

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 424 989**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/202** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A23L 1/30** (2006.01)

12

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.09.2003 E 03748553 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 1542670**

54 Título: **Composición que contiene ácido araquidónico solo o en combinación con ácido docosahexaenoico para potenciar las capacidades cognitivas en adultos**

30 Prioridad:

**24.09.2002 JP 2002277305**

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

**10.10.2013**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**AKIMOTO, KENGO y  
KOGA, YOSHIHIKO**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 424 989 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

Composición que contiene ácido araquidónico solo o en combinación con ácido docosahexaenoico para potenciar las capacidades cognitivas en adultos.

**Campo de la invención**

5 La presente invención proporciona alimentos y bebidas con efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, que contienen, como ingredientes activos, ácido araquidónico y/o compuestos con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, y un procedimiento para su producción. Más específicamente, la invención proporciona alimentos y bebidas con efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas de las capacidades cognitivas de una  
10 persona sana, del nivel de conciencia y/o de la capacidad discriminatoria con respecto a eventos seleccionados del grupo que consiste en estímulos auditivos, estímulos visuales, estímulos gustativos, estímulos olfativos y estímulos somatosensoriales, que contienen, como ingredientes activos, una o más especies seleccionadas del grupo que consiste en ácido araquidónico, ésteres de alcohol y ácido araquidónico y triglicéridos, fosfolípidos o glicolípidos que contienen ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente.

**Técnica fundamental**

El conocimiento es el proceso de seleccionar información del medio ambiente externo e identificarla claramente, y más específicamente, de transmitir estímulos externos tales como, estímulos visuales, auditivos, olfativos, gustativos y somatosensoriales al cerebro a través de órganos sensoriales y procesarlos e identificarlos con precisión por el funcionamiento coordinado de múltiples regiones del cerebro. Las capacidades cognitivas consisten en los dos  
20 factores siguientes: la velocidad de procesar la información (velocidad de transformación de estímulos externos) y la cantidad de recursos de procesamiento de la información (el nivel de asignación de recursos para procesar la información por estímulos externos), y por tanto se entiende que los efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, de acuerdo con la presente invención, se refieren a la prevención del deterioro, mejora o potenciación de las funciones normales, tales como atención, memoria, percepción, lenguaje, cálculo y similares, aunque son distintas de la mejora de una función deteriorada.

Se han investigado y desarrollado diversos agentes terapéuticos con relación a la función cognitiva deteriorada. Sin embargo, desafortunadamente aún no se han encontrado compuestos eficaces que prevengan el deterioro de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana o que las mejoren o potencien. Es decir, aunque se conocen métodos para determinar el deterioro de la función cognitiva y evaluar los efectos de mejora  
30 (véase, por ejemplo, Nishimura, T., Takeda, M., "*Diagnostic imaging of Alzheimer's dementia*", pp. 27-36, Medical View Publications (2/10/2001)), dichos métodos no permiten la evaluación de la prevención del deterioro ni la mejora o potenciación de las respuestas normales. Existe por tanto la necesidad de medios eficaces de evaluar objetivamente las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana con el fin de desarrollar e investigar objetivamente o fármacos para la prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana.

La atención se ha enfocado recientemente a los potenciales evocados cerebrales como un índice fisiológico que sirva como una evaluación objetiva de la capacidad cognitiva. Es posible registrar la actividad eléctrica exhibida por las neuronas a través de electrodos unidos al cuero cabelludo humano. Se conocen generalmente ondas cerebrales de fondo como actividad eléctrica continua que varía dependiendo del nivel de activación. También está presente un potencial de acción de acción minúscula transitoria que varía en relación con un evento especificable dado. Estos potenciales de acción se denominan comúnmente "potenciales evocados cerebrales", y se interpretan como los potenciales inducidos por estímulos internos o externos. Los potenciales evocados cerebrales, una variación de potencial minúscula de aproximadamente 0,1  $\mu\text{V}$  a varias decenas de  $\mu\text{V}$ , están compuestos de una serie de ondas positivas y ondas negativas. La onda positiva, que aparece próxima a 300 milisegundos para el evento de estímulo entre esta serie de variación de potencial, está asociada con la función cognitiva y se denomina P300. El momento de aparición de P300 para un evento de estímulo se denomina latencia de P300 y representa la velocidad de procesamiento de la información (velocidad de transformación de los estímulos externos), mientras que la altura del pico desde la línea base se denominada amplitud de P300 y representa la cantidad de los recursos de procesamiento de la información (el nivel de asignación de recursos para el procesamiento información por los estímulos externos) (véase, por ejemplo, Mitamura, S., "*Current Therapy*", Vol. 18, N° 4, pp. 618-621, Life Medicom (2/10/2001)). Por tanto, ha  
40 llegado a ser posible medir objetivamente las respuestas cognitivas humanas midiendo los potenciales evocados cerebrales.

Los estímulos externos se transmiten al cerebro a través de los órganos sensoriales, y el cerebro es el tejido similar a una masa adiposa, consistiendo alrededor de 1/3 de la materia blanca y 1/4 de la materia gris en fosfolípidos. Debido a que la mayoría de los ácidos grasos poliinsaturados de los fosfolípidos que constituyen las membranas celulares del cerebro son ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico, se ha sugerido que estos ácidos grasos poliinsaturados pueden desempeñar algún papel en mejorar las capacidades del aprendizaje y la memoria e prevenir o mejorar la demencia senil. El ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico no se pueden sintetizar *de novo* en  
55

- animales y por tanto deben ser ingeridos de alimentos bien sea directa o indirectamente (como ácido linoleico precursor de ácido araquidónico o ácido  $\alpha$ -linolénico precursor de ácido docosahexaenoico). Por tanto, se ha enfocado mucho la atención en los efectos mejoradores sobre el aprendizaje y la memoria y en los efectos preventivos y mejoradores sobre la demencia senil suministrando externamente ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico. El ácido docosahexaenoico se encuentra abundantemente en fuentes de aceite de pescado y se ha realizado mucha investigación sobre sus efectos de mejora de la función cerebral, aunque se han descrito invenciones respecto a su uso en reforzadores de la capacidad de aprendizaje, reforzadores de la memoria, agentes para la prevención de la demencia, agentes para tratamiento de la demencia, agentes anti-demencia o alimentos funcionales con efectos de mejora de la función cerebral (véase, por ejemplo, la publicación de patente japonesa no examinada N° 7-82146, la publicación de patente japonesa no examinada N° 5-117147 y la publicación de patente japonesa no examinada N° 2-49723). Además, los autores de la presente invención han mostrado recientemente que el ácido araquidónico y/o compuestos que contienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente mejoran, el deterioro de la capacidad de aprendizaje relacionado con la edad, basándose en los resultados de administrar ácido araquidónico y/o un compuesto que comprende ácido araquidónico como un ácido graso constituyente a animales envejecidos sometidos al ensayo del laberinto de agua de Morris, como se describe en la publicación de patente japonesa no examinada N° 2003-48831, que fue publicada el 21 de febrero de 2003, titulada "*Composición que tiene efectos de impedir o mejorar estados o enfermedades causados por hipofunción cerebral*". Sin embargo, esta invención particular está dirigida a la deterioro de la función cerebral y no describe nada en relación con los efectos sobre las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana.
- Se han realizado algunos intentos para determinar los efectos mejoradores de diversos compuestos sobre la respuesta cognitiva basándose en los potenciales evocados cerebrales. Miyanaga, K. examinó la acción farmacológica del ácido docosahexaenoico (DHA) sobre la función cerebral, midiendo los potenciales evocados cerebrales antes y después de administrar por vía oral cápsulas que contenían 2400 mg de DHA a 26 sujetos sanos, y descubrió que se acortó significativamente la latencia de P300 y se aumentó significativamente la amplitud de P300 (véase Miyanaga, K., "Shoku no Kagaku" [*Food Science*] pp. 84-96, Korin Books (1999)). Sin embargo, debido a una falta de resultados comparativos con muestras de placebo, no se pudo establecer una correlación entre los niveles de DHA en sangre y los resultados de P300. En un ensayo de administración prolongada con administración diaria de cápsulas que contenían 900 mg de DHA a 97 sujetos geriátricos sanos durante 6 meses, no se observó ningún cambio en la P300, siendo por tanto incierta la eficacia del DHA.
- Por tanto, aunque se considera que el ácido docosahexaenoico presenta un efecto mejorador sobre la capacidad de aprendizaje, el hecho de que no se encontraran resultados eficaces en términos de potenciales evocados cerebrales como un índice de la capacidad cognitiva significa que sigue sin estar claro si el ácido araquidónico y/o compuestos con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente son o no son eficaces para la prevención del deterioro, mejora y potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana.
- McGahon et al., (*Neuroscience*, Vol. 94 N° 1, pp. 305-314, 1999) describen el enriquecimiento de la dieta con ácidos grasos  $\omega$ -3, en particular DHA, en ratas. Dicho trabajo muestra alguna mejora en el deterioro relacionado con la edad de la potenciación a largo plazo del hipocampo en ratas alimentadas con una dieta enriquecida con ácidos grasos  $\omega$ -3, en particular DHA, en aceite de atún.

