

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
6 de Octubre de 2005 (06.10.2005)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2005/092354 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: A61K 35/78,
A61P 9/10

E-41012 SEVILLA (ES). SÁNCHEZ PERONA, Javier [ES/ES]; INSTITUTO DE LA GRASA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, Avda. Padre Garcia Tejero, 4, E-41012 SEVILLA (ES).

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2005/070036

(22) Fecha de presentación internacional:
23 de Marzo de 2005 (23.03.2005)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P200400755 26 de Marzo de 2004 (26.03.2004) ES

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección nacional admisible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS [ES/ES]; C/ SERRANO, 117, E-28006 MADRID (ES). UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA [ES/ES]; C/ Baltasar Gracián, 1 (entresuelo), E-50005 ZARAGOZA (ES). OSADA GARCÍA, Jesus de la [ES/ES]; Universidad de Zaragoza, Dpto. Bioquímica y Biología Molecular y Celular, C/ Pedro Cerbuna, 12, E-50009 ZARAGOZA (ES).

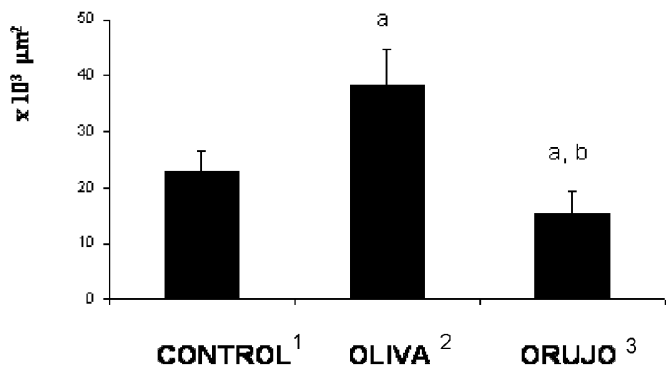
(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa, para toda clase de protección regional admisible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventores; e
(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): RUIZ GUTIERREZ, Valentina [ES/ES]; INSTITUTO DE LA GRASA, CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS, Avda. Padre Garcia Tejero, 4,

Publicada:
— con informe de búsqueda internacional
Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: USE OF REFINED, CENTRIFUGED POMACE OIL AS AN ATHEROSCLEROSIS INHIBITOR

(54) Título: UTILIZACIÓN DE ACEITE DE ORUJO DE CENTRIFUGACIÓN REFINADO COMO RETARDADOR DE LA ATHEROSCLEROSIS



1 CONTROL
2 OLIVE
3 POMACE

(57) Abstract: The invention relates to the nutritional/pharmacological use of refined, centrifuged pomace oil. More specifically, the invention outlines the effect of refined, centrifuged pomace oil on atherosclerotic lesion development, in order for said oil to be considered as a functional food since it has health properties that extend beyond its nutritional function and is a natural foodstuff that is intended to improve the status of populations at risk of atherosclerosis.

(57) Resumen: El objeto de la invención es la aplicación nutricional-farmacológica del aceite de orujo de oliva de centrifugación refinado. Se describe la influencia del aceite de orujo de centrifugación refinado sobre el desarrollo de la lesión arteriosclerótica, para considerar a este aceite como alimento funcional ya que presenta unas propiedades sanitarias más allá de su función

nutricional al ser un alimento natural destinado a mejorar el estado de poblaciones con riesgo de aterosclerosis.

WO 2005/092354 A1

TITULO**UTILIZACIÓN DE ACEITE DE ORUJO DE CENTRIFUGACIÓN REFINADO
COMO RETARDADOR DE LA ATROSCLEROSIS****5 OBJETO DE LA INVENCION**

El objeto de la invención es la aplicación nutricional-farmacológica del aceite de orujo de oliva de centrifugación refinado. Se describe la influencia del aceite de orujo de centrifugación refinado sobre el desarrollo de la lesión arteriosclerótica, para considerar a este aceite como alimento funcional ya que
10 presenta unas propiedades sanitarias más allá de su función nutricional al ser un alimento natural destinado a mejorar el estado de poblaciones con riesgo de aterosclerosis.

