

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 369 074**

⑯ Int. Cl.:

A61K 31/202	(2006.01)
A61K 31/232	(2006.01)
A61P 25/24	(2006.01)
A61P 25/28	(2006.01)
A23L 1/30	(2006.01)
A23L 2/52	(2006.01)
A23D 9/00	(2006.01)

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑯ Número de solicitud europea: **02716453 .2**

⑯ Fecha de presentación: **29.01.2002**

⑯ Número de publicación de la solicitud: **1419768**

⑯ Fecha de publicación de la solicitud: **19.05.2004**

⑭ Título: **COMPOSICIONES QUE TIENEN EFECTOS PREVENTIVOS O MEJORADORES DE SÍNTOMAS O ENFERMEDADES PROVOCADOS POR UNA HIPOFUNCIÓN CEREBRAL.**

⑯ Prioridad:
02.08.2001 JP 2001235519

⑯ Titular/es:
**SUNTORY HOLDINGS LIMITED
1-40, DOJIMAHAMA 2-CHOME, KITA-KU
KITA-KU, OSAKA-SHI, OSAKA 530-8203, JP**

⑯ Fecha de publicación de la mención BOPI:
25.11.2011

⑯ Inventor/es:
**AKIMOTO, Kengo;
KAWASHIMA, Hiroshi;
ONO, Yoshiko;
OKAICHI, Hiroshige y
OKAICHI, Youko**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de la patente:
25.11.2011

⑯ Agente: **de Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 369 074 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Composiciones que tienen efectos preventivos o mejoradores de síntomas o enfermedades provocados por una hipofunción cerebral

ANTECEDENTES

5 La presente invención se refiere a una composición que tiene acción preventiva o mejoradora sobre síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida, que tiene como su ingrediente activo ácido araquidónico y/o un compuesto que tiene ácido araquidónico como su ácido graso constituyente. Más particularmente, la presente invención se refiere a un preventivo o mejorador para una memoria o capacidad de aprendizaje disminuidas, que tiene como su ingrediente activo al menos un tipo seleccionado del grupo que consiste en ácido araquidónico, ésteres alcohólicos de ácido araquidónico, y triglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos en los que una porción o la totalidad del ácido graso constituyente es ácido araquidónico.

10 En los últimos años ha habido un incremento repentino en la proporción de ancianos en la sociedad, acompañando a avances realizados en el campo de la medicina. Esto está dando como resultado un incremento correspondiente en el número de personas que sufren demencia senil. De acuerdo con el "Annual Report on Health and Welfare 1999-2000" y el "Report on the Study of Countermeasures for Elderly Persons with Dementia", el número de 15 ancianos que sufrían demencia durante el año fiscal 2000 era 1,5-1,6 millones, y el número de pacientes con demencia de 65 años y más alcanzaba 1 de cada 14 personas. Se predice que el número de estos pacientes se incremente hasta 1 de cada 10 personas para 2030. A medida que avanza la demencia senil, provoca deterioro de las funciones mentales y las emociones, provocando finalmente problemas en términos de vida diaria y actividades 20 sociales. Las causas de la demencia senil pueden dividirse en demencia cerebrovascular, demencia de Alzheimer y sus combinaciones. Aunque se han realizado actividades de investigación y desarrollo sobre fármacos eficaces para el tratamiento de estos trastornos cerebrales (incluyendo los que mejoran la circulación y el metabolismo cerebrales así como los que inhiben la demencia), no se ha encontrado todavía un fármaco terapéutico eficaz. Aunque se producen infartos cerebrales en una cierta extensión a medida que las personas envejecen, la presencia de la 25 demencia puede prevenirse, por ejemplo, al usar el cerebro. Teniendo esto en cuenta, se cree que es bastante posible desarrollar fármacos dirigidos no solo al tratamiento, sino también a la prevención. Sin embargo, no se ha desarrollado todavía un fármaco que sea seguro y pueda ser tomado fácilmente por personas que varían de niños a ancianos, inhiba las disminuciones en la función cerebral, prevenga síntomas o enfermedades provocados por diminuciones en la función cerebral y exhiba efectos mejoradores.

30 Estudios de investigación han conducido en el pasado a métodos para mejorar la función cerebral, ejemplos de los cuales incluyen un método para mejorar el metabolismo de la energía cerebral que activa las funciones de las células al permitir que las células cerebrales absorban eficazmente nutrientes (tal como al elevar los niveles de glucosa en el cerebro), un método para mejorar la circulación cerebral con el propósito de suministrar adecuadamente nutrientes necesarios y oxígeno a las células cerebrales al mejorar el flujo sanguíneo cerebral (tal como al incrementar el volumen del flujo cerebral), y un método para activar la neurotransmisión que tiene lugar en huecos sinápticos mediados por neurotransmisores (al suministrar precursores de neurotransmisores (p. ej., al suplementar con colina o acetil CoA), inhibir la conversión de neurotransmisores liberados (p. ej., al inhibir acetilcolinesterasa), incrementar la liberación de neurotransmisores (p. ej., al incrementar la liberación de acetilcolina o ácido glutámico) o activar receptores de neurotransmisores), y proteger las membranas de las células nerviosas (por ejemplo, mediante antioxidación, suministro de componentes de la membrana y prevención de la arteriosclerosis).

35 Durante el transcurso de esta investigación pasada, aunque se han encontrado ingredientes que previenen síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida así como ingredientes que tienen efectos mejoradores, su eficacia sigue siendo dudosa en el momento actual, y todavía tiene que encontrarse un fármaco eficaz para el uso como un producto farmacéutico. Es más, en el caso de considerar aplicaciones a alimentos, 40 también ha existido la dificultad adicional de estar limitados a ingredientes de origen natural.

45 El cerebro consiste en tejido que se asemeja a una masa de lípidos. Por ejemplo, los fosfolípidos representan un tercio del tejido que comprende la materia blanca y un cuarto del tejido que comprende la material gris. Los ácidos grasos poliinsaturados en los fosfolípidos que componen las diversas membranas celulares de las células cerebrales 50 consisten principalmente en ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico. Sin embargo, este ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico no puede ser sintetizado de novo por los animales, y deben ingerirse de la dieta bien directamente o bien indirectamente (como ácido linoleico y ácido α-linolénico que son precursores de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico). Por lo tanto, la atención se está enfocando a la mejora del aprendizaje y las capacidades de memoria y la prevención y la recuperación de la demencia senil asociada con el ácido 55 docosahexaenoico. Sin embargo, entre los principales ácidos grasos de los fosfolípidos del cerebro, no solo el ácido docosahexaenoico, sino también el ácido araquidónico, es un ácido graso importante que está presente aproximadamente en el mismo grado. Sonderdegr et al. determinaron que, en contraste con la proporción de ácido araquidónico en los fosfolípidos del hipocampo que es de 12,4% en peso en individuos normales, esa proporción disminuye significativamente hasta 8,1% en peso en pacientes de alzheimer (Lipids, 26, 421- 425, 1991). De este modo, aunque esto sugiere que el ácido araquidónico tiene el potencial de representar un papel importante para 60

mantener la función cerebral, todavía no se ha presentado una evidencia concreta.

Varias invenciones han indicado que utilizan ácido araquidónico para mantener la función cerebral. El "potenciador de la capacidad de aprendizaje" descrito en el documento JP-A-6/256179 es una invención que tiene como su ingrediente activo un derivado de 1,2-diacil-sn-glicerol. Se listan diversos ácidos grasos poliinsaturados en la posición 2, y el ácido araquidónico se indica como uno de esos ácidos. Sin embargo, sólo un derivado de 1,2-diacil-sn-glicerol en el que está unido ácido docosahexaenoico se indica específicamente en los ejemplos, aunque el ácido araquidónico solamente se lista, sin ninguna demostración de su efecto. Un nuevo mejorador de la función cerebral y una combinación de gangliósido y ácido araquidónico como un medio para suministrar una composición nutritiva que contiene los mismos se indican en "una composición mejoradora de la función cerebral y nutritiva" descrita en el documento JP-A-10/101568. Sin embargo, aunque un experimento que usa ratas envejecidas naturalmente se indica como un ejemplo de ensayo, la edad de las ratas en el ensayo es de solo 13 meses, lo que es equivalente a una edad humana de 33 años (un día para la rata es equivalente a un mes para los seres humanos), haciendo así difícil considerar tal ensayo como indicativo de un modelo de envejecimiento. Además, la proporción o cantidad de ácido araquidónico en el fosfolípido cerebral típicamente no exhibe cambios a esta edad y, puesto que tampoco se observan disminuciones en la función cerebral provocadas por el envejecimiento a esta edad, se consideraría típicamente que sería improbable que se produjeran los efectos del ácido araquidónico. En realidad, el efecto del ácido araquidónico solo no se evaluaba en el ejemplo de ensayo, y meramente indicaba que el ácido araquidónico aumenta el efecto del gangliósido.

El "activador de isozima de proteína quinasa C" descrito en el documento JP-A-6/279311 indica la activación de proteína quinasa C, que representa un papel importante en la transmisión intracelular de información, y un fármaco terapéutico para la demencia senil como su efecto adjunto. Sin embargo, el ingrediente activo es un derivado de fosfatidilserina que tiene ácidos grasos poliinsaturados como sus ácidos grasos constituyentes, y uno de esos ácidos grasos poliinsaturados es el ácido araquidónico. Sin embargo, en los ejemplos, no hay grandes diferencias en el efecto del ácido araquidónico entre derivados de fosfatidilserina unidos con ácido linoleico y ácido α -linolénico, no hay superioridad de los derivados de fosfatidilserina que tienen ácido araquidónico como su ácido graso constituyente, y no se demuestra el efecto del ácido araquidónico. Además, como la evaluación consiste solo en la medida de la actividad de la enzima, no se clarifican los efectos preventivos o mejoradores sobre los síntomas o las enfermedades provocados por una función cerebral disminuida. De este modo, aunque se han indicado varias invenciones que utilizan ácido araquidónico para mantener la función cerebral, puesto que el ácido araquidónico y los compuestos que tienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente no se suministraban en cantidades adecuadas, los inventores no son capaces de identificar los efectos verdaderos en experimentos en animales, etcétera, y meramente describen el ácido araquidónico como un miembro de un grupo de ácidos grasos, impidiendo de ese modo que proporcionen una descripción del estado real.

La pérdida de memoria a corto plazo y a largo plazo, que son trastornos patológicos de la memoria que acompañan a lesiones orgánicas del cerebro, son un síntoma principal de la demencia. Sin embargo, el olvido, que es otra palabra para el trastorno de memoria, es una de las dolencias más frecuentemente observadas entre la tercera edad, y se han indicado en diversas investigaciones disminuciones en las capacidades de aprendizaje y memoria en seres humanos que acompañan al envejecimiento fisiológico (Katzman, R. y Terry, R., *The Neurology of Aging*, F.A. Davis, Filadelfia, pp. 15-50).