### Descripción de la invención

#### 40 Problemas que ha de resolver la invención

- Por consiguiente se ha deseado intensamente desarrollar compuestos que prevengan el deterioro, la mejora o la potenciación de las respuestas normales de la velocidad de procesamiento de la información (velocidad de transformar los estímulos externos) y la cantidad de los recursos de procesamiento de la información (el nivel de asignación de recursos para procesar la información por estímulos externos), como los dos factores de las capacidades cognitivas, y que sean altamente adecuados para productos farmacéuticos, así como productos alimenticios, con mínimos efectos secundarios.

#### Medios para resolver los problemas

- La presente invención proporciona, por tanto, composiciones de acuerdo con la reivindicación 1, alimentos y bebidas con efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, que contienen, como ingredientes activos, ácido araquidónico y/o compuestos con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente. Más específicamente, la invención proporciona composiciones, alimentos y bebidas con efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, del nivel de conciencia y/o de la capacidad discriminatoria con respecto a eventos (estímulos auditivos, estímulos visuales, estímulos gustativos, estímulos olfativos y estímulos somatosensoriales), que contiene como ingredientes activos una o más especies seleccionadas del grupo que consiste en ácido araquidónico, ésteres de alcohol y ácido araquidónico y triglicéridos, fosfolípidos o glicolípidos, que comprenden ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente.

Como resultado de una investigación diligente con el fin de elucidar los efectos de la prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana por ácido araquidónico y/o compuestos que comprenden ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, los autores de la presente invención descubrieron sorprendentemente un efecto del ácido araquidónico y/o compuestos que comprenden ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, basándose en la evaluación que usa como índice los potenciales evocados cerebrales.

Los autores de la presente invención también tuvieron éxito en conseguir la producción microbiológica a escala industrial de triglicéridos que contenían, al menos 10 % en peso de ácido araquidónico, y elucidaron los efectos de dichos triglicéridos en ensayos de efectos de acuerdo con la invención.

Los autores de la invención tuvieron además éxito en conseguir la producción enzimática de aceites y grasas que contenían triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2, y elucidaron los efectos de dichos triglicéridos en ensayos de efectos de acuerdo con la invención.

La presente invención proporciona por tanto composiciones, alimentos y bebidas con efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, que contienen como ingredientes activos ácido araquidónico y/o compuestos con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente. Más específicamente, la invención proporciona alimentos y bebidas con efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, del nivel de conciencia y/o de la capacidad discriminatoria con respecto a eventos (estímulos auditivos, estímulos visuales, estímulos gustativos, estímulos olfativos y estímulos somatosensoriales), que contienen, como ingredientes activos, una o más especies seleccionadas del grupo que consiste en ácido araquidónico, ésteres de alcohol y ácido araquidónico y triglicéridos, fosfolípidos o glicolípidos que comprenden ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente.

De acuerdo con la invención es posible proporcionar alimentos y bebidas que tienen efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, que contienen, como ingredientes activos, ácido araquidónico y/o compuestos con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, siendo por tanto la invención particularmente útil en la sociedad moderna.

#### Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un gráfico de barras que muestra cambios en los niveles de ácido araquidónico en los fosfolípidos del suero antes y después de la ingestión de cápsulas con aceite comestible que contiene ácido araquidónico y cápsulas que contienen aceite de oliva (cápsulas placebo).

La Fig. 2 es un gráfico de líneas que muestra cambios en la latencia de P300 antes y después de la ingestión de cápsulas con aceite comestible que contiene ácido araquidónico y cápsulas que contienen aceite de oliva (cápsulas placebo).

La Fig. 3 es un gráfico de líneas que muestra cambios en la amplitud de P300 antes y después de la ingestión de cápsulas con aceite comestible que contiene ácido araquidónico y cápsulas que contienen aceite de oliva (cápsulas placebo).

La Fig. 4 es un par de gráficos de puntos que muestran la correlación entre P300 (latencia y amplitud de P300) y los niveles de ácido araquidónico en fosfolípidos del suero.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a composiciones, alimentos y bebidas con efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, que comprenden, como ingredientes activos, ácido araquidónico y/o compuestos con ácido araquidónico como ácido graso constituyente.

Las composiciones de la invención tienen efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana, o dicho de un modo diferente, tienen efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales del nivel de conciencia de una persona sana y tienen efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de la capacidad discriminatoria de una persona sana con respecto a eventos (estímulos auditivos, estímulos visuales, estímulos gustativos, estímulos olfativos y estímulos somatosensoriales), y son capaces de presentar sus efectos en alimentos o bebidas, productos farmacéuticos, cuasi-fármacos y similares. Los efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana son también eficaces como alimentos o bebidas, productos farmacéuticos y cuasi-fármacos diseñados con el fin de la prevención del deterioro, mejora o potenciación de las funciones normales, tales como atención, memoria, percepción, lenguaje, cálculo y similares, y como alimentos o bebidas, alimentos sanos, alimentos funcionales, alimentos especiales para el cuidado de la salud, alimentos para niños, alimentos para personas ancianas, etc., diseñados con el fin de

mantener o potenciar la concentración, mantener la atención, despejar la cabeza o estimular la mente, rejuvenecer y similares.

Los ingredientes activos de acuerdo con la invención pueden ser, en lugar del ácido araquidónico libre, cualesquiera compuestos que tengan ácido araquidónico como un ácido graso constituyente. Los compuestos que tienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente incluyen sales del ácido araquidónico, tales como sales cálcicas y sódicas o ésteres de alcohol y ácido araquidónico, tales como éster metílico del ácido araquidónico, éster etílico del ácido araquidónico y similares. También se pueden usar triglicéridos, diglicéridos, monoglicéridos, fosfolípidos o glicolípidos que contengan ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente.

Para la aplicación a un producto alimenticio el ácido araquidónico está preferiblemente en la forma de triglicéridos o fosfolípidos, y especialmente triglicéridos. Aunque virtualmente no se conocen fuentes naturales de triglicéridos que contengan ácido araquidónico (o triglicéridos que incluyan triglicéridos con ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente), los autores de la presente invención han tenido éxito en facilitar el uso industrial de triglicéridos que contienen ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, y han sido los primeros en elucidar el efecto del ingrediente activo de la invención en seres humanos por la administración prolongada a seres humanos y el análisis de los potenciales evocados cerebrales que permiten la evaluación objetiva de las capacidades cognitivas, y en demostrar que tiene un efecto de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana.

De acuerdo con la presente invención, por tanto, se pueden usar triglicéridos que incluyan triglicéridos en los que parte o la totalidad de los ácidos grasos constituyentes son ácido araquidónico como el ingrediente activo de la invención (triglicéridos que contienen ácido araquidónico). Para aplicación a productos alimenticios, los triglicéridos que contienen ácido araquidónico están preferiblemente en la forma de aceites o grasas (triglicéridos) en donde la proporción de ácido araquidónico es al menos 20 % en peso (p/p), preferiblemente al menos 30 % en peso y más preferiblemente al menos 40 % en peso de los ácidos grasos totales de los triglicéridos. De acuerdo con la invención, por tanto, se pueden usar aceites o grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico obtenidos cultivando microbios capaces de producirlos.

Como ejemplos de microbios capaces de producir aceites o grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico pueden mencionarse microbios que pertenecen a los géneros *Mortierella*, *Conidiobolus*, *Pythium*, *Phytophthora*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Rhodotorula*, *Entomophthora*, *Echinosporangium* o *Saprolegnia*. Como microbios que pertenecen al género *Mortierella* subgénero *Mortierella* se pueden mencionar *Mortierella elongata*, *Mortierella exigua*, *Mortierella hygrophila*, *Mortierella alpina* y similares. Específicamente, pueden mencionarse cepas tales como *Mortierella elongata* IFO8570, *Mortierella exigua* IFO8571, *Mortierella hygrophila* IFO5941, *Mortierella alpina* IFO8568, ATCC16266, ATCC32221, ATCC42430, CBS219.35, CBS224.37, CBS250.53, CBS343.66, CBS527.72, CBS529.72, CBS608.70, CBS754.68, etc.