ESTADO DE LA TÉCNICA

15 El aceite de orujo de oliva es el que se obtiene a partir de los residuos de las aceitunas, una vez extraído el aceite de oliva virgen por presión. Mediante métodos mecánicos es posible separar el aceite de oliva virgen de las otras fases de la pasta de aceitunas, tanto líquida (alpechín) como sólidas (orujo). El orujo contiene todo el aceite no extraído por la centrifugación, denominándose
20 alperujo. Tradicionalmente, este aceite ha sido siempre recuperado mediante el empleo de hexano. Se obtiene así un aceite de orujo de oliva crudo, que posteriormente se refina, obteniéndose aceite de orujo de oliva refinado que se puede consumir encabezado con aceite de oliva virgen.

En la patente de invención publicada como ES 2 048 667 (Oleícola El Tejar) se
25 da a conocer un procedimiento para la extracción de aceite de orujo de oliva sin utilización de disolventes orgánicos, denominado de 2ª centrifugación ó de repaso [J.Alba Mendoza, F.Hidalgo Casado, Mª A. Ruíz Gómez, F. Martinez Roman, Mª J. Moyano Pérez, A. Cert Ventulá, Mª C. Pérez-Camino y Mª V.Ruiz-Méndez."Características de los aceites de oliva de primera y segunda
30 centrifugación" Grasas y aceites, 47. 163-181 (1996)]. Ciertos aceites obtenidos mediante dicho procedimiento, denominados "de segunda

centrifugación" ó "repaso", una vez refinados, presentan las siguientes características:

- Acidez: $\leq 0,3$
 - Indice de peróxidos (meq. O₂/Kg) max: ≤ 5
 - 5 Restos de disolventes (mg/Kg) = 0,0
 - Alcoholes alifáticos (mg/Kg): ≥ 1000
 - Ceras (mg/kg): 3000-6000
 - Acidos grasos saturados en sn-2: $\leq 2,0\%$
 - Tocoferoles totales (mg/kg): ≥ 200
 - 10 Eritrodiol+uvaol (mg/Kg): ≥ 200
 - Esteroles totales (mg/Kg): ≥ 1600
 - Ácido oleanólico (mg/Kg): ≥ 50
 - Ácido maslínico (mg/Kg): ≥ 100
- 15 Un aceite de orujo de estas características es el que se ha empleado en la presente invención.

EXPLICACIÓN DE LA INVENCION

20 El objeto de la presente invención es la utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado en la preparación de un alimento funcional retardador de la aterosclerosis. Asimismo dicho aceite de orujo se puede emplear en la preparación de nutraceúticos o de fitofármacos con el mismo propósito e incluso en la preparación de un medicamento retardador de la aterosclerosis.

25 El aceite de orujo de centrifugación refinado se puede utilizar para dicho propósito tal cual se obtiene o bien encabezándolo con hasta un 5% de aceite de oliva virgen. Es igualmente posible el añadir al aceite de orujo de centrifugación refinado, encabezado o no con aceite de oliva virgen, cantidades complementarias de otros compuestos, en particular tocoferoles hasta llegar a una cantidad total de al menos 1000 mg de tocoferoles totales por cada Kg de
30 aceite y de ácido oleanólico hasta un total de 100 ppm

El efecto retardador de la aterosclerosis se manifiesta a través de la disminución de triglicéridos y de lipoproteínas VLDL y HDL en ratones carentes de apolipoproteína E y también a través de la disminución de leucocitos circulantes en sangre que expresan la integrina Mac-1 en esos mismos ratones.

5

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Fig 1. Perfil de lipoproteínas plasmático obtenido por FPLC en los ratones carentes de apo E con las diferentes dietas. Fracciones 4-8 corresponden a TRL, 9-17 a LDL y fracciones 18-24 a HDL.

10 **Fig 2. Porcentaje de leucocitos que expresan Mac-1 tras la administración de las diferentes dietas.** Mediante citometría de flujo, se calculó el porcentaje de leucocitos que expresaron la integrina Mac-1 (CD11b) tras la tinción con un anticuerpo monoclonal marcado con fluorescencia.

