

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 286 999**

51 Int. Cl.:

A23L 33/115 (2006.01)

A61K 31/20 (2006.01)

A61K 31/23 (2006.01)

A23K 20/158 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA
TRAS OPOSICIÓN

T5

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.03.2000 PCT/JP2000/01355**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.09.2000 WO0051444**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.03.2000 E 00906735 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea modificada tras oposición: **13.07.2016 EP 1166652**

54 Título: **Utilización de un material que contiene ácido docosapentaenoico**

30 Prioridad:

04.03.1999 JP 5776999

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente modificada:
17.11.2016

73 Titular/es:

**SUNTORY HOLDINGS LIMITED (100.0%)
1-40 Dojimahama 2-chome Kita-ku
Osaka-shi, Osaka 530-8203, JP**

72 Inventor/es:

**IGARASHI, OSAMU;
AKIMOTO, KENGO;
YAGUCHI, TOSHIKI y
KISO, YOSHINOBU**

74 Agente/Representante:

URÍZAR ANASAGASTI, José Antonio

DESCRIPCIÓN

CAMPO TÉCNICO

5 [0001] La presente invención se refiere al uso de un material que contiene ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico (en lo adelante, también referido como "DPA") para el alivio de las condiciones deficientes en ácido araquidónico y el mantenimiento de un buen balance de ácidos grasos *in vivo* y especialmente se refiere al uso de un material que contiene ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico para prevenir la disminución de los niveles de ácido araquidónico causados por la toma de ácidos grasos insaturados ω 3.

10

ANTECEDENTES DE LA TÉCNICA

[0002] Las dos familias representativas de ácidos grasos insaturados son el tipo ω 3 y el tipo ω 6. Aquí, ω indica el número de átomos de carbono en un ácido graso, contando desde el terminal metilo hasta el doble enlace más cercano. Recientemente, la relación de ácidos grasos insaturados ω 6 en relación con los ácidos grasos insaturados del tipo ω 3 ha sido reconocida como importante.

15

[0003] Varios ácidos grasos incluyendo los ácidos grasos del tipo ω 6, como ácido linoleico, ácido dihomo- γ -linoleico, y ácido araquidónico, y los ácidos grasos del tipo ω 3, como el ácido α -linoleico, ácido eicosapentaenoico, y ácido docosahexaenoico, son cada uno conocidos por tomar lugar en diferentes funciones biológicas. Al mismo tiempo, e importantemente, estos dos tipos de ácidos grasos insaturados influyen fuertemente uno a otro en sus funciones biológicas. En los humanos, estos ácidos grasos insaturados no pueden ser sintetizados biológicamente *in vivo*, y ambos tipos no se convierte uno en el otro. Así, es esperado que la relación de los ácidos grasos insaturados ω 3 al ω 6 *in vivo* refleje la relación en la fuente de toma (ej. alimento).

20

25

[0004] Mientras tanto, basado en una investigación de nutrición entre japoneses, la relación de toma recomendada de los ácidos grasos insaturados ω 6 a los ácidos grasos insaturados ω 3 fue aproximadamente de 4:1, de acuerdo al permiso de dieta revisado en 1994 para japoneses. (Ministry of Health & Welfare, 5^{ta} edición revisada, Nihonjin No Eiyo no Shoyoryo (Permiso Dietario para los Japoneses), 1994, pp. 56-58.)

30

[0005] Además, los hábitos de comida actuales de los japoneses han sido influenciados por la dieta de los países occidentales conduciendo a un incremento señalado en alimentos centrados en carne, y un incremento en la toma de ácidos grasos insaturados ω 6 en comparación al tipo ω 3. Consecuentemente, la relación de mortalidad debido a enfermedades de aterosclerosis, como el infarto de miocardio y trombosis cerebral está incrementando rápidamente. Para mejorar esta condición, ha sido desarrollada la adición de ácidos grasos insaturados ω 3 altamente concentrados, como el 5,8,11,14,17-ácido eicosapentaenoico (en lo adelante, también referido como "EPA") y 4,7,10,13,16,19-ácido docosahexaenoico (en lo adelante referido como "DHA") a un alimento suplementado con nutriente.

35

[0006] Los eicosanoides (prostaglandina, leucotrieno, tromboxano, etc.), cada uno exhibiendo diferentes funciones biológicas, son biosintetizados a partir del EPA en el caso de los ácidos grasos insaturados ω 3 y a partir del ácido dihomo- γ -linoleico y el ácido araquidónico en el caso de los ácidos grasos insaturados ω 6. Además, los ácidos grasos insaturados ω 6 y del tipo ω 3, ellos mismos, suprimen la vía de biosíntesis de ácidos grasos de otro tipo. Por ejemplo, la

40

toma de EPA inhibe la $\Delta 6$ - desaturasa que controla la conversión de ácido linoleico, el ácido graso de iniciación en la biosíntesis de ácidos grasos del tipo $\omega 6$, a ácido γ -linoleico, la enzima de la cadena de elongación que controla la conversión de ácido γ -linoleico a ácido dihomo- γ -linoleico, y la $\Delta 5$ -desaturasa que controla la conversión del ácido dihomo- γ -linoleico a ácido araquidónico. Consecuentemente, la cantidad del producto final, el ácido araquidónico (en lo adelante, también referido como "ARA"), disminuye significativamente. La toma de los ácidos grasos precursores del ARA (como, ácido linoleico, y ácido γ -linoleico) es solo ligeramente efectiva para suplementar esta disminución de ARA, y se afirmó que era necesaria una toma directa de ARA.

[0007] Además, en años recientes, la elucidación de las funciones biológicamente activas del DHA y su uso práctico han progresado debido al descubrimiento de material de pescado que contiene concentraciones altas de DHA, como la grasa orbital de atún, y avances tecnológicos que producen ácidos grasos altamente purificados. Ha parecido aparente que el efecto de la disminución de los niveles de colesterol, el efecto anticoagulante, y el efecto carcinostático son funciones biológicamente activas del DHA. En relación al sistema metabólico del cerebro, ha sido también aparente que el DHA es eficaz en mejorar la memoria y el aprendizaje, prevenir la demencia senil, y en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Además, ha sido aprobado que el DHA es un ácido graso esencial para el crecimiento de alevines. De las razones anteriormente mencionadas, el DHA es usado en varios alimentos, materias primas de alimentos, y piensos. El DHA también inhibe la vía de biosíntesis que involucra los ácidos grasos insaturados $\omega 6$, conduciendo al ARA, y es conocido que esta inhibición es más fuerte que para el EPA. Así, un declive en los niveles de ARA como un efecto secundario debido a la administración sólo de DHA es considerado un problema

[0008] La administración sólo de DHA es fuertemente un problema si los ácidos grasos insaturados $\omega 3$ son sólo administrados por un período limitado a un paciente particular como un medicamento, o si la administración de suplementos de DHA a niveles disminuidos o a una deficiencia completa de ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Sin embargo, el balance entre los ácidos grasos del tipo $\omega 3$ y $\omega 6$ debe ser considerado cuando los ácidos grasos insaturados $\omega 3$ son tomados para prevenir enfermedades. En el pasado, la toma directa de ARA era necesaria para reprimir la disminución de los niveles de ARA debido a la toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Sin embargo, el control de la cantidad de la toma de ARA es difícil debido a que el ARA es el precursor directo de los eicosanoides, como la prostaglandina de la serie-2 y el leucotrieno de la serie-4.

[0009] Las condiciones deficientes en ARA no están limitadas a aquellas causadas por la toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Por ejemplo, entre infantes, ancianos, pacientes con enfermedades adultas, y aquellas con riesgo de enfermedades adultas como las enfermedades hepáticas, la vía de biosíntesis para producir ARA a partir del ácido linoleico está debilitada, y claramente, el ARA *in vivo* tiende a ser deficiente. En condiciones de enfermedad, la prostaglandina y su precursor, el ARA, están en alta demanda para la defensa central y los mecanismos de reparación *in vivo*. Por ello, los pacientes enfermos sufren de deficiencias de ARA que puede incidir en la recuperación y a la supervivencia. Con indiferencia de la edad, una nutrición inadecuada conduce a condiciones deficientes en ARA. Además, el ARA a veces deficiente en individuos en los cuales la toma de grasa está restringida (por ejemplo, debido a la hiperlipidemia, diabetes, obesidad y demás).

