

COMPOSICIONES ENRIQUECIDAS DE ÁCIDOS GRASOS POLIINSATURADOS

SOLICITUD RELACIONADA

Esta Solicitud reclama el beneficio prioritario de la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos No. 62/926,239, presentada el 25 de octubre de 2019, incorporada en su totalidad aquí para todos los propósitos.

CAMPO DE LA INVENCION

Las presentes modalidades se refieren a composiciones lipídicas que están enriquecidas con uno o más ácidos grasos poliinsaturados, por ejemplo, omega-3 DPA, DTA, ETA o combinaciones de los mismos. Estas composiciones de ácidos grasos poliinsaturados tienen una serie de beneficios para la salud y una estabilidad mejorada. Estas composiciones de ácidos grasos poliinsaturados se pueden obtener a partir de una única fuente que es escalable y sostenible. En algunas modalidades, omega-3 DPA, DTA o ETA se combinan con ácido oleico que sinergiza las actividades beneficiosas de estos ácidos grasos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 de cadena larga (LC-omega-3) son ampliamente reconocidos como compuestos importantes para la salud humana y animal. Estos ácidos grasos pueden obtenerse de fuentes dietéticas o, en menor medida, por conversión de ácidos grasos linoleico (LA, 18:2 ω -6) o α -linolénico (ALA, 18:3 ω -3), que se consideran ácidos grasos esenciales en la dieta humana. Desde el punto de vista nutricional, los ácidos grasos omega-3 más importantes son probablemente el ácido α -linolénico, el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20: 5 ω -3 o 20: 5n-3) y el ácido docosahexaenoico (DHA, 22:

6 ω -3 o 22: 6n-3). Por ejemplo, el DHA es importante para el desarrollo del cerebro y los ojos; EPA está asociado con la salud cardiovascular.

El ácido docosapentaenoico n-3 (DPAn-3, 22: 5 ω -3) es un LC-omega-3 con beneficios para la salud conocidos, que incluyen la reducción de la inflamación y el apoyo a la salud cardiovascular. El DPAn-3 también es un componente de los tejidos adiposo, cardíaco y muscular. Además, DPAn-3 es un sustrato para la conversión en DHA. Por consiguiente, existe la necesidad de una fuente sostenible de DPAn-3.

El ácido docosatetraenoico (ácido docosatetraenoico, DTAn-3, 22: 4 ω -3) es un LC-omega-3 menos conocido con beneficios comparativamente indocumentados. Por tanto, sigue existiendo la necesidad de una fuente sostenible de DTAn-3, al menos para proporcionar una caracterización adicional de este ácido graso.

El ácido eicosatetraenoico (ETA, 20: 4 ω -3) es un LC-omega-3 que también parece tener actividades antiinflamatorias. Además, ETA es un intermediario en la biosíntesis de EPA. Al igual que con DPA y DTA, sigue existiendo la necesidad de una fuente sostenible de ETA.

El ácido eicosatrienoico (ETrA) (C20: 3 ω -3) también puede servir como intermedio en la biosíntesis de EPA, como sustrato para la conversión a ETA. La ETrA también puede estar implicada en la salud cognitiva. Por consiguiente, existe la necesidad de una fuente sostenible de ETrA.

Generalmente, la estabilidad oxidativa de un ácido graso disminuye a medida que aumenta el número de dobles enlaces carbono-carbono (es decir, el grado de insaturación). Como consecuencia, los productos con un mayor contenido de omega-3 tienden a sufrir una vida útil reducida. DPAn-3, DTAn-3 y ETA son todas grasas poliinsaturadas que tienden a oxidarse fácilmente.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de DPAn-3, DTAn-3 o ETA que sean estables durante o después del procesamiento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Las presentes modalidades proporcionan composiciones lipídicas enriquecidas en contenido de LC-omega-3, tales como DPAn-3 (22: 5n-3), DTAn-3 (22: 4n-3), ETA (20: 4n-3), o contenido de ETrA (20: 3n-3), y métodos para obtener estas composiciones. En al menos una modalidad, el ácido graso DPAn-3, DTAn-3, ETA o ETrA se obtiene de una planta, tal como aceite de semilla vegetal de la familia de plantas *Brassicaceae*. En una modalidad particular, *Brassicaceae* es *Brassica juncea*. En algunas modalidades, la composición comprende al menos un LC-omega-3 enriquecido (por ejemplo, DPAn-3, DTAn-3, ETA o ETrA) obtenido de una fuente vegetal y al menos otro LC-omega-3 obtenido de otra fuente. Un LC-omega-3 de las presentes modalidades puede estar en forma de un ácido graso libre, una sal, un éster, una sal de un éster o una combinación de estos. En al menos una modalidad, el LC-omega-3 está en forma de un éster etílico. En al menos una modalidad, el LC-omega-3 está en forma de triglicérido.

En un aspecto, las presentes modalidades proporcionan composiciones con contenido enriquecido de DPAn-3, DTAn-3, ETA o ETrA, o combinaciones de los mismos. Por ejemplo, al menos una modalidad proporciona una composición que comprende aproximadamente 90%-99% de DPAn-3 (inclusive), por ejemplo, aproximadamente el 95% de DPAn-3, aproximadamente el 97% de DPAn-3, aproximadamente el 98% de DPAn-3 o aproximadamente el 99% de DPAn-3. Composiciones como estas, es decir, composiciones que contienen cantidades muy altas de DPAn-3 también pueden comprender una pequeña cantidad (por ejemplo, al menos aproximadamente 0,1% y hasta 5%, hasta 2% o hasta 1% de ácido

oleico (OA 18: 1n-9). Por ejemplo, estas composiciones pueden comprender aproximadamente un 96% de DPAn-3 y aproximadamente un 1% de OA. Otra modalidad proporciona una composición que comprende aproximadamente un 80%-99% de DTAn-3 (inclusive) (opcionalmente junto con hasta aproximadamente 15% OA) o aproximadamente 90%-99% DTAn-3 (inclusive). Por ejemplo, la composición puede comprender aproximadamente 80% DTAn-3, aproximadamente 87% DTAn-3, aproximadamente 90% DTAn-3 o aproximadamente 95% DTAn-3. Otra modalidad proporciona una composición que comprende aproximadamente 90%-99% ETA (inclusive), por ejemplo, aproximadamente 93% ETA aproximadamente 95% ETA, aproximadamente 98% ETA o aproximadamente 99% ETA. Otra modalidad proporciona una composición que comprende aproximadamente 60%-70% DPAn-3 (inclusive) y aproximadamente 0%-20% ETA (inclusive) (como aproximadamente 5%-15% ETA (inclusive)), (en particular aproximadamente 64% DPAn-3 y aproximadamente 12% ETA). Otra modalidad más proporciona una composición que comprende sobre 40%-95% DTAn-3 (inclusive) y 5%-60% ETA (inclusive).

En otro aspecto, las presentes modalidades proporcionan composiciones que comprenden DPAn 3, ETA o DTAn-3 y ácido oleico (OA, 18: 1n-9). En al menos una modalidad, por ejemplo, la composición comprende aproximadamente 30-60% de DTAn-3 (inclusive) y aproximadamente 30-60% de OA (inclusive) (en particular aproximadamente 49% de DTAn-3 y aproximadamente 43,3% de OA). En otra modalidad, la composición comprende aproximadamente 60-80% de DTAn-3 (inclusive), aproximadamente 10-20% de OA (inclusive) y aproximadamente 1-10% de ETA (inclusive) (en particular aproximadamente 74% de DTAn-3, aproximadamente 14% OA y aproximadamente 4% ETA). En otra modalidad más, la composición comprende aproximadamente 80-95% de DTAn-3

(inclusive) y aproximadamente 1-15% de OA (inclusive) (en particular aproximadamente 87% de DTAn-3 y aproximadamente 6,3% de OA). En otra modalidad más, la composición comprende aproximadamente 40%-60% de DPAn-3 (inclusive), 20%-40% de OA (inclusive) y 2%-20% de ETA (inclusive). En otra modalidad más, la composición comprende 20%-50% de DPAn-3 (inclusive), 10%-30% OA (inclusive) y 2%-20% ETA (inclusive). Por ejemplo, la composición puede comprender 30%-50% DPAn-3 (inclusive), 10%-30% OA (inclusive) y 2%-20% ETA (inclusive) (en particular, la composición puede comprender 36% DPAn-3, 22% OA y 6% ETA). En otra modalidad, la composición comprende aproximadamente un 35,8% de DPAn-3, aproximadamente un 22,0% de OA y aproximadamente un 6,1% de ETA. En un ejemplo alternativo, la composición puede comprender aproximadamente 5-20% de DPA (inclusive), aproximadamente 30-60% de OA (inclusive) y aproximadamente 1-10% de ETA (inclusive) (en particular, la composición puede comprender aproximadamente 10,5% de DPA, aproximadamente 44% OA y aproximadamente 4% ETA). En otro ejemplo alternativo, la composición puede comprender aproximadamente 20-40% de DPAn-3 (inclusive), aproximadamente 1-10% de DTAn-3 (inclusive), aproximadamente 1-10% de ETA (inclusive), aproximadamente 10-20% de ALA (inclusive), aproximadamente 1-10% de LA (inclusive) y aproximadamente 20-40% de OA (inclusive) (en particular, la composición puede comprender aproximadamente 28% de DPAn-3, aproximadamente 5% de DTAn-3, aproximadamente 5% de ETA, aproximadamente 14% ALA, aproximadamente 6% LA y aproximadamente 29% OA). En otro ejemplo alternativo más, la composición puede comprender aproximadamente 10%-40% DPAn-3 (inclusive), aproximadamente 20%-60% ETrA (inclusive) y aproximadamente 0%-30% OA (inclusive) (en particular, la composición puede comprender aproximadamente el 37% de ETrA y aproximadamente el 16% de DPAn-

3, o puede comprender aproximadamente el 54% de ETrA y aproximadamente el 35% de DPAn-3) En un aspecto relacionado de estas modalidades, la composición (que incluye OA y al menos uno de DPAn-3, DTAn-3 o ETA) tiene actividad antiinflamatoria sinérgica.

En otro aspecto, las presentes modalidades proporcionan composiciones que comprenden al menos una fracción enriquecida de DPAn-3, ETA, ETrA o DTAn-3, opcionalmente con OA, en las que la composición es antiinflamatoria. En al menos una modalidad, la composición modifica la actividad de las citocinas. En al menos una modalidad, la composición aumenta la actividad de las citocinas asociada con la disminución de la inflamación. En al menos una modalidad, la composición suprime la actividad de las citocinas asociada con un aumento de la inflamación. Por ejemplo, una composición con actividad antiinflamatoria sinérgica puede comprender DPAn-3 y ETA, como aproximadamente 64% de DPAn-3 y aproximadamente 12% de ETA. En otro ejemplo, una composición con actividad antiinflamatoria sinérgica puede comprender DTAn-3 y OA, tal como, por ejemplo, aproximadamente 3%-95% DTAn-3 (inclusive) y OA, aproximadamente 49% DTAn-3 y aproximadamente 43,3 % OA, o aproximadamente 87% DTAn-3 y 6,3% OA. En modalidades adicionales, la composición enriquecida con DPAn-3, DTAn-3 o ETA también está enriquecida con ALA. Por ejemplo, la composición enriquecida con DPAn-3 (por ejemplo, que contiene al menos aproximadamente un 28% de DPAn-3) también puede contener al menos aproximadamente un 14% de ALA.

En un aspecto adicional, las presentes modalidades proporcionan una composición enriquecida con DPAn-3, DTA, ETA o ETrA de una fuente vegetal (es decir, materia vegetal), en la que la composición es más estable que una composición similar en la que DPA, DTA, ETA o ETrA se obtiene del aceite de pescado o de la

fabricación sintética, como lo demuestra la menor degradación durante el almacenamiento.

Las composiciones de las presentes modalidades se pueden usar en piensos, nutracéuticos, cosméticos y otras composiciones químicas, y pueden ser útiles como intermedios o ingredientes farmacéuticos activos (API).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 es un gráfico que ilustra una mejor estabilidad de una composición de origen vegetal enriquecida en DPAn-3 mediante doble destilación en comparación con una mezcla de referencia enriquecida. Eje Y: ppm de propanal; eje x: día (0, 3, 5); o: retenido transesterificado, bidestillado obtenido de *B. juncea*; □: mezcla de referencia transesterificada, bidestillada.

La figura 2 es un gráfico que ilustra una mejor estabilidad de una composición de origen vegetal enriquecida en DPAn-3 mediante doble destilación y cromatografía (~ 98% de DPAn-3) en comparación con una mezcla de referencia enriquecida de manera similar. Eje Y: ppm de propanal; eje x: día (0, 3, 5); o: fracciones transesterificadas, bidestilladas, cromatografiadas obtenidas de *B. juncea* (~ 98% de DPAn-3); □: mezcla de referencia transesterificada, bidestillada y cromatografiada (~ 90% EPA).

La figura 3 es un gráfico que ilustra una mejor estabilidad de una composición de origen vegetal enriquecida en DPAn-3 mediante doble destilación y cromatografía (~ 64% de DPAn-3) en comparación con una mezcla de referencia enriquecida. Eje Y: ppm de propanal; eje x: día (0, 3, 5); o: fracciones transesterificadas, bidestilladas, cromatografiadas obtenidas de *B. juncea* (~ 64% de DPAn-3); □: mezcla de referencia transesterificada, bidestillada y cromatografiada (~ 58% EPA).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Debe entenderse que esta invención no se limita a la metodología, protocolos y reactivos particulares, etc., descritos aquí y, como tal, puede variar. A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos utilizados aquí tienen el mismo significado que los comúnmente entendidos por un experto en la técnica. La terminología utilizada aquí tiene el propósito de describir únicamente modalidades particulares y no pretende limitar el alcance de la presente invención, que se define únicamente por las reivindicaciones.