Estas cepas están todas disponibles sin restricción en el Institute for Fermentation, Osaka (IFO), The American Type Culture Collection (ATCC) y Centralbureau voor Schimmelcultures (CBS). Además, se puede usar la cepa *Mortierella elongata* SAM0219 (FERM P-8703) (FERM BP-1239) aislada del suelo por el grupo de investigación de los autores de la presente invención.

Para el cultivo de las cepas usadas para la invención, las esporas, hifas o células de una solución del cultivo de semillas obtenidas por precultivo se inoculan en un medio líquido o sólido para el cultivo principal. En el caso de un medio líquido, la fuente de carbono usada puede ser una cualquiera de las comúnmente usadas, tales como glucosa, fructosa, xilosa, sacarosa, maltosa, almidón solubilizado, melazas, glicerol o manitol, aunque no hay limitación a las mencionadas. Como fuentes de nitrógeno se pueden usar fuentes orgánicas de nitrógeno, incluyendo fuentes naturales de nitrógeno, tales como peptona, extracto de levadura, extracto de malta, extracto de carne, casaminoácidos, líquido de maceración de maíz, proteína de soja, soja desgrasada, harina de semilla de algodón o similares, así como urea, y fuentes inorgánicas de nitrógeno, tales como nitrato sódico, nitrato amónico y sulfato amónico. Si es necesario, se pueden usar también fuentes de nutrientes trazas que incluyen sales inorgánicas, tales como sales de ácido fosfórico, sulfato de magnesio, sulfato de hierro y sulfato de cobre o vitaminas. Estos componentes del medio de cultivo no están particularmente restringidos, siempre y cuando se encuentren en concentraciones que no inhiban el crecimiento de los microbios. En la práctica, la fuente de carbono se añadirá generalmente en una cantidad total de 0,1-40 % en peso (p/v) y preferiblemente 1-25 % en peso (p/v). La adición inicial de la fuente de nitrógeno puede estar en el intervalo de 0,1-10 % en peso (p/v) y preferiblemente 0,1-6 % en peso (p/v), con más adición de fuente de nitrógeno durante el cultivo, si se desea.

Los aceites o grasas (triglicéridos) que contienen al menos 45 % en peso (p/p) de ácido araquidónico se pueden preparar como el ingrediente activo de la invención controlando la concentración de la fuente de carbono en el medio. El cultivo produce células en la fase de crecimiento hasta el día 2-4 del cultivo, y células en la fase de acumulación de aceite/grasa después de los días 2-4 del cultivo. La concentración inicial de la fuente de carbono es 1-8 % en peso y preferiblemente 1-4 % en peso, y la fuente de carbono se añade sucesivamente solo durante los periodos iniciales de la fase crecimiento celular y la fase de acumulación de aceite/grasa, hasta una adición total sucesiva de la fuente de carbono de 2-20 % en peso y preferiblemente 5-15 % en peso. La adición sucesiva de la fuente de carbono durante los periodos iniciales de la fase de crecimiento celular y la fase de acumulación de

aceite/grasa se basa en la concentración inicial de la fuente de nitrógeno, para una concentración de fuente de carbono de cero en el medio a partir del 7º día de cultivo, preferiblemente a partir del 6º día de cultivo y más preferiblemente a partir del 4º día de cultivo, para obtener aceites o grasas (triglicéridos) que comprenden al menos 45 % en peso de ácido araquidónico, como ingrediente activo de acuerdo con la invención.

5 La temperatura de cultivo para el microbio productor del ácido araquidónico variará dependiendo del microbio, pero puede ser 5-40°C y preferiblemente 20-30°C, o las células se pueden cultivar a 20-30°C para el crecimiento y continuar el cultivo a 5-20°C para producir ácidos grasos insaturados. Dicha gestión de la temperatura se puede usar también para aumentar la proporción de ácidos grasos poliinsaturados entre los ácidos grasos producidos. El pH del medio puede ser 4-10 y preferiblemente 5-9, y el método de cultivo puede ser cultivo sumergido, cultivo agitado o cultivo estacionario. El cultivo se realizará usualmente durante 2-30 días, preferiblemente durante 5-20 días y más preferiblemente durante 5-15 días.

15 Como medio para aumentar la proporción de ácido araquidónico en los aceites o grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico, distinto de controlar la concentración de la fuente de carbono en el medio, los aceites o grasas que contienen ácido araquidónico se pueden hidrolizar selectivamente para obtener aceites o grasas ricos en ácido araquidónico. Las lipasas usadas para la hidrólisis selectiva no son específicas para las posiciones de los triglicéridos y, como la actividad hidrolítica es menor en proporción al número de dobles enlaces, se hidrolizan enlaces de ésteres de ácidos grasos distintos de los ácidos grasos poliinsaturados. Por otra parte, se produce una transesterificación entre los triglicéridos de ácidos grasos poliinsaturados (abreviadamente PUFA por la expresión inglesa *Polyunsaturated Fatty Acids*) producidos, dando como resultado triglicéridos con mayor contenido de ácidos grasos poliinsaturados (véase, por ejemplo, *Enhancement of Arachidonic Acid: Selective Hydrolysis of a Single-Cell Oil from Mortierella with Candida cylindracea lipase*", J. Am. Oil Chem. Soc., 72, pp. 1323-1327, AOCS Press (1998)). Por tanto, los aceites o grasas (triglicéridos) ricos en ácido araquidónico obtenidos por hidrólisis selectiva de aceites o grasas que contienen ácido araquidónico se pueden usar como ingredientes activos de acuerdo con la invención. Se prefiere una mayor proporción de ácido araquidónico con respecto a los ácidos grasos totales en los aceites o grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico de la invención para minimizar los efectos de los otros ácidos grasos, pero no hay restricción a una alta proporción y, en la práctica, la cantidad absoluta de ácido araquidónico puede plantear un problema para la aplicación a los productos alimenticios, aunque en la práctica se pueden usar los aceites o grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico en 10 % en peso o más.

30 Como triglicéridos que comprenden ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente de acuerdo con la invención se pueden usar triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2. También se pueden usar aceites o grasas (triglicéridos) que comprenden al menos 5 % en moles, preferiblemente al menos 10 % en moles, más preferiblemente al menos 20 % en moles y más preferiblemente al menos 30 % en moles de triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2. Los ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 de los triglicéridos se pueden seleccionar entre ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono. Como ejemplos de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono se pueden mencionar ácido caprílico y ácido cáprico, prefiriéndose el 1,3-capriloil-2-araquidonoil-glicerol (denominado en lo sucesivo "8A8").

40 Los triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2 son más adecuados como aceites o grasas (triglicéridos) para personas ancianas. Los aceites o grasas (triglicéridos) ingeridos son hidrolizados usualmente por las lipasas pancreáticas al entrar en el intestino delgado, y puesto que las lipasas pancreáticas son un tipo específico de las posiciones 1,3, dichas posiciones 1,3 de los triglicéridos se escinden produciendo dos moléculas de ácido graso libre al mismo tiempo que se produce una molécula de 2-monoacilglicérido (MG). Debido a que el 2-MG tiene una solubilidad muy alta en ácidos biliares y es altamente absorbible, los ácidos grasos de la posición 2 se considera que son los mejor absorbidos. Además, el 2-MG presenta una acción tensioactiva cuando se disuelve en ácidos biliares, y por tanto actúa aumentando la absorción de los ácidos grasos libres. Los ácidos grasos libres y el 2-MG forman entonces micelas de complejo de ácidos biliares con colesterol o fosfolípidos y son absorbidos por las células epiteliales del intestino, dando como resultado una nueva síntesis de triacilgliceroles y finalmente la liberación en la linfa como quilomicrones. Sin embargo, las propiedades de los ácidos grasos en relación con las lipasas pancreáticas son mejores que la de los ácidos grasos saturados, mientras que el ácido araquidónico se escinde menos eficientemente. Un problema adicional es que la actividad de la lipasa pancreática es menor en personas ancianas, de modo que los aceites o grasas (triglicéridos) ideales son triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2.