[0010] Consecuentemente, estuvieron en alta demanda las técnicas para mejorar las condiciones deficientes en ARA y para mantener un buen balance de ácidos grasos *in vivo*, y especialmente técnicas que proveen alternativas más

seguras para una toma directa de ARA en esfuerzos para prevenir la disminución de los niveles de ARA causados por la toma de ácidos grasos insaturados ω 3.

5 [0011] El documento WO 98/03671 revela un proceso para la preparación de lípidos los cuales contienen ácido docosapentaenoico (DPA). El proceso incluye los pasos del cultivo en un medio de un microorganismo que pertenece al género *Ulkenia* teniendo la habilidad para producir DHA y/o DPA y la recuperación de lípidos a partir del cultivo. El proceso puede además incluir, el paso de separación de DHA y/o DPA de los lípidos. El DHA y/o DPA, así como los lípidos que contienen DHA y/o DPA obtenidos como se describió con anterioridad pueden ser adicionados a varios alimentos, materias primas de alimentos, o piensos para contrarrestar una deficiencia de DHA y/o DPA. El ARA y el AIIA
10 están revelados como importantes para el crecimiento de los infantes, la ganancia de tamaño y el desarrollo cerebral, así como en la posible prevención de la demencia senil y la enfermedad de Alzheimer.

[0012] US- A-5444.54 manifiesta un producto de líquido nutricional para el mejoramiento del estado nutricional y revertir la diarrea característica y la inflamación en un mamífero que tiene colitis ulcerativa o inflamación del colon el cual
15 contiene en combinación (a) una mezcla de aceite que contiene ácido eicosapentaenoico (20:5n3) y/o ácido docosahexaenoico (22:6n3), y (b) una fuente de carbohidrato no digerible, el cual es metabolizado a ácidos grasos de cadena corta por microorganismos presentes en el colon humano.

[0013] La presente invención pretende resolver los problemas anteriormente mencionados y proporciona una técnica
20 novedosa para mejorar las condiciones deficientes en ácido araquidónico y para mantener un buen balance *in vivo* de ácidos grasos, y especialmente, una técnica novedosa para prevenir la disminución de ácido araquidónico causados por la toma de ácidos grasos insaturados ω 3.

[0014] Después de una investigación intensiva para lograr los objetos anteriormente mencionados, los presentes
25 inventores encontraron que el ácido docosapentaenoico del tipo omega 6 (ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico, en lo adelante, referido también como "DPA") es convertido a ácido araquidónico (ARA) *in vivo* en condiciones deficientes en ARA, y especialmente en condiciones deficientes en ARA causadas por la toma de ácidos grasos insaturados ω 3. Los inventores también se encontraron que el incremento resultante en los niveles de ARA puede afectar el balance de ácidos grasos *in vivo* conduciendo a un mantenimiento de un buen balance de ácidos grasos.
30

[0015] En un aspecto de la invención se refiere al uso de un material que contiene ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico (DPA) en la fabricación de una composición para el alivio de las condiciones deficientes en ácido araquidónico y el mantenimiento de un buen balance de ácidos grasos en mamíferos.

35 [0016] En otro aspecto la invención se relaciona al uso de un material que contiene DPA en la fabricación de una composición para prevenir la disminución de los niveles de ácido araquidónico causados por la toma de ácidos grasos insaturados ω 3.

[0017] Un aspecto adicional de la invención proporciona un método para la producción de una composición que
40 previene la disminución de los niveles de ácido araquidónico causados por la toma de ácidos grasos insaturados ω 3, que comprende:

preparar una dosis unitaria de dicha composición que comprende un material que contiene DPA basado en un promedio de toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ determinado durante un período de tiempo establecido en un sujeto y una estimación del decremento de los niveles de ácido araquidónico por la toma de dichos ácidos grasos $\omega 3$ en el sujeto.

5

[0018] Alternativamente, la invención proporciona un método para la producción de una composición que previene la disminución de los niveles de ácido araquidónico por la toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$, que comprende:

10

preparar una dosis unitaria de dicha composición que comprende un material que contiene DPA y un material que contiene ácidos grasos insaturados $\omega 3$ basada en una estimación de los niveles de ácido araquidónico causados por la toma de una cantidad predeterminada de ácidos grasos insaturados $\omega 3$, en donde la cantidad predeterminada de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ es una cantidad de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ a incluir por dosis unitaria en dicha composición.

15

[0019] La invención también proporciona un lípido que contiene ácido araquidónico (ARA), DPA, y DHA, en el cual:

ARA/DHA (relación en peso) es 0,03-0,4;

DPA/DHA (relación en peso) es no menor que 0,07; y

EPA/DHA (relación en peso) es no mayor que 0,03

20

[0020] La invención se refiere además a alimentos suplementados con nutrientes y alimento para animales como se define en las reivindicaciones acompañantes ej.; aditivos alimentarios, medicamentos, aditivo para medicamentos, alimentos o pienso. Este alimento suplementado con nutrientes puede ser una fórmula adecuada para alimentar niños, una fórmula adecuada para la alimentación de niños prematuros, alimentos para bebés, alimentos para madres expectantes o madres que amamantan, alimentos geriátricos, o alimentos para pacientes enfermos.

25

[0021] La aplicación de la presente invención con respecto a condiciones deficientes en ARA proporciona un incremento significativo de los niveles de ARA, y permite un mantenimiento de un buen equilibrio de ácidos grasos en mamíferos, por ejemplo, en el hígado y/o suero.

30

[0022] El material que contiene DPA puede ser cualquiera o más de lípidos que contienen DPA seleccionados entre el grupo que consta de alquil-ésteres inferiores de DPA y ésteres de glicerol que contienen DPA como material componente. Este material que contiene DPA puede ser derivado a partir de microorganismos. Los microorganismos pueden ser seleccionados del grupo que consta del género *Thraustochytrium*, el género *Schizochytrium*, el género *Japonochytrium*, y el género *Ulkenia*.

35

[0023] El material que contiene DPA y el material que contiene ácidos grasos insaturados $\omega 3$ pueden ser lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Además, la cantidad total de ácidos grasos en la composición antes mencionada puede contener 0,1% o más de DPA; 0,1% o más de DPA y 0,1% o más de 4,7,10,13,16,19-ácido docosahexaenoico (DHA); y 0,1% o más de DPA y 20% o menos de 5,8,11,14,17-ácido eicosapentaenoico (EPA).

40

[0024] Los antes mencionados lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$ pueden contener como componentes uno o más compuestos seleccionados entre el grupo que consta de alquil-ésteres inferiores de DPA, alquil-ésteres inferiores de ácidos grasos insaturados $\omega 3$, así como ésteres de glicerol que contienen DPA y/o ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Especialmente, los antes mencionados lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$ pueden contener como componentes, ya sea etil-éster de DPA y etil-éster de ácidos grasos insaturados $\omega 3$, o triglicéridos conteniendo DPA y/o ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Los lípidos antes mencionados pueden ser una mezcla de lípidos obtenidos cultivando un tipo de microorganismo o una mezcla de lípidos que pueden ser obtenidos cultivando separadamente varios microorganismos. Cualquiera de los lípidos antes mencionados puede contener ésteres de glicerol que incluyen ARA, DPA, y/o DHA como componentes, específicamente puede contener triglicéridos que incluyen ARA, DPA, y/o DHA como componentes.

[0025] La posibilidad de que el DPA puede convertirse a ARA a través de conversión inversa ha sido informada previamente ((*FEBS Letters*, **431**: 1-6 (1998); *Biochim. Biophys. Acta.* **137**: 420-426 (1967); *Biochim. Biophys. Acta.* **218**: 29-35 (1970); *J.Nutrition.* **83**: 234-238 (1964)).). Sin embargo, estos informes sólo revelan la conversión de DPA a ARA que ocurre cuando el DPA es administrado a una rata criada con una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales con lo que sus niveles de ARA están excesivamente disminuidos en los tejidos. Aún con experimentos en administración a animales normales, el informe solo reveló la conversión de DPA a ARA que ocurre en los testículos cuando los niveles de DPA están especialmente elevados. La conversión reportada previamente de DPA a ARA está limitada a cambios en animales que fueron criados con condiciones especiales, como con una dieta deficiente en ácidos grasos esenciales o cambios que ocurrieron durante un corto período dentro de tejidos especializados. No se aclaró si la administración de DPA por un largo período de tiempo como alimento en condiciones generales nutricionales incrementa significativamente los niveles disminuidos de ARA en el hígado, suero, y análogos, para mantener un buen balance de ácidos grasos. Además, no ha habido previamente indicación de que el DPA reprima niveles disminuidos de ARA causados por toma de ácidos grasos insaturados omega 3.