Al examinar la memoria en términos del paso del tiempo durante el que se forman los recuerdos, la memoria puede clasificarse en memoria sensorial, memoria primaria y memoria secundaria. La memoria primaria también se denomina memoria inmediata, mientras que la memoria secundaria puede denominarse memoria a largo plazo. La memoria a corto plazo puede denominarse memoria primaria así como capacidad de aprendizaje que también cubre la memoria secundaria. Aunque la memoria sensorial se forma cuando existe entrada visual que persiste durante aproximadamente 50 milisegundos, es extremadamente inestable y acaba perdiéndose en 250-500 milisegundos. La memoria primaria se retiene mientras el sujeto es constantemente consciente de ello durante el tiempo en el que la información se reconoce y se procesa, y cumple el papel de la memoria de trabajo. Después de que la información que ha sido procesada como memoria primaria se transfiera a la memoria secundaria y se retenga durante un largo período de tiempo, se recuerda de nuevo por medio de la memoria primaria. Puesto que la memoria primaria tiene una capacidad muy pequeña, acaba perdiéndose en 20-30 segundos a no ser que se recuerde repetidamente. La memoria secundaria está compuesta por cada una de las etapas de transferencia de información procesada con la memoria primaria, la consolidación, su almacenamiento semipermanente y su recuperación. Esta memoria secundaria se deteriora considerablemente con el envejecimiento. Puesto que esta disminución en la memoria secundaria es principalmente el resultado del deterioro en el estadio hasta e incluyendo el almacenamiento de recuerdos, apenas se observa disminución con respecto a la capacidad para recuperar recuerdos almacenados en la juventud. Sin embargo, en pacientes con demencia, esta memoria también está constantemente sometida a deterioro.

Uno de los efectos del ácido araquidónico se ha determinado claramente a partir de un análisis electrofisiológico. Se sabe que se produce un fenómeno en el que, cuando se aplican estímulos al hipocampo a una frecuencia alta para excitar las sinapsis, las respuestas sinápticas subsiguientes se mantienen a un nivel alto. Este fenómeno se denomina LTP (potenciación a largo plazo, por sus siglas en inglés) del hipocampo. Se basa en la naturaleza reversible de las sinapsis y se usa como un indicador para la evaluación de la función cerebral. B. M. McGaugh et ál.

midieron la LTP del hipocampo en ratas enjauladas durante 8 semanas mientras los animales eran alimentados con una dieta de control o una dieta que contenía ácido araquidónico (10 mg/rata/día) usando ratas de 22 meses de edad (Neurobiol. Aging, 20, 643, 1999). En comparación con ratas jóvenes de 4 meses de edad, los niveles de LTP del hipocampo de las ratas viejas disminuían bruscamente, y mostraban una recuperación hasta el nivel de ratas

5 jóvenes debido a la administración de ácido araquidónico. Sin embargo, en términos del mecanismo de memoria, este aumento de la LTP del hipocampo indica una activación de la memoria primaria, y no la activación de un cambio desde la memoria primaria a la memoria secundaria requerido para la fijación de los recuerdos. Así, no pueden verificarse efectos sobre la fijación de los recuerdos a no ser que se clarifiquen en un estudio de farmacología conductual. De este modo, aunque se han indicado ejemplos para evaluar los efectos del ácido 10 araquidónico usando indicadores electrofisiológicos, no se ha determinado si el ácido araquidónico y/o los compuestos que tienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente de la presente invención son eficaces para la prevención o la mejora de síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida.

15 Lynch, M.A. et ál., "Impaired spatial memory in aged rats is associated with alterations in inositol phospholipid metabolism", Neuroreport Vol 5 Nº 15, 1994, páginas 1493 a 1497, analizaron la relación en ratas viejas entre el comportamiento en el Ensayo del Laberinto de Agua de Morris de ARA en partes de la membrana cerebral. Los efectos del ARA y del glutamato al estimular el metabolismo de fosfolípidos inositolicos en los sinaptosomas se revisó en relación con el comportamiento en el ensayo. Las ratas más viejas se comportaban peor en el ensayo del laberinto de agua. Los autores establecieron como hipótesis una correlación entre el comportamiento en el ensayo, la conocida disminución relacionada con la edad en el ARA de las membranas y los cambios en el metabolismo de los fosfolípidos inositolicos. En este caso, se encontró la correlación para el metabolismo de los fosfolípidos inositolicos estimulado, pero no correlación con el ARA de las membranas. En un experimento asociado, se añadió ARA in vitro a suspensiones sinaptosomales o de cortes de cerebro para examinar la renovación de fosfolípidos inositolicos.

20 25 Así, existe una necesidad de desarrollar productos farmacéuticos y compuestos más seguros, superiores para la aplicación a alimentos, que eviten y exhiban efectos mejoradores sobre síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida.

30 Según se especifica en la reivindicación 1, la invención proporciona una composición que comprende como ingrediente activo ácido araquidónico y/o un compuesto que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, para la prevención o la mejora de síntomas de memoria disminuida o capacidad de aprendizaje disminuida provocados por una función cerebral disminuida.

35 Así, la invención es aplicable a la depresión, la demencia y específicamente la demencia de Alzheimer, y la demencia cerebrovascular. Un alimento o bebida que tiene dicha acción preventiva o mejoradora tiene como el ingrediente activo al menos un tipo seleccionado de ácido araquidónico, ésteres alcohólicos de ácido araquidónico, y triglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos en los que la totalidad o una porción de los ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico.

40 45 Como resultado de llevar a cabo una investigación intensiva con el propósito de determinar los efectos preventivos o mejoradores del ácido araquidónico o compuestos que tienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente sobre síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida, los inventores de la presente invención determinaron inesperadamente los efectos del ácido araquidónico o compuestos que tienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente a través de un análisis de patología conductual al usar ratas viejas de más de 20 meses de edad en un ensayo del laberinto de agua de Morris.

Por otra parte, los inventores de la presente invención tuvieron éxito en producir industrialmente triglicérido que tiene un contenido de ácido araquidónico de 20% en peso o más usando microorganismos, fueron capaces de usar esto para probar los efectos de la presente invención y determinaron los efectos de dicho triglicérido.

50 55 Por otra parte, los inventores de la presente invención también tuvieron éxito en producir aceites y grasas que contienen triglicérido en el que ácidos grasos de cadena media están unidos en la posición 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2, fueron capaces de usar esto para probar los efectos de la presente invención y determinaron los efectos de dicho triglicérido.

Como resultado de la presente invención, puede proporcionarse un preventivo o mejorador para dichos síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida, p. ej. un alimento o bebida, y es particularmente útil para todos los seres humanos considerando el tamaño creciente de la población anciana en toda la sociedad.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Fig. 1 es un dibujo explicativo esquemático de un dispositivo usado para un ensayo del laberinto de agua de Morris.

55 La Fig. 2 proporciona una explicación de la adquisición del aprendizaje (% de Hit).

La Fig. 3 es un gráfico que muestra la adquisición de aprendizaje con relación al número de experiencias realizadas

por ratas.

La Fig. 4 es un dibujo que muestra las trayectorias nadadas por las ratas durante 60 segundos en un ensayo de prueba para determinar el grado de adquisición de aprendizaje.

5 La Fig. 5 es un gráfico que muestra los resultados de un ensayo de prueba para determinar el grado de adquisición de aprendizaje.

La Fig. 6 es un gráfico que muestra los resultados de determinar la correlación entre los parámetros de aprendizaje y los niveles de ácido araquidónico en el hipocampo.

MEJOR MODO PARA LLEVAR A CABO LA INVENCIÓN

10 La presente invención se refiere a un preventivo o mejorador para síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida, a un alimento o bebida que tiene acción preventiva o mejoradora sobre síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida que tienen como su ingrediente activo ácido araquidónico y/o un compuesto que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente.

15 La composición de la presente invención tiene una acción preventiva o mejoradora sobre síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida, y es útil como un alimento o bebida, un producto farmacéutico o un fármaco sin receta, etc., con el propósito de la prevención y la mejora de una memoria o una capacidad de aprendizaje disminuidas, depresión, demencia, y específicamente demencia de Alzheimer, y demencia cerebrovascular.

20 Más específicamente, el compuesto tiene una acción preventiva o mejoradora sobre síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida que acompaña al envejecimiento, es útil como un alimento o bebida, un producto farmacéutico o un medicamento sin receta, etc., con el propósito de prevención y mejora de una memoria o una capacidad de aprendizaje disminuidas, demencia, y específicamente demencia de Alzheimer y demencia cerebrovascular, y es útil como un alimento o bebida, un alimento natural, un alimento funcional, un alimento para usos sanitarios especificados o un alimento geriátrico con los propósitos mencionados anteriormente.

25 Además del ácido araquidónico libre, todos los compuestos que tienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente pueden usarse como el ingrediente activo de la presente invención. Ejemplos de compuestos que tienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente incluyen sales de ácido araquidónico tales como sales cárnicas y sales sódicas. Otros ejemplos incluyen ésteres alcohólicos de ácido araquidónico tales como éster metílico de araquidonato y éster etílico de araquidonato. Además, también pueden usarse triglicéridos, fosfolípidos y glicolípidos en los que la totalidad o una porción de sus ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico.

30 En caso de considerar aplicaciones a alimentos, el ácido araquidónico está preferiblemente en forma de un triglicérido o fosfolípido, y de forma particularmente preferible en forma de un triglicérido. Aunque apenas existen fuentes de suministro en el mundo natural de triglicéridos que contienen ácido araquidónico (sinónimo de triglicéridos que contienen triglicéridos en los que la totalidad o una porción de los ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico), los inventores de la presente invención hicieron posible utilizar industrialmente un triglicérido que contiene ácido araquidónico, y, al usar ratas viejas de más de 20 meses de edad en un ensayo del laberinto de agua de Morris, determinaron por primera vez los efectos del ingrediente activo de la presente invención mediante análisis de farmacología conductual, demostrando claramente que tiene una acción preventiva o mejoradora sobre síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida.

40 Así, pueden usarse triglicéridos que contienen triglicéridos en los que la totalidad o una porción de los ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico (triglicéridos que contienen ácido araquidónico), el ingrediente activo de la presente invención. Aceites y grasas (triglicéridos) en los que la proporción de ácido araquidónico entre todos los ácidos grasos que componen el triglicérido es 20% en peso (p/p) o más, preferiblemente 30% en peso o más, y más preferiblemente 40% en peso o más, son la forma preferible de triglicéridos que contienen ácido araquidónico en el caso de la aplicación a alimentos. Así, en la presente invención, pueden usarse todos los triglicéridos con tal de que se obtengan al cultivar microorganismos que tengan la capacidad de producir aceites y grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico.

45 Ejemplos de microorganismos que tienen la capacidad de producir aceites y grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico incluyen microorganismos pertenecientes a los géneros Mortierella, Conidiobolus, Pythium, Phytophthora, Penicillium, Cladosporium, Mucor, Fusarium, Aspergillus, Rhodotorula, Entomophthora, Echinosporangium y Saprolegnia. Ejemplos de microorganismos pertenecientes al género Mortierella subgénero Mortierella incluyen Mortierella elongata, Mortierella exigua, Mortierella hygrophila y Mortierella alpina. Ejemplos específicos de estas cepas incluyen Mortierella elongata IF08570, Mortierella exigua IF08571, Mortierella hygrophila IF05941 y Mortierella alpina IF08568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS219.35, CBS224.37, CBS250.53, CBS343.66, CBS527.72, CBS529.72, CBS608.70 y CBS754.68.