Todas las patentes y otras publicaciones identificadas se incorporan aquí como referencia con el propósito de describir y divulgar, por ejemplo, las metodologías descritas en dichas publicaciones que podrían usarse en relación con las presentes modalidades, pero no deben proporcionar definiciones de términos inconsistentes con los presentados aquí. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su descripción antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe interpretarse como una admisión de que los inventores no tienen derecho a ser anterior a dicha descripción en virtud de una invención anterior o por cualquier otra razón. Todas las declaraciones en cuanto a la fecha o representación en cuanto al contenido de estos documentos se basan en la información disponible para los solicitantes y no constituyen ninguna admisión en cuanto a la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

Como se usa aquí y en las reivindicaciones, las formas singulares "un", "una" y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. A lo largo de esta especificación, a menos que se indique lo contrario, "comprende", "comprende" y "que comprende" se usan de

manera inclusiva en lugar de exclusivamente, de modo que un número entero o grupo de números enteros puede incluir uno o más otros números enteros o grupos de números enteros no establecidos. El término "o" es inclusivo a menos que se modifique, por ejemplo, por "cualquiera". Por tanto, a menos que el contexto indique lo contrario, la palabra "o" significa cualquier miembro de una lista en particular y también incluye cualquier combinación de miembros de esa lista.

Todos los valores son aproximados ya que existe alguna fluctuación en la composición de ácidos grasos debido a las condiciones ambientales. Los valores se expresan típicamente como porcentaje en peso del ácido graso total o porcentaje en peso de la semilla total. Por consiguiente, aparte de en los ejemplos operativos, o cuando se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades o condiciones de reacción usados aquí deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente" a menos que se indique lo contrario; "aproximadamente" se refiere generalmente a $\pm 1\%$ del valor designado, pero puede permitir $\pm 5\%$ o $\pm 10\%$ del valor designado según lo aceptado en el contexto relevante por un experto en la técnica.

Las cantidades de ácidos grasos en las composiciones de las presentes modalidades se pueden determinar usando métodos rutinarios conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen cromatografía de gases (GC) junto con patrones de referencia, por ejemplo, de acuerdo con los métodos descritos en los ejemplos proporcionados aquí. En un método particular, los ácidos grasos se convierten en ésteres metílicos o etílicos antes del análisis GC. La posición del pico en el cromatograma se puede usar para identificar cada ácido graso en particular, y el área debajo de cada pico integrado para determinar la cantidad. Como

se usa aquí, a menos que se indique lo contrario, el porcentaje de un ácido graso particular en una muestra se determina calculando el área bajo la curva en el cromatograma para ese ácido graso como un porcentaje del área total de ácidos grasos en el cromatograma. Generalmente, esto corresponde a un porcentaje en peso (p/p o % en peso). La identidad de los ácidos grasos puede confirmarse mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).

Se sabe que los LC-omega-3 tienen beneficios para la salud tales como función neurológica, diabetes mellitus, salud cardiovascular, regulación de lípidos y como agentes antiinflamatorios. El ácido docosapentaenóico (22: 5 n-3 o DPAn-3) se valora como un intermedio entre EPA y DHA, pero confiere muchos beneficios por sí solo y, de hecho, se retroconvierte a partir de DHA. El DPA se encuentra en altas concentraciones en la leche materna. Las células de mamíferos, incluidas las humanas, metabolizan el DPAn-3 en una serie de productos que son miembros de la clase de mediadores pro-resolución especializados de metabolitos de PUFA que promueven la restauración de la función celular normal después de la inflamación que ocurre después de una lesión tisular. Un estudio que analizó los efectos antitumogénicos de los ácidos grasos n-3 en el cáncer colorrectal encontró efectos antiproliferativos y proapoptóticos para EPA, DPA y DHA, y el DPA demostró los efectos más fuertes en modelos *in vitro* e *in vivo*. La DPA también se asocia con un menor riesgo de enfermedad cardíaca. Véase Yazdi, *Review of the biologic & pharmacologic role of docosapentaenoic acid n-3*, 2 F1000Research 256 (2014). En consecuencia, el DPA es cada vez más importante como complemento nutricional y terapéutico. La recitación de DPA o DPA3 aquí se refiere a DPAn-3 a menos que se indique lo contrario.

En comparación con una creciente cantidad de información sobre DHA y EPA, el ácido docosatetraenoico (22: 4 n-3, DTAn-3) es un LC-omega-3 relativamente poco conocido. DTAn-3 es el producto del alargamiento de ETA. Véase, por ejemplo, Gregory et al., *Cloning and functional characterisation of a fatty acyl elongase from southern bluefin tuna (Thunnus maccoyii)*, 155 Comp. Biochem. Physiol B Biochem Mol Biol. 178 (2010). Probablemente debido a la similitud de su estructura terciaria de cadena de acilo con DPA y DHAn-3, DTAn-3 se asocia con una mediación beneficiosa del metabolismo de A β en el cerebro. Amtul et al., *Structural insight into the different effects of omega-3 & omega-6 fatty acids on the production of A β peptides and amyloid plaques*, 286 J. Biol. Chem. 6100 (2011). Por tanto, el DTAn-3 puede tener potencial como agente nutricional o terapéutico. La recitación de DTA o DTA3 aquí se refiere a DTAn-3 a menos que se indique lo contrario.

El ácido eicosatetraenoico (ETA, 20: 4n-3) se conoce como un intermedio omega-3 en la biosíntesis de EPA, DPA y DHA. Véase, por ejemplo, la patente de E.U.A No. 7,807,849. La potencial actividad antiinflamatoria de ETA se ha identificado en el contexto de la artritis. Bierer & Bui, *Improvement of arthritic signs in dogs fed green-lipped mussel (Perna canaliculus)*, 132 J. Nutr. 1623S (2002). ETA, como otros LC-Omega-3, puede tener potencial como agente nutricional o terapéutico.

El ácido eicosatrienoico (ETrA) (C20: 3n-3) se produce por elongación del ALA o la desaturación omega 3 del ácido eicosadienoico (EDA, 20: 2 n-6), y puede desaturarse adicionalmente para formar ETA. Véase, por ejemplo, la patente de E.U.A. No. 7,807,849. La ETrA no solo es un intermediario importante en las vías de los omega-3, se ha identificado como

uno de los LC-Omega-3 importantes en la función cognitiva, al menos en las abejas. Arien et al., *Omega-3 deficiency impairs honey bee learning*, 112 PNAS 15761 (2015).

Las composiciones lipídicas que contienen LC-omega-3 se han obtenido típicamente de fuentes marinas (por ejemplo, peces, crustáceos) o fuentes de algas. Recientemente, las plantas han sido modificadas genéticamente para producir cantidades comercialmente relevantes de LC-omega-3, particularmente DHA. Ver, por ejemplo, WO 2017/219006; WO 2017/218969. Cuando se utilizan estas fuentes, la materia orgánica de partida se procesa en primer lugar para extraer el aceite (al que se hace referencia generalmente como aceite "crudo") que contiene. En el caso de semillas de plantas, como DHA canola o semilla de DPA juncea, por ejemplo, las semillas se trituran para liberar el aceite que luego se separa de la materia sólida mediante filtración y/o decantación. Si se desean concentraciones más altas de LC-omega-3 que las que se encuentran en el petróleo crudo, se requiere enriquecimiento. Además, el enriquecimiento se puede lograr procesando el aceite crudo para eliminar componentes no deseados (por ejemplo, componentes que afectan negativamente al color, olor o estabilidad del producto, o ácidos grasos no deseados), mientras se maximizan los niveles de los componentes de ácidos grasos deseados. Además, si el aceite crudo carece de uno o más componentes esenciales, a menudo se mezcla con aceites crudos o enriquecidos de otras fuentes (por ejemplo, de pescado o algas) para obtener la composición deseada.

Las composiciones de las presentes modalidades se pueden obtener de una sola fuente. Las composiciones particulares que pueden mencionarse a este respecto son los productos descritos en los cuadros 4 y 5 en los Ejemplos, así como las modalidades correspondientes de la invención como se discute en

otra parte del presente documento. Además, las composiciones de las presentes modalidades que se obtienen de una sola fuente pueden obtenerse proporcionando la mezcla de lípidos obtenida de una sola fuente, separando esa mezcla en una pluralidad de partes (por ejemplo, mediante separación cromatográfica) y luego combinando (mezclando) un subconjunto de esas partes. Por ejemplo, se contempla una composición que resulta de combinar dos o más fracciones obtenidas en un método de separación cromatográfica (u otro método de separación), y esas composiciones también se pueden caracterizar como obtenidas de una sola fuente. Por ejemplo, una composición que contiene predominantemente DPA y ETA (por ejemplo, en la que DPA y ETA juntos constituyen aproximadamente el 80% en peso del ácido graso total presente en la composición) puede obtenerse de una sola fuente. La combinación que contiene predominantemente DPA y ETA se puede obtener mezclando las fracciones CXZ y CR en el cuadro 5 en proporciones apropiadas. De manera similar, se pueden obtener otras combinaciones que muestran una buena actividad *in vitro* mezclando fracciones que son ricas en los componentes deseados (por ejemplo, que contienen al menos el 80% de uno de dichos componentes). El uso de una sola fuente facilita el procesamiento eficiente y económico del petróleo crudo y la fabricación de las composiciones lipídicas de la invención. "Obtenido de una sola fuente" significa que la composición de lípidos se puede obtener de uno o más organismos de una sola clase taxonómica. En una modalidad particular, la composición de lípidos no se deriva de múltiples organismos de diferentes clases taxonómicas y no es, por ejemplo, una mezcla de aceites obtenidos de una combinación de pescado y algas, o una combinación de pescado y plantas. En esta modalidad, las composiciones lipídicas (o los aceites "brutos" de los que se pueden obtener las composiciones mediante

técnicas de enriquecimiento, tales como transesterificación, destilación o cromatografía) se pueden obtener a partir de una única población de organismos, por ejemplo, una única fuente de materia vegetal o vegetación. En el contexto de la presente modalidad, "vegetal" se refiere a plantas o vida vegetal, a diferencia de las sustancias animales o minerales. Sin embargo, en otras modalidades, las composiciones se obtienen de una fuente vegetal (por ejemplo, DPA juncea) y de otra fuente (por ejemplo, pescado, algas o fuentes sintéticas).

En al menos una modalidad, la composición de lípidos tiene un alto nivel de DPAn-3 en relación con la cantidad de otros lípidos en la composición. En al menos una modalidad, la composición de lípidos tiene un alto nivel de DTAn-3 en relación con la cantidad de otros lípidos en la composición. En al menos una modalidad, la composición de lípidos tiene un alto nivel de ETA en relación con la cantidad de otros lípidos en la composición. Cada uno de DPAn-3, DTAn-3 o ETA puede proporcionarse independientemente en forma de un ácido graso libre, una sal, un éster o una sal de un éster, o una combinación de estos, por ejemplo, la composición puede contener DPAn-3 en forma de éster junto con ETA en forma de ácido graso libre. En al menos una modalidad, el DPAn-3, DTAn-3 o ETA es un éster de ácido graso, tal como un éster etílico. Estas modalidades pueden contener componentes lipídicos adicionales, tales como otros ácidos grasos omega-3, saturados, monoinsaturados o poliinsaturados, en forma de un ácido graso libre, una sal, un éster o una sal de un éster, o una combinación de estas.

Las formas adecuadas de ésteres de ácidos grasos son conocidas por los expertos. Por ejemplo, las formas de ésteres de ácidos grasos que son nutricionalmente aceptables o farmacéuticamente aceptables incluyen ésteres etílicos, ésteres

metílicos, fosfolípidos, monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos (triacilglicéridos) de ácidos grasos. Pueden requerirse diferentes formas de éster dependiendo del uso pretendido de la composición lipídica. Por ejemplo, los triglicéridos son ésteres derivados del glicerol y tres ácidos grasos. Los triglicéridos son particularmente adecuados para su uso en alimentos destinados al consumo humano, especialmente al consumo infantil, debido en parte al sabor y la estabilidad de estas formas de éster al tratamiento térmico (que puede ser necesario para tales productos alimenticios). Por consiguiente, una modalidad proporciona un producto alimenticio para consumo humano o animal que comprende una composición lipídica de la invención, en la que los ácidos grasos poliinsaturados DPAn-3, DTAn-3 o ETA se proporcionan en forma de ésteres de triglicéridos. Los ésteres etílicos son particularmente adecuados para su uso en suplementos dietéticos, ya que estas formas de éster se pueden fabricar de manera eficiente y sencilla. Por tanto, en al menos una modalidad, el DPAn-3, DTAn-3 o ETA se proporciona independientemente en forma de un éster etílico de ácido graso.

Alternativamente, los componentes de ácidos grasos pueden alternativamente estar presentes en forma de ácidos grasos "libres", es decir, la forma -COOH del ácido graso. En composiciones particulares de la invención, las composiciones contienen niveles relativamente bajos de ácidos grasos en esta forma porque están asociados con un sabor desagradable (a menudo "jabonoso") y son menos estables que los ácidos grasos esterificados. Los ácidos grasos libres se eliminan típicamente de las composiciones lipídicas mediante un refinado alcalino o físico como es bien conocido en la técnica. Por consiguiente, en una modalidad, el contenido total de ácidos grasos libres en las

composiciones lipídicas es menos del 5% (tal como menos del 3%, particularmente menos del 2%) en peso del contenido total de ácidos grasos de la composición.

Las composiciones lipídicas de las presentes modalidades también pueden contener otros componentes (por ejemplo, distintos de los ácidos grasos indicados anteriormente) que se originan a partir del material de origen y que no se eliminan completamente durante los procesos de extracción y enriquecimiento. Las identidades precisas de esos otros componentes pueden variar mucho según el material de origen, pero los ejemplos de dichos otros componentes incluyen fitoesteroles (es decir, esteroles vegetales y estanoles vegetales) presentes como esteroles libres o como ésteres de esteroles (tal como β -sitosterol, β -sitostanol, Δ^5 -avenasterol, campesterol, Δ^5 -estigmasterol, Δ^7 -estigmasterol y Δ^7 -avenasterol, colesterol, brassicasterol, chalinasterol, campesterol, campestanol o eburicol). Otros componentes de ejemplo incluyen antioxidantes, como tocoferoles y tocotrienoles. Por tanto, las composiciones lipídicas particulares de las presentes modalidades pueden incluir aquellas que contienen cantidades detectables de uno o más fitoesteroles (tales como β -sitosterol). Dichos esteroles pueden estar presentes en aproximadamente un 0,01% o más, pero típicamente no más de aproximadamente un 1% (por ejemplo, % en peso) de la composición lipídica.