[0026] Realizaciones de la Invención se describen con mayor detalle a continuación.

(Utilización de un material que contiene DPA para aliviar las condiciones deficientes en ARA y mantener un buen equilibrio de ácidos grasos *in vivo*)

[0027] La invención describe el uso de un material que contiene DPA para incrementar niveles deficientes en ARA en mamíferos y para mantener un buen balance de ácidos grasos. Composiciones teniendo esta utilidad comprenden un material que contiene DPA en una cantidad efectiva para aliviar las condiciones deficientes en ARA y mantener un buen balance de ácidos grasos en mamíferos, por dosis unitaria.

[0028] En esta descripción "material que contiene DPA" significa un material que contiene DPA en cualquier forma química o física apropiada para la toma fisiológica de DPA *in vivo*. Ejemplos de un material que contiene DPA además de DPA libre son las sales inorgánicas de DPA (por ejemplo, sales de metal no tóxicas incluyendo sales de metales alcalinos, como sal de sodio, y sal de potasio; y sales de metales alcalino-térreos como sal de calcio y sal de magnesio), sales orgánicas (por ejemplo, sal de amonio), derivados diferentes de lípidos que contienen DPA (por ejemplo, una amida de DPA y sus formas alquil sustituidas), y lípidos que contienen DPA (también referidos

simplemente como "lípidos que contienen DPA"). Lípido que contiene DPA es el material que contiene DPA preferido en un sentido de su estabilidad física, bioabsorción y su forma principal constructiva *in vivo*.

[0029] En esta descripción "lípido" se refiere a un material que es soluble en solventes orgánicos, como en éter, cloroformo, y benceno, pero insoluble en agua, y tiene un enlace químico intramolecular, representado por, por ejemplo, un enlace éster, formado entre un ácido graso superior. Ejemplos de lípidos que contienen DPA son los alquil-ésteres inferiores de DPA y los ésteres de glicerol que contienen DPA como sus componentes.

[0030] En esta descripción "alquil-ésteres inferiores de DPA" se refiere a ésteres formados entre DPA y alcoholes inferiores de 1~6 carbonos, preferiblemente 1~4 carbonos, y más preferiblemente 1~3 carbonos. El etil-éster es especialmente preferible por bioaceptabilidad y seguridad del alcohol que se disocia con la hidrólisis del enlace éster *in vivo*. "Ésteres de glicerol que contienen DPA" o "ésteres de glicerol que contienen DPA como su componente" se refiere a materiales en donde al menos una molécula de DPA forma un enlace éster por molécula de glicerol. Dichos ejemplos incluyen monoacilglicérido, diacilglicérido, triacilglicérido, glicerofosfolípido, etc. Considerando la aplicación para alimentación, el triacilglicérido (también llamado simplemente "triglicérido") es preferido desde el punto de vista de formas comestibles de grasa.

[0031] Como es claro para un experto en la técnica, los lípidos que contienen DPA no están limitados a los ejemplos antes mencionados, sino que también incluyen esfingofosfolípidos y otros fosfolípidos, esfingoglicolípidos y otros glicolípidos, y cualquier material que contiene DPA incluido en la definición anterior.

[0032] Los componentes por dosis unitaria, y la cantidad de material que contiene DPA incluido por dosis unitaria para un alivio eficaz de las condiciones deficientes en ARA y el mantenimiento de un buen balance de ácidos grasos en mamíferos, pueden ser ajustados a niveles adecuados por un experto en la técnica de acuerdo al tipo, sexo, edad, peso, condición de salud, o la enfermedad del sujeto (humanos u otros mamíferos). "Eficaz para aliviar condiciones deficientes en ARA y mantener un buen balance de ácidos grasos en mamíferos" significa que la toma de material que contiene DPA causa un incremento significativo de los niveles de ARA, lo cual es suficiente para restaurar niveles disminuidos de ARA a niveles normales y para mantener un nivel normal de ARA en mamíferos. La presencia o ausencia del incremento en los niveles de ARA en mamíferos puede ser medida por cualquiera de los métodos bioquímicos conocidos y/o métodos químico-analíticos conocidos por un experto en la técnica. Como un ejemplo no limitante, con el fin de aliviar las condiciones deficientes de ARA y para mantener un buen balance de ácidos grasos *in vivo* en humanos adultos, composiciones que comprendan un material que contiene DPA para una administración única por día deben contener 0,0001mg -100g, preferiblemente 0,001mg-10g, y más preferiblemente 0,5mg-5g de DPA libre por dosis unitaria.

[0033] La utilización de un material que contiene DPA de esta invención, y la administración de composiciones que comprendan un material que contenga DPA puede excluir la utilización y administración llevado a cabo de acuerdo a la prescripción médica por un doctor en medicina en casos en donde la ley de patentes aplicada a aplicaciones hechas por esta descripción incluye dichas limitaciones. Por lo tanto, la práctica del método para aliviar condiciones deficientes en ARA y mantener un buen equilibrio de ácidos grasos en mamíferos, incluyendo el proceso de administración de las composiciones anteriormente mencionadas puede estar limitada a mamíferos no humanos.

(Utilización de un material que contiene DPA para prevenir la disminución de niveles de ARA)

[0034] El material que contiene DPA puede ser utilizado, especialmente para prevenir la disminución de los niveles de ARA, causados por la toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Composiciones efectivas contengan un material que contiene DPA en una cantidad efectiva para prevenir la disminución de los niveles causados por la toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$, por dosis unitaria. Aquí, "eficaz para prevenir la disminución de los niveles de ARA" significa disminuir suficiente a significativamente la magnitud del decremento de los niveles de ARA, o preferiblemente, suficiente para llevar el ARA a un nivel que es el mismo que cuando no se consumen ácidos grasos insaturados $\omega 3$.

[0035] El método para producir composiciones que eviten la disminución de niveles de ARA debido a la toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ comprende dos formas. Una es cuando la fuente de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ existe separadamente de esta composición, y la otra es cuando la fuente de la toma de ácidos grasos insaturado $\omega 3$ está combinada dentro de esta composición.

[0036] En el primer caso, primero, se identifica el promedio de toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ durante un período de tiempo dado para un sujeto que consume ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Basado en la toma promedio identificada, se estima la disminución de los niveles de ARA debido a la toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ por el sujeto. En el caso último, primero se identifica el contenido de ácidos grasos insaturado $\omega 3$ por dosis unitaria a incluir dentro de la composición. Esto puede determinarse dependiendo en el uso principal pretendido de los ácidos grasos insaturados $\omega 3$ (por ejemplo DHA y/o EPA). Después, se estima el decremento de los niveles de ARA en un sujeto causado por la toma de una cantidad predeterminada de ácidos grasos insaturados $\omega 3$. En cualquier caso, de acuerdo al nivel estimado de disminución, se determina la cantidad de DPA efectiva para prevenir la disminución de los niveles de ARA. Los procedimientos específicos necesarios para el proceso antes mencionado pueden ser entendidos fácilmente por los expertos en la técnica, y pueden ser llevados a cabo apropiadamente de acuerdo al sujeto individual y al material que contiene DPA. Así, puede ser preparada una dosis unitaria de composición que comprende una cantidad efectiva de material que contiene DPA y opcionalmente, un material que contiene ácido graso insaturado $\omega 3$.