55 Todas estas cepas pueden adquirirse sin restricción del Institute for Fermentation (IFO), Osaka, Japón, la American Type Culture Collection (ATCC), EE. UU. de A. y el Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS). Además, también

puede usarse la cepa *Mortierella elongata* SAM0219 (Nº de Depósito de NIBH FERM P 8703) (Nº de depósito de NIBH FERM BP 1239), que fue aislada del suelo por el grupo de investigación de la presente invención.

A fin de cultivar las cepas microbianas, esporas o micelios de esa cepa microbiana o un líquido de precultivo obtenido al cultivar la cepa microbiana por adelantado se inoculan en un medio líquido o sólido. En el caso de los medios líquidos, aunque glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón soluble, melazas, glicerol o manitol se usan típicamente como una fuente de carbono, cualquiera de estos puede usarse y no existen restricciones sobre ellos. Ejemplos de fuentes de nitrógeno que pueden usarse incluyen fuentes de nitrógeno naturales tales como peptonas, extracto de levadura, extracto de germe de trigo, extracto de ternera, casaminoácidos, almidón de maíz, proteína de soja, soja desgrasada y residuo de semillas de algodón, así como fuentes de nitrógeno orgánicas tales como urea, y fuentes de nitrógeno inorgánicas tales como nitrato sódico, nitrato amónico y sulfato amónico. Además, sales inorgánicas tales como fosfatos, sulfato magnésico, sulfato de hierro y sulfato de cobre así como vitaminas, etc., pueden usarse según sea necesario como fuentes de nutrientes traza. No existen restricciones particulares sobre estos ingredientes del medio con tal de que estén a una concentración que no dificulte el crecimiento de los microorganismos. En términos prácticos, la fuente de nitrógeno debe tener típicamente una concentración de 0,1-40% en peso (p/v), y preferiblemente 1-25% en peso (p/v). La cantidad inicial de fuente de nitrógeno añadida es típicamente 0,1-10% en peso (p/v), y preferiblemente 0,1-6% en peso (p/v), y la fuente de nitrógeno puede añadirse durante el transcurso del cultivo.

Por otra parte, aceites y grasas (triglicéridos) que tienen un contenido de ácido araquidónico de 45% en peso o más también pueden usarse como el ingrediente activo de la presente invención al controlar la concentración de la fuente de carbono en el medio. El cultivo consiste en una fase de crecimiento de los organismos que se extiende desde los días 2 a 4 de cultivo, y una fase de acumulación de aceite o grasa que se extiende más allá de los días 2 a 4 de cultivo. La concentración inicial de la fuente de carbono debe ser 1-8% en peso, y preferiblemente 1-4% en peso, la fuente de carbono debe incrementarse gradualmente solo durante la fase de crecimiento de los organismos y la fase temprana de acumulación de aceite o grasa, y la cantidad total de la fuente de carbono añadida secuencialmente debe ser 2-20% en peso, y preferiblemente 5-15% en peso. Además, un aceite o grasa (triglicérido) que tiene un contenido de ácido araquidónico de 45% en peso o más puede obtenerse y usarse como el ingrediente activo de la presente invención al elaborar la cantidad añadida gradualmente de fuente de carbono añadida durante la fase de crecimiento de los organismos o la fase temprana de acumulación de aceite o grasa de modo que la concentración de fuente de carbono en el medio llegue a ser 0 el día 7 de cultivo y más allá, preferiblemente el día 6 de cultivo y más allá, y más preferiblemente el día 4 de cultivo y más allá, mediante una adición correspondiente a la concentración inicial de fuente de nitrógeno.

Aunque la temperatura de cultivo de microorganismos productores de ácido araquidónico varía de acuerdo con el microorganismo usado, debe ser 5-40°C y preferiblemente 20-30°C y, después del crecimiento de los microorganismos al cultivar a 20-30°C, el cultivo se continúa a 5-20°C para producir ácido graso insaturado. La proporción de ácidos grasos poliinsaturados entre los ácidos grasos formados puede incrementarse al controlar la temperatura de este modo. El pH del medio es 4-10, y preferiblemente 5-9, y el cultivo se lleva a cabo mediante cultivo agitado aireado, cultivo batido o cultivo estacionario. El cultivo se lleva a cabo normalmente durante 2-30 días, preferiblemente 5-20 días, y más preferiblemente 5-15 días.

Por otra parte, como otro medio para incrementar la proporción de ácido araquidónico en un aceite o grasa (triglicérido) que contiene ácido araquidónico, además de controlar la concentración de la fuente de carbono en el medio, aceite o grasa que tiene un alto contenido de ácido araquidónico también puede obtenerse al hidrolizar selectivamente el aceite o la grasa que contiene ácido araquidónico. Puesto que la lipasa usada para esta hidrólisis selectiva no tiene especificidad de posición para triglicéridos, y la actividad de hidrólisis disminuye en proporción con el número de dobles enlaces, se hidrolizan enlaces éster de ácidos grasos distintos a los ácidos grasos poliinsaturados. El triglicérido resultante tiene un contenido de ácidos grasos poliinsaturados incrementado debido a la presencia de una reacción de transesterificación entre los glicéridos parciales de PUFA resultantes ("Enhancement of Arachidonic Acid: Selective Hydrolysis of a Single-Cell Oil from *Mortierella* with *Candida cylindracea* Lipase", J. Am. Oil Chem. Soc., 72, 1323-1327 (1998). De este modo, un aceite o grasa que tiene un alto contenido de ácido araquidónico obtenido al llevar a cabo una hidrólisis selectiva sobre un aceite o grasa (triglicérido) que contiene ácido araquidónico puede usarse como el ingrediente activo en la presente invención. Aunque la proporción de ácido araquidónico con relación a la cantidad total de ácidos grasos de un aceite o grasa (triglicérido) que contiene ácido araquidónico de la presente invención es preferiblemente alta con el propósito de eliminar los efectos de otros ácidos grasos, no se limita a una proporción alta sino que en cambio, en realidad, en el caso de la aplicación a alimentos, hay casos en los que la cantidad absoluta de ácido araquidónico puede presentar problemas, e incluso pueden usarse sustancialmente aceites y grasas (triglicéridos) que tienen un contenido de ácido araquidónico de 10% en peso o más.

Por otra parte, triglicéridos en los que ácidos grasos de cadena media están unidos en la posición 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2 también pueden usarse como un triglicérido en el que la totalidad o una porción de los ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico. Además, pueden usarse aceites y grasas (triglicéridos) que contienen 5% en moles o más, preferiblemente 10% en moles o más, más preferiblemente 20% en moles o más, y lo más preferiblemente 30% en moles o más de un triglicérido en el que ácidos grasos de cadena media están unidos en la posición 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2. Ácidos grasos de cadena

media seleccionados de ácidos grasos que tienen 6 a 12 átomos de carbono pueden usarse como los ácidos grasos de cadena media unidos en la posición 1,3 del triglicérido mencionado anteriormente. Ejemplos de ácidos grasos que tienen 6 a 12 átomos de carbono incluyen ácido caprílico y ácido cáprico, y el 1-3-caprioloil-2-araquidonoil-glicerol (al que va a hacerse referencia como "8A8") es particularmente preferible.

5 Estos triglicéridos en los que ácidos grasos de cadena media están unidos en la posición 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2 son aceites y grasas (triglicéridos) óptimos en caso de que se usen para la tercera edad. Aunque los aceites y grasas (triglicéridos) ingeridos típicamente son hidrolizados por lipasa pancreática cuando entran en el intestino delgado, esta lipasa pancreática es específica para la posición 1,3, permitiendo que la posición 1,3 de los triglicéridos se escinda dando como resultado la formación de dos moléculas de ácido graso libre, mientras que formando al mismo tiempo una molécula de 2-monoacilglicerol (que va a denominarse "2-MG"). Como este 2-MG es extremadamente soluble en ácidos biliares y tiene un alto grado de absorción, se considera típicamente que los ácidos grasos de la posición 2 son fácilmente absorbidos. Además, cuando el 2-MG se disuelve en ácidos biliares, representa el papel de un tensioactivo al actuar para incrementar la absorción de ácidos grasos libres. A continuación, los ácidos grasos libres y el 2-MG biosintetizan micelas de compuestos de ácido biliar junto con colesterol y fosfolípidos, que se incorporan a continuación en células epiteliales del intestino delgado en las que tiene lugar la resíntesis de triacilglicerol, después de lo cual este se libera finalmente a la linfa en forma de quilomicrones. Sin embargo, esta lipasa pancreática es altamente específica para ácidos grasos saturados, dando así al ácido araquidónico la característica de ser resistente a ser escindido por esta enzima. Otro problema es que, puesto que la actividad de la lipasa pancreática disminuye con la edad, en las personas ancianas propensas a 10 síntomas y enfermedades provocados por una función cerebral disminuida, los triglicéridos en los que ácidos grasos de cadena media están unidos en la posición 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2 son el tipo óptimo de aceites y grasas (triglicéridos).

15

20

Como un ejemplo concreto de un método para producir triglicérido en el que ácidos grasos de cadena media están unidos en la posición 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2, tal triglicérido puede producirse al permitir que la lipasa, que actúa específicamente sobre los enlaces éster en la posición 1,3 del triglicérido, actúe en presencia de aceite o grasa (triglicérido) que contiene ácido araquidónico y ácidos grasos de cadena media.

30 El aceite o grasa (triglicérido) que sirve como la materia prima es un triglicérido que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente y, en caso de que la proporción de ácido araquidónico con relación a la cantidad total de ácidos grasos que componen el triglicérido sea alta, debido a que las disminuciones en el rendimiento de reacción pueden evitarse al incrementar el aceite o grasa sin reaccionar (triglicérido en el que solo el triglicérido usado como materia prima o ácidos grasos en la posición 1,3 se han convertido en ácidos grasos de cadena media), la temperatura de la reacción enzimática es normalmente mayor que 20-30°C, preferiblemente 30-50°C, y más preferiblemente 40-50°C.

35 Ejemplos de lipasas que pueden usarse que actúan específicamente sobre los enlaces éster en la posición 1,3 de los triglicéridos incluyen los producidos por microorganismos tales como especies de Rhizopus, especies de Rhizomucor y especies de Aspergillus así como lipasa pancreática porcina. También pueden usarse como esta lipasa productos disponibles comercialmente. Ejemplos de lipasas disponibles comercialmente incluyen, pero no se limitan a, la lipasa de Rhizopus delemar (Tanabe Seiyaku, Talipase) y las lipasas de Rhizomucor miehei (Novo Nordisk, Lipozyme IM) y Aspergillus niger (Amano Pharmaceutical, Lipase A), y puede usarse cualquier lipasa con 40 tal de que sea específica para la posición 1,3.