55 Un proceso de producción específico para triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2 es un proceso de producción en el cual la lipasa se deja actuar solamente en los enlaces 1,3-éster de los triglicéridos en presencia de aceites o grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico y ácidos grasos de cadena media.

60 El aceite o grasa (triglicéridos) usado como material de partida consiste en triglicéridos con ácido araquidónico como ácido graso constituyente, y cuando la proporción de ácido araquidónico es alta con respecto a los ácidos grasos totales de los triglicéridos, se emplea una temperatura de 30-50°C y preferiblemente 40-50°C que es superior a la temperatura de reacción enzimática ordinaria de 20-30°C, con el fin de impedir la reducción en el rendimiento de la

reacción debido al aumento del aceite o grasa sin reaccionar (el material de partida de triglicérido y los triglicéridos en los que solo uno de los ácidos grasos en las posiciones 1,3 es un ácido graso de cadena media).

Como lipasas que actúan específicamente sobre los enlaces éster de las posiciones 1,3 de los triglicéridos pueden mencionarse las producidas por microbios que pertenecen al género *Rhizopus*, *Rhizomucor*, *Aspergillus* o similares, así como lipasas pancreáticas de cerdo. Dichas lipasas pueden estar comercialmente disponibles. Ejemplos de dichas lipasas incluyen lipasa de *Rhizopus delemanii* (Talipasa, producto de Tanabe Seiyaku), lipasa de *Rhizomucor miehei* (Ribozyme IM de Novo Nordisk Co., Ltd.) y lipasa de *Aspergillus niger* (Lipasa A, producto de Amano Enzyme Co., Ltd.), sin particular limitación a estas enzimas, se pueden usar cualesquiera lipasas de tipo específico de las posiciones 1,3.

10 La forma en la cual se usa la lipasa es preferiblemente como una lipasa inmovilizada en un soporte inmovilizante, con el fin de conferir estabilidad térmica a la enzima puesto que la temperatura de reacción es 30°C o superior y preferiblemente 40°C o superior para una mayor eficacia de reacción. Como soportes inmovilizantes se usan resinas altamente porosas y pueden mencionarse soportes de resinas de intercambio iónico con poros de al menos alrededor de 100 Angstroms, tales como Dowex MARATHON WBA (marca comercial de Dow Chemical).

15 Con respecto al soporte inmovilizante se ponen en suspensión en dicho soporte 0,5 a 20 veces el peso de solución acuosa de la lipasa de tipo específico de las posiciones 1,3, y se añaden lentamente con agitación una cantidad 2 a 5 veces de acetona fría (por ejemplo, -80°C) con respecto a la suspensión para formar un precipitado. El precipitado se seca bajo presión reducida para preparar la enzima inmovilizada. Como un método más sencillo se disuelve, una cantidad de 0,05 a 0,4 veces de la lipasa de tipo específico de las posiciones 1,3, con respecto al soporte inmovilizante, en una cantidad mínima de agua, y luego la solución se mezcla con agitación con el soporte inmovilizante y dicha mezcla se seca bajo presión reducida para preparar la enzima inmovilizada. Este método da como resultado la inmovilización de aproximadamente 90% de la lipasa sobre el soporte, pero sin exhibir absolutamente actividad de transesterificación, y por tanto la enzima inmovilizada puede ser activada y preparada para la producción más eficazmente por tratamiento previo en el sustrato (aceite o grasa y ácidos grasos de cadena media materia prima) que contiene 1 a 10 % en peso (p/v) de agua, y preferiblemente en el sustrato que contiene 1 a 3 % en peso de agua.

La cantidad de agua añadida al sistema de reacción es extremadamente importante dependiendo del tipo de enzima, puesto que la transesterificación no transcurrirá en ausencia de agua, mientras que un exceso de agua causa hidrólisis y un rendimiento reducido de glicérido (produciéndose diglicéridos y monoglicéridos por hidrólisis).

30 En tales casos, sin embargo, se puede usar la enzima inmovilizada activada por tratamiento previo para disminuir la importancia de la cantidad de agua añadida al sistema de reacción, permitiendo que la reacción de transesterificación ocurra eficientemente incluso en un sistema que no contenga agua. Además, el tipo de agente enzimático se puede seleccionar también para permitir la omisión del tratamiento previo.

35 Por tanto, usando una enzima inmovilizada resistente al calor y aumentando la temperatura de la reacción enzimática es posible producir eficientemente triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2 sin reducción en la eficiencia de la reacción, incluso en el caso de aceites o grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico con baja reactividad para las lipasas de tipo específico de las posiciones 1,3.

40 El proceso para la producción de alimentos y bebidas con efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de las capacidades cognitivas de una persona sana emplea ácido araquidónico y/o un compuesto con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente, solo o mezclado con un material alimenticio o bebida que no contenga esencialmente ácido araquidónico, o contenga solamente una cantidad traza de dicho ácido. En la presente memoria, "cantidad traza" significa que el ácido araquidónico está presente en el material alimenticio o bebida, pero en una cantidad que no llega a la ingesta diaria de ácido araquidónico de acuerdo con la invención, como se describe más adelante, si la composición alimenticia es ingerida por un individuo.

Los aceites y grasas (triglicéridos) que contienen ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente tienen posibilidades ilimitadas para uso como materias primas y aditivos en alimentos, bebidas, productos farmacéuticos y parafarmacéuticos. Además, no hay limitaciones sobre los fines o cantidades de su uso.

50 Como ejemplos de composiciones alimenticias pueden mencionarse productos alimenticios comunes, así como alimentos funcionales, complementos nutricionales, alimentos para lactantes o alimentos para personas ancianas. Como ejemplos de productos alimenticios que contienen aceites o grasas pueden mencionarse alimentos naturales que originalmente contienen aceites y grasas, tales como carne, pescado y frutos secos, productos alimenticios con aceites y grasas añadidos durante su preparación, tales como sopas, productos alimenticios que usan aceites o grasas como medios de calentamiento, tales como rosquillas, productos alimenticios oleosos o grasos, tales como mantequilla, productos alimenticios procesados con aceites o grasas añadidos durante el procesamiento, tales como pastas, o productos alimenticios pulverizados o revestidos con aceites o grasas durante el procesamiento final, tales como galletas duras. También se pueden añadir alimentos fermentados o bebidas que no contienen aceites o grasas. También pueden estar en la forma de productos alimenticios funcionales, productos farmacéuticos o

parafarmacéuticos, y por ejemplo, en la forma de nutrientes entéricos, polvos, gránulos, pastillas para chupar, soluciones, suspensiones, emulsiones, jarabes para vía oral o similares.

La composición de la invención también puede contener, además del ingrediente activo de la invención, diversos vehículos y aditivos comúnmente usados en alimentos y bebidas, productos farmacéuticos o parafarmacéuticos. En particular contiene preferiblemente antioxidantes para prevenir la oxidación del ingrediente activo de la invención. Como antioxidantes pueden mencionarse antioxidantes naturales, tales como tocoferoles, derivados de flavona, filolodulcina, ácido kójico, derivados de ácido gálico, catequinas, ácido fukiico, gossipol, derivados de pirazina, sesamol, guayacol, ácido guayaco, ácido p-cumárico, ácido nordihidroguayático, esteroides, terpenos, bases de ácidos nucleicos, carotenoides, lignanos y similares, y antioxidantes sintéticos, tales como éster ascórbico-palmitico, éster ascórbico-esteárico, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), mono-t-butilhidroquinona (TBHQ) y 4-hidroximetil-2,6-di-t-butilfenol (HMBP). Como tocoferoles pueden mencionarse  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -tocoferol,  $\gamma$ -tocoferol,  $\delta$ -tocoferol,  $\epsilon$ -tocoferol,  $\xi$ -tocoferol,  $\eta$ -tocoferol y ésteres de tocoferol (éster de tocoferol y ácido acético, etc.). Como ejemplos de carotenoides se pueden mencionar  $\beta$ -caroteno, cantaxantina, astaxantina y similares.

Como soportes para usar en la composición de la invención además del ingrediente activo de la invención, se pueden mencionar diversos tipos de soportes portadores, extendedores, diluyentes, cargas, agentes dispersantes, excipientes, aglutinantes, disolventes (por ejemplo, agua, etanol o aceites vegetales), adyuvantes de solubilización, tampones, aceleradores de disolución, agentes gelificantes, agentes de puesta suspensión, harina de trigo, harina de arroz, almidón, almidón de maíz, polisacáridos, proteínas de la leche, colágeno, aceite de arroz, lecitina y similares. Como ejemplos de aditivos se pueden mencionar vitaminas, edulcorantes, ácidos orgánicos, agentes colorantes, aromatizantes, agentes deshumidificantes, fibras, electrolitos, minerales, nutrientes, antioxidantes, conservantes, agentes aromáticos, humidificantes, extractos comestibles naturales, extractos vegetales y similares, aunque no hay limitación a los mencionados.