Las composiciones de las presentes modalidades se pueden obtener ventajosamente de fuentes de plantas (fuentes "vegetales"). "Basados en vegetales" se refiere a que al menos el 70% en peso de los lípidos que están presentes en las composiciones lipídicas se obtienen de fuentes vegetales. Las fuentes vegetales que incluyen fuentes vegetales, particularmente cultivos como cultivos de semillas oleaginosas. En al menos una

modalidad, los lípidos se obtienen de un cultivo de aceite de semillas como *Brassica*, por ejemplo *B. juncea* o *B. napus*. Sin embargo, para evitar dudas, no es esencial que las composiciones se obtengan únicamente de dichas fuentes: una proporción (por ejemplo, como máximo aproximadamente el 30% en peso) de los lípidos en las composiciones de las modalidades puede obtenerse de otras fuentes, incluyendo aceites marinos (por ejemplo, de pescado o crustáceos), aceites de algas o mezclas de los mismos. En un ejemplo, al menos el 80%, tal como al menos el 90% en peso de los lípidos presentes se obtienen de fuentes vegetales. En modalidades particulares, esencialmente todos (es decir, al menos el 95%, al menos el 99% o aproximadamente el 100%) de los lípidos se obtienen de fuentes vegetales.

El uso de plantas como fuente de lípidos o ácidos grasos ofrece una serie de ventajas. Por ejemplo, se sabe que las fuentes marinas de aceites contienen niveles relativamente altos de contaminantes (como mercurio, PCB o alérgenos de pescado (por ejemplo, parvalbuminas)) que no se encuentran en los materiales vegetales. Además, la sobrepesca histórica también ha agotado las poblaciones de peces y crustáceos (por ejemplo, krill) de tal manera que ya no son sostenibles. Por lo tanto, la presente invención ofrece una composición de aceite de ácidos grasos poliinsaturados de origen sostenible que contiene niveles relativamente bajos de contaminantes no deseados.

Por consiguiente, las presentes composiciones lipídicas (y los piensos y composiciones farmacéuticas que comprenden estas composiciones) no son de origen animal (por ejemplo, animal marino). Es decir, en tales modalidades, las composiciones lipídicas no contienen ningún componente que provenga de animales, tal como peces y crustáceos. Se cree que las composiciones lipídicas en las que no se obtienen componentes de

un animal son ventajosas en términos de contenido de lípidos y un perfil de estabilidad que se puede lograr siguiendo procedimientos estándar de refinamiento o enriquecimiento.

En un aspecto de las modalidades, la composición lipídica se deriva de una planta. Las plantas de las que se obtienen los aceites son típicamente cultivos de semillas oleaginosas, tales como mostaza, canola, copra, semilla de algodón, lino, palmiste, maní, colza, soya y semilla de girasol. Las composiciones obtenidas exclusivamente de plantas pueden denominarse aceites "vegetales" o "composiciones lipídicas vegetales". Las plantas adecuadas a partir de las cuales se pueden obtener las composiciones lipídicas de las modalidades (ya sea a escala comercial o no) son conocidas por los expertos e incluyen *Brassica* sp. (semillas oleaginosas tal como *B. juncea*, *B. napus* o *B. carinata*), *Arabidopsis thaliana* (berro), *Linum usitatissimum* (lino), *Camelina sativa* (falso lino), *Gossypium hirsutum* (algodón), *Helianthus* sp. (girasol), *Carthamus tinctorius* (cártamo), *Glycine max* (soya), *Zea mays* (maíz), *Sorghum* sp., *Avena sativa* (avena), *Trifolium* sp. (trébol), *Nicotiana* sp. (por ejemplo, *benthamiana* o *tabacum*) tabaco), *Hordeum vulgare* (cebada), *Lupinus angustifolius* (lupino), *Oryza* sp. (arroz tal como *O. sativa* u *O. glaberrima*), *Elaeis guineensis* (palma) o *Crambe abyssinica* (crambe, una semilla oleaginosa de *Brassicaceae*). En al menos una modalidad, la fuente vegetal es *Brassica* sp.

Las fuentes adecuadas (que incluyen las fuentes marinas y de algas además de las fuentes vegetales) pueden ser de origen natural o pueden estar modificadas genéticamente para que tengan la capacidad de producir omega-3. Los expertos conocen ejemplos de fuentes vegetales que han sido modificadas genéticamente para este fin. Ver, por ejemplo, WO 2013/185184, WO 2015/089587, WO

2015/196250. Por ejemplo, la línea de canola modificada genéticamente NSB500274, que produce DHA en su aceite de semilla, se describe en WO 2017/218969 y WO 2017/219006. Los procesos para obtener aceites de fuentes adecuadas son bien conocidos en la técnica. El enriquecimiento de los omega 3s descritos a partir de estos aceites se analiza aquí.

Las técnicas que se practican habitualmente en la técnica pueden usarse para extraer, procesar y analizar aceites producidos por plantas y semillas. En resumen, las semillas de las plantas se cocinan, se prensan y se extrae el aceite para producir aceite crudo. Ese aceite puede, a su vez, desgomarse, refinarse, blanquearse o desodorizarse. Se ha descubierto que una combinación de desgomado, refinado, blanqueo y desodorización es particularmente efectiva para preparar mezclas de lípidos enriquecidas con LC-omega-3. Por tanto, en una modalidad, la composición lipídica se obtiene a partir de un aceite de semilla que ha sido desgomado, refinado, blanqueado y/o desodorizado. Sin embargo, no siempre es necesario que los aceites se procesen de esta manera, y sin estos métodos se puede lograr una purificación y un enriquecimiento adecuados.

Generalmente, las técnicas para triturar semillas se conocen en la técnica. Por ejemplo, las semillas oleaginosas se pueden templar rociándolas con agua para elevar el contenido de humedad a, por ejemplo, 8,5%, y se pueden desmenuzar utilizando un rodillo liso con un ajuste de separación de 0,23 mm a 0,27 mm. Dependiendo del tipo de semilla, es posible que no se agregue agua antes de triturar. La extracción también se puede lograr mediante un proceso de extrusión. El proceso de extrusión se puede utilizar o no en lugar de la descamación y, a veces, se utiliza como un proceso adicional antes o después del prensado del tornillo.

En una modalidad, la mayor parte del aceite de semilla se libera triturando usando una prensa de tornillo. El material sólido expulsado de la prensa de tornillo se extrae luego con un disolvente, por ejemplo, hexano, usando una columna calentada, después de lo cual se elimina el disolvente del aceite extraído. Alternativamente, el petróleo crudo producido por la operación de prensado se puede pasar a través de un tanque de sedimentación con una tapa de drenaje de alambre ranurado para eliminar los sólidos que se exprimen con el aceite durante la operación de prensado. El aceite clarificado se puede pasar a través de un filtro de placa y marco para eliminar las partículas sólidas finas restantes. Si se desea, el aceite recuperado del proceso de extracción se puede combinar con el aceite clarificado para producir un aceite crudo mezclado. Una vez que el disolvente se elimina del petróleo crudo, las porciones prensadas y extraídas se combinan y se someten a los procedimientos normales de procesamiento del aceite.

Como se usa aquí, "purificado", cuando se usa en relación con el lípido o aceite descrito aquí, típicamente significa que el lípido o aceite extraído se ha sometido a una o más etapas de procesamiento para aumentar la pureza del componente lípido/aceite. Por ejemplo, las etapas de purificación pueden comprender uno o más de: desgomado, desodorización, decoloración o secado del aceite extraído. Sin embargo, el término "purificado" no incluye un proceso de transesterificación u otro proceso que altere la composición de ácidos grasos del lípido o aceite de la invención para aumentar el contenido de LC-omega-3 como porcentaje del ácido graso total contenido. En otras palabras, las composiciones de ácidos grasos que comprenden el lípido o aceite purificado son esencialmente las mismas que las del lípido o aceite no purificado.

Los aceites vegetales se pueden refinar (purificar) una vez extraídos de la fuente vegetal, usando uno o más de los siguientes procesos, y particularmente usando una combinación de desgomado, refinado alcalino, blanqueo y desodorización. Los expertos en la técnica conocen métodos adecuados. Véase, por ejemplo, WO 2013/185184.

Brevemente, el desgomado es un paso temprano en el refinado de aceites y su propósito principal es la eliminación de la mayoría de los fosfolípidos del aceite. La adición de aproximadamente un 2% de agua, que contiene típicamente ácido fosfórico, a 70°C a 80°C, al petróleo crudo da como resultado la separación de la mayoría de los fosfolípidos acompañados de trazas de metales y pigmentos. El material insoluble que se elimina es principalmente una mezcla de fosfolípidos. El desgomado se puede realizar mediante la adición de ácido fosfórico concentrado al aceite de semilla crudo para convertir los fosfatidos no hidratables en una forma hidratable, y para quelar los metales menores que están presentes. Normalmente, la goma de mascar se separa del aceite de semilla mediante centrifugación.

El refinado alcalino es uno de los procesos de refinado para el tratamiento del petróleo crudo, a veces también denominado neutralización. Por lo general, sigue al desgomado y precede al blanqueo. Después del desgomado, el aceite de semilla se puede tratar mediante la adición de una cantidad suficiente de una solución alcalina para valorar todos los ácidos grasos libres y ácido fosfórico, y eliminar los jabones así formados. Los materiales alcalinos adecuados incluyen hidróxido de sodio, hidróxido de potasio, carbonato de sodio, hidróxido de litio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio e hidróxido de amonio. El refinado con álcali se lleva a cabo típicamente a temperatura

ambiente y elimina la fracción de ácido graso libre. El jabón se elimina por centrifugación o por extracción en un disolvente para el jabón y el aceite neutralizado se lava con agua. Si es necesario, cualquier exceso de álcali en el aceite se puede neutralizar con un ácido adecuado tal como ácido clorhídrico o ácido sulfúrico.

El blanqueo es un proceso de refinado en el que los aceites se calientan a 90°C a 120°C durante 10 a 30 minutos en presencia de una tierra blanqueadora (0,2% a 2,0%) y en ausencia de oxígeno operando con nitrógeno o al vapor o al vacío. El blanqueo está diseñado para eliminar los pigmentos no deseados (carotenoides, clorofila, etc.) y el proceso también elimina los productos de oxidación, la traza de metales, los compuestos de azufre y los restos de jabón.

La desodorización es un tratamiento de aceites y grasas a alta temperatura (por ejemplo, alrededor de 180°C) y baja presión (0,1 mm Hg a 1 mm Hg). Esto se logra típicamente introduciendo vapor en el aceite de semilla a una velocidad de aproximadamente 0,1 ml/minuto/100 ml de aceite de semilla. Después de aproximadamente 30 minutos de burbujeo, el aceite de semilla se deja enfriar al vacío. Este tratamiento mejora el color del aceite de semilla y elimina la mayoría de las sustancias volátiles o compuestos olorosos, incluidos los ácidos grasos libres restantes, monoacilgliceroles y productos de oxidación.

La preparación para el invierno es un proceso que a veces se utiliza en la producción comercial de aceites para la separación de aceites y grasas en fracciones sólidas (estearina) y líquidas (oleína) mediante cristalización a temperaturas sub-ambientales. Por lo general, se usa para disminuir el contenido de ácidos grasos saturados de los aceites.

Las presentes modalidades se refieren, en parte, a composiciones lipídicas obtenidas usando técnicas de transesterificación. Como se indica aquí, los aceites crudos normalmente contienen los ácidos grasos deseados en forma de triacilglicerol (TAG). La transesterificación es un proceso que puede utilizarse para intercambiar los ácidos grasos dentro y entre los TAG o para transferir los ácidos grasos a otro alcohol para formar un éster (como un éster etílico o un éster metílico). En modalidades de lo descrito aquí, la transesterificación se logra usando medios enzimáticos o químicos.

Con respecto a la transesterificación enzimática, en este enfoque la transesterificación se logra usando una o más enzimas, particularmente lipasas que se sabe que son útiles para hidrolizar enlaces éster, por ejemplo, en glicéridos. La enzima puede ser una lipasa que es específica de posición (específica de sn-1/3 o sn-2) para el ácido graso en el triacilglicérido (triglicérido o TAG), o que tiene preferencia por algunos ácidos grasos sobre otros. Las enzimas particulares que pueden mencionarse incluyen Lipozyme 435 (disponible de Novozymes). El proceso se realiza típicamente a temperatura ambiente. El proceso se realiza típicamente en presencia de una cantidad en exceso del alcohol correspondiente a la forma de éster deseada (por ejemplo, usando etanol para formar ésteres etílicos de los ácidos grasos).

La transesterificación química utiliza un ácido o una base fuerte como catalizador. El etóxido de sodio (en etanol) es un ejemplo de una base fuerte que se utiliza para formar ésteres etílicos de ácidos grasos mediante transesterificación. El proceso puede realizarse a temperatura ambiente o a temperatura elevada (por ejemplo, hasta aproximadamente 80°C).

En al menos una modalidad, la composición de lípidos enriquecida de las presentes modalidades se obtiene usando

destilación. La destilación molecular es un método efectivo para eliminar cantidades significativas de los componentes más volátiles, como los ácidos grasos saturados de cadena corta, de los aceites crudos. La destilación se realiza típicamente a presión reducida, por ejemplo, por debajo de aproximadamente 1 mbar. La temperatura y la duración del proceso pueden elegirse luego para lograr una división de aproximadamente 50:50 entre el destilado y el residuo después de un tiempo de destilación de unas pocas horas (por ejemplo, 1 hora a 10 horas). Las temperaturas de destilación típicas usadas en la producción de las composiciones lipídicas de la presente invención están en la región de 120°C a 180°C, tal como entre 140°C y 160°C, particularmente entre 145°C y 160°C.

Pueden realizarse múltiples destilaciones, considerándose cada destilación completa cuando se logra una división de aproximadamente 50:50 entre el destilado y el residuo. El uso de destilaciones sucesivas reduce el rendimiento general, pero dos destilaciones (es decir, el producto se denomina "doble destilado") pueden producir resultados óptimos.