45 La lipasa mencionada anteriormente se usa preferiblemente en forma de lipasa inmovilizada sobre un soporte inmovilizador con el propósito de impartir resistencia térmica a la enzima ya que la temperatura de reacción es 30°C o más, y preferiblemente 40°C o más, con el propósito de aumentar la eficacia de reacción. Un soporte de resina de intercambio iónico en forma de una resina altamente porosa que tiene un diámetro de poro de aproximadamente 100 ángstroms o más puede usarse como el soporte inmovilizador, un ejemplo del cual es la Dowex Marathon WBA (nombre comercial, Dow Chemical).

50 0,5-20 partes (en peso) de una solución acuosa de lipasa de tipo específico para la posición 1,3 se suspenden en 1 parte de soporte inmovilizador seguido por la adición gradual de 2-5 partes de acetona fría (p. ej., -80°C) a la suspensión mientras se agita para formar un precipitado. Una enzima inmovilizada puede prepararse a continuación al secar este precipitado bajo presión reducida. Como un método aún más simple, 0,05-0,4 partes de lipasa específica para la posición 1,3 se disuelven en un mínimo de agua y se mezclan con 1 parte de soporte inmovilizador mientras se agitan, seguido por secado bajo presión reducida para preparar una enzima inmovilizada. Aunque aproximadamente 90% de la lipasa se inmoviliza sobre el soporte mediante este procedimiento, puesto que 55 no exhibe actividad de transesterificación en este estado, la enzima inmovilizada puede activarse lo más eficazmente al pretratar en un soluto (aceite o grasa y ácidos grasos de cadena media usados como materia prima) al que se ha añadido 1-10% en peso (p/v) de agua, y preferiblemente en un soluto al que se ha añadido 1-3% en peso de agua, seguido por el uso en la producción.

60 Dependiendo del tipo de enzima, la cantidad de agua añadida al sistema de reacción es extremadamente crucial. La transesterificación avanza con dificultad si no hay agua contenida en el sistema de reacción, mientras que se produce hidrólisis si está presente una gran cantidad de agua, disminuyendo de ese modo la velocidad de

recuperación de triglicérido (debido a la formación de diglicéridos y monoglicéridos mediante hidrólisis). Sin embargo, en este caso, al usar una enzima inmovilizada que se ha activado mediante el pretratamiento mencionado anteriormente, la cantidad de agua añadida al sistema de reacción ya no es importante, y la reacción de transesterificación es capaz de producirse eficazmente incluso en ausencia completa de agua. Por otra parte, el pretratamiento puede omitirse al seleccionar el tipo de agente enzimático.

Al usar una enzima inmovilizada que tiene resistencia térmica e incrementar la temperatura de reacción enzimática de este modo, triglicérido en el que ácidos grasos de cadena media están unidos en la posición 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2 pueden producirse eficazmente sin provocar una disminución en la eficacia de reacción incluso en el caso de aceites y grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico para los que la lipasa de tipo específico para la posición 1,3 tiene un bajo nivel de actividad.

En la producción de un alimento o bebida que tiene acción preventiva o mejoradora sobre síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida, ácido araquidónico y/o un compuesto que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente puede usarse solo, o puede combinarse con una materia prima de alimento o bebida sustancialmente libre de ácido araquidónico o que contiene sólo una pequeña cantidad de ácido araquidónico. En esta memoria, una pequeña cantidad se refiere a una cantidad para la cual, aun cuando esté contenido ácido araquidónico en la materia prima de alimento o bebida, la composición alimentaria en la que está contenido no alcanza la cantidad ingerida diaria de ácido araquidónico que se describirá más adelante, cuando esa composición sea ingerida por una persona.

En el caso de triglicéridos en los que la totalidad o una porción de los ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico en particular, no existen restricciones sobre la aplicación de esos aceites y grasas (triglicéridos), y pueden usarse como materias primas o aditivos de alimentos, bebidas, productos farmacéuticos o fármacos sin receta. Estos triglicéridos tampoco están sometidos a restricciones en el propósito de su uso o la cantidad usada.

Ejemplos de composiciones alimentarias incluyen no solo alimentos normales, sino también alimentos funcionales, alimentos de suplemento nutricional, fórmulas para recién nacidos, fórmulas para niños, alimento para bebés, alimentos que han de consumirse durante el embarazo y alimentos geriátricos. Ejemplos de alimentos que contienen aceites y grasas incluyen alimentos naturales que contienen inherentemente aceites y grasas, tales como carnes, pescado y nueces, alimentos a los que se añaden aceites y grasas durante la preparación tales como sopa, alimentos para los que se usan aceites y grasas como un medio de calentamiento tales como rosquillas, alimentos aceitosos tales como mantequilla, alimentos procesados a los que se añaden aceites y grasas durante el procesamiento tales como galletas, y alimentos en los que se pulverizan o se revisten aceites y grasas durante el procesamiento final, tales como bizcochos duros. Por otra parte, también pueden añadirse aceites y grasas a productos alimenticios agrícolas, productos alimenticios fermentados, productos alimenticios ganaderos, productos alimenticios marinos o bebidas que no contienen aceites y grasas. Por otra parte, estos también puede estar en forma de alimentos funcionales, productos farmacéuticos o fármacos sin receta, ejemplos de los cuales incluyen nutrientes transintestinales, polvos, gránulos, comprimidos, cápsulas, trociscos, medicinas, suspensiones, emulsiones, jarabes y otras formas procesadas.

Por otra parte, además del ingrediente activo de la presente invención, la composición de la presente invención también puede contener diversos portadores y aditivos usados normalmente en alimentos, bebidas, productos farmacéuticos o fármacos sin receta. En particular, la composición de la presente invención contiene preferiblemente un antioxidante con el propósito de prevenir el deterioro oxidativo del ingrediente activo de la presente invención. Ejemplos de antioxidantes incluyen antioxidantes naturales tales como tocoferoles, derivados de flavona, filozulcinas, ácido kójico, derivados de ácido gálico, catequinas, ácido buterburíco, gosipol, derivados de pirazina, sesamol, guayacol, grasa de guayaco, ácido p-cumárico, ácido nordihidroguayatético, esteroles, terpenos, bases de ácidos nucleicos, carotenoides y lignanos, así como antioxidantes sintéticos ejemplificados por compuestos tales como éster de palmitato ascórbico, éster de estearato ascórbico, butilhidroxianisol (BEA), butilhidroxitolueno (BHT), mono-t-butilhidroxiquinona (TBHQ) y 4-hidroximetil-2,6-di-t-butilfenol (HMBP). Ejemplos de tocoferoles incluyen α -tocoferol, β -tocoferol, γ -tocoferol, δ -tocoferol, ϵ -tocoferol, ζ -tocoferol, η -tocoferol y ésteres de tocoferol (tales como acetato de tocoferol). Por otra parte, ejemplos de carotenoides incluyen β -caroteno, cantaxantina y astaxantina.

En la composición de la presente invención, además del ingrediente activo de la presente invención, ejemplos de portadores incluyen diversos soportes inmovilizadores, extendedores, diluyentes, espesantes, dispersantes, vehículos, disolventes aglutinantes (tales como agua, etanol y aceites vegetales), auxiliares de disolventes, tampones, promotores de la solubilidad, agentes gelificantes, agentes de suspensión, harina, harina de arroz, almidón, almidón de maíz, polisacárido, proteína de leche, colágeno, aceite de arroz y lecitina. Ejemplos de aditivos incluyen, pero no se limitan a, vitaminas, edulcorantes, ácidos orgánicos, colorantes, fragancias, agentes de prevención de la humedad, fibras, electrolitos, minerales, nutrientes, antioxidantes, conservantes, sustancias aromáticas, agentes humectantes, extractos alimentarios naturales y extractos vegetales.

El principal ingrediente farmacológicamente activo del ácido araquidónico y el compuesto que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente radica en el ácido araquidónico. Se presenta que la cantidad ingerida diaria de ácido araquidónico en la dieta es 0,14 g en la región de Kanto y 0,19-0,20 g en la región de Kansai (Lipid Nutrition Science, 4, 73-82, 1995). Teniendo en cuenta la ingestión disminuida de aceites y grasas por los

ancianos y la disminución en la actividad de lipasa pancreática, se requiere que las personas mayores ingieran al menos una cantidad equivalente, y lo más probablemente una cantidad aún mayor, de ácido araquidónico. Así, la cantidad ingerida diaria del ácido araquidónico y el compuesto que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente de la presente invención para un adulto (por ejemplo, peso corporal: 60 kg) es 0,001-20 g, 5 preferiblemente 0,01-10 g, más preferiblemente 0,05-5 g y lo más preferiblemente 0,1-2 g como ácido araquidónico.

En caso de aplicar realmente el ingrediente activo de la presente invención a alimentos y bebidas, la cantidad absoluta de ácido araquidónico combinada en el alimento es importante. Sin embargo, como la cantidad absoluta combinada en el alimento o bebida también varía de acuerdo con la cantidad ingerida del alimento o bebida en el que está combinado, en el caso de combinar triglicéridos que contienen un triglicérido en el que la totalidad o una porción de los ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico en un alimento, deben combinarse de modo que la cantidad de ácido araquidónico sea 0,0003% en peso o más, preferiblemente 0,003% en peso o más, y más preferiblemente 0,03% en peso o más. Por otra parte, en caso de combinar triglicéridos que contienen un triglicérido en el que ácidos grasos de cadena media están unidos a la posición 1,3 y ácido araquidónico está unido a la posición 2 en un alimento o bebida, deben combinarse de modo que la cantidad de ácidos grasos de cadena media unidos en la posición 1,3 sea 0,001% en peso o más, preferiblemente 0,01% en peso o más, y más preferiblemente 10 0,1% en peso o más, como triglicérido en el que ácido araquidónico está unido en la posición 2.

En caso de usar la composición de la presente invención como un producto farmacéutico, un producto farmacéutico puede producirse de acuerdo con métodos usados normalmente en el campo de la tecnología farmacéutica, tales como los métodos descritos en la Farmacopea Japonesa o métodos que se ajustan a estos.

20 En caso de usar la composición de la presente invención como un producto farmacéutico, no existen restricciones particulares sobre la cantidad combinada de ingrediente activo en la composición con tal de que se alcance el objetivo de la presente invención, y puede usarse en cualquier relación de combinación adecuada.

En caso de usar la composición de la presente invención como un producto farmacéutico, se administra preferiblemente en una sola forma de administración, y la administración oral es particularmente preferible. Aunque 25 la dosificación de la composición de la presente invención varía de acuerdo con la edad, el peso corporal, los síntomas, el número de administraciones, etc., por ejemplo, la dosificación diaria para adultos (peso corporal: aprox. 60 kg) de ácido araquidónico o un compuesto que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente es normalmente aproximadamente 0,001-20 g, preferiblemente aproximadamente 0,01-10 g, más preferiblemente 30 aproximadamente 0,05-5 g y lo más preferiblemente aproximadamente 0,1-2 g como ácido araquidónico, y debe de administrarse al dividirla entre de una a tres administraciones al día.

