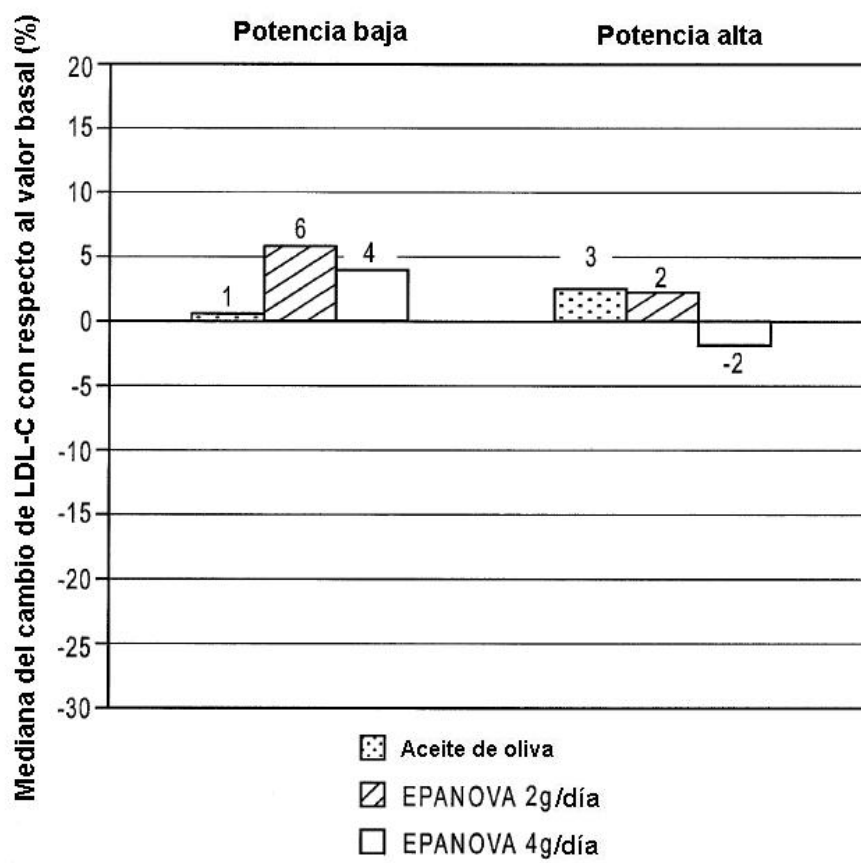


FIG. 51

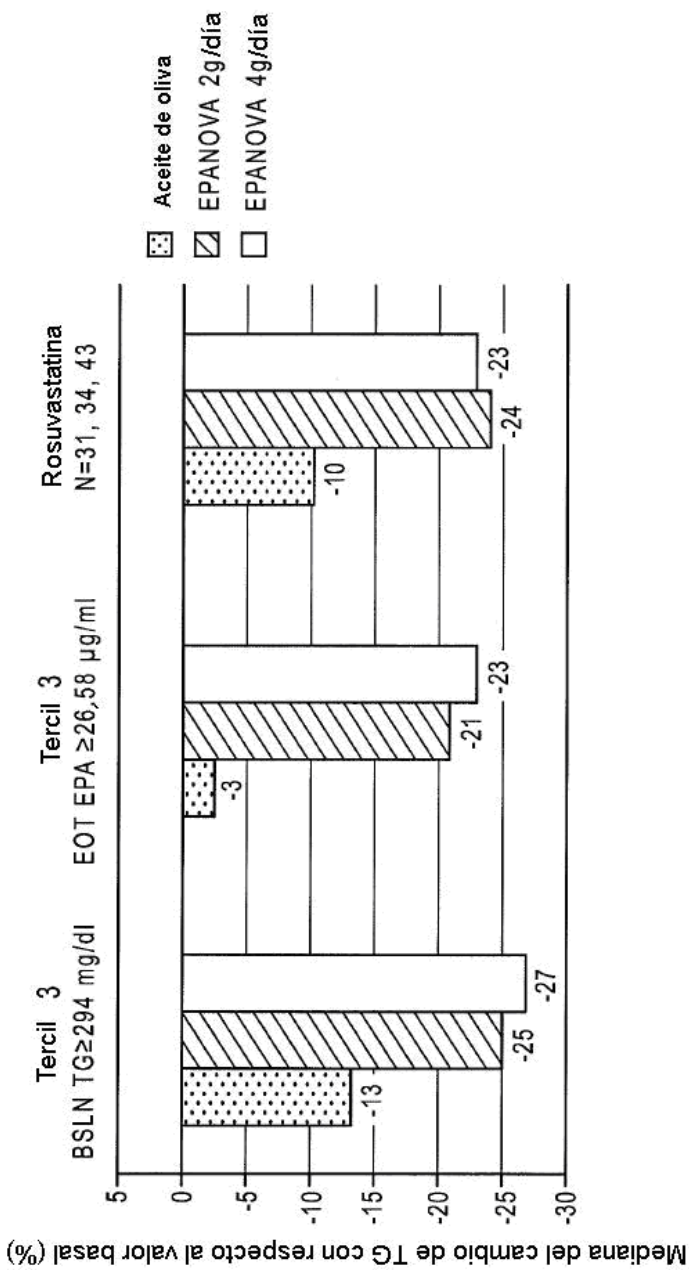


FIG. 52

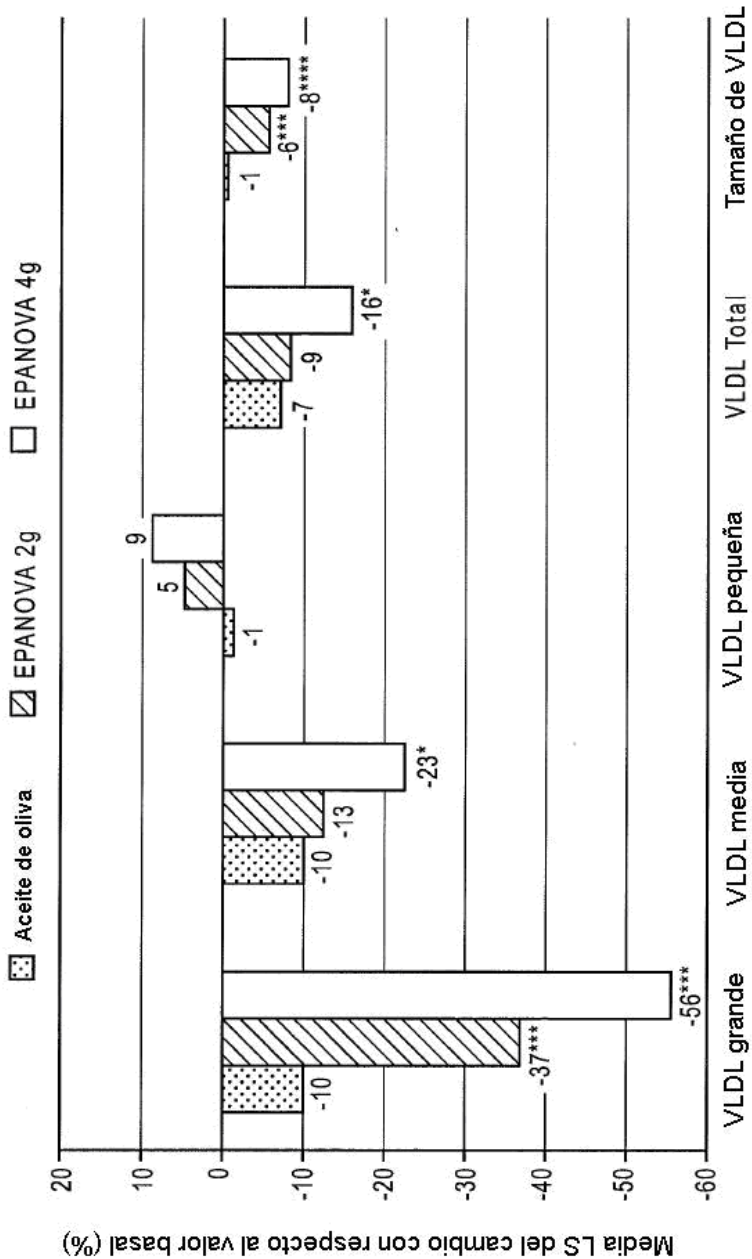


FIG. 53

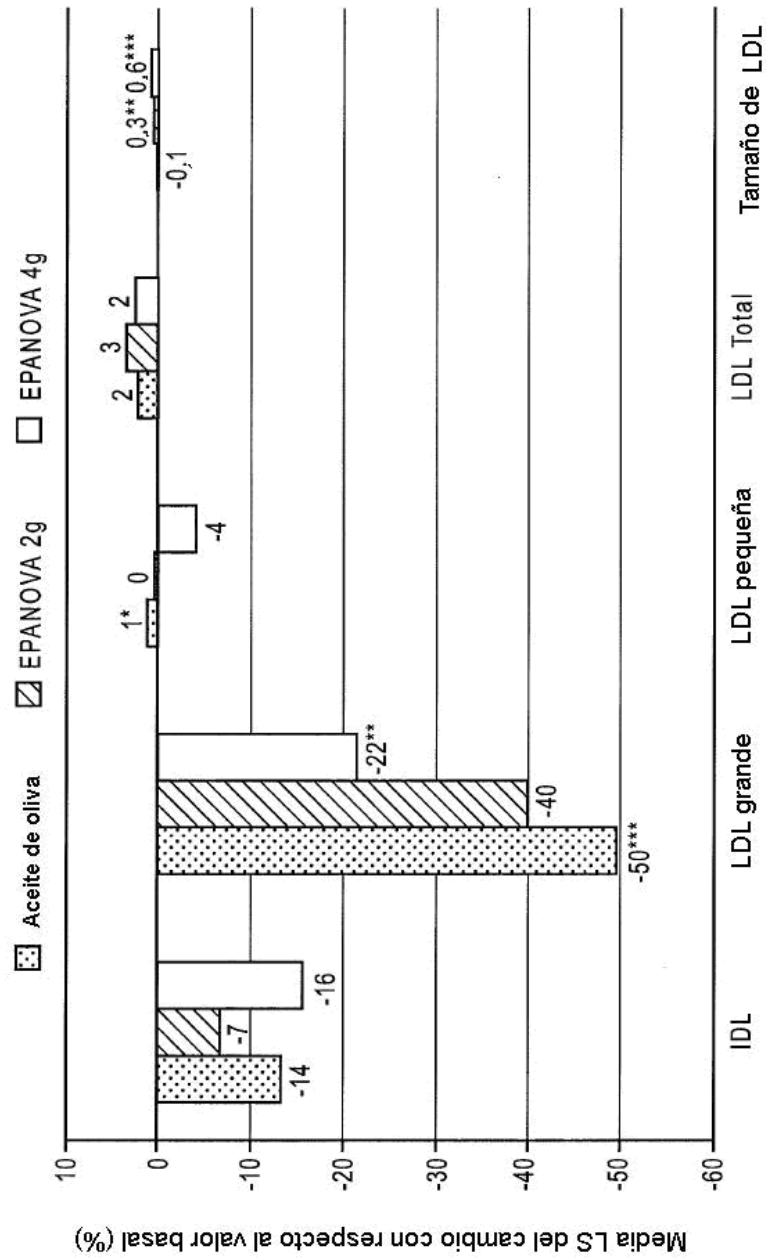