El principal componente medicinal del ácido araquidónico o del compuesto con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente es el ácido araquidónico. Se ha descrito que la ingesta diaria de ácido araquidónico a partir de alimentos es 0,14 g en la región de Kanto, Japón y 0,19-0,20 g en la región de Kansai, Japón (véase "Shishitsu Eiyogaku" [*Lipid Nutrition*] 4th, ed., de Japan Society for Lipid Nutrition Editing Committee, pp. 73-82 (1995) ISN 1343-4594 CODEN:SHEIFG), y por tanto el ácido araquidónico debe ser ingerido en una cantidad correspondiente o mayor. Por tanto, la ingesta diaria de ácido araquidónico o de un compuesto con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente de acuerdo con la invención para un adulto (de por ejemplo 60 kg de peso) es 0,001-20 g, preferiblemente 0,01-10 g, más preferiblemente 0,05-5 g y más preferiblemente 0,1-2 g, en términos de ácido araquidónico.

Cuando el ingrediente activo de la invención se usa realmente en un producto alimenticio o bebible, también es importante la cantidad absoluta de ácido araquidónico en el producto alimenticio. Sin embargo, puesto que la cantidad absoluta en el alimento o bebida varía también dependiendo de la cantidad de ingestión del alimento o bebida, el producto alimenticio contiene preferiblemente los triglicéridos que incluyen triglicéridos con ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente, en una cantidad de al menos 0,0003 % en peso, preferiblemente al menos 0,003 % en peso y más preferiblemente al menos 0,03 % en peso en términos de ácido araquidónico. Cuando se añaden a un alimento o bebida triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2, la cantidad de los triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido la posición 2 es al menos 0,001 % en peso, preferiblemente al menos 0,01 % en peso y más preferiblemente al menos 0,1 % en peso.

Cuando la composición de la invención se usa como producto farmacéutico, se puede producir por un método usual para fabricar medicamentos, por ejemplo, un método descrito en la Farmacopea japonesa o un método basado en ella.

Cuando la composición de la invención se usa como un producto farmacéutico, el contenido de ingrediente activo en la composición no está particularmente restringido siempre y cuando se consiga el objeto de la invención, y la proporción de mezcla pueda ser considerada apropiada.

Cuando la composición de la invención se usa como un producto farmacéutico, se administra preferiblemente en dosis unitarias, prefiriéndose particularmente la administración oral. Las dosis de la composición de la invención diferirán dependiendo de la edad, el peso y los síntomas del paciente y el número de veces administradas, y por ejemplo, el ácido araquidónico y/o el compuesto con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente de acuerdo con la invención puede ser administrado usualmente a alrededor de 0,001-20 g, preferiblemente a alrededor de 0,01-10 g, más preferiblemente a alrededor de 0,05-5 g y más preferiblemente a alrededor de 0,1-2 g en términos de ácido araquidónico al día para un adulto (de aproximadamente 60 kg), en dosis divididas de 1 a 3 veces al día.

Los ácidos grasos principales de las membranas fosfolipídicas del cerebro son ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico, y por tanto la composición de la invención es preferiblemente una combinación de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico para mantener el equilibrio. Generalmente hablando, el ácido araquidónico (ácido graso insaturado n-6) y el ácido docosahexaenoico (ácido graso insaturado n-3) son biosintetizados por la



misma enzima a partir del ácido linoleico y ácido  $\alpha$ -linolénico, respectivamente. Cuando el ácido araquidónico se administra solo, por tanto, se inhibe la biosíntesis de ácido docosahexaenoico. Inversamente, cuando se administra solo ácido docosahexaenoico, se inhibe la biosíntesis de ácido araquidónico. Con el fin de evitar dichos desequilibrios, se prefiere que el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico sean consumidos en combinación. Además, como la proporción de ácido icosapentaenoico es muy baja en las membranas fosfolipídicas del cerebro, la combinación preferiblemente no contiene virtualmente ácido icosapentaenoico. Por lo tanto, preferiblemente no contiene ácido icosapentaenoico, o solamente hasta 1%. La composición más preferiblemente no contiene virtualmente ácido icosapentaenoico con el ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico. La combinación de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico también tiene preferiblemente una relación de ácido araquidónico/ácido docosahexaenoico (en peso) en el intervalo de 0,1-15 y preferiblemente en el intervalo de 0,25-10. Los más preferidos son los alimentos y bebidas que contienen ácido icosapentaenoico en no más de 1/5 (en peso) del ácido araquidónico.

Las composiciones alimenticias de la invención para alimentos o bebidas, alimentos sanos, alimentos funcionales, alimentos saludables especiales, alimentos para personas ancianas y similares incluyen los que se comercializan usando recipientes para envases y/o herramientas de comercialización de composiciones alimenticias (por ejemplo, folletos o similares) que establecen o indican de otro modo que las composiciones y/o componentes de la composición tienen efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las capacidades cognitivas, o establecen de modo diferente, que tienen efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales del nivel de conciencia de una persona sana, efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de la capacidad discriminativa de una persona sana con respecto a eventos (estímulos auditivos, estímulos visuales, estímulos gustativos, estímulos olfativos y estímulos somatosensoriales) y efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las funciones normales, tales como atención, memoria, percepción, lenguaje, cálculo y similares, así como que tienen efectos de mantenimiento o mejora de la concentración, mantenimiento de la atención, despejamiento de la cabeza y estimulación de la mente, rejuvenecimiento y similares.

### Ejemplos

A continuación se explicará con mayor detalle la presente invención por medio de los siguientes ejemplos.

#### Ejemplo 1

Proceso de producción de triglicéridos con ácido araquidónico como ácido graso constituyente

Como cepa productora de ácido araquidónico se utilizó *Mortierella alpina*. Se preparó una porción de medio de 6 kL que contenía glucosa al 1,8%, harina de soja desgrasada al 3,1%, aceite de soja al 0,1%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0,3%,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  al 0,1%,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  al 0,05% y  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  al 0,05% en un recipiente de cultivo de 10 kL y el pH inicial se ajustó a 6,0. Después de sembrar 30 L de la solución de cultivo, se realizó el cultivo sumergido durante 8 días en condiciones de 26°C de temperatura, 360 m<sup>3</sup>/h de aireación y 200 kPa de presión interior. Se ajustó la agitación para mantener una concentración de oxígeno disuelto de 10-15 ppm. También se ajustó la concentración de glucosa del medio alimentándola de modo que estuviera en el intervalo de 1-2,5% hasta el 4º día y de 0,5-1% en adelante (siendo los porcentajes en peso (p/v)). Después de la finalización del cultivo, seguido de filtración y secado, se recogieron las células que contenían triglicéridos con ácido araquidónico como ácido graso constituyente, se obtuvo el aceite/grasa de las células obtenidas por extracción con hexano y el aceite/grasa comestible se sometió a una etapa de purificación (desgomado, desacidificación, destilación con arrastre de vapor de agua, decoloración) obteniéndose 150 kg de triglicéridos que contenían ácido araquidónico (estando el ácido araquidónico unido en cualquiera de las posiciones de los triglicéridos). El aceite/grasa (triglicérido) obtenido se metilesterificó y se analizó por cromatografía de gases el éster metílico del ácido graso resultante, lo que reveló una proporción de ácido araquidónico del 40,84% de los ácidos grasos totales. Los contenidos de ácido palmítico, ácido esteárico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido  $\gamma$ -linolénico y ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico fueron 11,63%, 7,45%, 7,73%, 9,14%, 2,23% y 3,27%, respectivamente. El aceite/grasa (triglicérido) que contenía ácido araquidónico se etilesterificó y se separó el 99% de éster etílico de ácido araquidónico y purificó de la mezcla de éster etílico de ácido graso que comprendía 40% de éster etílico de ácido araquidónico por cromatografía de líquidos de alta resolución usual.

#### Ejemplo 2

Producción de triglicéridos que incluían al menos 5% de triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2 (8A8)

Después de poner en suspensión 100 g de un soporte de resina de intercambio iónico (Dowex MARATHON WBA™: Dow Chemical) en 80 ml de solución acuosa al 12,5% de lipasa de *Rhizopus delemar* (Talipasa en polvo, producto de Tanabe Seiyaku), se secó la suspensión a presión reducida obteniéndose la lipasa inmovilizada.