[0037] En la composición anterior, un material que contiene DPA y un material que contiene ácido graso insaturado $\omega 3$ son preferiblemente lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$. Ejemplos de lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$ son una mezcla de alquil-ésteres inferiores de DPA, alquil-ésteres inferiores de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ y ésteres de glicerol que contienen DPA y/o ácidos grasos insaturados $\omega 3$ como componentes. Lípidos que contienen ácidos grasos insaturados $\omega 3$ son preferiblemente DHA y/o EPA. En un ejemplo, la composición puede estar caracterizada por contenido de DPA no menor que 0,1%, preferiblemente no menor que 1,0%, o más preferiblemente no menor que 3,5% respecto a la cantidad total de ácido graso dentro de la composición. En otro ejemplo, la composición puede estar caracterizada por un contenido de DPA no menor que 0,1%, preferiblemente no menor que 1,0%, y más preferiblemente no menor que 3,5% y un contenido de DHA no menor que 0,1%, preferiblemente no menor que 1,0%, y más preferiblemente no menor que 5,0% respecto a la cantidad total de ácidos grasos dentro de la composición. En otro ejemplo más, la composición puede estar caracterizada por un contenido de DPA no menor que 0,1%, preferiblemente no menor que 1,0%, y más preferiblemente no menor que 3,5% y un contenido de DHA no menor que 0,1%, preferiblemente no menor que 1,0%, y más preferiblemente no menor que 5,0% y un contenido de EPA de no más del 20%, preferiblemente, no mayor que 5,0%, y más preferiblemente mayor que 1,0% con respecto a la cantidad total de ácidos grasos dentro de la composición.

[0038] La administración directa de ARA es un método simple para prevenir la disminución de los niveles de ARA en mamíferos sin embargo, incluso si la administración tiene en cuenta la cantidad biológicamente requerida, dicha cantidad varía entre individuos y puede, por lo tanto, en algunos casos, causar una toma excesiva. El ARA es el precursor directo de los eicosanoides. En contraste, en esta invención el cuerpo suministra ARA cuando es necesario, esto es, respondiendo a la disminución de los niveles de ARA, a través de retroconversión del DPA administrado, y cuando el nivel de ARA retorna al valor normal, la retroconversión se detiene. Los niveles normales de ARA varían entre los tejidos sin embargo, la retroconversión del DPA es regulada para llegar al valor normal en cada uno de los tejidos. Cuando la retroconversión el DPA a ARA se detiene, el sobrante de DPA quedará. Sin embargo, ya que el DPA no es el precursor directo de eicosanoides, y ya que no tiene el efecto de incrementar el ARA a un nivel que sea mayor que el necesario, éste será acumulado en mamíferos como una fuente eficaz de ARA, y por ende, el efecto sobre el cuerpo es indirecto y más leve que la administración directa de ARA.

(Alimentos/Medicamentos que comprenden material que contiene DPA)

[0039] Cualquiera de las composiciones anteriormente mencionadas de esta invención no está limitada en particular respecto a su modo de uso. Modos representativos de uso incluyen alimentos, aditivos alimentarios, medicamentos, aditivos para medicamentos, piensos y cebos.

[0040] Ejemplos de composiciones de alimentos, además de los alimentos generales, son los alimentos funcionales, alimentos suplementados con nutrientes, fórmulas adecuadas para alimentar infantes o infantes prematuros, alimentos para bebés, alimentos para madres expectantes o madres que amamantan, y alimentos geriátricos. Ejemplos de alimentos que contienen aceites y grasa incluyen alimentos naturales, los cuales por naturaleza contienen aceites y grasa como carne, pescado, y nuez, alimentos para los cual los aceites y grasa son adicionados al cocinarlos como sopa, alimento para los cuales los aceites y grasas son usados como medios de calentamiento, como las masas de bollos, aceites y grasa como la mantequilla, alimento procesado para el cual los aceites y la grasa son adicionados durante el procesamiento como galletas, o alimento para el cual los aceites y grasas son rociados o aplicados después del completar el procesamiento como las galletas duras. Más aun, los lípidos de esta invención pueden también ser adicionados a un alimento agrícola, alimentos fermentados, alimentos para ganado, alimentos marinos, o bebidas, que normalmente no contienen aceites ni grasa. El aditivo alimentario es un término general para un producto intermedio que puede ser utilizado para preparar cualquiera de estos alimentos. La definición de alimento incluye alimentos funcionales. Los alimentos funcionales y medicamentos pueden proporcionarse en formas procesadas como, agentes internos para la promoción de la nutrición, polvo, gránulo, tableta, solución interna, suspensión, emulsión, sirope, cápsula, y análogos. Aditivos para medicamentos incluyen productos intermedios que pueden ser usados para preparar los medicamentos de elección. La composición de esta invención puede también ser utilizada como pienso para criar animales tales como animales domésticos, y alimento para la crianza de peces, marisco, crustáceos, y alevines.

(Preparación y purificación de un material que contiene DPA)

[0041] El material que contiene DPA de esta invención puede ser obtenido a partir de cualquiera de las fuentes sintéticas y naturales, por ejemplo, material que es químicamente sintetizado y material obtenido a partir de fuentes animales o vegetales. Ejemplos de fuentes animales o vegetales son el aceite de pescado, polvo de pescado, heces de

pescado, extracto de aceite de pescado y demás. Ejemplos de aceite de pescado son los aceites de sardina, arenque, atún, bonito, paparda, sábalo, y análogos.

[0042] Preferiblemente, el material que contiene DPA puede ser un lípido que contiene DPA derivado de células microbianas obtenidas por el cultivo de microorganismos que tienen la capacidad de producir DPA. Los lípidos que contiene DPA derivados de microorganismos pueden ser utilizados en una variedad de formas incluyendo las células microbianas mismas, extracto de lípido extraído de células bacterianas, lípidos purificados obtenidos por purificación ulterior del extracto de lípido, y lípidos alterados en los cuales el extracto de lípido o el extracto de lípido son además modificados mediante reacciones químicas (por ejemplo, esterificación).

[0043] Microorganismos pertenecientes a cualquiera de las categorías mostradas a continuación son ejemplos de microorganismos que tienen la capacidad de producir DPA:

género *Thraustochytrium*

género *Schizochytrium*

género *Japonochytrium*

género *Ulkenia*

género *Vibrio*

género *Cyclotella*

género *Emiliania*

género *Isochrysis*

género *Nanochloropsis*

género *Chaetoceros*

género *Phaeodactylum*

género *Amphidinium*

género *Gonyaulax*

género *Peridinium*

género *Chroomonas*

género *Cryptomonas*

género *Hemiselmis*

género *Chilomonas*

género *Chlorella*

género *Histiobanchus*

género *Coryphenoides*

género *Conidiobolus*

género *Entomorphophora*

[0044] Um microorganismo perteneciente a cualquiera de los géneros *Thraustochytrium*, género *Schizochytrium*, género *Japonochytrium*, género *Ulkenia*, género *Vibrio*, género *Cyclotella*, o género *Emiliania* es un microorganismo que puede producir DHA en alta proporción respecto a la cantidad total de ácidos grasos.

[0045] Ejemplos específicos de microorganismos mencionados anteriormente son los siguientes: bacteria aislada a partir de mar profundo, *Vibrio marinus* ATCC 15381; bacteria del género *Vibrio* aislada del intestino de un pez de fondo