Además de la destilación, la cromatografía es un método eficaz para separar los diversos componentes de las mezclas de ácidos grasos. Se puede usar cromatografía para aumentar la concentración de uno o más LC-omega-3 preferidos dentro de una mezcla. La separación cromatográfica se puede lograr en una variedad de condiciones, pero normalmente implica el uso de un sistema cromatográfico de lecho estacionario o un sistema de lecho móvil simulado. Estos se explican a continuación.

Un sistema cromatográfico de lecho estacionario se basa en el siguiente concepto: una mezcla cuyos componentes se van a separar (normalmente junto con un eluyente) se hace filtrar a través de una columna que contiene un relleno de un material

poroso (la fase estacionaria) que presenta una alta permeabilidad a los fluidos. La velocidad de percolación de cada componente de la mezcla depende de las propiedades físicas de ese componente para que los componentes salgan de la columna sucesiva y selectivamente. Por lo tanto, algunos de los componentes tienden a fijarse fuertemente a la fase estacionaria y, por lo tanto, se retrasarán más, mientras que otros tienden a fijarse débilmente y a salir de la columna después de un tiempo.

Un sistema de lecho móvil simulado consta de una serie de columnas individuales que contienen adsorbente que están conectadas entre sí en serie y que funcionan cambiando periódicamente los puntos de inyección de mezcla y eluyente y también los puntos de recogida de componentes separados en el sistema por lo que el efecto general consiste en simular el funcionamiento de una sola columna que contiene un lecho móvil del adsorbente sólido. Por lo tanto, un sistema de lecho móvil simulado consta de columnas que, como en un sistema de lecho fijo convencional, contienen lechos estacionarios de adsorbente sólido a través de los cuales pasa el eluyente, pero en un sistema de lecho móvil simulado la operación es tal que simula un lecho de movimiento en contracorriente continuo.

Las columnas utilizadas en estos procesos contienen típicamente sílice (o una sílice modificada) como base para la fase estacionaria. La fase móvil (eluyente) es típicamente una mezcla de disolventes altamente polar, que a menudo contiene uno o más disolventes próticos, tales como agua, metanol, etanol y similares, así como mezclas de los mismos. El experto en la materia puede ajustar el caudal de eluyente para optimizar la eficacia del proceso de separación. Por ejemplo, los productos definidos en las reivindicaciones pueden obtenerse usando un caudal de eluyente relativamente rápido. El uso de caudales más

lentos puede mejorar el grado de separación de los AG contenidos en la mezcla inicial permitiendo así obtener concentraciones más altas o fracciones más puras de DPA. Los expertos en la técnica conocen métodos de detección de LC-PUFA, e incluyen métodos de absorción de UV-vis así como métodos de detección del índice de refracción.

Por consiguiente, otro aspecto de las presentes modalidades proporciona un proceso para producir una composición lipídica, en el que el proceso comprende proporcionar una mezcla de ésteres etílicos de ácidos grasos y luego someter la mezcla a un proceso de separación cromatográfica. Las presentes modalidades también proporcionan composiciones lipídicas que se pueden obtener mediante tales procesos. Las condiciones de separación cromatográfica adecuadas incluyen las descritas aquí.

Por ejemplo, se pueden usar técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) preparativa para obtener fracciones de lípidos enriquecidas. Una fase móvil particular que puede usarse en la separación cromatográfica es una mezcla de metanol y agua (por ejemplo, 88% de metanol), aunque esto puede cambiarse (por ejemplo, para aumentar el contenido de metanol) durante el proceso de separación para mejorar la eficiencia. Una fase estacionaria particular que se puede utilizar es una fase estacionaria a base de sílice. Se puede realizar HPLC analítica, o cualquier otra técnica adecuada conocida por el experto en la técnica, sobre las fracciones obtenidas para identificar aquellas que contienen concentraciones suficientemente altas de los ácidos grasos deseados y, por tanto, contienen las composiciones lipídicas de la invención.

Por consiguiente, en al menos una modalidad, los ésteres etílicos de ácidos grasos enriquecidos se obtienen mediante transesterificación y destilación de un aceite lipídico

de base vegetal, por ejemplo, mediante cualquiera de los procesos descritos anteriormente. El aceite lipídico de base vegetal puede obtenerse de cualquiera de las plantas, particularmente las semillas oleaginosas, descritas aquí o conocidas de otro modo en la técnica. Antes de la transesterificación y destilación, se puede realizar opcionalmente el refinamiento del aceite lipídico de base vegetal usando desgomado, refinamiento alcalino, blanqueo o desodorización.

Las composiciones lipídicas de la presente invención son útiles como ingredientes farmacéuticos activos (API) o como precursores (o intermedios) de los API que se pueden obtener a partir de ellos mediante un enriquecimiento adicional. Dichas composiciones se enriquecerían aún más en los niveles de LC-omega-3 beneficiosos, tales como DPAn-3, DTAn-3, ETA o combinaciones de los mismos, o mezclas de los anteriores con OA o ALA. La forma de estos LC-omega-3 puede ser cualquier forma farmacéuticamente aceptable, tal como ácido graso libre, éster etílico, triglicérido o combinaciones de los mismos.

La concentración de ácidos grasos en un aceite se puede incrementar adicionalmente mediante una variedad de métodos conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, cristalización por congelación, formación de complejos usando urea, extracción con fluido supercrítico y complejación de iones de plata. La formación de complejos con urea es un método simple y eficaz para reducir el nivel de ácidos grasos saturados y monoinsaturados en el aceite. Inicialmente, los TAG del aceite se dividen en sus ácidos grasos constituyentes, a menudo en forma de ésteres de ácidos grasos. Estos ácidos grasos libres o ésteres de ácidos grasos, que normalmente no se alteran en la composición de ácidos grasos por el tratamiento, pueden luego mezclarse con una solución etanólica de urea para la formación del complejo. Los

ácidos grasos saturados y monoinsaturados se forman en complejos fácilmente con la urea y cristalizan al enfriarse y posteriormente pueden eliminarse por filtración. De este modo, la fracción formada en complejos sin urea se enriquece con ácidos grasos LC-omega-3 (aunque los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 u omega-6 de cadena más corta pueden enriquecerse mediante esta técnica).

Las composiciones lipídicas de las presentes modalidades pueden ser aceites a granel en los que la composición de lípidos se ha separado de la materia de origen (por ejemplo, semillas de plantas) de la que se obtuvo parte o la totalidad del lípido.

Las composiciones lipídicas de las presentes modalidades se pueden usar en o como alimentos para ganado. Es decir, estas composiciones pueden proporcionarse en una forma disponible por vía oral. Para los propósitos de las presentes modalidades, "alimento para ganado" incluye cualquier alimento o preparación para consumo humano que cuando se ingiere en el cuerpo sirve para nutrir o construir tejidos o suministrar energía; y/o mantiene, restaura o apoya el estado nutricional o la función metabólica adecuados. Los alimentos para ganado incluyen composiciones nutricionales para bebés o niños pequeños como, por ejemplo, fórmula infantil. En el caso de los alimentos para animales, los ácidos grasos se pueden proporcionar en forma de triglicéridos para minimizar aún más cualquier sabor desagradable y maximizar la estabilidad.

Los alimentos para ganado comprenden una composición de lípidos como se describe aquí, opcionalmente junto con un vehículo adecuado. El término "vehículo" se usa en su sentido más amplio para abarcar cualquier componente que pueda o no tener valor nutricional. Como apreciará el experto en la materia, el

vehículo debe ser adecuado para su uso (o usarse en una concentración suficientemente baja) en un alimento para ganado de manera que no tenga un efecto deletéreo sobre los organismos que consumen el alimento para ganado. La composición del alimento para ganado puede estar en forma sólida o líquida.

Además, la composición puede incluir macronutrientes, proteínas, carbohidratos, vitaminas o minerales comestibles en las cantidades deseadas para un uso particular como son bien conocidos en la técnica. Las cantidades de estos ingredientes variarán dependiendo de si la composición está destinada al uso con individuos normales o al uso con individuos que tienen necesidades especializadas, tales como individuos que padecen trastornos metabólicos y similares.

Los ejemplos de vehículos adecuados con valor nutricional incluyen macronutrientes tales como grasas comestibles (por ejemplo, aceite de coco, aceite de borraja, aceite de hongos, aceite de corriente negra, aceite de soya, mono o diglicéridos), carbohidratos (por ejemplo, glucosa, lactosa comestible, almidón hidrolizado) y proteínas (por ejemplo, proteínas de soya, suero electrodializado, leche desnatada electrodializada, suero lácteo o los hidrolizados de estas proteínas).

Las vitaminas y minerales que se pueden añadir al alimento que se describe aquí incluyen, por ejemplo, calcio, fósforo, potasio, sodio, cloruro, magnesio, manganeso, hierro, cobre, zinc, selenio, yodo y vitaminas A, E, D, C y el complejo B.

En otro aspecto de las presentes modalidades, las composiciones lipídicas pueden usarse en composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones farmacéuticas comprenden la composición de lípidos de las modalidades opcionalmente junto con

uno o más excipientes, diluyentes o vehículos farmacéuticamente aceptables, que son conocidos por los expertos. Los excipientes, diluyentes o vehículos adecuados incluyen solución salina tamponada con fosfato, agua, etanol, polioles, agentes humectantes o emulsiones tales como una emulsión de agua/aceite. La composición puede estar en forma líquida o sólida, incluso como solución, suspensión, emulsión, aceite o polvo. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de tableta de cápsula, gel encapsulado, líquido ingerible (incluido un aceite o solución) o polvo, emulsión o pomada o crema tópica. La composición farmacéutica también se puede proporcionar como preparación intravenosa.

Las formas particulares adecuadas para piensos y para composiciones farmacéuticas incluyen cápsulas que contienen líquido y geles encapsulados. Las composiciones lipídicas de la invención se pueden mezclar con otros lípidos o mezclas de lípidos (particularmente ésteres de ácidos grasos de base vegetal y mezclas de ésteres de ácidos grasos) antes de su uso. Las composiciones lipídicas de la invención se pueden proporcionar junto con uno o más componentes adicionales seleccionados del grupo que consiste en un antioxidante (por ejemplo, un tocoferol como α -tocoferol o γ -tocoferol, o un tocotrienol), un estabilizador y un tensioactivo. Los tocoferoles y tocotrienoles son componentes naturales en varios aceites de semillas de plantas, incluidos los aceites de canola.

También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio y similares. Además de dichos diluyentes inertes, la composición también puede incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes edulcorantes, agentes aromatizantes y agentes perfumantes. Las suspensiones, además de las

composiciones lipídicas de la invención, pueden comprender agentes de suspensión tales como alcoholes isoestearílicos etoxilados, ésteres de polioxietilensorbitol y sorbitano, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto o mezclas de estas sustancias.

Se pueden preparar formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas usando técnicas bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, los ácidos grasos producidos de acuerdo con los métodos descritos aquí se pueden formar comprimidos con bases de comprimidos convencionales como lactosa, sacarosa y almidón de maíz en combinación con aglutinantes como goma arábiga, almidón de maíz o gelatina, agentes desintegrantes como almidón de patata o ácido algínico, y un lubricante como ácido esteárico o estearato de magnesio. Las cápsulas se pueden preparar incorporando estos excipientes en una cápsula de gelatina junto con la composición lipídica relevante y opcionalmente uno o más antioxidantes.

Las posibles vías de administración de las composiciones farmacéuticas de las presentes modalidades incluyen, por ejemplo, enteral (por ejemplo, oral y rectal) y parenteral. Por ejemplo, se puede administrar una preparación líquida por vía oral o rectal. Además, una mezcla homogénea puede dispersarse completamente en agua, mezclarse en condiciones estériles con diluyentes, conservantes, tampones o propelentes fisiológicamente aceptables para formar un aerosol o inhalante.

Las composiciones lipídicas descritas aquí pueden proporcionar una serie de beneficios que se asocian típicamente con los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga. Por ejemplo, las composiciones lipídicas y las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente aquí pueden usarse en el tratamiento o prevención de enfermedades cardiovasculares,

protección contra la muerte en pacientes con enfermedades cardiovasculares, reducción de los niveles de colesterol sérico general, reducción de la PA (presión arterial) alta, aumento de la relación HDL: LDL, reducción de triglicéridos o reducción de los niveles de apolipoproteína-B, como puede determinarse usando pruebas que son bien conocidas por los expertos. Por consiguiente, un aspecto de las presentes modalidades proporciona métodos para tratar (o prevenir) las enfermedades y afecciones utilizando las composiciones lipídicas descritas aquí.

Como se usa aquí, los términos "tratamiento", "tratar" y "que trata" se refieren a revertir, aliviar, inhibir el progreso de una enfermedad o trastorno como se describe aquí, o retrasar, eliminar o reducir la incidencia o el inicio de un trastorno o enfermedad como se describe aquí, en comparación con el que se produciría en ausencia de la medida tomada. Como se usa aquí, los términos "prevenir", "prevención" y "que previene" se refieren a la reducción del riesgo de adquirir o desarrollar una determinada condición, o la reducción o inhibición de la recurrencia o dicha condición en un sujeto que no está enfermo.

Una dosis típica de un ácido graso en particular es de 0,1 mg a 20 g, tomada de una a cinco veces al día (hasta 100 g diarios), y está particularmente en el rango de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 1 g, 2 g, 5 g o 10 g al día (tomados en una o múltiples dosis). Como se conoce en la técnica, es deseable un mínimo de aproximadamente 300 mg/día de ácido graso, especialmente LC-omega-3. Sin embargo, se apreciará que cualquier cantidad de ácido graso será beneficiosa para el sujeto. Las formas de dosificación oral se pueden tomar con una comida para aumentar la absorción de los ácidos grasos omega-3. Cuando se usa como composición farmacéutica, la dosis de la composición lipídica que se administrará al paciente puede ser determinada

por un experto en la técnica y depende de varios factores tales como el peso del paciente, la edad del paciente, la salud general del paciente, antecedentes del paciente, estado inmunológico del paciente, etc.