A continuación, 80 g del triglicérido que contenía 40 % en peso del ácido araquidónico obtenido en el Ejemplo 1 (TGA40S), 160 g de ácido caprílico, 12 g de la lipasa inmovilizada antes mencionada y 4,8 ml de agua se hicieron reaccionar a 30°C durante 48 horas con agitación (130 rpm). Después de finalizar la reacción, se separó la mezcla de reacción obteniéndose la lipasa inmovilizada activada.

Se introdujo una porción de 10 g de la enzima inmovilizada (lipasa de *Rhizopus delemar*, soporte: Dowex MARATHON WBA™) en una columna de vidrio de doble pared (1,8 x 12,5 cm, 31,8 ml de volumen) y un aceite mixto que contenía el TGA40S obtenido en el Ejemplo 1 y se hizo pasar ácido caprílico en una proporción de 1:2 a través de la columna a un caudal fijo (4 ml/h) para conseguir una reacción continua obteniéndose 400 g de aceite/grasa reaccionado. La temperatura de la columna fue 40-41°C. Se separaron el ácido caprílico sin reaccionar y los ácidos grasos libres del aceite/grasa reaccionado por destilación molecular y el aceite/grasa comestible se sometió a una etapa de purificación (desgomado, desacidificación, destilación con arrastre de vapor de agua, decoloración) obteniéndose aceite/grasa (triglicéridos) que contenía 8A8. El contenido de 8A8 del aceite/grasa (triglicéridos) que contenía 8A8 obtenido fue 31,6% determinado por cromatografía de gases y cromatografía de líquidos de alta resolución. (Las proporciones de 8P8, 8O8, 8L8, 8G8 y 8D8 fueron 0,6, 7,9, 15,1, 5,2 y 4,8%, respectivamente. Los ácidos grasos P, O, L, G y D unidos al triglicérido en la posición 2 representan ácido palmítico, ácido oleico, ácido linoleico, ácido  $\gamma$ -linolénico y ácido dihomo- $\gamma$ -linolénico, respectivamente, 8P8 es 1,3-capriloil-2-palmitoleil-glicerol, 8O8 es 1,3-capriloil-2-oleoil-glicerol, 8L8 es 1,3-capriloil-2-linoleoil-glicerol, 8G8 es 1,3-capriloil-2- $\gamma$ -linoleoil-glicerol y 8D8 es 1,3-capriloil-2-dihomo- $\gamma$ -linoleoil-glicerol). La separación y purificación por cromatografía de líquidos de alta resolución de acuerdo con un protocolo establecido proporcionaron 96 por ciento en moles de 8A8 a partir del aceite/grasa (triglicéridos) que contenía 8A8 obtenido.

### Ejemplo 3

#### Producción de cápsulas de ensayo

Se añadió agua a 100 partes en peso de gelatina y 35 partes en peso de glicerina de calidad alimentaria para su disolución a 50-60°C para preparar un revestimiento de gelatina con una viscosidad de 2000 cp. A continuación, se mezcló aceite de vitamina E al 0,05 % en peso con aceite/grasa (triglicéridos) que contenía ácido araquidónico obtenido en el Ejemplo 1 para preparar el Contenido de relleno 1. Por separado, se mezcló aceite de vitamina E al 0,05 % en peso con aceite/grasa (triglicéridos) que contenía 32 por ciento en moles de 8A8 obtenido en el Ejemplo 2 para preparar el Contenido de relleno 2. El Contenido de relleno 1 se usó para moldear y secar cápsulas por un método usual de fabricación de cápsulas blandas que contenían 200 mg de relleno por cápsula (cápsulas de aceite comestible que contenían ácido araquidónico) mientras que el Contenido de relleno 2 se usó también para moldear y secar cápsulas por un método usual de fabricación de cápsulas blandas que contenían 200 mg de relleno por cápsula (cápsulas de aceite comestible que contenían 8A8). Se fabricaron también como cápsulas de placebo, cápsulas blandas que contenían aceite de oliva como contenido de relleno para un ensayo en seres humanos.

### Ejemplo 4

Ensayo de ingestión de cápsulas de aceite comestible que contenía ácido araquidónico para determinar los efectos sobre las respuestas cognitivas en individuos sanos

Los potenciales evocados (ERP) cerebrales se midieron por tareas audibles (o discriminación auditiva) de acuerdo con las directrices de medida de los potenciales evocados establecidas por el Comité de Normas para Examinar los Potenciales Evocados de la Sociedad Japonesa de Neurofisiología Clínica. Específicamente, se utilizó un paradigma infrecuente (*oddball*) auditivo para la medida del ERP en el que la estimulación de ambos oídos del sujeto de ensayo por dos tonos puros diferentes a frecuencias de 1000 Hz y 2000 Hz se realizó por medio de auriculares a una relación 1:4 y en orden aleatorio, instruyendo al sujeto para que presionara un botón, dispuesto al efecto, cuando oyera el tono a 2000 Hz y contara el número de veces oídas. La intensidad del tono fue 90 dB, la duración 100 milisegundos y el intervalo entre estímulos fue aleatorio entre 1000-3000 milisegundos. El número aproximado de estimulaciones en el ensayo real fue 200 por prueba y la duración del ensayo fue aproximadamente 10 minutos. El ensayo se realizó en 2 pruebas en las que se midieron los potenciales evocados cerebrales. Las electroencefalografías (EEG) se registraron usando electrodos de Ag-AgCl, cuya resistencia no es mayor que 5 k $\Omega$ , colocados en tres puntos a lo largo de la línea central del cuero cabelludo (Fz, Cz y Pz, según los desplazamientos internacionales 10-20) y los electrodos de referencia en ambos lóbulos de la oreja.

El potencial positivo máximo entre 250-600 milisegundos a partir del inicio de la simulación auditiva de baja frecuencia percibido (un tono a 2000 Hz en este experimento) se identificó como el componente intrínseco P300 que varía en la evaluación de la atención selectiva o la respuesta cognitiva, registrándose el tiempo desde el comienzo de la estimulación como la latencia de P300 (velocidad de transmisión de la estimulación) y la altura del potencial desde la línea base como la amplitud de P300 (la cantidad de recursos procesadores de la información).

El ensayo de la invención en seres humanos se realizó con la debida consideración siguiendo el espíritu de la Declaración de Helsinki.

Tras la explicación del consentimiento para la participación en el ensayo, 12 individuos sanos con edad para consentir (que no tomaban medicación, sin resultados anómalos en los análisis de sangre y sin infartos determinados por escáner craneal CT) se dividieron en dos grupos A y B (A: n=7, B: n=5). Durante un periodo de un mes, se le administró al Grupo A tres cápsulas de aceite comestible que contenía ácido araquidónico preparadas en el Ejemplo 3 (80 mg/cápsula de ácido araquidónico) para una ingesta diaria de ácido araquidónico de 240 mg, mientras que al Grupo B se le administró tres cápsulas de placebo. Se midieron los potenciales evocados cerebrales antes y después de la ingestión de las cápsulas y se analizaron la latencia y amplitud de P300. A continuación los

participantes de los Grupos A y B no ingirieron las cápsulas durante un periodo de lavado de un mes. Después del periodo de lavado, al Grupo A se le administró las cápsulas de placebo y al Grupo B se le administró las cápsulas de aceite comestible que contenía ácido araquidónico durante un mes y se midieron los potenciales evocados cerebrales antes y después de la ingestión de las cápsulas (ensayo de cruzamiento, doble ciego).

5 Se extrajo sangre en el momento de la medida de los potenciales evocados cerebrales y se extrajeron los lípidos totales del suero de cada participante por el método de Folch. Los lípidos se fraccionaron por cromatografía en capa fina, se recogió la fracción fosfolipídica, se separó el agua por destilación azeotrópica con etanol y se realizó el análisis por cromatografía de gases por conversión en éster metílico de ácido graso con HCl al 10%-metanol, para determinar el contenido de ácido araquidónico de los fosfolípidos del suero.

10 La Fig. 1 muestra los cambios de los contenidos de ácido araquidónico en fosfolípidos de suero antes y después de la ingestión de las cápsulas. El contenido de ácido araquidónico de los fosfolípidos del suero de sujetos que ingirieron cápsulas de aceite comestible que contenía ácido araquidónico aumentó significativamente después de la ingestión de cápsulas de aceite comestible que contenía ácido araquidónico, mientras que el contenido de ácido araquidónico de los fosfolípidos del suero de sujetos que ingirieron las cápsulas de placebo no varió antes y después  
15 de la ingestión de las cápsulas de placebo.