15 **Fig 3. Áreas de lesiones aórticas de los ratones carentes de apo E alimentados con las diferentes dietas.** Resultados son media \pm SEM de cada grupo. Los análisis estadísticos se efectuaron mediante la U de Mann-Whitney. ^{a,b}, $p < 0.05$ vs control y oliva, respectivamente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

20 El objeto de la presente invención es la utilización del aceite de orujo de centrifugación refinado como retardador de la aterosclerosis, por tanto como alimento funcional según la recomendación de la European Commission Concerted Action on Functional Food Science in Europe (FUFOSE), quien en la actualidad pretende definir y caracterizar los alimentos funcionales como

25 alimentos que consumidos en cantidades normales en la dieta habitual tienen efectos beneficiosos para la salud. En este sentido, el aceite de orujo de centrifugación refinado es un alimento natural, obtenido en condiciones en las que no se añade ni quita ningún componente mediante medios tecnológicos o biológicos, diferente del que contenga en su extracción natural y que posee

30 propiedades que ayudan a disminuir el riesgo de padecer arteriosclerosis. Se define como "Cardiorujo de oliva" al aceite referido anteriormente a la vista de

los resultados obtenidos en ratones transgénicos, concretamente ratones carentes de la apolipoproteína E (apo E knock-out).

Animales empleados

5 La tecnología transgénica ha generado una serie de ratones muy útiles para el estudio de la hiperlipidemia y de la arteriosclerosis que se añaden a las ventajas que poseen estos modelos animales tales como la economía en su mantenimiento, ya que requieren pequeñas cantidades tanto de alimento como de agentes de ensayo. Adicionales ventajas son su fácil reproducción en un
10 corto periodo de tiempo y la disponibilidad de razas puras con fenotipos heredables perfectamente conocidos.

Trabajando con estos animales se está delimitando la influencia de componentes ambientales y genéticos en el desarrollo del proceso arteriosclerótico, más concretamente en los procesos celulares y moleculares
15 que intervienen en el mismo. Ha sido precisamente la generación de ratones modificados genéticamente que presentan lesiones vasculares complejas lo que ha permitido disponer de un sistema de referencia para evaluar la progresión o el retraso de la enfermedad vascular en presencia de diferentes proteínas o agentes ambientales (Functional Food Science in Europe. (1998). British Journal
20 of Nutrition, 80(1):S1-S193). Estos ratones, sin los cuales todo este progreso sería imposible, son los ratones carentes de la apolipoproteína E (apo E knock-out). Además, en ellos se ha desarrollado una estandarizada metodología para evaluar el grado de lesión que permite cuantificar exactamente la contribución de un agente (Osada J, Joven J, Maeda N. The value of apolipoprotein E
25 knockout mice for studying the effects of dietary fat and cholesterol on atherogenesis. Curr. Opin. Lipidol. 2000;11(1):25-9).

Los ratones carentes de la apolipoproteína E, alimentados con una dieta comercial estándar baja en grasa (4%) y con un 0.01% (p/p) de colesterol, muestran unos niveles de colesterol de 500 mg/dl, mientras que los animales
30 sanos, en las mismas condiciones, se mantienen en 75 mg/dl (Knowles JW, Maeda N. Genetic modifiers of atherosclerosis in mice. Arterioscler Thromb Vasc

Biol 2000;20(11):2336-2345 y Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aaltosetala K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe Hypercholesterolemia and Atherosclerosis in Apolipoprotein-E-Deficient Mice Created by Homologous Recombination in ES Cells. Cell 1992;71(2):343-353). Esta elevación de los niveles de colesterol plasmático se debe principalmente al aumento del colesterol transportado por las VLDL, IDL y LDL. El ratón deficiente en apo E, con una dieta normal, desarrolla una extensa aterosclerosis fibroproliferativa espontánea (Zhang SH, Reddick RL, Piedrahita JA, Maeda N. Spontaneous Hypercholesterolemia and Arterial Lesions in Mice Lacking Apolipoprotein-E. Science 1992;258(5081):468-471 y Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. Apo E-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. Arterioscler Thromb 1994;14:133-140) . Un análisis cronológico de esta aterosclerosis muestra la misma secuencia de formación de la lesión que la ya establecida en otros modelos animales y en el hombre. Las lesiones se extienden por el entramado arterial, formándose en primer lugar en la base de la aorta y en las arterias coronarias proximales, para continuar luego a lo largo de toda la aorta, con una predisposición especial en los puntos de ramificación de los vasos mayores: las arterias carótidas, las intercostales, las mesentéricas, las renales y las iliacas.

20 Con estos animales se estudiará la influencia sobre el desarrollo de la lesión arteriosclerótica del aceite de orujo de centrifugación refinado.