FIG. 54

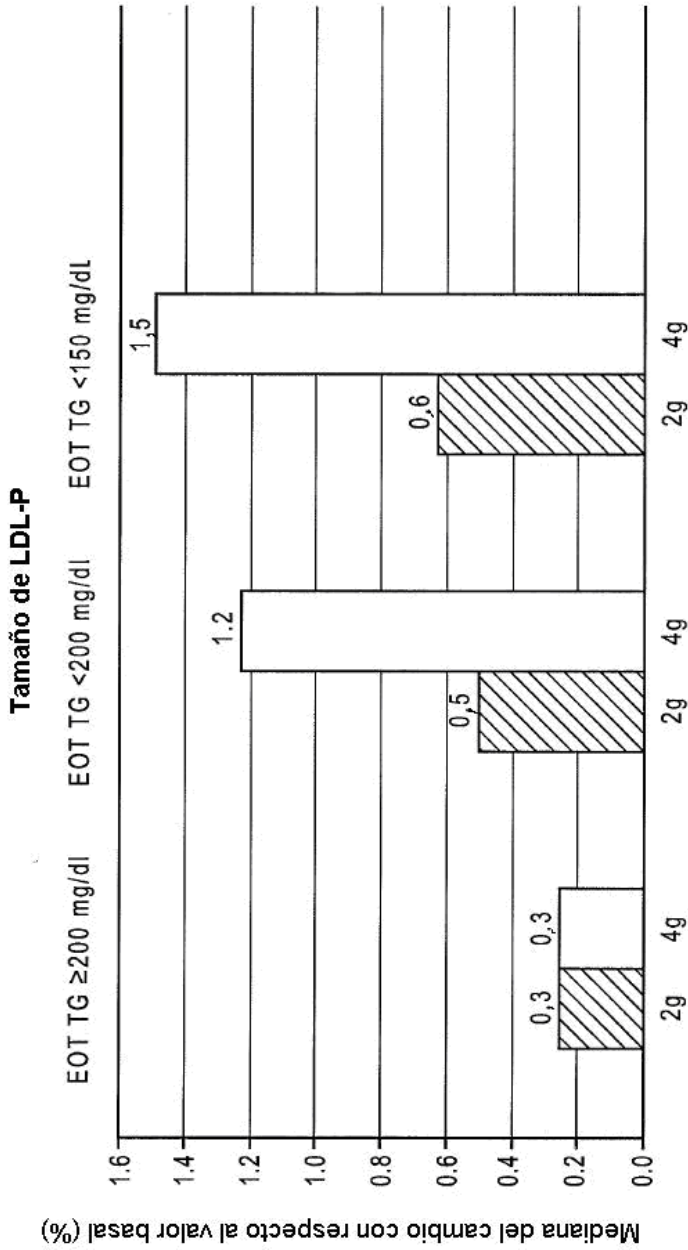
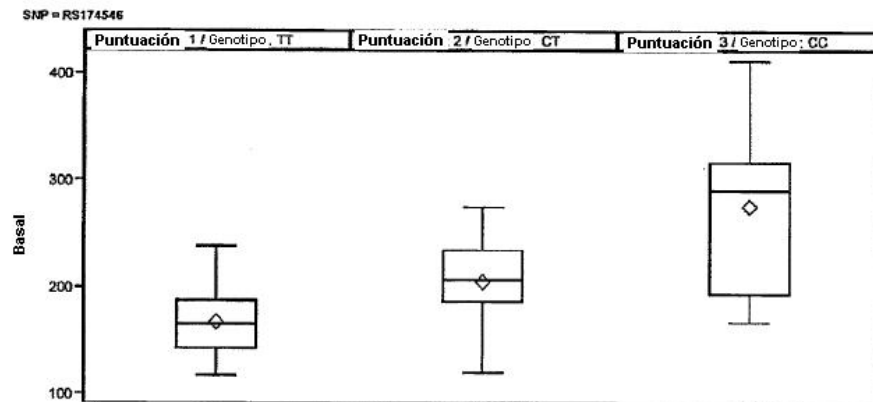


FIG. 55

A



B

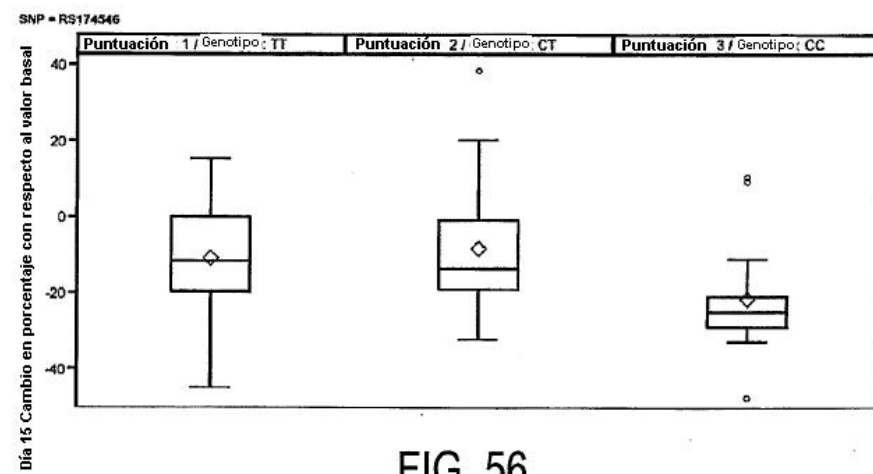


FIG. 56

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau

(43) International Publication Date
11 July 2013 (11.07.2013)



(10) International Publication Number
WO 2013/103902 A1

(51) International Patent Classification:
A61K 31/19 (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)

Illinois 60035 (US). **WOOD, Peter Ralph**; Glen View,
Cotherstone, County Durham DL12NT (GB).