- del mar; bacterias flageladas (como, *Thraustochytrium aureum* ATCC 34303; *Thraustochytrium* sp. ATCC 28211, ATCC 20890 y ATCC 20891; *Schizochytrium* sp. ATCC 20888 y ATCC 20889 (Patente de los EE.UU. No. 5.340.742); género *Thraustochytrium* SR21 (Nippon Nogei Kagaku Kaishi, vol. 69, extra edición, Julio 5, 1995; Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología número de acceso No. FERM BP-5034);
- 5 *Japonochoytrium* sp. ATCC 28207 (Japanese Laid-open(kokai) Publicación de la patente No. (JP-A) Hei 1-199588 (1989)); microalga (por ejemplo *Cyclotella cryptica*); y *Emiliana* sp. (JP-A) Hei 5-308976 (1993)). Estas cepas pueden ser obtenidas, por ejemplo, sin cualquier restricción a partir de la Colección Americana de Cultivos Tipo.
- 10 [0046] La cepa SAM 2180 y la cepa SAM 2179 pertenecientes al género *Ulkenia*, que fueron aisladas a partir de agua de mar por los presentes inventores, pueden también ser usadas favorablemente como microorganismos que tiene la habilidad para producir DPA. La cepa SAM 2179 fue depositada en el Instituto Nacional de Biociencia y Tecnología Humana, Agencia de Ciencia Industrial y Tecnología (dirección; 1-3, Higashi 1 chome, Tsukuba-shi, Ibaraki-ken, JAPÓN), y asignada un número de acceso No. FERM BP-5601.
- 15 [0047] Microorganismos capaces de producir DPA pueden ser cultivados siguiendo métodos estándares. Por ejemplo, el cultivo puede ser llevado a cabo inoculando un medio sólido o líquido con la cepa microbiana en un bucle, en esporas, en micelio o como un precultivo. Mediante el cultivo, los lípidos que contienen DPA permanecen almacenados dentro de las células microbianas.
- 20 [0048] Después del cultivo, las células microbianas cultivadas son recolectadas del cultivo mediante técnicas de separación líquido-sólidas convencionales como centrifugación y filtración. Las células cultivadas son extensivamente lavadas con agua y las células húmedas se recogen. Mediante el secado de estas células, son obtenidas células bacterianas secas. El secado de las células puede ser llevado a cabo por congelamiento seco, secado por aire y análogos. Dichas células húmedas o secas comprenden los lípidos que contiene DPA, y estas células pueden ser
- 25 usadas directamente para el propósito de esta invención. Preferiblemente, lípidos que contienen DPA son extraídos por extracción adicional de las células secas en una corriente de nitrógeno usando solventes orgánicos. El éter, metanol, etanol, cloroformo, diclorometano, petróleo-éter y análogos pueden ser usados como solventes orgánicos. Una extracción alternativa con metanol y éter de petróleo usando un solvente monofásico que consta en agua-metanol-cloroformo también puede proporcionar buenos resultados. La remoción de solvente orgánico a partir del extracto a
- 30 presión reducida rinde un extracto de lípidos que contiene DPA, el cual puede ser usado para el propósito de esta invención.
- [0049] Varios ácidos grasos altamente insaturados son incluidos como componentes de lípidos dentro del extracto de lípidos obtenido como se describió anteriormente. Es posible separar los lípidos de acuerdo a tipos diferentes sometiendo directamente el extracto de lípido a pasos de purificación apropiados (por ejemplo, cromatografía). Más
- 35 preferiblemente, la purificación es llevada a cabo después de la conversión de los ácidos grasos altamente insaturados en el extracto de lípidos a ésteres de alcoholes inferiores (por ejemplo, etil-éster de DPA, etil-éster de DHA, etil-éster de EPA, y demás. Dicha esterificación facilitará la separación del éster de DHA a un lípido que contiene DPA a partir de componentes del lípido que no contienen DPA. Esto también facilitará la separación de otros ácidos grasos como ácido
- 40 palmítico, ácido oleico, y análogos (éstos también serán esterificados durante la esterificación de ácidos grasos altamente insaturados) que pueden ser producidos durante el cultivo de los microorganismos.

[0050] La esterificación de ácidos grasos altamente insaturados pueden ser llevados a cabo usando condiciones conocidas. Por ejemplo, para obtener el etil-éster, los lípidos extraídos antes mencionados son preferiblemente tratados con reactivos como el HCl al 5~10%-solución de etanol anhidro, BF₃ al 10~50%-solución de etanol, y análogos por 1~24 horas a temperatura ambiente.

5

[0051] Para recoger el etil-éster de ácidos grasos altamente insaturado a partir de la solución anteriormente mencionada, es preferida la extracción mediante solventes orgánicos como el hexano, éter, y etil acetato. Con el secado de este extracto sobre los agentes de secado como el sulfato de sodio, el solvente orgánico es removido, preferiblemente a presión reducida, para proporcionar una mezcla que contiene ésteres ácidos grasos como su mayor componente. Esta mezcla también contiene una variedad de etil-ésteres ácidos grasos, además del etil-éster de DPA. Esta mezcla puede ser usada para el propósito de esta invención. Si es necesario, la cromatografía de columna, una baja temperatura de cristalización, adición de urea, y cromatografía líquido-líquido de distribución a contra corriente, y análogos, pueden ser usados solos o en combinación para aislar el etil-éster de DPA a partir de una mezcla. El etil-éster de DPA purificado obtenido puede ser usado favorablemente especialmente para el propósito de esta invención.

10

15

[0052] Con el fin de obtener un DPA libre del etil-éster de DPA purificado, el cual es aislado como se describe con anterioridad, el éster debe ser hidrolizado por un álcali, entonces extraído con solventes orgánicos como el éter, acetato de etilo y análogos. El DPA libre obtenido y su sal pueden ser usados para el propósito de esta invención. Para preparar el DPA libre por ninguna vía de sus derivados esterificados, el extracto de lípidos antes mencionado es sujeto de una hidrólisis alcalina en condiciones apropiadas (por ejemplo, en 5% de hidróxido de sodio a temperatura ambiente por 2-3 horas). De la solución de reacción de la hidrólisis, el DPA libre puede ser obtenido por la extracción de ácidos grasos siguiendo métodos de purificación estándares.

20

(Nuevos lípidos que contienen DPA)

25

[0053] Esta invención introduce nuevos lípidos que pueden ser utilizados favorablemente como lípidos que contienen DPA. Estos lípidos contienen ARA, DPA, y DHA (y opcionalmente EPA), y están caracterizados por la combinación de tres relaciones, ARA/DHA, DPA/DHA, y EPA/DHA (cada una expresada por su relación en peso). Típicamente la relación ARA/DHA es 0,03~0,4, preferiblemente 0,05~0,4, y más preferiblemente 0,1~0,4. Típicamente la relación DPA/DHA no es menor que 0,07, preferiblemente 0,07~5,0, más preferiblemente 0,07~3,0, e incluso más preferiblemente 0,07~0,5. La relación EPA/DHA es no mayor que 0,03%. En general, cuando los tres relaciones están dentro de este intervalo, la cantidad de DPA puede ser efectiva para prevenir la disminución de los niveles de ARA causados por la toma de ácidos grasos insaturados ω 3 (esto es, DHA, y cuando está presente, EPA).

30

35

[0054] Los lípidos anteriormente mencionados son preferiblemente lípidos que son obtenidos mediante el cultivo de un tipo de microorganismo (esto es, lípidos derivados a partir de células microbianas obtenidas por el cultivo de uno o más lotes de un cierto microorganismo), o una mezcla de lípidos obtenidos por el cultivo separadamente de muchos diferentes microorganismos (esto es, lípidos derivados a partir de células microbianas mediante el cultivo separadamente de uno o múltiples lotes de dos o más diferentes microorganismos). Los lípidos de esta invención pueden ser obtenidos mediante la combinación de lípidos que son obtenibles por el cultivo de microorganismos que pueden producir DPA y DHA mientras producen fuertemente cualquier EPA como el género *Thraustochytrium*, género *Schizochytrium*, género *Japonochytrium*, y el género *Ulkenia*, con lípidos obtenibles mediante el cultivo de

40

microorganismos que pueden producir ARA pero producen fuertemente cualquier EPA, como las especies *alpina*, *banieri*, *elongata*, *exigua*, *minutissima*, *verticilata*, *hygrophila*, *polycephla*, y *schmuckeri*, pertenecientes al subgénero *Mortierella* del género *Mortierella*. En este lípido, cada uno de los ARA, DPA, y DHA (y opcionalmente EPA) puede existir dentro del éster de glicerol y puede existir especialmente en triacilglicéridos.

5

[0055] Los nuevos lípidos anteriormente mencionados alivian las condiciones deficientes y mantiene un buen balance de ácidos grasos *in vivo*. O muestra el efecto de prevenir la disminución de los niveles de ARA. Al mismo tiempo ellos son útiles ya que contienen una cantidad relativamente pequeña de si mismos, el efecto fisiológico naturalmente fuerte del ARA hacia el cuerpo es fuertemente visto, y su efecto sobre el cuerpo es moderado. En concordancia, este lípido puede ser utilizado favorablemente como un componente de alimentos suplementados con nutrientes que incluye fórmula para la alimentación de infantes, fórmula para infantes prematuros, alimentos para bebés, alimentos para madres expectantes y madres que amamantan, alimentos geriátricos, y alimentos para pacientes enfermos en donde el enriquecimiento de ARA y DHA es deseado, y para alimentos de animales.

10

15 Ejemplos

[0056] En adelante, la presente invención será específicamente descrita por vía de ejemplos. Sin embargo, la invención no está limitada a estos ejemplos.