Aceite empleado

A continuación se definen las características del insaponificable del aceite empleado procedente de Oleícola El Tejar de la campaña 2002-2003:

- Acidez: 0.1
- Índice de peróxidos (meq. O₂/kg) max: ≤5
- Restos de disolventes (mg/kg) 0,00
- Ceras (mg/kg): 3484
- Alcoholes alifáticos (mg/kg): 3117
- Ácidos grasos saturados en sn-2: 2,0%

6

Tocoferoles totales (mg/kg): 468

- α -tocoferol (mg/kg): 386- β -tocoferol (mg/kg): 38- γ -tocoferol (mg/kg): 44

5 Eritrodiol+uvaol (mg/kg): 507

Esteroles totales (mg/Kg): 2245

Ácido oleanólico (mg/kg): 59

Ácido maslínico (mg/kg): 107

10 Saponificable del aceite:

COMPOSICIÓN DE ACIDOS GRASOS POR CROMATOGRAFÍA GASEOSA

Laúrico C.12.....	ND	Linolénico C. 18:3.....	0,70
Mirístico C.14.....	0,02	Aráquico C.20.....	0,45
Palmitico C.16.....	10,29	Gadoleico C.20:1.....	0,33
15 Palmitoleico C.16:1.....	0,76	Behénico C.22:1.....	0,17
Estearico C.18.....	2,95	Erúxico c.22:1.....	ND
Oleico C.18:1.....	74,27	Lignocérico C.24.....	0.07
Linoleico C.18:2.....	8,07		

20 **MODO DE REALIZACIÓN DE LA INVENCION****Animales**

Se utilizaron ratones machos híbridos de C57BL/6J y 129Ola carentes de apo E homocigotos descendientes de los generados por Piedrahita y cols. (Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. Proc Natl Acad Sci USA 1992;89:4471-4475) y se mantuvieron en la Unidad Mixta de Investigación de Zaragoza, España. A 26 animales de dos meses de edad se les puso en ayuno durante 18 horas. Se les anestesió con isofluorano y se obtuvo su sangre por punción retroorbital para la determinación de colesterol plasmático. Se dividieron al azar en tres grupos de idéntico nivel de colesterol y se mantuvieron en jaulas estériles provistas de filtro en habitaciones con ciclos de 12 horas de luz y las mismas de oscuridad.

Los animales tuvieron libre acceso al agua y a la comida. El pienso fue suministrado por Harlan Teklad (Harlan Ibérica, Barcelona). Se hizo un seguimiento del peso de los animales a lo largo del estudio y ninguno de los animales murió durante el estudio. El protocolo fue aprobado por el Comité
5 ético para la experimentación animal de la Universidad de Zaragoza.

Dietas

Los tres grupos recibieron: a) la dieta del ratón para el grupo control, b) la dieta del ratón suplementada con un 10% (p/p) de aceite de oliva virgen de reciente preparación y c) la dieta del ratón enriquecida con un 10% (p/p) de
10 aceite de orujo. Las dietas se prepararon semanalmente y se almacenaron en atmósfera de N₂ a 20°C. Las dietas se suministraron durante 11 semanas y fueron bien toleradas.

15 Análisis de moléculas de adhesión en células sanguíneas

Tras 10 semanas de la dieta, Se tomaron muestras retroorbitales de los animales previamente ayunados y anestesiados con isoflurano. Aproximadamente 1×10^6 leucocitos, se resuspendieron en PBS que contenía 0.1 % (w/v) BSA y 10 mmol/l azida sódica. En ellos se estudió la expresión de
20 Mac-1 (CD11b) por citometría de flujo. Los datos se expresan como porcentaje de células marcadas positivamente.

Análisis de lípidos y lipoproteínas

Finalizado el periodo experimental los animales fueron sacrificados con una
25 inyección de avertina (Aldrich Chemical Co., Madrid, España) y se obtuvo la sangre por punción cardiaca. Las concentraciones plasmáticas de colesterol total y de triglicéridos se midieron enzimáticamente en placas de microensayo usando kits de Sigma Chemical Co. (Madrid, España) y Boehringer Mannheim GMBH (Barcelona, España). Como control de calidad del proceso se utilizó
30 cardiolipid (Sigma). Para un análisis más detallado de los perfiles lipoproteicos, una mezcla de 100 µl de plasma de los animales de cada grupo se sometió a

cromatografía líquida de filtración por gel en una columna de Superosa 6B (Pharmacia LKB Biotechnology, Barcelona, España) de acuerdo con las condiciones descritas por Calleja y cols (Low-cholesterol and high-fat diets reduce atherosclerotic lesion development in ApoE-knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999;19(10):2368-2375). Se recogieron fracciones de 0.5 ml y se midió el colesterol total como se ha descrito anteriormente.