Los principales fosfolípidos de las membranas fosfolipídicas del cerebro son el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico y, en caso de considerar el equilibrio entre los dos, la composición de la presente invención preferiblemente combina ácido docosahexaenoico con ácido araquidónico. Además, como la proporción de ácido eicosapentaenoico en las membranas fosfolipídicas del cerebro es extremadamente baja, la composición de la 35 presente invención preferiblemente apenas contiene ácido eicosapentaenoico. Además, es más preferible una composición que apenas contenga ácido eicosapentaenoico pero contenga ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico. En la combinación del ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico, la relación de ácido araquidónico a ácido docosahexaenoico (relación en peso) está dentro del intervalo de 0,1-15 y preferiblemente dentro del intervalo de 0,25-10. Además, es preferible un alimento o bebida en el que la cantidad de ácido 40 eicosapentaenoico no supere un quinto de la cantidad (relación en peso) de ácido araquidónico.

Los siguiente proporciona una explicación más detallada de la presente invención a través de sus ejemplos.

Además, alimentos naturales, alimentos funcionales, un alimento para usos sanitarios especificados, un alimento geriátrico u otras composiciones alimentarias de la presente invención incluyen los vendidos sin ninguna descripción 45 o etiqueta o recipiente de envasado de dicha composición alimentaria y/o una herramienta de mercadotecnia (tal como un prospecto) para promover las ventas de dicha composición alimentaria que indique que dicha composición alimentaria y/o los ingredientes de dicha composición alimentaria tienen acción preventiva o mejoradora para síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida, y más específicamente, acción preventiva o mejoradora para síntomas o enfermedades provocados por una función cerebral disminuida que acompaña al envejecimiento, la prevención y la mejora de una memoria o una capacidad de aprendizaje disminuidas

50 Ejemplo 1

(Método de Producción de Triglicéridos que Contienen Ácido Araquidónico)

Se usó *Mortierella alpina* CBS754.68 como el microorganismo productor de ácido araquidónico. Seis kl de medio que contiene 1,8% de glucosa, 3,1% de polvo de soja desgrasado, 0,1% de aceite de soja, 0,3% de KH_2PO_4 , 0,1% de Na_2SO_4 , 0,05% de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 0,05% de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ se prepararon en un depósito de cultivo de 10 kl y el pH inicial se ajustó hasta 6,0. Despues de inocular con 30 l de líquido de precultivo, se llevó a cabo el cultivo mientras se aireaba al agitar durante 8 días bajo condiciones de una temperatura de 26°C, un caudal de aire de 360 m^3/hora y una presión interna del depósito de 200 kPa. Además, la velocidad de agitación se ajustó a fin de mantener la concentración de oxígeno disuelto a 10-15 ppm. Por otra parte, la concentración de glucosa se mantuvo de modo

que la concentración de glucosa en el medio estuviera dentro del intervalo de 1-2,5% hasta el día 4 y 0,5-1% después de ese momento (los porcentajes anteriores se refieren a % p/v) usando el método de adición de flujo. Despues de la terminación del cultivo, los microorganismos que contienen triglicéridos que contienen ácido araquidónico se recuperaron mediante filtración y secado, y se extrajo aceite o grasa de los microorganismos resultantes con hexano seguido por una etapa de purificación con aceite comestible (desgomado, desacidificación, desodorización y decoloración) para obtener 150 kg de triglicéridos que contiene ácido araquidónico (en los que el ácido araquidónico estaba unido a un sitio arbitrario del triglicérido). Cuando se preparaban los ésteres metílicos a partir del aceite o grasa (triglicéridos) resultante mediante transmetilación y se analizaban mediante cromatografía de gases, la proporción de ácido araquidónico en la cantidad total de ácidos grasos era 40,84% en peso. Además, las proporciones de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido y-linolénico y ácido dihomo- γ -linolénico eran 11,63, 7,45, 7,73, 9,14, 2,23 y 3,27% en peso, respectivamente. Por otra parte, 99% en peso de éster etílico de ácido araquidónico se aisló y se purificó mediante el método establecido de cromatografía líquida de alta resolución a partir de una mezcla de ésteres etílicos de ácido graso que contiene 40% en peso de éster etílico de ácido araquidónico, preparado mediante transesterilación a partir del aceite o grasa (triglicéridos) que contiene ácido araquidónico mencionado anteriormente.

Ejemplo 2

(Producción de Triglicéridos que Contienen 5% en moles o más de 8A8)

100 g de un soporte de resina de intercambio iónico (Dowex Marathon WBA: Dow Chemical, nombre comercial) se suspendieron en 80 ml de una solución acuosa de 12,5% de lipasa de *Rhizopus delemar* (Talipase Powder, Tanabe Seiyaku) seguido por secado bajo presión reducida para obtener lipasa inmovilizada.

Posteriormente, 80 g de los triglicéridos obtenidos en el Ejemplo 1 que contenían 40% en peso de ácido araquidónico (TGA40S), 160 g de ácido caprílico, 12 g de la lipasa inmovilizada mencionada anteriormente y 4,8 ml de agua se dejaron reaccionar durante 48 horas a 30°C mientras se agitaba (130 rpm). Despues de la terminación de la reacción, la solución de reacción se retiró para obtener lipasa inmovilizada activada.

25 Posteriormente, 10 g de lipasa inmovilizada (lipasa de *Rhizopus delemar*, soporte: Dowex Marathon WBA, nombre comercial) se cargaron en una columna de vidrio (1,8 x 12,5 cm, volumen: 31,8 ml) con camisa, y un aceite o grasa mixto que consistía en el TGA40S obtenido en el Ejemplo 1 y ácido caprílico mezclados en una relación de 1:2 se dejó fluir a través de la columna a un caudal constante (4 ml/h) para permitir que la reacción avanzara continuamente y obtener 400 g de aceite o grasa de reacción. Además, la temperatura de la columna era 40-41°C. 30 El ácido caprílico y los ácidos grasos libres sin reaccionar se retiraron mediante destilación molecular para obtener un aceite o grasa (triglicéridos) que contiene 8A8. Cuando la proporción de 8A8 en el aceite o grasa (triglicéridos) que contiene 8A8 resultante se investigaba mediante cromatografía de gases y cromatografía líquida de alta resolución, se encontró que era 31,6% en moles. (Además, las proporciones de 8P8, 8O8, 8L8, 8G8 y 8D8 eran 0,6, 7,9, 15,1, 5,2 y 4,8% en moles, respectivamente. Los ácidos grasos P, O, L, G y D unidos a la posición 2 del triglicérido representan ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido y-linolénico y ácido dihomo- γ -linolénico, respectivamente, mientras que 8P8 se refiere a 1,3-caprioloil-2-palmitoil-glicerol, 8O8 a 1,3-caprioloil-2-oleoil-glicerol, 8L8 a 1,3-caprioloil-2-linoleoil-glicerol, 8G8 a 1,3-caprioloil-2-y-linolenoil-glicerol y 8D8 a 1,3-caprioloil-2-dihomo- γ -linolenoil-glicerol.) Además, 96% en moles de 8A8 se purificaron y se aislaron del aceite o grasa (triglicéridos) que contiene 8A8 resultante mediante el método establecido de cromatografía líquida de alta resolución.

Ejemplo 3

(Evaluación de la Capacidad de Aprendizaje de TGA40S mediante un Ensayo del Laberinto de Agua de Morris)

Para los grupos de control de ratas viejas, ratas Fischer macho de 18 meses de edad se dividieron en dos grupos que consistían en un grupo de dieta de control (8 animales, grupo OC) y un grupo de dieta con TGA40S (8 animales, grupo OA), y la dieta de control y la dieta de SUNTGA40S mostradas en la Tabla 1 se administraron a cada grupo, respectivamente. La dieta de control mostrada en la Tabla 1 se administró a ocho ratas Fischer macho de 4 meses de edad que servían como un grupo de control de ratas jóvenes (grupo YC). Además, el TGA40S obtenido en el Ejemplo 1 se usó como el TGA40S usado en la dieta de TGA40S.

Tabla 1 Dietas de Ensayo

	Dieta de Control (g)	Dieta de TGA40S (g)
Caseína	200	200
DL-metionina	3	3
Almidón de maíz	150	150
Sacarosa	500	500
Polvo de celulosa	50	50
Aceite de maíz	50	45
Mineral AIN-76	35	35
Vitamina AIN-76	10	10
Bitartrato de colina	2	2
Vitamina E	0,05	0,05
TGA40S	0	5

Puesto que la cantidad ingerida diaria por rata era aproximadamente 20 g, la cantidad ingerida diaria de TGA40S por rata es 0,1 g. Puesto que 40% en peso de todos los ácidos grasos unidos a TGA40S es ácido araquidónico, esto significa que la cantidad ingerida diaria de ácido araquidónico por rata es 40 mg (el peso del esqueleto de glicerol se ignoró para simplificar los cálculos). Estos 40 mg son equivalentes a 133 mg/60 kg/día cuando se convertían en las cantidades ingeridas para seres humanos.

Un ensayo de aprendizaje en el laberinto de agua de Morris se efectuó alrededor del tercer mes del experimento (edad de las ratas viejas: 21 meses, edad de las ratas jóvenes: 7 meses). El ensayo del laberinto de agua de Morris es un ensayo de aprendizaje basado en el reconocimiento espacial en el que agua teñida de negro con tinta se carga (altura del nivel de agua: 20 cm) en un depósito de agua (diámetro: 120 cm, altura: 35 cm), una rata se pone sobre una plataforma de escape de un tamaño (diámetro: 11,5 cm, altura: 19 cm) que es justo suficientemente grande para que la rata se mantenga (la plataforma de escape está situada por debajo de la superficie del agua y no puede ser observada por las ratas que nadan en el depósito de agua), la rata sobre la que ha de realizarse el ensayo de aprendizaje se pone en el depósito de agua en una posición predeterminada en el depósito (punto de partida), y a continuación es forzada a nadar hasta la plataforma de escape. Se sabe que este ensayo tiene una correlación con el hipocampo que gobierna la memoria, y se usa ampliamente en los EE. UU. y Europa. A medida que el ensayo se repite, las ratas aprenden la posición de la plataforma de escape. Se deja que las ratas aprendan usando el método descrito posteriormente. A saber, después de liberar a una rata desde el punto de partida del aparato para el ensayo del laberinto de agua de Morris, si la rata era incapaz de alcanzar la plataforma de escape en 60 segundos, la rata se colocaba sobre la plataforma de escape, permitiendo de ese modo que aprendiera la posición de la plataforma de escape no observada. Este proceso de aprendizaje se continuó durante 2 semanas no más de dos veces al día. El porcentaje de la cantidad de tiempo requerida para nadar desde el punto de partida hasta la plataforma de escape dentro de un intervalo de desviación angular de $\pm 15^\circ$ con respecto al tiempo de nado total (% de Hit, véase la Fig. 2) se usó como un indicador del aprendizaje. Aunque la velocidad de adquisición de aprendizaje de las ratas viejas disminuye claramente en comparación con las ratas jóvenes, como resultado de la alimentación con TAG40S, a saber, ácido araquidónico, la velocidad de adquisición de aprendizaje mejoraba hasta casi el nivel de las ratas jóvenes (Fig. 3). En la Fig. 3, cada graduación sobre la escala del eje horizontal representa cuatro valoraciones, o dos días de ensayo.