20 [Ejemplo 1]

[0057] Método para la producción de lípidos que contienen DPA y etil-éster de DPA usando microorganismos que tienen la capacidad para producir DPA.

25 [0058] La cepa SAM 2179 del género *Ulkenia* fue cultivada en las siguientes condiciones en un fermentador de 200L (fermentador del tipo vaso) que contenía 120L de medio teniendo la composición siguiente.

(1) Composición del medio:

- | | | |
|----|--------------------------------|-----|
| 30 | 1) Glucosa (g/L): | 60 |
| | 2) Fosfato de potasio (g/L): | 3 |
| | 3) Sulfato de amonio (g/L): | 2 |
| | 4) Cloruro de magnesio (g/L): | 1,3 |
| | 5) Sulfato de sodio (g/L): | 1 |
| 35 | 6) Cloruro de calcio (g/L): | 0,3 |
| | 7) Licor de maíz mojado (g/L): | 0,7 |
| | 8) pH: | 4,0 |

(2) Condición de Cultivo:

- | | | |
|----|------------------------------------|-----|
| 40 | 1) Temperatura del cultivo (°C): | 28 |
| | 2) Cantidad de aireación (vvm): | 0,5 |
| | 3) Velocidad de agitación (r.p.m): | 300 |

4) Ajuste de pH: mantenido a pH 4 con 10% (peso/volumen) de hidróxido de sodio y ácido sulfúrico 1M.

[0059] Después del cultivo, las células fueron recolectadas mediante centrifugación y secadas por congelación para preparar células secas. Como resultado, fueron recolectados 2,4 kg de células secas que contenían 58% de lípido, comprendiendo 12,1% de DPA con respecto a la cantidad total de ácidos grasos en el lípido.

[0060] Después, a partir de 2kg de las células secas obtenidas, los lípidos que contenían DPA fueron extraídos con hexano. Después de la remoción del solvente, el aceite extraído fue purificado a un grado adecuado para alimentos a través de pasos de purificación de aceite alimentario, desinfección, desadificación, despegamiento, y decoloración, para proporcionar 815 g de aceite purificado que contenía 12,8% de DPA con respecto a la cantidad total de ácidos grasos en el aceite purificado. Además una porción del aceite purificado fue convertido a etil-ésteres y una purificación a alta pureza fue realizada mediante cromatografía líquida de alta velocidad para proporcionar 10 g del etil-éster de DPA al 99%.

[Ejemplo 2]

Demostración de la disminución en los niveles de ARA causados por la toma de DHA.

[0061] 4 ratas Wistar machos de cuatro semanas de edad fueron inicialmente criadas durante una semana, y después divididas en dos grupos descritos a continuación.

- 1) Grupo control
Aceite de perilla : Aceite de azafrán = 7:3
- 2) Grupo del DH
Aceite de nabo: etil-éster de DHA = 3:2

[0062] Durante 4 semanas, las ratas fueron alimentadas con dietas experimentales preparadas por la mezcla del 5% de los aceites indicados para cada uno de los grupos hasta la alimentación basal. La tabla 1 muestra la composición de ácidos grasos de los aceites adicionados a cada uno de los grupos.

Tabla 1. Composición de ácidos grasos de los aceites adicionados a cada uno de los grupos (%).

	16:0	18:0	18:1(n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-3)	DPA (n-6)	DHA (n-3)
Grupo control	6.7	2.1	36.7	14.1	40.3	-	-
Grupo DHA	2.4	1.0	35.2	13.1	6.5	-	40.0
16:0, ácido palmítico; 18:0, ácido esteárico; 18:1 (n-9), ácido oleico; 18:2 (n-6), ácido linoleico; 18:3 (n-3), ácido α- linoleico							

[0063] Los hígados fueron extirpados de las ratas criadas de ambos grupos, y los lípidos fueron extraídos por el método de Folch y después de la conversión a metil-éster, fue analizado la cantidad de cada ácido graso mediante cromatografía de gas. La composición de ácidos grasos en los hígados de cada grupo es mostrada en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición de ácidos grasos en los hígados de cada grupo

	Grupo control	Grupo del DHA
16:0	28,7 ± 3,41	22, 6 ± 1,27***
18:1(n-9)	22,9 ± 5,80	23,0 ± 2,49
18:2(n-6)	25,1 ± 4,29	13,3 ± 1,96***
18:3 (n-3)	8,83 ± 1,75	1,03 ± 0,21***
20:3(n-6)	1,03 ± 0,35	0,78 ± 0,15
20:4(n-6)	24,1±2,75	6,18 ± 0,79***
20:5(n-3)	5,26 ± 1,20	10,5 ± 1,57***
22:5(n-6)	-	-
22:5(n-3)	2,98 ± 0,20	1,49 ± 0,35***
22:6(n-3)	9, 59 ± 0,83	24, 7 ± 2,23***

Los valores son mostrados como: media ± desviación estándar

18:0, ácido esteárico; 18:1 (n-9), ácido oleico; 18:2 (n-6), ácido linoleico; 18:3 (n-3), ácido α -linoleico; 20:3 (n-6), ácido dihomo- γ -linoleico; 20: 4 (n-6), ácido araquidónico; 20:5 (n-3), 5, 8, 11, 14, 17-ácido eicosapentaenoico; 22:5 (n-6), ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico; 22:5 (n-3), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico; 22: 6 (n-3), 4,7, 10, 13, 16, 19-ácido docosahexaenoico

*** Presencia de diferencia significativa comparada con el valor control, $P < 0,001$

[0064] El grupo control y el grupo DHA ambos contenían cantidades similares de ácido linoleico, el cual es el precursor del ARA. Con la administración de DHA, es confirmada una disminución significativa del ARA. Además, aunque la fracción de ácidos grasos insaturados $\omega 3$ presentes en los lípidos adicionados del grupo control y el grupo DHA son de 40,3% y 48,5%, respectivamente, y es fuertemente diferente, una disminución significativa de los niveles de ARA debido a la adición de DHA fue indicada.

[Ejemplo 3]

Efecto de la prevención de la disminución de los niveles de ARA, el cual es causado por la toma de DHA, a través de la toma de DPA (1)

[0065] 4 ratas Wistar machos de cuatro semanas de edad fueron inicialmente criadas durante una semana, y después divididas en dos grupos descritos a continuación.

1) Grupo control
Aceite de soja

2) Grupo DPA
Aceite purificado obtenido en el Ejemplo 1: aceite de oliva = 4:1

[0066] Durante 4 semanas, las ratas fueron alimentadas con dietas experimentales preparadas mezclando 5% de los aceites indicados para cada uno de los grupos a la alimentación basal. Las composiciones de ácidos grasos del aceite adicionado a cada grupo son mostrados en la Tabla 3.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos añadidos a cada grupo (%)

	16:0	18:0	18:1 (n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-3)	DPA (n-6)	DHA (n-3)
Grupo control	14,1	5,1	2,9	66,1	9,9	-	-
Grupo DHA	32,5	2,0	17,2	2,8	0,2	10,3	34,9

16:0, ácido palmítico; 18:0, ácido esteárico; 18:1 (n-9), ácido oleico; 18:2 (n-6), ácido linoleico; 18:3 (n-3), ácido α -linoleico

5

[0067] Los hígados fueron extirpados de las ratas criadas de ambos grupos, y los lípidos fueron extraídos por el método de Folch y después de la conversión a metil-éster, la cantidad de cada ácido graso fue analizado mediante cromatografía de gas. La composición de ácidos grasos en los hígados de cada grupo son indicados en la Tabla 4.