(21) International Application Number:
PCT/US2013/020398

(74) Agents: **BECKER, Daniel et al.**; Dechert LLP, P.O. Box
390460, Mountain View, CA 94039 (US).

(22) International Filing Date:
4 January 2013 (04.01.2013)

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM,
DO, 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, LY, MA, MD,
ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI,
NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU,
RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ,
TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA,
ZM, ZW.

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
61/583,796 6 January 2012 (06.01.2012) US
61/664,047 25 June 2012 (25.06.2012) US
61/669,940 10 July 2012 (10.07.2012) US
61/680,622 7 August 2012 (07.08.2012) US
61/710,517 5 October 2012 (05.10.2012) US
61/713,388 12 October 2012 (12.10.2012) US

(71) Applicants: **OMTHERA PHARMACEUTICALS, INC.**
[US/US]; 707 State Road, Princeton, NJ 08540 (US).
CHRYSLIS PHARMA AG [CH/CH]; Chilchasse 8,
CH-6072 Sachseln (CH).

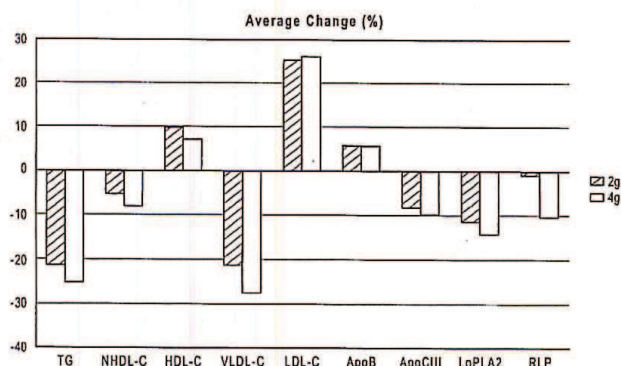
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ,
UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ,
TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM,
TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW,
ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: **MAINES, Timothy, J.**; 13001 North Com-
mons Way, Potomac, MD 20854 (US). **MACHIELSE,**
Bernardus N M; 13800 Turkey Foot Road, North Potom-
ac, Maryland 20854 (US). **MEHTA, Bharat M.**; 21 Crom-
well Drive, Mendham, NJ 07945 (US). **WISLER, Gerald**;
9713 Green Island Cove, Windermere, Florida 34786 (US).
DAVIDSON, Michael; 140 Belle Avenue, Highland Park,

Published:

— with international search report (Art. 21(3))

(54) Title: DPA-ENRICHED COMPOSITIONS OF OMEGA-3 POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN FREE ACID FORM



(57) Abstract: DPA-enriched pharmaceutical compositions of polyunsaturated fatty acids in free acid form, therapeutic methods for their use, and processes for refining the compositions from fish oil are presented. Also provided are methods of treating hypertrigly- ceridemia (200 mg/dL - 500 mg/dL) by adjunctive administration of a statin and the pharmaceutical compositions described herein. Further treatment methods include, inter alia, treatments to increase plasma EPA:AA ratios, treatments to decrease ApoCIII levels, and treatments to reduce or prevent resistance to platelet aggregation inhibitors.

WO 2013/103902 A1

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0070764

Bogotá D.C., Julio 04 de 2014 - 11:19:26

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 830.008.643

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	20233205	04/07/2014	18.750.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr. UNDITARIO	Vr. CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	515.000.00	515.000.00
				<u>\$515.000.00</u>
				=====

SON: **QUINIENTOSQUINCE MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable:

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Julio 4 de 2014 - 11:19:30

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

-/-



RECIBO DE CAJA

No. 14 - 0070486

Bogotá D.C., Julio 03 de 2014 - 17:11:00

RECIBIDO DE : CLARKE MODET

NI 83.008.643

RE

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR PAGO
RECIBO DE CA	999999999	46991	05/05/2014		106.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58492	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58493	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58494	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58495	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58496	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58497	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58498	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58499	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58500	04/06/2014		520.000.00
RECIBO DE CA	999999999	58501	04/06/2014		520.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT. RENTISTICO
58 50005-01-01 SOLICITUDES

CONCEPTO
1607 REIVINDICACION PATENTE UNITARIA
ADICIONAL A LAS 10 INIC

Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
31.000.00	1.798.000.00
\$1.798.000.00	

SON: **UN MILL&OACUTE;N SETECIENTOS NOVENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mail: Info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Julio 3 de 2014 - 17:11:02