Posteriormente, a fin de determinar el grado de adquisición de aprendizaje, se efectuó un ensayo de prueba el día después de dos semanas del aprendizaje mencionado anteriormente, esto es el día 15. Si la plataforma de escape se retira después de que las ratas hayan adquirido el aprendizaje, las ratas nadan alrededor de la posición en la que estaba la plataforma de escape. El tiempo durante el cual las ratas nadan alrededor de la situación previa de la plataforma de escape basado en el recuerdo de dónde estaba (evaluado dividiendo el depósito de agua en cuatro cuadrantes y evaluado como la cantidad de tiempo (segundos) transcurrida en el cuadrante en el que estaba la plataforma de escape) puede usarse para evaluar el grado de adquisición de aprendizaje. Se muestran las trayectorias nadadas por las ratas N° 1 y N° 2 del grupo YC, el grupo OA y el grupo (Fig. 4). Por otra parte, como se dejaba que las ratas aprendieran al cambiar los puntos de partida para ratas individuales, el punto de partida (5) y el cuadrante en el que estaba la plataforma de escape en la Fig. 4 difieren de acuerdo con las ratas individuales.

Además, en la Fig. 5, el cuadrante diana indica el cuadrante (1/4) en el que estaba la plataforma de escape. La rata OC-1 del grupo OC se perdía claramente a través del depósito de agua, y estaba en el cuadrante en el que estaba la plataforma de escape solo durante 2,4 segundos. Los resultados del ensayo de prueba se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2 Resultados del Ensayo de Prueba

Grupo de Prueba	Tiempo nadando en la posición en la que estaba la plataforma de escape como resultado de recordar la posición de la plataforma de escape (s) n = 8	Media ± desviación estándar	Muestra	valor t	valor P (a partir de la tabla de t(f:p)) grado de libertad f = n - 1 = 7
Grupo OA	28,6, 36,6, 14,8, 22,2, 22,2, 26,2, 13,0, 21,8	23,20 ± 7,548 ^{ab*}	7,06	3,07	p<0,05
Grupo OC	2,4, 30,2, 23,4, 17,4, 5,0, 23,0, 30,4, 26,4	19,78 ± 10,79 ^b	10,09	1,25	--
Grupo YC	27,8, 34,8, 30,6, 33,4, 20,8, 23,4, 34,0, 22,6	28,43±5,59 ^a	5,23	6,79	p<0,001

5 * a y b indican una diferencia significativa entre letras diferentes (p<0,05)

En la Tabla 2,

$$t = \frac{\bar{x} - \mu}{\frac{s}{\sqrt{n-1}}}$$

donde

$$\bar{x}$$

10 representa la media (15 segundos), S la desviación estándar de la muestra, SD la media ± la desviación estándar y n el número de elementos de datos (número de elementos de datos de cada grupo), mientras que S representa

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n}}$$

y SD representa

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

15 Cuando la Tabla 2 se expresa en la forma de un gráfico (Fig. 5), puede observarse que la cantidad de tiempo que pasan en el cuadrante en el que estaba la plataforma de escape las ratas viejas del grupo OA a las que se les administraba TGA40S (tiempo transcurrido nadando alrededor de la posición en la que estaba la plataforma de escape como resultado de recordar la posición de la plataforma de escape) es significativamente más prolongada. Como el nivel de probabilidad de 15 segundos mide el tiempo empleado al dejar que las ratas nadan durante 60 segundos, esto también indica la posibilidad de que las ratas pasen el tiempo en ese cuadrante por coincidencia. El gráfico de barras indica el tiempo medio empleado por las ratas en el cuadrante en el que estaba la plataforma de escape.

Posteriormente, el hipocampo se extirpó de las ratas usadas en el ensayo del laberinto de agua de Morris y todos los lípidos se extrajeron usando el método de Folch. Despues de fraccionar los lípidos mediante cromatografía en capa

5 fina, rascar la fracción de fosfolípido y retirar el agua al hervir con etanol, los lípidos se analizaron mediante cromatografía de gases después de convertir en ésteres metílicos de ácido graso con ácido clorhídrico al 10%-metanol. Como resultado de determinar una correlación entre los parámetros de aprendizaje del laberinto de agua ("tiempo para alcanzar la plataforma de escape (cuanto menos, mejor)", "proporción de tiempo nadando hacia la 10) plataforma de escape (% de Hit, cuanto más, mejor)") y la cantidad de ácido araquidónico en el hipocampo con una curva de aproximación primaria basada en el método de mínimos cuadrados (Fig. 6), se observó una correlación negativa entre el tiempo para alcanzar la plataforma de escape y la cantidad de ácido araquidónico en el hipocampo (coeficiente de correlación $R = -0,38$), mientras que se observaba una correlación positiva entre el tiempo para alcanzar la plataforma de escape y % de Hit de la trayectoria nadada por las ratas (coeficiente de correlación $R = 0,32$). En la Fig. 6, el eje vertical indica la cantidad de ácido araquidónico en mg por gramo de tejido de hipocampo. De este modo, se observó por primera vez que la administración de TGA40S mejora la capacidad de aprendizaje o la capacidad cognitiva, y también se demostró por primera vez que el efecto se debe al ácido araquidónico.

Ejemplo 4

(Evaluación de la Capacidad de Aprendizaje de 8A8 mediante un Ensayo del Laberinto de Agua de Morris)

15 Para los grupos de ensayo de ratas viejas, veinte ratas Fischer macho de 18 meses de edad se dividieron en tres grupos que consistían en un grupo de dieta de control (6 animales, grupo OC), un grupo de dieta de TGA40S (6 animales, grupo OA) y un grupo de dieta de 8A8 (8 animales, grupo 8A8), y la dieta de control, la dieta de SUNTGA40S y la dieta de 8A8 mostradas en la Tabla 3 se administraron a cada grupo, respectivamente. La dieta de control mostrada en la Tabla 3 se administró a ocho ratas Fischer macho de 4 meses de edad que servían como un grupo de control de ratas jóvenes (grupo YC). Además, el 96% en moles de 8A8 obtenido en el Ejemplo 2 se usó 20 para el 8A8 usado en la dieta de 8A8

Tabla 3 Dietas de Ensayo

	Dieta de Control (g)	Dieta de TGA40S (g)	Dieta de 8A8 (g)
Caseína	200	200	200
DL-metionina	3	3	3
Almidón de maíz	150	150	150
Sacarosa	500	500	500
Polvo de celulosa	50	50	50
Aceite de maíz	50	45	45,8
Mineral AIN-76	35	35	35
Vitamina AIN-76	10	10	10
Bitartrato de colina	2	2	2
Vitamina E	0,05	0,05	0,05
TGA40S	0	5	0
8A8	0	0	4,2

25 Puesto que la cantidad ingerida diaria por rata era aproximadamente 20 g, la cantidad ingerida diaria de TGA40S por rata es 0,1 g. Puesto que 40% en peso de todos los ácidos grasos unidos a TGA40S es ácido araquidónico, esto significa que la cantidad ingerida diaria de ácido araquidónico por rata es 40 mg (el peso del esqueleto de glicerol se ignoró para simplificar los cálculos). Puesto que el peso molecular del TGA40S es 928,5 (calculado a partir del peso molecular medio de ácidos grasos) y el peso molecular de 8A8 es 628,7, la dieta de ensayo se diseño de modo que la cantidad ingerida diaria de ácido araquidónico por animal fuera 40 mg también en el grupo de la dieta de 8A8.

30 Se efectuó un ensayo de aprendizaje de laberinto de agua de Morris alrededor del tercer mes del experimento (edad de las ratas viejas: 21 meses, edad de las ratas jóvenes: 7 meses).

Como resultado de efectuar un ensayo de prueba, los tiempos empleados nadando alrededor de la posición en la que estaba la plataforma de escape como resultado de recordar la posición de la plataforma de escape (evaluados como la cantidad de tiempo (segundos) empleada en el cuadrante (1/4) en el que estaba la plataforma de escape

después de dividir el depósito de agua en cuatro cuadrantes) eran $28,59 \pm 5,44^a$, $13,27 \pm 7,89^b$, $22,02 \pm 5,35^c$ y $27,18 \pm 5,10^{ac}$ (valores: media \pm desviación estándar, a, b y c indican una diferencia significativa, entre diferentes letras ($P < 0,05$)) para el grupo YC, el grupo OC, el grupo OA y el grupo 8A8, respectivamente. Así, como resultado de administrar triglicérido que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, el grado de adquisición de aprendizaje que se disminuía debido al envejecimiento se mejoraba significativamente hacia el nivel de las ratas jóvenes. Con respecto a una comparación entre TGA40S y 8A8, 8A8 tenía la tendencia a dar como resultado un alto grado de adquisición de aprendizaje. Puesto que las cantidades de ácido araquidónico ingeridas por las ratas eran iguales tanto para el grupo OA como para el grupo 8A8, se indicaba que 8A8 se absorbía más fácilmente que TGA40S, y se demostró que era eficaz para lipasa pancreática para la que ha disminuido la actividad debido al envejecimiento.

10 Ejemplo 5

(Evaluación de la Adquisición de Aprendizaje de Triglicérido que Contiene al Menos 5% de 8A8 mediante un Ensayo del Laberinto de Agua de Morris)

Para los grupos de ensayo de ratas viejas, veinte ratas Fischer macho de 18 meses de edad se dividieron en tres grupos que consistían en un grupo de dieta de control (6 animales, grupo OC), un grupo de dieta de 8A8 (6 animales, grupo 8A8) y un grupo de dieta de aceite o grasa que contiene 8A8 (8 animales, grupo 8A8 (32% en moles)), y la dieta de control, la dieta de 8A8 y la dieta de aceite o grasa que contiene 8A8 mostradas en la Tabla 4 se administraron a cada grupo, respectivamente. La dieta de control mostrada en la Tabla 4 se administró a ocho ratas Fischer macho de 4 meses de edad que sirven como un grupo de control de ratas jóvenes (grupo YC). Además, el aceite o grasa (triglicéridos) que contiene 31,6% en moles de 8A8 obtenido en el Ejemplo 2 se usó como el aceite o grasa (triglicéridos) que contiene 8A8 usado para la dieta de aceite o grasa que contiene 8A8.

20 Tabla 4 Dietas de Ensayo

	Dieta de Control (g)	Dieta de 8A8 (g)	Dieta de aceite o grasa que contiene 8A8 (g)
Caseína	200	200	200
DL-metionina	3	3	3
Almidón de maíz	150	150	150
Sacarosa	500	500	500
Polvo de celulosa	50	50	50
Aceite de Maíz	50	45,8	45,8
Mineral AIN-76	35	35	35'
Vitamina AIN-76	10	10	10
Bitartrato de Colina	2	2	2
Vitamina E	0,05	0,05	0,05
8A8	0	4,2	0
Aceite que contiene 8A8	0	0	4,2

La dieta de 8A8 era igual que en el Ejemplo 4, y la cantidad ingerida diaria de ácido araquidónico por rata era 40 g. En el caso de la dieta de aceite o grasa (triglicéridos) que contiene 8A8, la cantidad ingerida diaria de ácido araquidónico por rata era 13,2 mg.