10 Tabla 4. Composición de ácidos grasos en los hígados de cada grupo (%).

	Grupo control	Grupo del DHA
16:0	37,9 $\pm$ 5,57	34,0 $\pm$ 2,66
18:0	25,1 $\pm$ 1,54	23,2 $\pm$ 1,12
18:1(n-9)	28,9 $\pm$ 3,97	19,3 $\pm$ 3,47
18:2(n-6)	30,1 $\pm$ 4,20	4,14 $\pm$ 0,50
18:3 (n-3)	1,56 $\pm$ 0,40	0,04 $\pm$ 0,06***
20:4(n-6)	29,9 $\pm$ 2,15	22,4 $\pm$ 1,60***
20:5(n-3)	-	3,94 $\pm$ 0,89***
22:5(n-6)	-	4,30 $\pm$ 0,76
22:6(n-3)	8,32 $\pm$ 1, 63	30,5 $\pm$ 4,28***

Los valores son mostrados como: media $\pm$ desviación estándar

16:0, ácido palmítico; 18:0 ácido esteárico; 18:1 (n-9), ácido oleico; 18:2 (n-6), ácido linoleico; 18:3 (n-3), Ácido α -linoleico; 20: 4 (n-6), ácido araquidónico; 20:5 (n-3), 5, 8, 11, 14, 17-ácido eicosapentaenoico; 22:5 (n-6), ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico; 22:5 (n-3), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico; 22: 6 (n-3), 4,7, 10, 13, 16, 19-ácido docosahexaenoico

15

*** Presencia de diferencia significativa comparada con el valor control, P<0,001

20

[0068] El grupo control (aceite de soja) de este ejemplo tiene una relación de ácidos grasos insaturados ω 3 con respecto a los ácidos grasos insaturados ω 6 que es semejante al relación de toma en condiciones vivientes normales. Comparado con el grupo de DHA del Ejemplo 2, el grupo DPA de este ejemplo fue capaz de prevenir la disminución de ARA, incluso aunque el contenido de DHA fue de 34,9%. Esto es, aunque un poco inferior, un valor de ARA cercano al grupo control de este ejemplo fue indicado. Este efecto fue claramente observado incluso cuando la cantidad de DPA fue menor que la cantidad absoluta de DHA.

25

[Ejemplo 4]

Efecto de la prevención de la disminución de los niveles de ARA, la cual es causada por la toma de DHA, a través de la toma (2).

5

[0069] 4 ratas Wistar machos de cuatro semanas de edad fueron inicialmente criadas durante una semana, y después divididas en 4 grupos descritos a continuación.

1) Ácido linoleico 15-grupo DPA 10 (LA15DPA10)

10

Aceite purificado obtenido en el Ejemplo 1: aceite de azafrán

2) Grupo Ácido linoleico 10-ácido araquidónico 5- DPA 10 (LA10AA5DPA10)

Aceite de nabo: etil-éster de ácido araquidónico: aceite purificado obtenido en el Ejemplo 1.

3) Ácido linoleico grupo 15 (LA15)

Aceite de nabo: etil-éster de DHA = 65:35

15

4) Ácido linoleico grupo 25 (LA25)

Aceite de nabo: aceite de soja = 1:1: etil-éster de DHA= 65:35

[0070] Durante 4 semanas, las ratas fueron alimentadas con dietas experimentales preparadas mediante la mezcla de 5% de los aceites indicados por cada uno de los grupos hasta la alimentación basal. Las composiciones de ácidos grasos de los aceites adicionados a cada uno de los grupos son mostrados en la Tabla 5. La cantidad de DHA fue mantenido cercanamente constante (30-35%) mientras que ácido linoleico tipo ω 6, el ARA, y el DPA fueron variados.

20

Tabla 5. Composición de ácidos grasos de estos aceites añadidos en cada uno de los grupos (%)

	16:0	18:0	18:1 (n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-3)	20:4 (n-6)	DPA (n-6)	DHA (n-3)
Grupo 1	31,41	1,95	3,85	16,88	-	-	10,19	35,72
Grupo 2	33,66	1,65	2,42	11,18	-	5,06	10,19	35,84
Grupo 3	3,76	1,83	42,11	15,95	5,88	-	-	30,47
Grupo 4	5,49	2,39	29, 0	26,4	6, 00	-	-	30,72

25

16:0, ácido palmítico; 18:0, ácido esteárico; 18:1 (n-9), ácido oleico; 18:2 (n-6), ácido linoleico; 18:3 (n-3), ácido α -linoleico; 20:4 (n-6), ácido araquidónico.

[0071] La sangre y los hígados fueron obtenidos de las ratas criadas de cada uno de los grupos y los lípidos fueron extraídos mediante el método de Folch y después de la conversión al metil-éster, la cantidad de ácidos grasos fue analizada mediante cromatografía de gas. La Tabla 6 muestra las composiciones de ácidos grasos en los hígados de cada uno de los grupos.

30

Tabla 6. Composición de ácidos grasos en los hígados de cada grupo (μmol/g)

	LA15DPA10	LA10AA5DPA10	LA15	LA25
18:0	25,0±2,15	24,2±4,18	24,1±1,37	24,8±1,19
18:1(n-9)	16,2±2,64	23,7±3,63	18,8±2,65	20,7±6,08
18:2(n-6)	13,0±1,75 a	11,0±3,44 a	13,5±2,02 a	20,2±1,74 b
18:3 (n-3)	0,05±0,11 a	0,20±0,06 a	0,99±0,44 b	1,19±0,17 b
20:4(n-6)	20,8±1,84 a	29,9±3,73 b	8,00±0,82 c	8,60±1,36 c
20:5(n-3)	2,16±0,62 a	1,97±0,70 a	6,05±1,54 b	4,27±0,64 c
22:5(n-6)	6,94±1,95	8,31±2,51	-	-
22:6(n-3)	44,9±8,38 ab	55,0±10,9 a	32,1±5,94 b	43,9±7,68 ab

Los valores son mostrados como: media ± desviación estándar

18:0 ácido esteárico; 18:1 (n-9), ácido oleico; 18:2 (n-6), ácido linoleico; 18:3 (n-3), Ácido α-linoleico; 20: 4 (n-6), ácido araquidónico; 20:5 (n-3), 5, 8, 11, 14, 17-ácido eicosapentaenoico; 22:5 (n-6), ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico; 22:5 (n-3), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico; 22: 6 (n-3), 4, 7, 10, 13, 16, 19-ácido docosahexaenoico

[0072] La presencia de una diferencia significativa entre los valores son indicados por letras diferentes, a, b, y c; P<0,05.

[0073] La Tabla 7 indica las composiciones de ácidos grasos en el suero de cada grupo.

Tabla 7. Composiciones de ácidos grasos en los sueros de cada grupo (μmol/g)

	LA15DPA10	LA10AA5DPA10	LA15	LA25
18:0	0,78±0,13 a	0,57±0,12 b	0,83±0,05 a	0,76±0,09 ab
18:1(n-9)	0,68±0,16 a	0,53±0,18 a3	1,36±0,07 b	1,16±0,99 b
18:2(n-6)	0,50±0,11 a	0,26±0,11 b	1,36±0,07 b	0,99±0,12 c
18:3 (n-3)	-	-	0,05±0,01	0,04±0,01
20:4(n-6)	1,63±0,53 a	1,30±0,27 a	0,51±0,04 b	0,50±0,09 b
20:5(n-3)	0,12±0,07 ab	0,05±0,04 a	0,37±0,01 b	0,26±0,13 b c
22:5(n-6)	0,14±0,05	0,11±0,05	-	-
22:6(n-3)	0,90±0,25 ab	0,63±0,22 a	1,14±0,35 b	1,16±0,14 b

Los valores son mostrados como: media ± desviación estándar

18:0 ácido esteárico; 18:1 (n-9), ácido oleico; 18:2 (n-6), ácido linoleico; 18:3 (n-3), Ácido α-linoleico; 20: 4 (n-6), ácido araquidónico; 20:5 (n-3), 5, 8, 11, 14, 17-ácido eicosapentaenoico; 22:5 (n-6), ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico; 22:5 (n-3), ácido 7,10,13,16,19-docosapentaenoico; 22: 6 (n-3), 4, 7, 10, 13, 16, 19-ácido docosahexaenoico

La presencia de una diferencia significativa entre los valores son indicados por letras diferentes, a, b, y c; P<0,05.

[0074] Los resultados en base a la composición de ácidos grasos en el hígado, descrita en la Tabla, muestra que los niveles de ARA disminuyeron significativamente en el grupo 3 (LA15) y el en el grupo 4(LA25), los cuales no fueron

suplementados con DPA, comparados con el grupo 1 (LA15DPA10) y el grupo 2 (LA10AA5DPA10), los cuales fueron suplementados con DPA. Incluso cuando fue dado un suplemento grande de ácido linoleico, el cual es el precursor del ARA, (al grupo 4), no pudo ser reprimida suficientemente una disminución de los niveles de ARA debido a la toma de DHA. La composición de ácidos grasos en el suero, mostrado en la Tabla 7, fue similar a los resultados de la composición de ácidos grasos obtenido para el hígado.