Las composiciones de las presentes modalidades son composiciones fácilmente obtenibles que pueden tener un perfil de estabilidad mejorado y que pueden contener una mezcla de ácidos grasos en la que las proporciones relativas de ácidos grasos omega-3 y omega-6 son particularmente beneficiosas para la salud humana. La estabilidad se puede evaluar usando una variedad de métodos conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen el método Rancimat, la evaluación de la formación de propanal (particularmente apropiado para ácidos grasos omega-3), la evaluación de la formación de hexanal (particularmente apropiado para ácidos grasos omega-6), el método del "índice de peróxido" (por ejemplo, usando AOCS método oficial Cd 8-53) y el método del "valor de p-anisidina" (por ejemplo, utilizando el método oficial AOCS Cd 18-90). En los ejemplos se muestra que las composiciones de las presentes modalidades tienen un mejor perfil de estabilidad que las mezclas de referencia (las mezclas de referencia tienen una composición similar en términos de los LC-PUFA clave pero que contienen una cantidad significativa de lípidos de animales (peces) u origen sintético).

Las composiciones de las presentes modalidades también pueden tener la ventaja de la eficacia, menos toxicidad, vida media, potencia, menos secuelas, metabolismo o perfil farmacocinético (por ejemplo, mayor biodisponibilidad oral y/o menor aclaramiento) u otros fármacos farmacológicos útiles, propiedades físicas o químicas en comparación con las composiciones lipídicas de la técnica anterior.

EJEMPLOS

EJEMPLO 1

Extracción de aceite de DPA Juncea a partir de semillas

Brassica juncea NUBJ1207 (número de acceso ATCC depositado PTA-125954) se cultivó en tiendas de campaña en California, EE. UU. La semilla se recogió y luego se almacenó a temperatura ambiente antes de triturarla. NUBJ1207 produce grandes cantidades de DPAn-3 en su aceite de semilla (más del 10%).

La semilla (4,92 kg) se trituró para producir aceite DPA usando una prensa de tornillo Kern Kraft KK80. La temperatura del calentador del collar de expulsión se ajustó a la temperatura máxima establecida en el termostato. La temperatura ambiente y de estrangulamiento inicial fue de 20°C y la distancia de estrangulamiento se fijó en 73,92 mm. La semilla fue alimentada con recolección continua de aceite y harina sin detener el expulsor hasta que toda la semilla fue triturada.

La velocidad de rotación del sinfín, la temperatura de la harina y el aceite expulsado se controlaron durante todo el prensado. Se obtuvo un rendimiento de 1,02 kg (20,7%) de aceite crudo. Después de filtrar para eliminar los finos, el rendimiento fue de 0,96 kg (19,4%). El perfil de aceite (contenido de ácidos grasos) de esta preparación (denominada BrJ) se muestra en el cuadro 1.

EJEMPLO 2

Aceite de mezcla de referencia

El aceite de pescado puro contiene niveles bajos de ácidos grasos ALA y niveles significativamente más altos de EPA y DHA. Se diseñó una mezcla de aceite de referencia para ser similar en composición al aceite de DPA *Juncea* filtrado obtenido

en el Ejemplo 1. Debido a que el DPA no estaba disponible de otras fuentes en cantidades comparables, se seleccionó EPA como comparador para su inclusión en el aceite de referencia porque tiene cinco dobles enlaces. Esto se logró mezclando un aceite de pescado rico en EPA, aceite de linaza y aceite de girasol con alto contenido de OA. El aceite de mezcla de referencia resultante también tenía un contenido total de omega-3 similar al del aceite DPA Juncea.

Más específicamente, a un reactor seco, lavado con nitrógeno equipado con un agitador mecánico se le añadió aceite de sardina semirrefinado (19,40 kg, 48,5%), aceite de girasol crudo alto oleico (9,52 kg, 23,8%) y aceite de semilla de lino crudo. (11,08 kg, 27,7%) y la mezcla se agitó en una atmósfera inerte a temperatura ambiente durante 2 h. El aceite de referencia (designado Rf) se drenó del reactor y se almacenó bajo nitrógeno antes de su uso.

El cuadro 1 compara el ejemplo de DPA-Juncea y los aceites de mezcla de referencia:

Cuadro 1. Mayor FA en aceites de partida (% , GC-FID)		
Ácido graso (FA)	Aceite crudo de DPA-Juncea (BrJ)	Aceite crudo de mezcla de referencia (Rf)
OA (18:1n9)	43,73	26,71
LA (18:2n6)	7,64	8,60
ALA (18:3n3)	16,51	16,94
EPA (20:5n3)	0,54	10,19
DPA (22:5n3)	10,46	1,0
EPA, DPA, DHA	11,0	14,55

EJEMPLO 3

Transesterificación enzimática de aceite crudo de DPA Juncea

El siguiente procedimiento de transesterificación enzimática se realizó en aproximadamente 5 kg del aceite de triglicéridos crudo obtenido en el Ejemplo 1 para producir éster

etílico de ácido graso (FAEE).

Se añadió etanol al 100% sin desnaturalizar (2,0 kg) y el aceite de triglicéridos en bruto obtenido en el Ejemplo 1 (0,95 kg) a un reactor seco, lavado con nitrógeno, equipado con un agitador mecánico, y se agitó la mezcla. A esta mezcla se le añadieron 100 g de Lipozyme 435 (Novozymes A/S) y la mezcla se calentó a 40°C durante 21 h. Un espectro de ¹H NMR registrado de una muestra tomada de la mezcla indicó que la reacción se había completado.

La mezcla se enfrió a 20°C. La mezcla se drenó del reactor y se filtró a través de una tela filtrante de polipropileno de 4 µm en un filtro Neutsche de 20 l. El reactor se enjuagó con etanol (2 x 1,25 l) y alcohol pet. (2,5 l) y estos se utilizan para lavar secuencialmente la torta del filtro. A la mezcla de reacción bruta resultante se le añadió alcohol pet. (2,5 l) y agua (2 l) y la mezcla se mezcló completamente en el reactor y luego se dejó reposar, después de lo cual se formaron dos fases.

La capa de alcohol pet. se eliminó y la capa acuosa se extrajo adicionalmente con alcohol pet. (1 x 5 l y 1 x 2,5 l). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro (aproximadamente 1 kg), se filtraron y se concentraron al vacío para dar un aceite amarillo (rendimiento: 99%) DPA FAEE crudo. Rendimiento: 99,0%.

La transesterificación enzimática del aceite de mezcla de referencia de triglicéridos en bruto obtenido de acuerdo con el Ejemplo 2 (5,0 kg) se completó usando el proceso que se acaba de describir. El producto FAEE se obtuvo en forma de aceite amarillo.

EJEMPLO 4

Enriquecimiento por destilación al vacío de aceites
transesterificados

A continuación se describe un procedimiento estándar para la eliminación de componentes más volátiles de mezclas de ésteres etílicos de ácidos grasos (FAEE) mediante destilación al vacío. Los FAEE del Ejemplo 3 se sometieron a destilación para desarrollar dos fracciones, una fracción de destilado que contenía poco DPAEE y una fracción de residuo que contenía la mayor parte del DPAEE que es menos volátil. La separación por destilación se logró pasando el aceite crudo transesterificado a través de una película limpia Pope de 50 mm (2 pulgadas) todavía al vacío equipada con 2 matraces de recogida de 1000 ml que recogen el destilado y el residuo. Cada uno fue analizado para determinar la composición de ácidos grasos. El vacío se suministró mediante una bomba rotativa Edwards 3 y el vacío se midió con un ebrovacumetro VM2000.

El aceite se alimentó al alambique mediante una bomba peristáltica de carga fácil II de Cole-Palmer Instrument Company a 4 ml/min con el motor del alambique ajustado a 325 rpm con un condensador de agua usado para condensar el destilado. La alimentación continuó hasta el momento en que uno u otro de los matraces receptores estuvo lleno (de modo que se observaron porciones relativamente iguales de aceites destilados y retenidos). Se destiló DPA FAEE crudo en estas condiciones con las bandas calefactoras ajustadas inicialmente a 153°C. El objetivo era obtener una división 50:50 de destilado: residuo. Durante los primeros 45 minutos del experimento, la temperatura de las bandas calentadoras se redujo a 143°C para disminuir la proporción de aceite que se destiló y luego se dejó que el destilador se equilibrara. Después de minutos, la temperatura de las bandas calentadoras se ajustó a 141°C. El resto de la

destilación tuvo lugar a 141°C. El tiempo total de destilación fue de 145 min. Rendimiento: 52,1% de destilado, 47,1% de retenido (residuo). El volumen se redujo así en un 50% mientras se mantenía el 80% de DPAEE en el aceite residual. Esto produjo aceites con aproximadamente un 19% de DPAEE a partir de un aceite que originalmente contenía aproximadamente un 10% de DPAEE.

Una parte del residuo de la destilación anterior se sometió de nuevo a la eliminación de componentes más volátiles por destilación en las condiciones estándar con la temperatura de las bandas calentadoras ajustada a 145°C, de nuevo apuntando a una división 50:50. Durante 20 minutos, en un intento de aumentar la proporción de aceite destilado, la temperatura de las bandas calefactoras se aumentó a 153°C y se mantuvo a esa temperatura. Sin embargo, después de 50 min a 153°C, se encontró que el caudal del destilado era demasiado alto y la temperatura de las bandas calentadoras se redujo a 151°C durante el resto de la destilación. El tiempo total de destilación fue de 95 min. Rendimiento: 53,0% de destilado, 46,4% de retenido. Esto produjo un aceite con aproximadamente un 35% de DPAEE. El resultado final de la doble destilación redujo el volumen de aceite en un factor de 4, mientras que retuvo aproximadamente el 65% del DPAEE original en el aceite.

El aceite de referencia se destiló en condiciones similares.

EJEMPLO 5

Separación cromatográfica de FAEE derivado de DPA-Junceá

El FAEE obtenido en el Ejemplo 4 (es decir, FAEE que se había obtenido del aceite crudo DPA-Junceá por transesterificación y doble destilación) se sometió a separación cromatográfica mediante HPLC preparativa. La HPLC preparativa en una escala de 1 g seguida de una concentración al vacío produjo

fracciones superiores al 85% de DPAEE (y superiores al 85% de EPAEE de los aceites de mezcla de referencia). Se realizó un segundo experimento de HPLC preparativa para obtener una única fracción de aceite enriquecido con DPA al 50-85% o aceite enriquecido con EPA al 40-60%. Se realizaron experimentos adicionales de HPLC preparativa usando una columna alternativa. Todas las demás fracciones de FAEE se recogieron y analizaron para determinar su pureza mediante HPLC y las fracciones puras de interés se concentraron al vacío. De esta manera, también se produjeron fracciones enriquecidas en OAEE, LAEE, ALAEE, ETAEE, EPAEE y DPAEE a partir de uno o más de los aceites.

Método A de HPLC preparativa: este método utilizó un sistema de HPLC que comprende un sistema Waters Prep 4000, un inyector Rheodyne con bucle de 10 ml, una columna Deltaprep C18 de 300 x 40 mm, un detector de longitud de onda doble Waters 2487 y un registrador de gráficos equilibrado con metanol al 88%/fase móvil de agua a 70 ml/min. El detector se ajustó a 215 nm y 2,0 unidades de absorbancia a escala completa y el gráfico corrió a 6 cm/h. Se disolvió 1,0 g de aceite FAEE en una cantidad mínima de 88% de metanol/agua y se inyectó en la columna a través del inyector Rheodyne. Se recogieron fracciones de aproximadamente 250 ml una vez que apareció el frente del disolvente después de aproximadamente 7 min. Se recogieron cuarenta y siete (47) fracciones durante 150 min. Después de 106 min, la fase móvil se cambió a metanol al 90%/agua. Después de 116 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 134 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Después de que se recogieron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min.

Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones (y los métodos de HPLC A-D, arriba y abajo), y se combinaron las

fracciones "simétricas" que contenían predominantemente DPA (rendimiento: 22%). Para el análisis de muestras se utilizó un sistema de HPLC que comprende un controlador de bomba Waters 600E, un muestreador automático 717, un detector de matriz de fotodiodos 2996 y un detector de índice de refracción 2414. El análisis se realizó en una columna Alltima C18 de 150 x 4,6 mm usando metanol/agua isocrático al 90% o metanol/agua al 95% a 1,0 ml/min como fase móvil. La recopilación y el procesamiento de datos se realizó en el software Waters Empower 3.

Este enfoque produjo fracciones designadas "A fr" en el cuadro 2:

Cuadro 2. Rendimiento del método A de HPLC preparativa		
Fracción	Masa FAEE obtenida	Componente(s) * significantes
A fr 18	2,5 mg	ALA
A fr 19-21	57 mg	ALA
A fr 23-26	40 mg	ETA
A fr 27-28	23 mg	LA, DPA3
A fr 29-34	228 mg	DPA3
A fr 35-37	17 mg	OA, ETrA, DPA3
A fr 38	108 mg	OA
A fr 39-40	77 mg	OA, DTA3
A fr 44-45	38 mg	
*Al menos 10% FAEE.		

En una variación de este método para aislar un DPAEE de alta pureza, el método A se modificó como sigue: después de 96 min, la fase móvil se cambió a 90% de metanol/agua. Después de 109 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 120 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Después de que se recogieron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se recogieron treinta y nueve (39) fracciones durante 120 min. Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones para determinar su pureza y perfil FAEE, que coincidían estrechamente con los de las fracciones A, y sobre esa base se combinaron las siguientes

fracciones: A1 fr 25-30 y A1 fr 36-37.

Se realizó otra variación del enfoque de HPLC A con estas modificaciones: Después de 107 minutos, la fase móvil se cambió a metanol al 90%/agua. Después de 119 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 130 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Después de que se recogieron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se recogieron cuarenta (40) fracciones durante 129 min. Esto proporcionó el aislamiento de DPAEE de alta pureza, y las fracciones se denominaron A2 fr 25-30 y A2 fr 38-39.

A continuación, las fracciones del método A se sometieron a más pasos de purificación y análisis. Para obtener DTA3EE de pureza media, las fracciones A fr 39-40, A1 fr 36-37 y A2 fr 38-39 se combinaron y extrajeron con alcohol pet. (3 x 300 ml). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. Esta preparación se denominó AP (rendimiento: 260 mg).