Evaluación de la lesión aterosclerótica

El corazón y el sistema circulatorio arterial se perfundió con tampón fosfato formalina (4% pH 7.4 Panreac, Barcelona, España) a presión fisiológica. Los corazones y las aortas fueron diseccionados, limpiados y almacenados en formaldehído neutro. La zona de las aurículas y la base de la aorta se extrajeron para su análisis y se transfirieron a un tubo con OCT (Bayer Diagnostic, Germany) donde se mantuvieron 24 horas para eliminar burbujas.

Los corazones se situaron sobre la base de un criostato (Microm HM505E, Barcelona España) con OCT nuevo. Se recogieron cortes seriados de la aorta proximal y del seno aórtico, se tiñeron con Sudan IV B (Sigma Chemical Company), y un tinte de contraste con hematoxilina y eosina (Sigma Chemical Company). La evaluación morfométrica se realizó según el método de Paigen y cols. (Quantitative assessment of atherosclerotic lesions in mice. *Atherosclerosis* 1987;68:231-240) tomando el tamaño medio de la lesión de las cuatro secciones, que comprenden desde la región proximal aórtica hasta el seno aórtico que contenía las tres válvulas completas. Las lesiones fueron capturadas utilizando un microscopio Canon con una videocámara conectada a un ordenador. La cuantificación de la lesión aterosclerótica y el perímetro de los vasos se realizaron con el software NIH Image.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados con el programa Instat para Windows (GraphPad). La mayoría de los parámetros en este estudio no siguen una distribución normal de acuerdo con el test de Shapiro-Wilk. Así pues, para el análisis estadístico se

realizó el test de la U Mann-Whitney para los datos no apareados. Las diferencias se consideraron no significativas cuando $P > 0.05$. La asociación entre variables se realizó por el cálculo del coeficiente de correlación de Spearman.

5 RESULTADOS

Efecto de las diferentes dietas sobre los parámetros somáticos y plasmáticos.

Después de 11 semanas de administración de las dietas, no se observaron cambios en el peso corporal en los diferentes grupos (Tabla I). Tampoco se observaron cambios en el peso del hígado por el enriquecimiento graso de las dietas. Tal como se muestra en la tabla, el colesterol plasmático no experimentó variaciones significativas en ninguna de las intervenciones dietéticas, en concordancia con resultados previos al aportar el contenido de grasa del 10% a estos animales. Ni el colesterol transportado en HDL, ni los triglicéridos plasmáticos aparecieron afectados en el grupo de aceite de oliva y si aparecieron disminuidos en el grupo de animales alimentados con el aceite de orujo.

Tabla I. Efecto de las dietas experimentales en ratón carente de ApoE

	Control (n= 9)	Oliva (n= 9)	Orujo (n= 8)
Variación peso corporal (g)	3,4 ± 1,4	4,4 ± 0,8	4,0 ± 1,0
Peso hígado (g)	0,78 ± 0,08	0,79 ± 0,15	0,76 ± 0,08
Colesterol plasmático (mmol.l ⁻¹)	15,5 ± 2,4	17,4 ± 2,4	16,1 ± 3,8
Colesterol en HDL (mmol.l ⁻¹)	0,8 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,3 ± 0,1 †*
Triglicéridos plasmáticos (mmol.l ⁻¹)	1,7 ± 0,4	2,4 ± 1,4	1,1 ± 0,4 †*

Los resultados se expresan como medias ± SD. Las dietas fueron proporcionadas durante 11 semanas. El análisis estadístico se refleja como † P = 0.01, ‡ P = 0.05 vs control, * P=0.05 vs oliva.

La distribución del colesterol plasmático entre las diferentes lipoproteínas plasmáticas fue analizado por cromatografía líquida en una columna de Superose 6B y se muestra en la figura 1. El grupo que recibió el aceite de oliva presentó mayores niveles de lipoproteínas LDL en tanto que el grupo que recibió el aceite de orujo presentó menores niveles de lipoproteínas VLDL y HDL en consonancia con la disminución de triglicéridos (principalmente transportados en VLDL) y el descenso de HDL verificado por el método de precipitación que se presentó en la tabla I. Estos resultados indican que los componentes que diferencian a ambos aceites poseen suficiente potencia para cambiar el comportamiento de los parámetros lipídicos en estos animales.