[Ejemplo 5]

Preparación de cápsulas conteniendo DPA

[0075] El agua fue adicionada a 100 partes de gelatina y 35 partes de aditivo alimentario de glicerol en peso. Y después de la disolución a 50-60°C, fue preparada la película de gelatina con una viscosidad de 20.000 cps. Después, fueron mezclados el 97% del aceite purificado obtenido en el Ejemplo 1 y el 3% de aceite de vitamina E para obtener el contenido. Usados estos materiales, fueron llevados a cabo la formación de la cápsula y el secado mediante procedimientos estándares para producir cápsulas blandas que contenían 180 mg de contenido por cápsula.

[Ejemplo 6]

Preparación de una mezcla de grasa y aceite conteniendo DPA, DHA y ARA

[0076] Una mezcla de grasa y aceite fue preparada mediante la mezcla del aceite purificado que contiene DPA, obtenido en el Ejemplo 1 con aceite purificado que contiene ARA, el cual fue purificado por procedimientos estándares a partir de un cultivo de *Mortella alpina* (4:1). La Tabla 8 muestra la composición de ácidos grasos de la mezcla de grasa y aceite obtenida.

Tabla 8. Composición de ácidos grasos de la mezcla de grasa y aceite que contiene DPA, DHA, y ARA (%).

16:0	18:0	18:1 (n-9)	18:2 (n-6)	18:3 (n-6)	20:3 (n-6)	ARA	EPA	DPA	DHA	22:0	24:0	Resi dual
30,1	2,3	1,5	2,3	0,5	0,8	8,1	0,1	10,2	36,6	0,5	1,0	6

[Ejemplo 7]

Preparación de cápsulas que contienen DPA, DHA, y ARA.

[0077] Una membrana de gelatina fue preparada usando el mismo método como en el Ejemplo 5. Después, el contenido fue preparado mediante la mezcla del 97% de la mezcla de grasa y aceite obtenida en el Ejemplo 7 y el 3% de vitamina E. La formación de la cápsula usando estos materiales y el secado llevado a cabo mediante procedimientos estándares proporcionó cápsulas blandas que contenían 180 mg de contenido por cápsula.

APLICABILIDAD INDUSTRIAL

- 5 [0078] El uso de un material que contiene DPA y composiciones de materiales que contienen DPA de esta invención facilita el alivio de las condiciones deficientes en ARA y el mantenimiento de un buen balance de ácidos grasos *in vivo*, y la prevención de la disminución de los niveles de ARA causados por la toma de ácidos grasos insaturados $\omega 3$. El DPA es convertido en ARA *in vivo*, y en contraste al ARA, no es el precursor de los eicosanoides. Por lo tanto, esto puede sustituir la administración directa de ARA y proporciona una técnica que tiene una más suave influencia sobre el cuerpo.

REIVINDICACIONES

1. Uso de material que contiene ácido 4,7,10,13,16-docosapentaenoico (DPA) en la fabricación de una composición para mitigar condiciones deficientes en ácido araquidónico y mantener un buen equilibrio de ácidos grasos en mamíferos.
2. El uso de la reivindicación 1, en donde dicho material que contiene DPA es uno o más de lípidos que contienen DPA seleccionados entre el grupo que consta de ésteres formados entre DPA y alcoholes inferiores con 1-6 carbonos.
3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en la fabricación de una composición en forma de un alimento, aditivo alimentario, aditivo para medicamento, pienso o cebo.
4. Uso de material que contiene DPA en la fabricación de una composición para prevenir la disminución de los niveles de ácido araquidónico causados por toma de ácidos grasos insaturados ω 3.
5. El uso de la reivindicación 4, en donde dicho material que contiene DPA es uno cualquiera o más de lípidos que contienen DPA seleccionados entre el grupo que consta de ésteres formados entre DPA y alcoholes inferiores con 1-6 carbonos.
6. El uso de la reivindicación 5, en donde dichos lípidos que contienen DPA son obtenidos a partir de microorganismos.
7. El uso de acuerdo a la reivindicación 6, en donde dichos microorganismos son seleccionados entre el grupo que consta del género *Thraustochytrium*, género *Schizochytrium*, género *Japonochytrium*, y el género *Ulkenia*.
8. Un método para la producción de una composición que previene el decremento de los niveles de ácido araquidónico causados por toma de ácidos grasos insaturados ω 3, que comprende:
 preparación de una dosis unitaria de dicha composición que contiene material que contiene DPA en base a una toma promedio de ácidos grasos insaturados ω 3 determinados durante un período de tiempo establecido en un sujeto y una estimación del decremento de los niveles de ácido araquidónico llevado a cabo por toma de dichos ácidos grasos ω 3 en el sujeto.
9. Un método para la producción de una composición que previene la disminución de los niveles de ácido araquidónico causados por la toma de ácidos grasos insaturados ω 3, que contiene:
 preparación de una dosis unitaria de dicha composición que contiene un material que contiene DPA y un material que contiene un ácido graso insaturado ω 3, en base a una estimación de los niveles de ácido araquidónico causados por la toma de una cantidad predeterminada de ácidos grasos insaturados ω 3, en la que la cantidad predeterminada de ácidos grasos insaturados ω 3 es una cantidad de ácidos grasos insaturados ω 3 a incluir por dosis unitaria en dicha composición.

10. El método de la reivindicación 9, en el que dichos material que contiene DPA y material que contiene ácidos grasos insaturados $\omega 3$ son lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$, y la cantidad de DPA con respecto a la cantidad total de ácidos grasos en dicha composición no es menor que 0,1%.
- 5 11. El método de la reivindicación 9, en el que:
dichos material que contiene DPA y material que contiene ácidos grasos insaturados $\omega 3$ son lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$;
la cantidad total de DPA con respecto a la cantidad total de ácidos grasos dentro de dicha composición no es menor que 0,1%, y la cantidad de ácido 4,7,10,13,16,19 docosahexaenoico (DHA) no es menor que 0,1%.
- 10 12. El método de la reivindicación 9, en el que:
dichos material que contiene DPA y material que contiene ácidos grasos insaturados $\omega 3$ son lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$; y
con respecto a la cantidad total de ácidos grasos dentro de dicha composición, la cantidad de DPA no es menor que 0,1%, DHA no es menor que 0,1%, y ácido 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico (EPA) no es mayor que 20%.
- 15 13. El método de cualquiera de las reivindicaciones 10-12, donde dichos lípidos que contienen DPA y ácidos grasos insaturados $\omega 3$ comprenden uno cualquiera o más de los compuestos seleccionados entre el grupo que comprende ésteres formados entre DPA y alcoholes inferiores con 1-6 carbonos, alquilésteres con 1-6 carbonos de ácidos grasos insaturados $\omega 3$, y de glicerol ésteres que contienen DPA y/o ácidos grasos insaturados $\omega 3$ como componentes.
- 20 14. Un lípido que contiene ácido araquidónico (ARA), DPA, y DHA, en el cual:
ARA/DHA (relación en peso) es 0,03-0,4;
DPA/DHA (relación en peso) no es menor que 0,07; y
EPA/DHA (relación en peso) no es mayor que 0,03.
- 25 15. El lípido de la reivindicación 14, en el cual dicho DPA/DHA (relación en peso) es 0,07-5,0.
- 30 16. El lípido de la reivindicación 14 o 15, obtenido mediante el cultivo de un tipo de microorganismo, o una mezcla de lípidos obtenidos por el cultivo separadamente de diferentes tipos de microorganismos.
- 35 17. El lípido de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que incluye glicerol ésteres que contienen ARA, DPA y/o DHA como componentes.
18. El lípido de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 16, que incluye triglicéridos que contienen ARA, DPA y/o DHA como componentes.
- 40 19. Un alimento suplementado con nutrientes que comprende el lípido de cualquiera de la reivindicaciones 14 a 18.

20. El alimento de la reivindicación 19, el cual es una fórmula para alimentar infantes, fórmula para infantes prematuros, alimentos de bebés, alimento para madres expectantes y madres que amamantan, alimento geriátrico, o alimentos para adultos.

5 21. Un alimento para animales que comprende el lípido de cualquiera de las reivindicaciones 14 a 18.