Método B de HPLC preparativa: para el aislamiento de DPAEE de pureza media mediante HPLC preparativa, se cromatografió el aceite FAEE bidestilado en condiciones estándar y una columna Deltaprep C18, con modificaciones. El objetivo era recolectar una única fracción de DPA que contenga entre 50 y 85% de DPA. A partir del material de partida, 1,07 g de DPAEE bidestilado, se recogió una sola fracción de 72 min (15 min antes del pico de DPA) a 120 min (15 min después del final del pico de DPA) en estas condiciones: Después de 105 min la fase móvil se cambió a metanol al 90%/agua. Después de 120 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 124 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Después de que se recogieron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con

metanol al 100% a 70 ml/min. La fracción única (denominada B fr 1) se evaporó para el análisis por CG (rendimiento: 338 mg).

En un enfoque relacionado, el método B de HPLC se modificó como sigue: Después de 96 min, la fase móvil se cambió a metanol al 90%/agua. Después de 111 minutos, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 116 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Una vez que los picos finales hubieron eluido de la columna, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se realizó HPLC analítica en la fracción, denominada B1 fr1, para determinar su pureza y perfil FAEE, que coincidía estrechamente con el de B fr 1.

En otro enfoque relacionado, el método B de HPLC se modificó como sigue: Después de 104 min, la fase móvil se cambió a metanol al 90%/agua. Después de 119 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 126 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Una vez que los picos finales hubieron eluido de la columna, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se recogió una única fracción desde 15 minutos antes del pico de DPA hasta 15 minutos después del final del pico de DPA. Se realizó HPLC analítica en la fracción, denominada B2 fr1, para determinar su pureza y perfil FAEE, que coincidía estrechamente con el de la fracción B fr 1. Este procedimiento se repitió para preparar las fracciones B1 fr 1 y B2 fr 1.

A continuación, se combinaron B fr 1, B1 fr 1 y B2 fr 1 y se extrajeron con alcohol pet. (3 x 3l). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. Esta preparación se denominó BL (rendimiento: 1,1 g).

El extracto concentrado de DPAEE, BL, se cromatografió en las condiciones estándar usando una fase móvil de metanol/agua

al 94%. Se recogió un total de ocho fracciones durante 24 min. Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones para determinar su pureza y perfil FAEE, que coincidían estrechamente con los de BL, y sobre esa base se combinaron las siguientes fracciones y se denominaron BM fr 1-8.

Posteriormente, se combinaron BM fr 1-8 y se extrajeron con alcohol pet. (3 x 300 ml). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. Este extracto de DPAEE se denominó BN (rendimiento: 809 mg).

Método C de HPLC preparativa: Se realizó un aislamiento alternativo de DPAEE de alta pureza como sigue. Se cromatografió aceite crudo de doble destilación FAEE derivado de DPA-juncea (1,57 g) en condiciones estándar utilizando una columna Gemini-NX C18 de 250 x 50 mm, con las siguientes modificaciones: Las fracciones se recogieron desde el comienzo del pico EPAEE a aproximadamente 58 min. Se recogió un total de veintiún (21) fracciones durante 73 min. Después de 111 min, la fase móvil se cambió a metanol al 90%/agua. Después de 127 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 137 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Después de que se recogieron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones y, sobre esa base, las siguientes fracciones se combinaron y concentraron al vacío para el análisis por GC. Los rendimientos se muestran en el cuadro 3:

Cuadro 3. Rendimiento del método C de HPLC preparativa		
Fracción	Masa obtenida	Componente(s) * principales
C fr 1	10 mg	EPA
C fr 2-3	80 mg	ALA
C fr 5-6	50 mg	ETA
C fr 7-9	40 mg	LA, ETA
C fr 14-15	14 mg	ETrA, DPA3
C fr 16-18	203 mg	OA
C fr 19-20	60 mg	DTA3
C fr 10-13	283 mg	DPA3
C fr 10-13aq	6 mg	DPA3
* Al menos 10% de FAEE.		

Las fracciones C fr 10-13 se extrajeron con alcohol pet. (3 x 300 ml). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. A continuación, la capa acuosa residual también se concentró al vacío para determinar la finalización del procedimiento de extracción. Este paso dio como resultado C fr 10-13 y C fr 10-13aq con los rendimientos mostrados en el cuadro 3 anterior.

Se llevó a cabo una variación del método C con las siguientes modificaciones: Después de 93 min, la fase móvil se cambió a 90% de metanol/agua. Después de 116 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 124 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Después de que se recogieron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se recogió un total de 23 fracciones durante 68 min. Las fracciones se combinaron como sigue: C1 fr 5-6, C1 fr 10-13 y C1 fr 20-21.

Se llevó a cabo otra variación del método C con las siguientes modificaciones: Después de 96 min, la fase móvil se cambió a 90% de metanol/agua. Después de 111 minutos, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 117 min, la

fase móvil se cambió a metanol al 100%. Una vez recogidas las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se recogió un total de 23 fracciones durante 70 min. Las fracciones se combinaron como sigue: C2 fr 5-6, C2 fr 10-13 y C2 fr 20-21.

Se llevó a cabo otra variación más del método C con las siguientes modificaciones: Después de 99 minutos, la fase móvil se cambió a 90% de metanol/agua. Después de 115 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 126 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Después de que se recogieron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se recogió un total de 24 fracciones durante 75 min. Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones para determinar su pureza y perfil FAEE, que coincidían estrechamente con los de C fr, y sobre esa base se combinaron las siguientes fracciones. Las fracciones se combinaron como sigue: C3 fr 5-6, C3 fr 10-13 y C3 fr 20-22.

Se llevó a cabo una variación adicional del método C con las siguientes modificaciones: Después de 92 min, la fase móvil se cambió a 90% de metanol/agua. Después de 109 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 116 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Después de que se recogieron las fracciones finales, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. Se recogió un total de 24 fracciones durante 72 min. Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones para determinar su pureza y perfil FAEE, que coincidían estrechamente con los de C fr, y sobre esa base se combinaron las siguientes fracciones. Las fracciones se combinaron como sigue: C4 fr 5-6, C4 fr 10-13 y C4 fr 20-21.

Siguiendo estos procedimientos, las fracciones C fr 5-6, C1 fr 5-6, C2 fr 5-6, C3 fr 5 6 y C4 fr 5-6 se combinaron y

extrajeran con alcohol pet. (3 x 300 ml). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. Esta preparación comprendía un alto contenido de ETAn-3EE y se denomina CR (rendimiento: 217 mg).

Además, siguiendo los procedimientos de HPLC iniciales, las fracciones C fr 19-20, C1 fr 20-21, C2 fr 20-21, C3 fr 20-22 y C4 fr 20-21 se combinaron y extrajeran con alcohol pet. (3 x 300 ml). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. Esta preparación contenía un alto contenido de DTAn-3EE y se denomina CS (rendimiento: 254 mg).

Además, siguiendo los procedimientos iniciales de HPLC preparativa, las fracciones C fr 10-13, C1 fr 10-13, C2 fr 10-13, C3 fr 10-13 y C4 fr 10-13 se combinaron y extrajeran con alcohol pet. (3 x 3L). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. Estas preparaciones proporcionaron DPAEE de alta pureza, denominado CT1 (rendimiento: 1,088 g) y CT2 (rendimiento: 417 mg).

El extracto de DPAEE concentrado (417 mg, CT2) se cromatografió en las condiciones estándar usando una fase móvil de metanol/agua al 94%, y se recogieron cuatro fracciones durante 12 min. Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones para determinar la pureza y el perfil FAEE, que coincidían estrechamente con los de CT2, y sobre esa base se combinaron las siguientes fracciones y se denominaron CX fr 2-4. Además, los extractos concentrados de DPAEE (1,088 mg, CT1) se cromatografiaron en condiciones estándar utilizando una fase móvil de metanol/agua al 94% y se recogieron seis fracciones durante 16 min. Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones para determinar la pureza y el perfil FAEE, que coincidían

estrechamente con los de CT1, y sobre esa base se combinaron las siguientes fracciones y se denominaron CZ fr 3-6.

Después de eso, las preparaciones concentradas de DPAEE CX fr 2-4 y CZ fr 3-6 se combinaron y extrajeron con alcohol pet. (3 x 300 ml). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío. Esta preparación se denominó CXZ (rendimiento: 1,0 g).

Método D de HPLC preparativa: También se usó un aislamiento alternativo de DPAEE de pureza media para recoger una única fracción de DPA que contiene entre 50-85% de DPA. Se cromatografió aceite bidestilado de FAEE derivado de DPA-juncea crudo (1,57 g) en condiciones estándar utilizando una columna Gemini-NX C18 de 250 x 50 mm, con las siguientes modificaciones: Se recogió una única fracción 15 min antes del pico de DPA, a 15 min después del final del pico de DPA. Después de 90 min, la fase móvil se cambió a metanol al 90%/agua. Después de 100 min, la fase móvil se cambió a 94% de metanol/agua. Después de 113 min, la fase móvil se cambió a metanol al 100%. Una vez que los picos finales hubieron eluido de la columna, la columna se lavó durante 1 hora más con metanol al 100% a 70 ml/min. La fracción única se extrajo con alcohol pet. (3 x 300 ml). Las capas de alcohol pet. se secaron sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtraron y se concentraron al vacío para análisis por CG. Esta fracción se identificó como D fr 1 (rendimiento: 587 mg).

Los ésteres etílicos de ácidos grasos destilados (FAEE) de la mezcla de referencia se sometieron de manera similar a separación cromatográfica en condiciones similares. Se realizó HPLC analítica en todas las fracciones, y se combinaron las fracciones "simétricas" que contenían predominantemente EPA.

En el siguiente cuadro se muestra un ejemplo de contenido de ácidos grasos en aceite crudo DPA Juncea y en varios

pasos de enriquecimiento (el aceite se analizó mediante GC-FID como es bien conocido en la técnica; identidades FAEE establecidas usando Supelco 37 FAME mezcla estándar transesterificada a la mezcla FAEE):

Cuadro 4. Ejemplo de contenido de ácidos grasos por enriquecimiento											
Muestra	OA	LA	ALA	SDA	ETA	EPA	DTA3	DPA3	DHA	N3 tot	N9 tot
Aceite DPA crudo	43,73	7,64	16,51	1,05	3,55	0,54	1,88	10,46	-	34,58	45,14
Transesterificado	43,73	7,64	16,51	1,05	3,55	0,54	1,88	10,46	-	34,58	45,14
1er Destilado	48,30	8,46	18,29	1,25	2,49	0,40	0,61	3,75	-	27,18	49,27
1er Retención	36,90	6,27	13,93	0,64	5,01	0,72	3,48	19,18	-	43,78	39,38
2o Destilado	43,43	7,37	16,55	0,97	4,57	0,68	1,79	10,44	-	35,76	45,31
2a Retención*	22,03	3,66	8,61	-	6,13	0,91	6,93	35,80	-	59,53	25,87
Fracción DPA	-	2,45	0,10	-	0,20	-	-	95,31	-	95,73	-
Fracción ETA	-	2,73	1,78	-	92,90	0,07	-	0,43	-	95,18	-
Fracción DTA	43,34	0,08	0,10	-	0,09	-	48,99	0,98	-	50,27	43,34
Fracción DPA	9,88	6,70	0,34	-	11,01	-	0,53	65,97	-	80,01	9,88
Petróleo crudo = sólo la parte de la prensa de expulsión, tot = total; Fracciones mediante HPLC preparativa del segundo retenido.											
* Esta preparación utilizada en la comparación de estabilidad de la Figura 1.											

En el cuadro 5 se muestra una presentación más detallada del contenido de FA de varias fracciones enriquecidas de las presentes modalidades:

Cuadro 5. Resultados de análisis GC para aceites derivados del aceite DPA Juncea FAEE									
Muestra	OA	LA	ALA	ETrA	ETA	EPA	DTA3	DPA3	Suma EPA, DPA
Transesterificado	43,73	7,64	16,51	0,59	3,55	0,54	1,88	10,46	11,0
2a Retención	22,03	3,66	8,61	1,15	6,13	0,91	6,93	35,80	38,71
A fr 18	0,08	0,06	33,87	-	-	60,24	-	0,07	60,32
A fr 19-21	-	-	89,94	-	0,08	4,60	-	-	4,60
A fr 23-26	-	2,73	1,78	-	92,90	0,07	-	0,43	0,51
A fr 27-28	-	79,92	0,56	-	3,07	-	-	15,23	15,23
A fr 29-34	-	2,45	0,10	0,12	0,20	-	-	95,31	95,31
A fr 35-37	25,64	1,0	0,53	37,57	0,76	-	0,92	16,07	16,07
A fr 38	87,36	-	-	0,11	0,0	-	3,77	0,52	0,52
A fr 39-40	43,34	0,08	0,10	0,11	0,09	-	48,99	0,98	0,98
AP	55,79	-	-	-	-	-	37,36	0,60	0,60
B fr 1	9,88	6,70	0,34	2,16	11,01	-	0,53	65,97	65,97
BL	11,83	6,82	-	1,97	10,86	-	0,85	63,33	63,33
BN	11,82	6,96	0,40	2,11	11,01	-	0,25	64,31	64,31
C fr 1	0,17	-	-	-	-	93,04	-	-	93,04
C fr 2-3	0,11	-	89,91	-	-	4,10	-	-	4,10
C fr 5-6	-	-	0,54	-	94,89	0,06	-	0,18	0,26
C fr 7-9	0,01	80,81	0,30	-	14,92	0,02	-	0,38	0,43
C fr 10-13	-	0,18	-	0,23	0,06	-	-	98,42	98,42
C fr 10-13 aq	0,03	0,18	-	0,18	0,07	0,03	-	98,11	98,11
C fr 14-15	0,14	0,17	0,06	54,06	0,16	-	0,40	34,58	34,58
C fr16-18	91,25	0,04	-	-	-	-	1,34	0,40	0,40
C fr 19-20	6,30	0,02	-	0,03	-	-	86,59	0,32	0,32
CR	0,05	-	0,71	-	98,45	0,05	-	-	0,05
CS	11,53	-	0,44	0,03	-	-	80,57	-	0,35
CT	0,13	0,29	-	0,12	0,09	-	-	96,68	96,68
CXZ	0,10	0,31	-	0,13	-	-	-	98,61	98,61
D fr 1	30,14	4,99	0,07	-	8,22	-	3,36	48,11	48,11

En algunas modalidades, las fracciones se pueden mezclar

para lograr una concentración deseada de FAEE particular. Por ejemplo, las fracciones de DPA enriquecidas se pueden mezclar con otra fracción, o con un aceite de una fuente diferente (por ejemplo, aceite de canola DHA u otro aceite de canola), para proporcionar una composición lipídica que comprenda aproximadamente un 45% de DPAn-3. En al menos una modalidad, la composición comprende 20% -50% DPAn-3, 10% -30% OA y 2% -20% ETA (todos los rangos incluidos).