Las Fig. 2 y Fig. 3 muestran cambios en la latencia y amplitud de P300 antes y después de la ingestión de las cápsulas. La latencia de P300 era significativamente más corta en 12,3 milisegundos y la amplitud de P300 era significativamente mayor en 1,9  $\mu$ V con la ingestión de las cápsulas de aceite comestible que contenía ácido araquidónico en comparación con las cápsulas de placebo. Se conocen (Goodin DS et al., 1978) un acortamiento normal de la latencia de P300 de 1,8 milisegundos/año y una disminución de la amplitud de P300 de 0,2  $\mu$ V/año y por consiguiente los resultados de este ensayo indican un rejuvenecimiento medio de las respuestas cognitivas de los sujetos de 6,8 años, basándose en la latencia de P300, y de 9,5 años, basándose en la amplitud de P300.

A continuación se determinó la correlación entre P300 (latencia de P300 y amplitud de P300) y el nivel de ácido araquidónico en el suero (fosfolípidos) por una curva de primer orden basada en el método de mínimos cuadrados usando un total de 48 datos obtenidos midiendo 4 veces cada uno de 12 sujetos (Fig. 4). Para la latencia de P300, se encontró una correlación significativa (coeficiente de correlación  $R = -0,27$ ) entre los niveles de ácido araquidónico, resultando latencias más cortas con mayores niveles de ácido araquidónico. Así mismo, para la amplitud de P300, se encontró una correlación significativa (coeficiente de correlación  $R = -0,49$ ) entre los niveles de ácido araquidónico, resultando mayores amplitudes de P300 con mayores niveles de ácido araquidónico. Esto  
20 constituye la primera demostración de mejora de la respuesta cognitiva por ingestión de aceite comestible que contiene ácido araquidónico y la primera prueba de que el ácido araquidónico es la causa del efecto.

#### Ejemplo 5

Ensayo de ingestión de cápsulas de aceite comestible que contenía 8A8 para determinar los efectos sobre las respuestas cognitivas en individuos sanos

35 Tras la explicación del consentimiento para la participación en el ensayo de la misma manera que en el Ejemplo 4, 16 individuos sanos con edad para consentir (que no tomaban medicación, sin resultados anómalos en los análisis de sangre y sin infartos determinados por escáner craneal CT) se dividieron en dos grupos A y B ( $n=8$  para cada grupo). Durante un período de un mes, se le administró al Grupo A tres cápsulas de aceite comestible que contenía 8A8 preparadas en el Ejemplo 3 (72 mg/cápsula de ácido araquidónico) mientras que al Grupo B se le administró tres cápsulas de placebo y midiendo los potenciales evocados cerebrales y registrando la latencia y amplitud antes y después de la ingestión de las cápsulas (ensayo doble ciego), se encontró que la latencia de P300 era significativamente más corta en 16,3 milisegundos y la amplitud de P300 aumentó significativamente en 2,4  $\mu$ V debido a la ingestión de las cápsulas de aceite comestible que contenía 8A8. Estos resultados indican un rejuvenecimiento medio de las respuestas cognitivas de los sujetos de 9,1 años, basados en la latencia de P300, y de 12,0 años, basados en la amplitud de P300.  
40  
45

#### Ejemplo 6

Preparación de cápsulas que contenían aceite/grasa (triglicéridos) con ácido araquidónico como ácido graso constituyente

Se añadió agua a 100 partes en peso de gelatina y 35 partes en peso de glicerina de calidad alimentaria para su disolución a 50-60°C para preparar un revestimiento de gelatina con una viscosidad de 2000 cp. A continuación, 50% en peso del aceite/grasa (triglicéridos) que contenía ácido araquidónico obtenido en el Ejemplo 1 se mezcló con 50% en peso de aceite de pescado (aceite de atún que comprendía ácido icosapentaenoico y ácido docosahexaenoico en proporciones de 5,1% y 26,5%, respectivamente, de los ácidos grasos totales) y esta mezcla se combinó con 0,05% en peso de aceite de vitamina E para preparar el Contenido de relleno 3. Por separado, se  
50 mezcló 80% en peso del aceite/grasa (triglicéridos) que contenía ácido araquidónico con 20% en peso de aceite de pescado (aceite de atún que comprendía ácido icosapentaenoico y ácido docosahexaenoico en proporciones de 5,1% y 26,5%, respectivamente, de los ácidos grasos totales) y esta mezcla se combinó con 0,05% en peso de aceite de vitamina E para preparar el Contenido de relleno 4. El 99% del éster etílico de ácido araquidónico obtenido  
55

en el Ejemplo 1 se combinó también con 0,05% en peso de aceite de vitamina E para obtener el Contenido de relleno 5. Los Contenidos de relleno 3-5 se usaron para moldear y secar las cápsulas por un método usual de fabricación de cápsulas blandas que contenían 200 mg de relleno por cápsula.

#### Ejemplo 7

##### 5 Uso en soluciones oleosas para infusión

Después de combinar 400 g del aceite/grasa (triglicéridos) que contenía 96% 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 sosa caustica 0,1 N y dispersar la mezcla con un homogeneizador, se añadió a 4 litros de esta mezcla agua destilada para inyección. Esta mezcla se emulsionó con un emulsificador de tipo pulverizador a alta presión para preparar una emulsión lipídica. La emulsión lipídica se distribuyó en bolsas de plástico de 200 ml y se sometió a un tratamiento de esterilización con vapor de agua a alta presión a 121°C durante 20 minutos, para preparar soluciones oleosas para infusión.

#### Ejemplo 8

##### Uso en zumo

Una porción de 2 g de  $\beta$ -ciclodextrina se añadió a 20 ml de una solución acuosa al 20% de etanol y a continuación se añadieron, agitando con un agitador, 100 mg de los triglicéridos que contenían ácido araquidónico obtenidos en el Ejemplo 1 (que comprendían 0,05% de vitamina E) y la mezcla se incubó a 50°C durante 2 horas. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente (aproximadamente 1 hora), se continuó la incubación a 4°C durante 10 horas con agitación continua. El precipitado producido se recuperó mediante separación por centrifugación y después de lavarlo con n-hexano, se liofilizó obteniéndose 1,8 g de un compuesto clatrato de ciclodextrina que contenía triglicéridos que contenían ácido araquidónico. Una porción de 1 g de este polvo se mezcló uniformemente con 10 L de zumo para preparar zumo que contuviera triglicéridos que contenían ácido araquidónico.

## REIVINDICACIONES

1. Una composición que contiene ácido araquidónico y/o un compuesto en el que el ácido araquidónico es un ácido graso constituyente, para uso en el tratamiento de un ser humano adulto sano para mejorar o potenciar las respuestas normales de las capacidades cognitivas o en la mejora, potenciación o prevención del deterioro de las respuestas normales de las capacidades cognitivas en un ser humano adulto.
2. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el compuesto con ácido araquidónico como un ácido graso constituyente es un éster de alcohol y ácido araquidónico o un triglicérido, fosfolípido o glicolípido que contiene ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente.
3. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 2, en la que el triglicérido que contiene ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente es un triglicérido que tiene ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2.
4. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 3, en la que los ácidos grasos de cadena media se seleccionan de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono.
5. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 4, en la que los ácidos grasos de cadena media se seleccionan de ácidos grasos de 8 átomos de carbono.
6. Una composición para uso que contiene triglicéridos, que incluye triglicéridos que contienen ácido araquidónico como parte o la totalidad del(de los) ácido(s) graso(s) constituyente(s), en el tratamiento de un ser humano adulto sano para mejorar o potenciar las respuestas normales de capacidades cognitivas o en la mejora, potenciación o prevención del deterioro de las respuestas normales de las capacidades cognitivas en un ser humano adulto.
7. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6, en la que el contenido de ácido araquidónico de los triglicéridos que incluyen triglicéridos que contienen ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente es al menos el 10% en peso del ácido graso total de los triglicéridos.
8. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en la que los triglicéridos que incluyen triglicéridos que contienen ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente proceden de microbios que pertenecen al género *Mortierella*.
9. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 6 a 8, en la que los triglicéridos que incluyen triglicéridos que contienen ácido araquidónico como parte o la totalidad del ácido graso constituyente son triglicéridos que no contienen ácido icosapentaenoico o que no contienen más del 1% de ácido icosapentaenoico.
10. Una composición que contiene triglicéridos que incluyen al menos 5 por ciento en moles de triglicéridos con ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2, para uso en el tratamiento de seres humanos adultos sanos para mejorar o potenciar las respuestas normales de las capacidades cognitivas o en la mejora, potenciación o prevención del deterioro de las respuestas normales de las capacidades cognitivas en un ser humano adulto.
11. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que los ácidos grasos de cadena media se seleccionan de ácidos grasos de 6 a 12 átomos de carbono.
12. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que los ácidos grasos de cadena media se seleccionan de ácidos grasos de 8 átomos de carbono.
13. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dichos efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de un ser humano adulto sano son con respecto a la velocidad de procesamiento o velocidad de respuesta con relación a eventos seleccionados de estímulos auditivos, estímulos visuales, estímulos olfativos, estímulos gustativos y estímulos somatosensoriales, como dicha capacidad cognitiva.
14. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dichos efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales de un ser humano adulto sano son con respecto a la capacidad de concentración con relación a eventos seleccionados de estímulos auditivos, estímulos visuales, estímulos olfativos, estímulos gustativos y estímulos somatosensoriales, como dicha capacidad cognitiva.
15. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dichos efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales son con respecto al nivel de conciencia de un ser humano adulto sano, como dicha capacidad cognitiva.
16. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que dichos