25 Un ensayo de aprendizaje de laberinto de agua de Morris se efectuó alrededor del tercer mes del experimento (edad de las ratas viejas: 21 meses, edad de las ratas jóvenes: 7 meses).

Como resultado de efectuar un ensayo de prueba, los tiempos empleados nadando alrededor de la posición en la que estaba la plataforma de escape como resultado de recordar la posición de la plataforma de escape (evaluados como la cantidad de tiempo (segundos) empleada en el cuadrante (1/4) en el que estaba la plataforma de escape después de dividir el depósito de agua en cuatro cuadrantes) eran $27,91 \pm 5,93^a$, $13,75 \pm 7,74^b$, $27,00 \pm 4,65^c$ y $21,18 \pm 4,89^c$ (valores: media \pm desviación estándar, a, b y c indican una diferencia significativa entre diferentes letras ($P < 0,05$)) para el grupo YC, el grupo OC, el grupo 8A8 y el grupo 8A8 (32% en moles), respectivamente. Así, como

resultado de administrar aceite o grasa (triglicéridos) que contiene al menos 5% de 8A8, el grado de adquisición de aprendizaje que se disminuía debido al envejecimiento se mejoraba significativamente hacia el nivel de las ratas jóvenes. Sin embargo, el grado de adquisición era claramente inferior que el grupo de la dieta de 8A8, demostrando que el grado de adquisición de aprendizaje depende de la concentración de 8A8 y, más específicamente, de la concentración de ácido araquidónico.

Ejemplo 6

(Preparación de Cápsulas que Contienen Aceite o grasa (Triglicéridos) que Contiene Ácido araquidónico)

100 partes en peso de gelatina y 35 partes en peso de glicerina usada como aditivo alimentario se disolvieron a 50-60°C mediante la adición de agua para preparar un revestimiento de gelatina que tiene una viscosidad de 2000 cp. Posteriormente, 0,05% en peso de aceite de vitamina E se mezcló en el aceite o grasa (triglicéridos) que contiene ácido araquidónico obtenido en el Ejemplo 1 para preparar el Contenido de Cápsula 1. 0,05% en peso de aceite de vitamina E se mezclaron en el aceite o grasa (triglicéridos) que contiene 32% en moles de 8A8 obtenido en el Ejemplo 2 para preparar el Contenido de Cápsula 2. 50% en peso del aceite o grasa (triglicéridos) que contiene ácido araquidónico obtenido en el Ejemplo 1 y 50% en peso de aceite de pescado (aceite de atún en el que las proporciones de ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico con respecto a la cantidad total de ácidos grasos eran 5,1% en peso y 26,5% en peso, respectivamente) se mezclaron seguido por una mezcladura en 0,05% en peso de aceite de vitamina E para preparar el Contenido de Cápsula 3. 80% en peso del aceite o grasa (triglicéridos) que contiene ácido araquidónico obtenido en el Ejemplo 1 y 20% en peso de aceite de pescado (aceite de atún en el que las proporciones de ácido eicosapentaenoico y ácido docosahexaenoico con respecto a la cantidad total de ácidos grasos eran 5,1% en peso y 26,5% en peso, respectivamente) se mezclaron seguido por una mezcladura en 0,05% en peso de aceite de vitamina E para preparar el Contenido de Cápsula 4. Las cápsulas se formaron y se secaron de acuerdo con métodos normales usando estos Contenidos de Cápsula 1 a 4 para producir cápsulas blandas que contienen 180 mg de contenido por cápsula.

Ejemplo 7

(Aplicación a un Agente de Infusión de Grasas)

Después de añadir 400 g del aceite o grasa (triglicéridos) que contiene 32% en moles de 8A8 obtenido en el Ejemplo 2, 48 g de lecitina de yema de huevo purificada, 20 g de ácido oleico, 100 g de glicerina y 40 ml de hidróxido sódico 0,1 N y dispersar con un homogeneizador, se añadió agua destilada para inyección para llevar hasta un volumen de 4 litros. Esto se emulsificó a continuación con un emulsificador de pulverización a alta presión para preparar un látex lipídico. Después de añadir partes alícuotas de 200 ml de este látex lipídico a bolsas de plástico, las bolsas de plástico se esterilizaron mediante vapor de agua a alta presión durante 20 minutos a 121°C para obtener agentes de infusión de grasas.

Ejemplo 8

(Aplicación a un Zumo)

35 2 g de β -ciclodextina se añadieron a 20 ml de solución acuosa de etanol al 20% seguido por la adición de 100 mg de los triglicéridos que contienen ácido araquidónico (que contienen 0,05% en peso de vitamina E) obtenidos en el Ejemplo 1 mientras se agitaba con un agitador y se incubaba durante 2 horas a 50°C. Después de dejarse enfriar hasta temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora), la mezcla se incubó adicionalmente durante 10 horas a 4°C mientras continuaba la agitación. Después de recuperar el precipitado resultante mediante separación centrifuga y lavado con n-hexano, el producto se liofilizó para obtener 1,8 g de un compuesto de inclusión de ciclodextrina que contiene triglicéridos que contienen ácido araquidónico. 1 g de este polvo se mezcló uniformemente a continuación con 10 l de zumo para preparar un zumo que contiene triglicéridos que contienen ácido araquidónico.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende como ingrediente activo ácido araquidónico y/o un compuesto que tiene ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, para la prevención o mejora de síntomas de memoria disminuida o 5 capacidad de aprendizaje disminuida provocadas por una función cerebral disminuida.
2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dicho ingrediente activo es un éster alcohólico de ácido araquidónico, o un triglicérido, fosfolípido o glicolípido en el que la totalidad o una porción de los ácidos grasos 10 constituyentes son ácido araquidónico.
3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende dicho triglicérido, en el que ácidos grasos de 15 cadena media están unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2.
4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en la que 5% en moles o más de triglicérido total es dicho triglicérido en el que ácidos grasos de cadena media están unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2.
5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en la que dichos ácidos grasos de cadena media se 20 seleccionan de ácidos grasos que tienen 6 a 12 átomos de carbono.
6. Una composición de acuerdo con la reivindicación 5, en la que dichos ácidos grasos de cadena media se seleccionan de ácidos grasos que tienen 8 átomos de carbono.
7. Una composición de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende dicho triglicérido en el que la totalidad o una 25 porción de los ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico.
8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, en la que la proporción de ácido araquidónico en dicho triglicérido es 10% en peso o más, con relación a todos los ácidos grasos que componen el triglicérido.
9. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7 o la reivindicación 8, en la que dicho triglicérido se extrae de 30 un microorganismo perteneciente al género *Mortierella*.
10. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, en la que dicho triglicérido está sustancialmente libre de ácido eicosapentaenoico.
11. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la cantidad de ácido 35 eicosapentaenoico no supera un quinto de la cantidad de ácido araquidónico de la composición.
12. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, que comprende adicionalmente ácido docosahexaenoico y/o un compuesto que tiene ácido docosahexaenoico como un ácido graso constituyente.
13. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12, en la que dicho compuesto que tiene ácido 40 docosahexaenoico como un ácido graso constituyente es un éster alcohólico de ácido docosahexaenoico o un triglicérido, fosfolípido o glicolípido en el que la totalidad o una porción de los ácidos grasos constituyentes son ácido docosahexaenoico.
14. Una composición de acuerdo con la reivindicación 12 o 13, en la que la relación en peso de ácido araquidónico a 45 ácido docosahexaenoico en la combinación de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico está en el intervalo 0,1 a 15.
15. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en la que dichos síntomas son síntomas en la depresión o la demencia.
16. Una composición de acuerdo con la reivindicación 15, en la que la demencia es demencia de Alzheimer o 50 demencia cerebrovascular.
17. Una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, que es una composición farmacéutica.
18. Una composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 17, que es para administración oral a de 0,1 a 2 g al día, determinada como ácido araquidónico.
19. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en donde la composición es una 55 composición alimentaria.
20. Una composición alimentaria de acuerdo con la reivindicación 19 cuando depende de la reivindicación 3, en donde la composición alimentaria contiene 0,001% o más en peso del triglicérido en el que ácidos grasos de cadena media están unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico está unido en la posición 2.

21. Una composición alimentaria de acuerdo con la reivindicación 19 o 20, que es un suplemento nutricional o un alimento geriátrico.