EJEMPLO 6

Pruebas de estabilidad del aceite

Se sometió una selección de aceites a estudios oxidativos acelerados, de curso temporal, inducidos por luz, usando GC/MS de espacio de cabeza de microextracción en fase sólida (SPME). Esto fue para determinar si los aceites de origen vegetal mostraban una mayor estabilidad que los aceites de mezcla de referencia de origen marino, lo que de hecho se observó.

La prueba de estabilidad por GC-MS de espacio de cabeza se realizó como sigue. El análisis del espacio de cabeza se realizó en los productos enriquecidos preparados como se describe anteriormente para evaluar las cantidades de propanal que se liberan en condiciones específicas. Los niveles aumentados de liberación propanal demuestran una estabilidad reducida del material de prueba.

Método SPME (microextracción en fase sólida): Fibra StableFlex PDMS/DVB seleccionada de 65 μm (kit de fibra Supelco 57284-u). Las fibras se acondicionaron durante 10 minutos antes de su uso a 250°C en una estación de acondicionamiento Triplus RSH. Las muestras se incubaron a 40°C durante 1 min antes de la extracción.

Método de GC: columna Thermo Scientific TRACE 1310 GC

Thermo Scientific TR-DIOXIN 5MS, diámetro interno de 0,25 mm, película de 30 m de 0,1 μ m. Inyección dividida 250°C Split 83, 1,2 ml He/min. Rampa de GC: 40°C 1 min a 100 a 5°C/min, luego a 300°C a 50°C/min.

Se usó una columna genérica específica de MS con buena sinergia para el análisis del espacio de cabeza. Se empleó una rampa de temperatura inicial lenta para maximizar la separación de los volátiles antes de subir al máximo para mantener el rendimiento de la columna. Se emplearon inyecciones divididas para evitar el requisito de enfriamiento criogénico de la entrada y mejorar la resolución de la columna.

Thermo Scientific DFS MS de doble enfoque de alta resolución con TRACE 1310 y muestreador automático Triplus RSH que emplea detección de iones múltiples de alta resolución (MID) (ESCANEO ELÉCTRICO LINEAL) a una resolución de 10,000 que monitorea los siguientes iones: m/z 57 Propanal -H (-H da un rango dinámico más alto (58 se registró pero no se usó). Se empleó perfluorocaroseno (PFK) como patrón de calibración y masa de bloqueo m/z 51, 69 y 93.

Método de MS: GC-MS de alta resolución Thermo Scientific DFS de alta resolución (1000), barrido completo 35-350 Da a 0,5 s/barrido, Estándares: Se hicieron diluciones estándar de Propanal y Hexanal en aceite de canola comercial suministrado. A continuación, estas mezclas estándar se añadieron a un volumen de 100 μ l a viales con espacio de cabeza de 20 ml.

Se empleó un barrido completo, lo que permitió el seguimiento de todos los productos evolucionados en lugar de moléculas específicas.

Resultados de estabilidad: el cuadro 6, a continuación, proporciona los resultados obtenidos del aceite DPA Juncea en comparación con las preparaciones de referencia, obtenidos del

enriquecimiento por HPLC del Ejemplo 5 a T = 0, T = 3 y T = 5 días. Las muestras de prueba se mantuvieron durante este período a temperatura ambiente en una caja de luz y bajo iluminación de tubo fluorescente. Se analizó el ion molecular m/z 57 y el cromatograma de masas muestra claramente la aparición de propanal a TA 1,37 minutos. El desarrollo propanal se cuantifica en el cuadro siguiente, y los datos también se ilustran en la figura 1 a la figura 3. El aceite de DPA Juncea liberó cantidades sustancialmente menores de propanal, demostrando así la estabilidad mejorada de las fracciones de FAEE en comparación con las composiciones de referencia.

Cuadro 6. Datos de la comparación de estabilidad			
Propanal (ppm) por punto de tiempo (días)	T0 (ppm)	T3 (ppm)	T5 (ppm)
Aceite DPA Juncea FAEE bidestilado	94	156	314
Aceite de mezcla de referencia FAEE bidestilado	76	333	534
Aceite DPA Juncea FAEE bidestilado y cromatografiado, compuesto por un 98% de DPAn-3 *	25	313	412
Aceite de mezcla de referencia FAEE bidestilado y cromatografiado, que comprende un 90% de EPA	70	356	771
Aceite DPA Juncea FAEE bidestilado y cromatografiado, que comprende 64% DPAn 3 **	4	198	369
Aceite de mezcla de referencia FAEE bidestilado y cromatografiado, que comprende 58% de EPA	16	378	538
* El contenido de CXZ de muestra, FA comprendía 98,61% de DPA y <1% de cualquier otro FA individual. ** El contenido de BN, FA de la muestra comprendía 1,09% de ácido palmítico (16: 0), 11,82% de OA, 2,11% de ETrA (20: 3n3), 6,96% de LA, 11,01% de ETA, 64,31% de DPAn-3 y <1% cualquiera otro solo FA.			

Estos datos muestran que el FAEE preparado a partir del aceite de DPA Juncea tiene una estabilidad superior en comparación con el FAEE del aceite de mezcla de referencia.

EJEMPLO 7

Modulación de la producción de citocinas inflamatorias

Las composiciones lipídicas DPA, DTA y ETA de las presentes modalidades modulan el sistema inmunológico. El sistema inmunológico es una red compleja organizada de estructuras y procesos biológicos que protegen contra las enfermedades infecciosas. Por ejemplo, las citocinas y quimiocinas median las interacciones entre las células directamente, regulando las respuestas de las células inmunitarias diana y promoviendo la inflamación. Estas respuestas dan como resultado un ataque coordinado donde el sistema inmunológico intenta erradicar los patógenos extraños y comenzar el proceso de curación. En consecuencia, el proceso inflamatorio juega un papel protector clave en la inmunidad. Además, la investigación de citocinas y quimiocinas es esencial para comprender el sistema inmunológico y su respuesta multifacética a la mayoría de los antígenos, así como estados patológicos como enfermedades autoinmunes, reacciones alérgicas, sepsis y cáncer. Por muy beneficiosa que pueda ser la respuesta inmune para la protección contra patógenos, la inmunidad excesiva o inadecuada puede ser dañina. Por ejemplo, se propone que la inflamación crónica puede contribuir a enfermedades tan diversas como diabetes tipo 2, síndrome metabólico, enfermedad hepática, artritis, aterosclerosis, cáncer, colitis y enfermedades neurodegenerativas. Por tanto, la supresión de la inmunidad también puede ser beneficiosa.

Este ejemplo investiga composiciones lipídicas derivadas de DPA-Junceá para confirmar su actividad inmunomoduladora y comparar esa actividad con sus contrapartes sintéticas. La comparación, en al menos una modalidad, muestra

que las composiciones lipídicas de origen vegetal descritas aquí se pueden distinguir de las contrapartes sintéticas.

Preparación de materiales de prueba: Las composiciones lipídicas de ejemplo para comparar en este Ejemplo incluyen composiciones de FAEE enriquecidas, como se describe aquí, mezcladas con ácidos grasos sintéticos y fracciones de aceite de referencia para comparación.

Se prepararon ácidos grasos libres a partir del FAEE de los ejemplos anteriores: BrJDD (DPA Juncea FAEE bidestilado), BN, CS y AP. A un matraz de fondo redondo y dos bocas de 100 ml se añadió alcohol pet. (10 ml) y éster etílico de ácidos grasos (150 mg) para formar una solución transparente. Se añadió lipozima 435 (150 mg) y luego agua desionizada (5 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente con el matraz sumergido en un baño de aceite mantenido a 40°C. La mezcla de reacción se comprobó diariamente mediante ^1H RMN y TLC hasta que se observó que la mayoría de FAEE estaba disminuida y no se observó más hidrólisis. Una vez completada, la mezcla de reacción de color blanco turbio se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 100 ml de alcohol pet. y se transfiere a un embudo de decantación. Se eliminó la fase acuosa clara y se filtró la fase orgánica al vacío para eliminar todos los sólidos. El filtrado transparente se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró al vacío para dar un aceite viscoso. Las muestras se analizaron mediante ^1H RMN (CDCl_3) y se purificaron mediante cromatografía radial (sílice de 4 mm, eluyendo con alcohol de petróleo al 100% hasta DCM al 100%, luego DCM: MeOH 95: 5). Las fracciones se analizaron mediante TLC desarrollada usando 75:25 alcohol pet.:EtOAc. Las placas reveladas se pulverizaron con una pulverización de bromocresol básica y las fracciones que mostraban manchas de color amarillo brillante se analizaron

mediante ^1H NMR. Las fracciones que contenían ácidos grasos libres se combinaron, se concentraron al vacío, se colocaron en viales y se sellaron bajo nitrógeno.

También se prepararon ácidos grasos libres a partir de aceites TAG de semilla de lino (Flx) y girasol con alto contenido de ácido oleico (HOS) como sigue: A un matraz de 250 ml de dos cuellos y fondo redondo se añadió alcohol pet. (60 ml) y aceite de triglicéridos (1000 mg) para formar una solución transparente. Se añadió lipozima 435 (1000 mg) y luego agua desionizada (40 ml) y la mezcla se agitó vigorosamente con el matraz sumergido en un baño de aceite mantenido a 40°C . La mezcla de reacción se comprobó diariamente mediante ^1H RMN y TLC hasta que se observó que la mayoría de las señales de triglicéridos a 5,2, 4,2 y 4,1 ppm estaban disminuidas y no se observó más hidrólisis. Una vez completada, la mezcla de reacción de color blanco turbio se dejó enfriar a temperatura ambiente. La mezcla se diluyó con 100 ml de alcohol pet. y se transfiere a un embudo de decantación. Se eliminó la fase acuosa clara y se filtró la fase orgánica al vacío para eliminar todos los sólidos. El filtrado transparente se secó sobre sulfato de magnesio anhidro, se filtró y se concentró al vacío para dar un aceite viscoso. El aceite crudo se analizó por ^1H RMN (CDCl_3) y se purificó por cromatografía radial (4 mm de sílice, eluyendo con alcohol pet. al 100% hasta DCM al 100%, luego con DCM: MeOH 95:5). A continuación, se analizaron las fracciones mediante TLC desarrollada usando 75:25 alcohol pet.: EtOAc. Las placas reveladas se pulverizaron con una pulverización de bromocresol básica y las fracciones que mostraban manchas de color amarillo brillante se analizaron mediante ^1H NMR. Las fracciones que contenían ácidos grasos libres se combinaron, se concentraron al vacío, se colocaron en viales y se sellaron bajo nitrógeno.

Además, se adquirieron DPA (synDPA) y ETA (synETA) para su uso como comparadores en los ensayos celulares.

Se prepararon varias mezclas de ácidos grasos libres de la siguiente manera:

Cuadro 7. Mezclas de ácidos grasos libres (FFA) para ensayos de marcadores inflamatorios celulares								
	Componente FFA							
Código de mezcla	BrJdd	BN	CS	AP	Flx	HOS	SynDPA	SynETA
BrJddFlxHOS	96 mg				13 mg	27 mg		
BrJddFlxHOS1	43 mg				15 mg	44 mg		
Bfr1FlxHOS		102 mg			23 mg	28 mg		
Afr39-40HOS				14 mg		14 mg		
Cfr19-20HOS			18 mg			6 mg		
SynDHOS						33,5 mg	68 mg	
SynDEHOS						33 mg	80 mg	6 mg
SynDEHOS1						23 mg	74 mg	13,5 mg
SynDEHOS2						15 mg	61 mg	14,4 mg

El contenido de FA de los componentes de FFA y las mezclas de FFA se determinó mediante GC y se muestra en el cuadro 8:

Cuadro 8. Resultados del análisis de GC para mezclas de FFA y FFA (como% o contenido total de FA de la muestra)										
Muestra	OA	LA	ALA	ETrA	ETA	EPA	DTA3	DPA3	DHA	Suma EPA, DPA, DHA
BrJ	41,9	7,2	14,4	0,7	3,1	0,6	1,8	9,0	-	9,5
BrJdd	29,2	5,9	13,5	0,9	5,2	0,8	4,9	28,4	-	29,2
BrJddFlxHOS	36,2	8,3	16,5	0,6	3,5	0,6	3,4	19,7		20,4
BrJddFlxHOS1	46,2	10,6	16,2	0,4	2,1	0,4	1,9	10,8	0,1	11,2
Bfr1FlxHOS	23,9	9,5	13,6	1,4	6,6	0,5	0,9	38,1	-	38,6
BN	12,2	7,2	0,4	2,2	10,8	-	0,8	61,7	0,3	62,0
SynDHOS	23,4	4,7	-	-	-	-	0,4	67,4	0,2	67,5
SynDEHOS	19,8	3,4	-	-	5,7	-	0,4	66,8	0,2	67,0
SynDEHOS1	12,0	2,2	-	-	10,3	-	0,4	72,5	0,2	72,7
SynDEHOS2	13,8	2,3	-	-	17,3	-	0,4	63,3	0,1	63,4
CXZ	0,9	0,4	-	0,1	-	-	-	95,8	-	95,8
SynDPA	-	-	-	-	-	-	-	98,9	0,2	99,1
AP	59,5	-	0,1	0,1	3,0	-	29,9	0,1	-	0,1
CS	13,2	-	0,4	-	3,7	-	74,4	0,4	-	0,4
HOS	74,4	13,9	0,2	-	-	-	-	-	-	-
Afr39-40HOS	73,0	9,2	-	-	0,9	-	7,4	0,2	-	0,2
Afr19-20HOS	34,8	4,6	0,4	-	-	-	50,0	0,3	0,3	0,6
CR	0,6	0,1	0,7	-	96,2	0,1	-	0,1	-	0,2
SynETA	-	-	-	-	99,0	-	-	-	-	-
Rfdd	20,8	6,4	13,0	0,1	0,9	17,3	-	3,2	10,6	31,1
DHAfr21-25*	9,8	3,2	2,2	-	10,7	-	-	-	66,5	66,5
* Preparado a partir de aceite de semilla de canola de la línea NSB500274 mediante el método HPLC A.										