Efecto de las diferentes dietas sobre el porcentaje de leucocitos activados y potencialmente reclutables a través de la integrina Mac-1.

Se analizó el porcentaje de leucocitos circulantes en sangre que expresan Mac-1 para ver la activación de estas células. Debido a que esta integrina permite la interacción de los monocitos circulantes con las moléculas ICAM-1 y 2 del endotelio y así su migración a los focos ateroscleróticos, es una diana importante en el desarrollo de la arteriosclerosis. En la figura 2 se muestra el porcentaje de leucocitos que expresan Mac-1 en los grupos de ratones que consumieron las dietas control, enriquecida en oliva o en orujo. Tal como se aprecia el último grupo presentó los valores más bajos de células potencialmente reclutables comparados con las otras dos dietas.

Efecto de las diferentes dietas sobre el desarrollo de la lesión aterosclerótica.

En la figura 3 se muestran los valores cuantitativos de las lesiones ateroscleróticas en los animales tras el consumo de las diferentes dietas. Los animales cuya dieta estuvo enriquecida en el aceite de oliva presentaron mayores valores de lesión que el grupo control. En contraste, el grupo que recibió el aceite de orujo presentó valores significativamente más bajos que los animales alimentados con las otras dos dietas.

Estos resultados globalmente indican que los componentes presentes en el aceite de orujo ensayado tienen suficiente potencia para disminuir el desarrollo de la aterosclerosis en los ratones deficientes en la apolipoproteína E y que en este proceso están implicados procesos celulares tales como la activación de

5 Mac-1 en leucocitos circulantes junto con cambios de triglicéridos circulantes y en menor proporción de lipoproteínas de alta densidad, puesto que el perfil de este último parámetro (descenso de colesterol en HDL) observado para el

10 aceite de orujo fue hallado de características negativas. El aceite de orujo fue perfectamente tolerado por todos los animales y no tuvo repercusiones de sobrepeso, ni aumento de masa hepática en las dosis administradas.

Reivindicaciones

- 1.- Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado caracterizado porque se emplea en la preparación de un alimento funcional retardador de la aterosclerosis.
5
- 2.- Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado en la preparación de un alimento funcional retardador de la aterosclerosis según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho efecto retardador de la aterosclerosis se manifiesta a través de la disminución de triglicéridos y de lipoproteínas VLDL y HDL en ratones carentes de apolipoproteína E.
10
- 3.- Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado en la preparación de un alimento funcional retardador de la aterosclerosis según la reivindicación 1, caracterizado porque dicho efecto retardador de la aterosclerosis se manifiesta a través de la disminución de leucocitos circulantes en sangre que expresan la integrina Mac-1 en ratones carentes de apolipoproteína E.
15
- 4.- Utilización de aceite de orujo de centrifugación refiando caracterizado porque se emplea en la preparación de nutraceúticos retardadores de la aterosclerosis.
20
- 5.- Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado caracterizado porque se emplea en la preparación de fitofármacos retardadores de la aterosclerosis.
25
- 6.- Utilización de aceite de orujo de centrifugación refinado caracterizado porque se emplea en la preparación de medicamentos retardadores de la aterosclerosis.