Fig.1

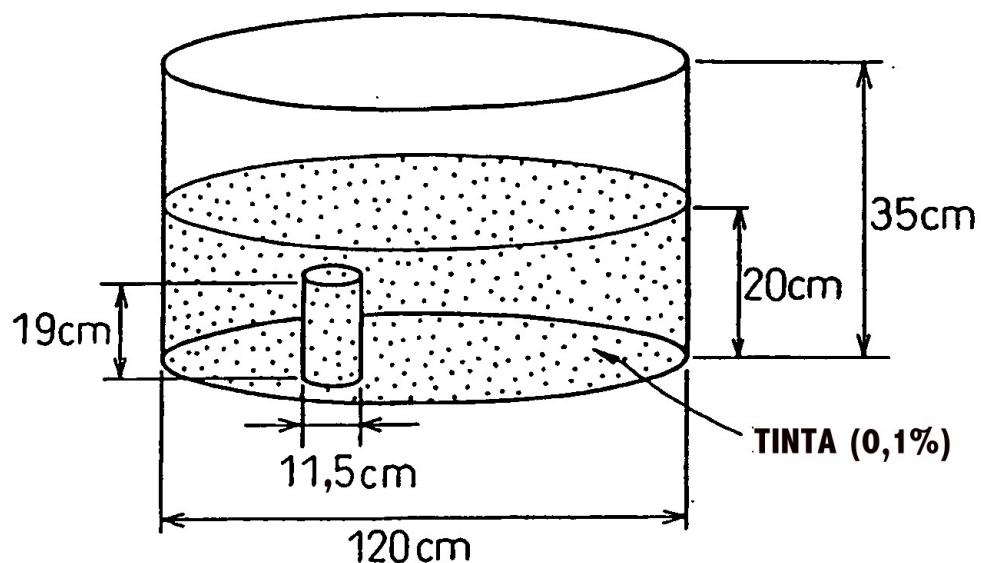


Fig.2

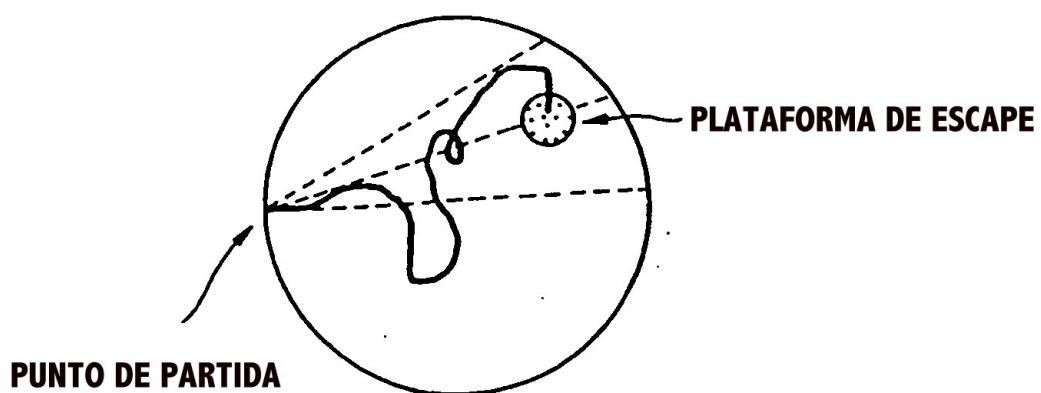


Fig.3

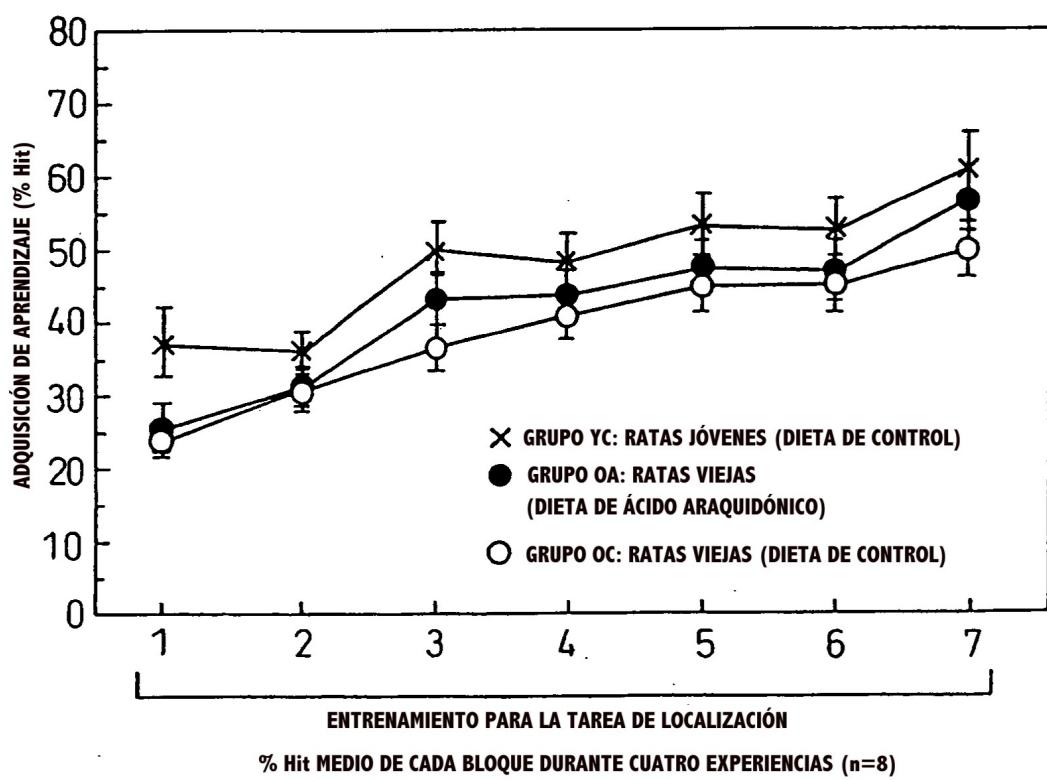
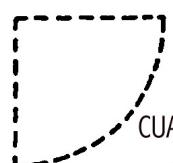
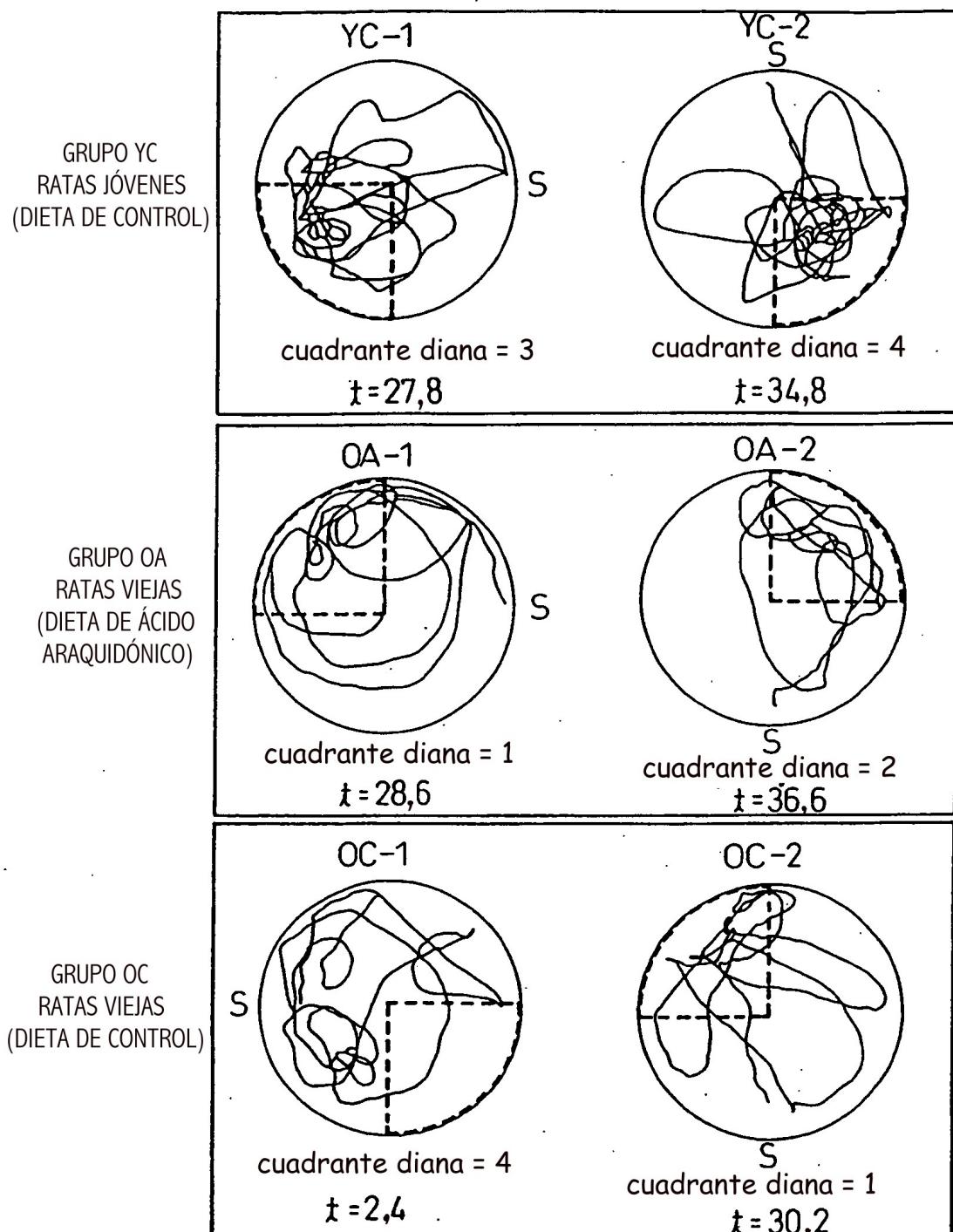


Fig.4



CUADRANTE (1/4) EN EL QUE HABÍA ESTADO LA PLATAFORMA DE ESCAPE

Fig. 5

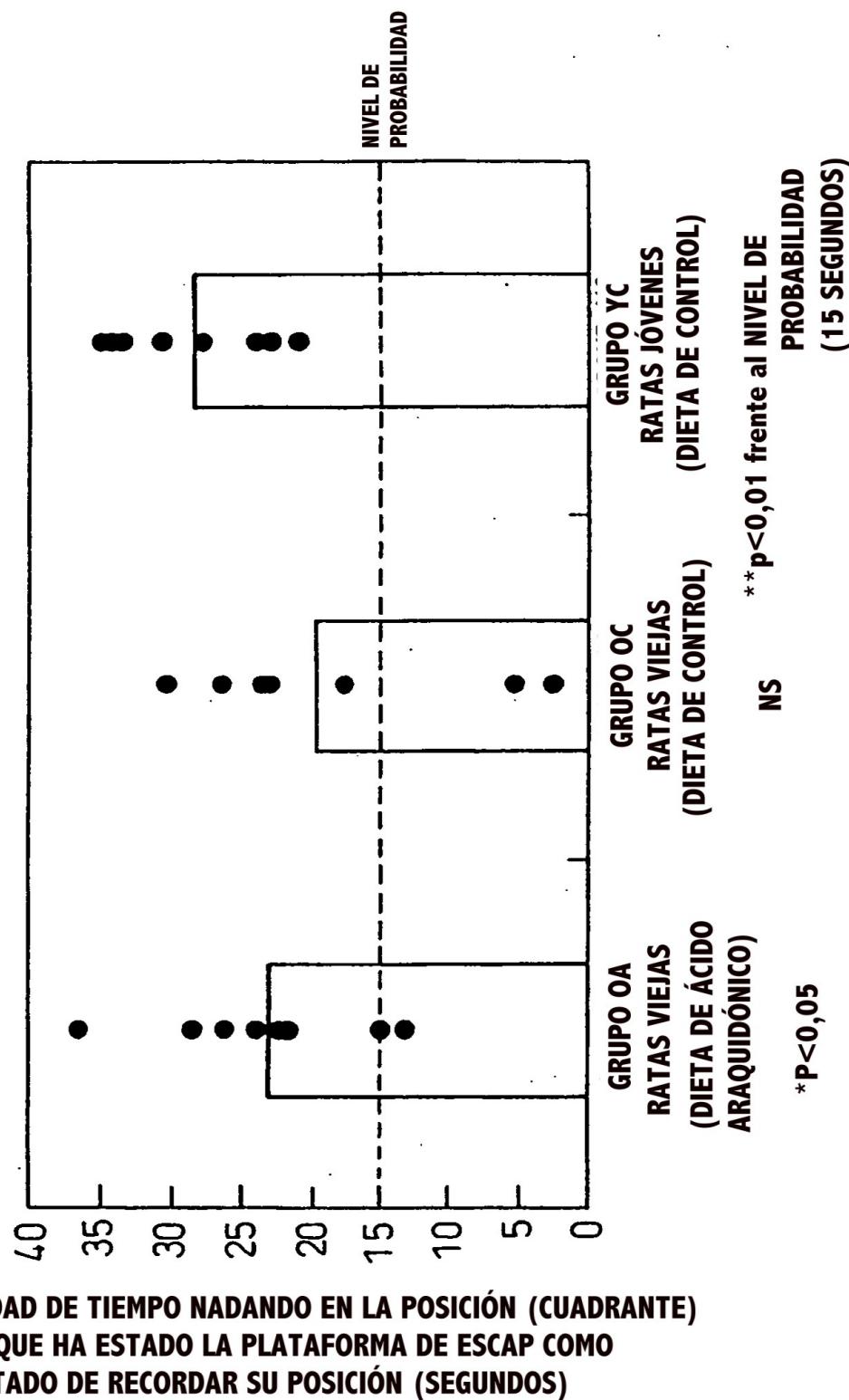


Fig.6