Prueba de modulación: Brevemente, se obtienen células de bazo (esplenocitos) de ratones hembra (BALB/c mic) y se cultivan en placas de 96 pozos. Las células se exponen a cada preparación de aceite (en dilución) y lipopolisacárido (LPS, típicamente de la bacteria *E. coli* o que imita de otro modo) para estimular la respuesta de citocinas en presencia de la preparación de aceite de prueba. Posteriormente (después de un cultivo de 24 h con exposición a la dilución de la preparación de aceite y LPS), los medios de las células estimuladas se analizan para detectar la presencia de citocinas (es decir, citocinas que se han liberado de la célula al medio). Los kits estándar o conjuntos de citocinas y anticuerpos útiles para la

identificación o cuantificación de la modulación de citocinas están disponibles comercialmente. Por ejemplo, el panel de perlas magnéticas de citocinas/quimiocinas Milliplex Map Mouse (Millipore # MCYTMAG-70K-PX32) incluye una premezcla de anticuerpos que reconocen los siguientes analitos de citocinas/quimiocinas: Eotaxina/CCL11, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, IP-10, KC, LIF, LIX, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2, RANTES, TNF- α y VEGF. Los datos están normalizados para citocinas a controles no estimulados.

Los datos pueden indicar que las composiciones lipídicas enriquecidas con DPA de origen vegetal poseen una actividad moduladora inesperada en comparación con las composiciones lipídicas sintéticos.

EJEMPLO 8

Inhibición de citocinas inflamatorias

Se emprendió un estudio preliminar *in vitro* del efecto de diversas preparaciones de ácidos grasos libres (FFA) sobre células sanguíneas humanas activadas por endotoxina (LPS). Más específicamente, el ensayo midió el efecto *in vitro* de diversas preparaciones de FFA sobre la capacidad de las células mononucleares de sangre periférica humana (PBMC) estimuladas con LPS para producir citocinas, quimiocinas y factores de crecimiento pro y antiinflamatorios.

Inicialmente, se sembraron tres muestras de PBMC humanas en placas de 96 pozos y se estimularon con cuatro dosis diferentes de LPS contra un control sin LPS (es decir, 0, 1, 10, 100, 1000 ng/ml). Cada serie también se incubó con una única preparación de FFA, Rfdd (ver Tabla 8), a tres dosis diferentes

(frente a un control sin FFA) en un vehículo DMSO. Las distribuciones celulares de las muestras se determinaron en base al análisis citométrico de flujo de marcadores de superficie celular (CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD56). El cuadro 9 proporciona más información sobre la fuente y el contenido celular de las muestras de células humanas:

Cuadro 9. Muestras de PBMC humanas						
Donador	Edad	Sexo	Células T (CD4, CD8)	Células B	Monocitos	Células NK
D1	29y	M	38% (48, 32)	14%	20%	17%
D2	56y	F	37% (52, 43)	13%	37%	8%
D3	49y	M	39% (56, 39)	20%	27%	13%

Se comparó la producción de treinta y ocho citocinas/quimiocinas/factores de crecimiento diferentes (Citoicina humana map MILLIPLEX /Panel de perlas magnéticas de quimiocinas - Premezclado 38 Plex - Ensayo multiplex de inmunología (Millipore HCYTA-60K-PX38)) se comparó entre estas muestras de células. Los marcadores de este kit de ensayo fueron EGF, Eotaxina/CCL11, G-CSF, GM-CSF, IFN α 2, IFN γ , IL-1 α , IL-1 β , IL-RA, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IL-17E/IL-25, IL-17F, IL-18, IL-22, IP-10, MCP-1, M-CSF, MIG, MIP 1 α , MIP-1 β , PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, TNF α , TNF β y VEGF-A. Los datos mostraron que 1 ng/ml de LPS exhibió fuertes efectos estimulantes sobre los niveles de múltiples analitos.

En ausencia de preparación de FFA, los monocitos activados por LPS generalmente como se esperaba. Específicamente, los siguientes factores fueron inducidos por LPS: Eotaxina (levemente), G-CSF, GM-CSF, IFN γ , IL-1 α e IL-1 β , IL-1RA, IL-6,

IL-8 (levemente), IL-10, IL-12 (p40) (2/3 muestras), IL-17e, IL-18, IL-22, MIP1 α , MIP1 β , RANTES (leve), TNF α y TNF β . Por el contrario, se suprimieron tres factores: IL-2, IP10, MCP-1 (2/3 muestras), aunque no está claro por qué estos tres factores serían suprimidos por LPS. Tenga en cuenta que las citocinas derivadas de células T en general no se activaron; Las células B también pueden haber contribuido a la expresión inducida por LPS. Cuando se estimula con 1 ng/ml de LPS, Rfdd exhibió efectos inhibidores moderados sobre D1 PBMC, como se muestra en disminuciones de citocinas como IFN γ , IL-1 β , IL-1RA, IL-12 y TNF α . Se seleccionó PBMC de D1 para estudio adicional.

Se descongelaron PBMC D1 y se sembraron en placas de 96 pozos a una densidad de 1×10^5 células por pozo. Las células en placa se trataron luego con preparaciones de FFA de prueba ciegas (ver ejemplo 7) diluidas en serie a diluciones 1: 3 con una dosis más alta a aproximadamente 30 μ M, por duplicado. Para el contexto, el contenido típico de FFA total en sangre de $\sim 580 \mu$ M para personas normales después de un ayuno nocturno. A continuación, las células tratadas se estimularon con 1 ng/ml de LPS. Los pozos de control se establecieron con PBMC no tratadas que fueron estimuladas o no estimuladas con 1 ng/ml de LPS en presencia de vehículo (0,1 o 0,3% de DMSO). El sobrenadante libre de células se recogió 24 horas después del tratamiento y se analizó con el equipo Milliplex Map Kit A de citoquina/quimioquina/factor de crecimiento humano 38 plex (Millipore HCYTA-60KPX38) indicado anteriormente.

Con respecto a la inhibición, se consideró una dosis inhibidora a cualquier preparación que generara una señal inferior al 50% de la señal de control (estimulada con LPS, sin FFA añadido). Para analizar los datos en el contexto del contenido de FFA, se creó una escala simple de 0-5 para la

inhibición basada principalmente en los datos de 30 µM basada en los siguientes aspectos cualitativos: se utilizó 0 cuando no había inhibición o era mínima. La inhibición de IFN γ así como la inhibición de las citocinas de la serie IL-1 (IL 1 α , IL-1 β , IL-1RA) y las quimiocinas IP-10 y MCP-1 se consideraron bajas y se clasificaron de 1 a 2,5. Se dio una puntuación de 3 si también se inhibía el TNF α . Por encima de 3 se requirió la inhibición de algunas citocinas de células T. Se asignó el máximo de 5 si se inhibían todas las citocinas. Los resultados se muestran en el cuadro 10 (contenido de FA redondeado, 0 significa <0,5):

Cuadro 10. Citocinas estimuladas por LPS por inhibición <i>in vitro</i> mediante preparaciones de FFA 30 µM											
Prep	OA	LA	ALA	ETrA	ETA	EPA	DTA3	DPA3	DHA	Objetivos inhibidos	Escala inhibitoria (0-5)
Rfdd	21	6	13	0	1	17	-	3	11	IFN γ , series IL-1, IP-10 /MCP-1	2
BrJdd	29	6	14	1	5	1	5	28		IFN γ , series IL-1, IP-10 /MCP-1, y TNF	3
BN	12	7	0	2	11	-	1	62	0	nil	0
CXZ	1	0	-	0	-	-	-	96	-	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1, TNF α , citocinas de células T	4,5
CR	1	0	1	-	96	0	0	0	-	IFN γ , series IL-1, IP-10	2
CS	14	-	0	-	4	-	74	0	-	IFN γ , series IL-1, IP-10/ MCP-1, TNF	3,5
AP	60	-	0	0	3	-	30	0	-	nil	0
DHA fr 21-25	10	3	2	-	11	-	-	-	66	nil	0
BrJ	42	7	14	1	3	1	2	9	-	IFN γ , series IL-1, IP-10/ MCP-1, algunas citocinas de células T sin TNF	3,75

Cuadro 10. Citocinas estimuladas por LPS por inhibición <i>in vitro</i> mediante preparaciones de FFA 30 µM											
Prep	OA	LA	ALA	ETrA	ETA	EPA	DTA3	DPA3	DHA	Objetivos inhibidos	Escala inhibitoria (0-5)
HOS	74	14	0	-	-	-	-	-	-	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1, TNF α , Algunas citocinas de células T	4,0
BrJdd Flx HOS	36	8	16	1	4	1	3	20	-	IFN γ , series IL-1 parciales, IP10	1,5
BrJdd Flx HOS1	46	11	16	0	2	0	2	11	0	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1	2
B fr1 Flx HOS	24	10	14	1	7	1	1	38	-	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1	2,25
A fr 39-40 HOS	73	9	0	-	1	-	7	0	-	IFN γ , series IL-1 parciales, IP-10	1,5
A fr 19-20 HOS	35	5	0	-	-	-	50	0	0	IFN γ , series IL-1 parciales, MIP1a	1,5
Syn DPA	-	-	-	-	-	-	-	99	0	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1, TNF α , algunas citocinas de células T	4,0
SynD HOS	23	5	-	-	-	-	0	67	0	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1, TNF α , algunas citocinas de células T	4,0
Syn ETA	-	-	-	-	99	-	-	-	-	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1, TNF α , citocinas de células T	4,75

Cuadro 10. Citocinas estimuladas por LPS por inhibición <i>in vitro</i> mediante preparaciones de FFA 30 µM											
Prep	OA	LA	ALA	ETrA	ETA	EPA	DTA3	DPA3	DHA	Objetivos inhibidos	Escala inhibitoria (0-5)
Syn DE HOS	20	3	-	-	6	-	0	67	0	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1, algunas citocinas de células T, algo de TNF	3,8
Syn DE HOS1	12	2	-	-	10	-	0	72	0	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1, algunas citocinas de células T, sin TNF	3,5
Syn DE HOS2	14	2	-	-	17	-	0	63	0	IFN γ , series IL-1, IP-10/MCP-1, TNF α , citocinas de células T	5,0

En términos generales, algunas preparaciones de FFA mostraron un fuerte efecto inhibidor a la dosis de 30 µM (> 50% de reducción en comparación con el control estimulado por LPS) en más de la mitad de los analitos: fracciones combinadas con alto contenido de B. juncea DPAn-3 (~ 95,8 % DPAn-3); ETA sintético; y SynDEHOS2 (DPA y EPA sintéticos con ácido oleico).

Algunos de los compuestos tenían fuertes efectos inhibidores. El IFN γ fue inhibido universalmente por todas las preparaciones de FFA, al menos débilmente. Otros tipos de inhibición mínima tendían a incluir las citocinas IL-1 α , IL-1 β e IL-1RA (serie IL-1) o las quimiocinas IP-10 y MIP-1. La más potente de las formulaciones inhibidoras también suprimió las citocinas de células T clásicas como IL2 7, IL-13, IL-15 e IL-22. Las preparaciones más inhibidoras también inhibieron el TNF α , que podría considerarse un marcador representativo de una fuerte inhibición. En este estudio preliminar, pareció que al menos una preparación de DPA derivada de DPA Juncea (~ 96% de DPAn-3 de la serie C de técnicas descritas aquí) era más inhibidora que el DPA

sintético análogo. En general, las preparaciones que contienen una mayor cantidad de DPAn 3, DTAn-3 o ETA tuvieron actividad inhibidora en este ensayo. ETA, DTAn-3 y DPAn-3 mostraron una actividad inhibidora significativa cuando estaban presentes como componente principal en la preparación. Sorprendentemente, las combinaciones de DPAn-3 y ETA fueron inhibidores eficaces de citocinas inflamatorias en este ensayo.

También se observó actividad inmunomoduladora para las preparaciones de FFA proporcionadas a aproximadamente 10 μ M. Más específicamente, una señal estimulante se categorizó como una señal por encima del 130% en comparación con el control estimulado con LPS (sin FFA agregado), y una señal inhibidora se categorizó como una señal por debajo del 70% en comparación con la estimulada con LPS (sin FFA agregado). A 10 μ M, las siguientes preparaciones mostraron únicamente respuestas estimulantes (ver el contenido de FFA en el cuadro 8): BrJdd, BN, Bfr1FlxHOS y Rfdd. A 10 μ M, las siguientes preparaciones mostraron respuestas inhibitorias: CR (IFN γ , IL-12 (p40), solo IP-10), AP (IL-12 (p40), solo IL-17F), DHAfr21 25 (IL12 (p40), IL-17F solamente), HOS (sustancial) y SynDEHOS1 (seis citocinas). A 10 μ M, las siguientes preparaciones mostraron respuestas tanto estimulantes como inhibidoras: CXZ, CS, BrJddFlxHOS, BrJddFlxHOS1, Afr39-40HOS, Afr19-20HOS, SynDPA, SynDHOS, SynETA, SynDEHOS y SynDEHOS2.

Además, con respecto a la estimulación, en general, la única citoquina que se incrementó de manera consistente con la preparación 30 μ M fue GM-CSF (en formulaciones 15/21 más del 150% en comparación con el control).

Aunque las modalidades anteriores se han descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo con fines de claridad y comprensión, será claro para un experto en la técnica

que ciertos cambios y modificaciones pueden practicarse dentro del alcance de la invención que está limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

La lista o discusión de un documento aparentemente publicado anteriormente en esta especificación no debe tomarse necesariamente como un reconocimiento de que el documento es parte del estado de la técnica o es de conocimiento general común.