1/3

Figura 1

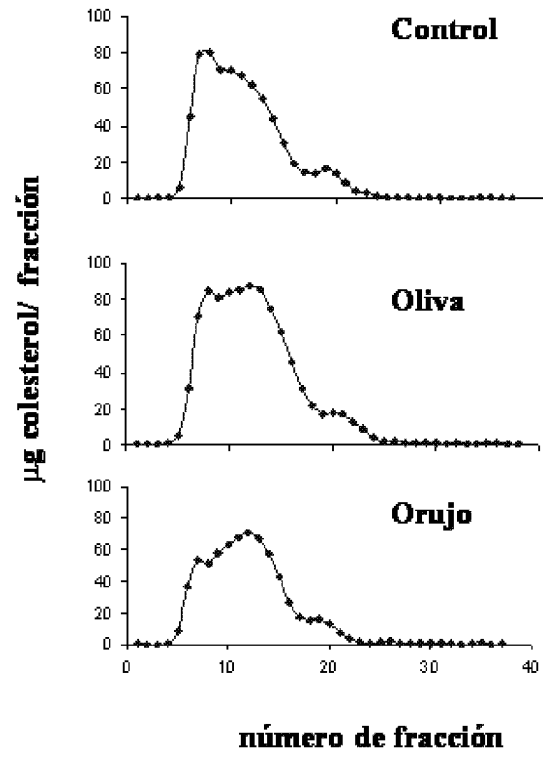
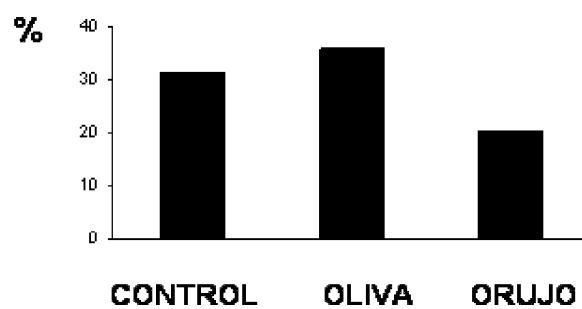
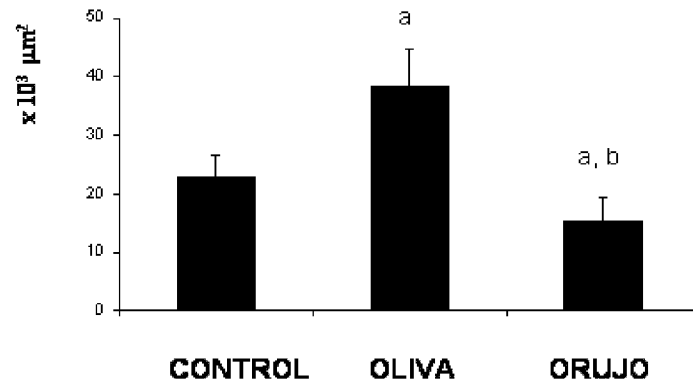


Figura-2



3/3

Figura 3



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/ ES 2005/070036

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 A61K35/78, A61P9/10		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	COVAS, M.I. et al.: "Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation", Int. J. Clin. Pharm. Res. (2000) vol. XX (3/4), pp.: 49-54, the whole document, in particular, the abstract	1-6
A	WO 2004/005237 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS y UNIVERSIDAD DE SEVILLA) 15.01.2004, the abstract	1-6
A	MANGIAPANE, E.H. et al.: "Modulation of the regression of atherosclerosis in the hamster by dietary lipids: comparison of coconut oil and olive oil", British J. Nutr. (1999), vol. 82, pp.: 401-409, the whole document	1-6
A	COVAS, M.I. et al.: "Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans", Drugs Exptl. Clin. Res. (2003) vol. XXIX (5/6), pp.: 203-206, the whole document	1-6
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 30 May 2005 (30.05.05)		Date of mailing of the international search report 07 June 2005 (07.05.05)
Name and mailing address of the ISA/ S.P.T.O.		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional nº
PCT/ ES 2005/070036

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ A61K35/78, A61P9/10

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)

CIP⁷ A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, BIOSIS, CA

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones nº
A	COVAS, M.I. et al.: "Virgin olive oil phenolic compounds: binding to human low density lipoprotein (LDL) and effect on LDL oxidation", Int. J. Clin. Pharm. Res. (2000) vol. XX (3/4), pp.: 49-54, todo el documento, en particular, resumen	1-6
A	WO 2004/005237 A1 (CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS y UNIVERSIDAD DE SEVILLA) 15.01.2004, resumen	1-6
A	MANGIAPANE, E.H. et al.: "Modulation of the regression of atherosclerosis in the hamster by dietary lipids: comparison of coconut oil and olive oil", British J. Nutr. (1999), vol. 82, pp.: 401-409, todo el documento	1-6
A	COVAS, M.I. et al.: "Bioavailability of tyrosol, an antioxidant phenolic compound present in wine and olive oil, in humans", Drugs Exptl. Clin. Res. (2003) vol. XXIX (5/6), pp.: 203-206, todo el documento	1-6

En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:	"T" documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.
"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.	"X" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.
"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.	"Y" documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.
"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).	"&" documento que forma parte de la misma familia de patentes.
"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.	
"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.	

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

30.Mayo.2005 (30.05.2005)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

- 7 JUN 2005 - 7. 06. 2005

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

A. Maquedano Herrero

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

Nº de fax 34 91 3495304

Nº de teléfono + 34 91 3495474

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2005/070036

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2004005237 A1	15.01.2004	AU 2003244661 A1	23.01.2004