efectos de prevención del deterioro, mejora o potenciación de las respuestas normales son con respecto a la capacidad discriminativa de un ser humano adulto sano con relación a eventos seleccionados de estímulos auditivos, estímulos visuales, estímulos olfativos, estímulos gustativos y estímulos somatosensoriales, como dicha capacidad cognitiva.

- 5 17. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que tiene un efecto de acortamiento de la latencia de P300 de los potenciales evocados cerebrales (P300) o un efecto de aumento de la amplitud de P300 de los potenciales evocados cerebrales (P300), como índice de respuesta de la capacidad cognitiva.
- 10 18. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que es una composición alimenticia o una composición farmacéutica.
19. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 18, que es una composición alimenticia que contiene el ácido araquidónico y/o un compuesto en el que el ácido araquidónico es un ácido graso constituyente, en una cantidad tal que la ingestión diaria para un adulto sea 0,001-20 g en términos de ácido araquidónico.
- 15 20. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 18 o 19, que es una composición alimenticia que contiene al menos 0,001% en peso de triglicéridos que tienen ácidos grasos de cadena media unidos en las posiciones 1,3 y ácido araquidónico unido en la posición 2.
- 20 21. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 18 a 20, que es un alimento funcional, alimento complementario nutricional, alimento saludable especial o alimento para personas ancianas.
22. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además ácido docosahexaenoico y/o un compuesto en el que el ácido docosahexaenoico es un ácido graso constituyente.
- 25 23. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 22, en la que el compuesto en el que el ácido docosahexaenoico es un ácido graso constituyente es un éster de alcohol y ácido docosahexaenoico o un triglicérido, fosfolípido o glicolípido que comprende ácido docosahexaenoico como parte o la totalidad del(de los) ácido(s) graso(s) constituyente(s).
- 30 24. Una composición para uso de acuerdo con la reivindicación 22 o 23, en el que la relación ácido araquidónico/ácido docosahexaenoico (en peso) en la combinación del ácido araquidónico y el ácido docosahexaenoico está en el intervalo 0,1-15.
25. Una composición para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, en la que el ácido icosapentaenoico también está presente en la composición en una cantidad no superior a 1/5 del ácido araquidónico en la composición.

Fig.1

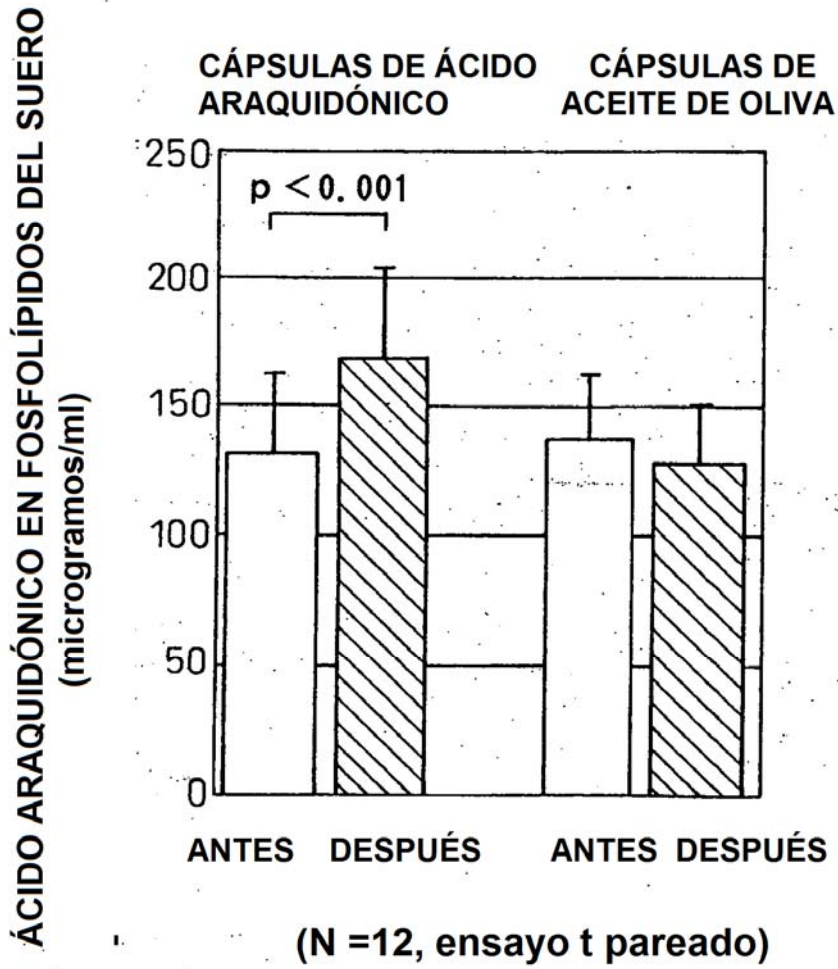


Fig.2

◆ CÁPSULAS QUE CONTIENEN ÁCIDO ARAQUIDÓNICO  
□ CÁPSULAS QUE CONTIENEN ACEITE DE OLIVA  
(CÁPSULAS SIMULADAS)

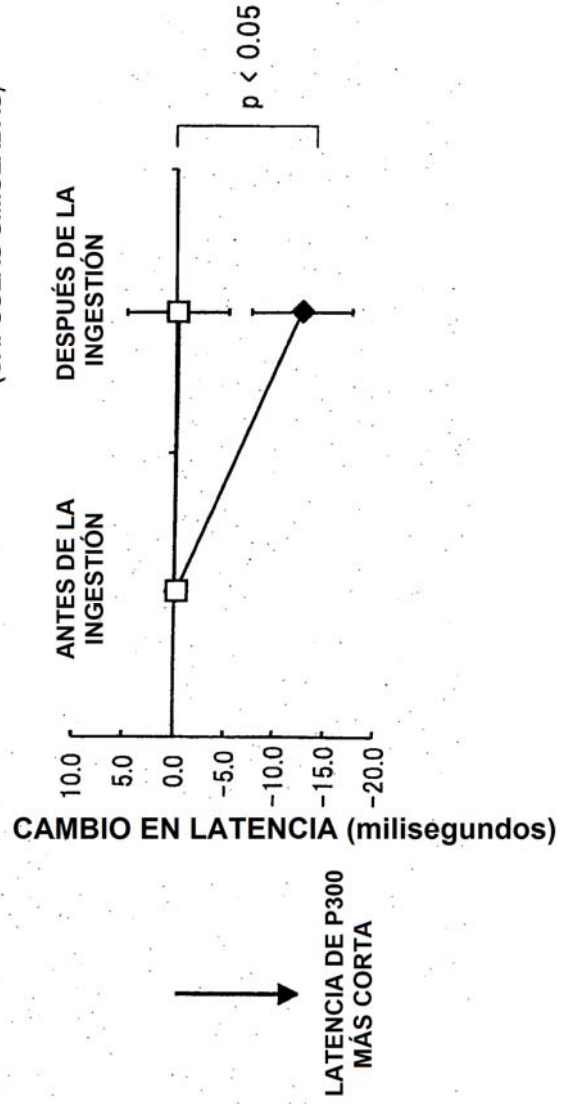




Fig.3

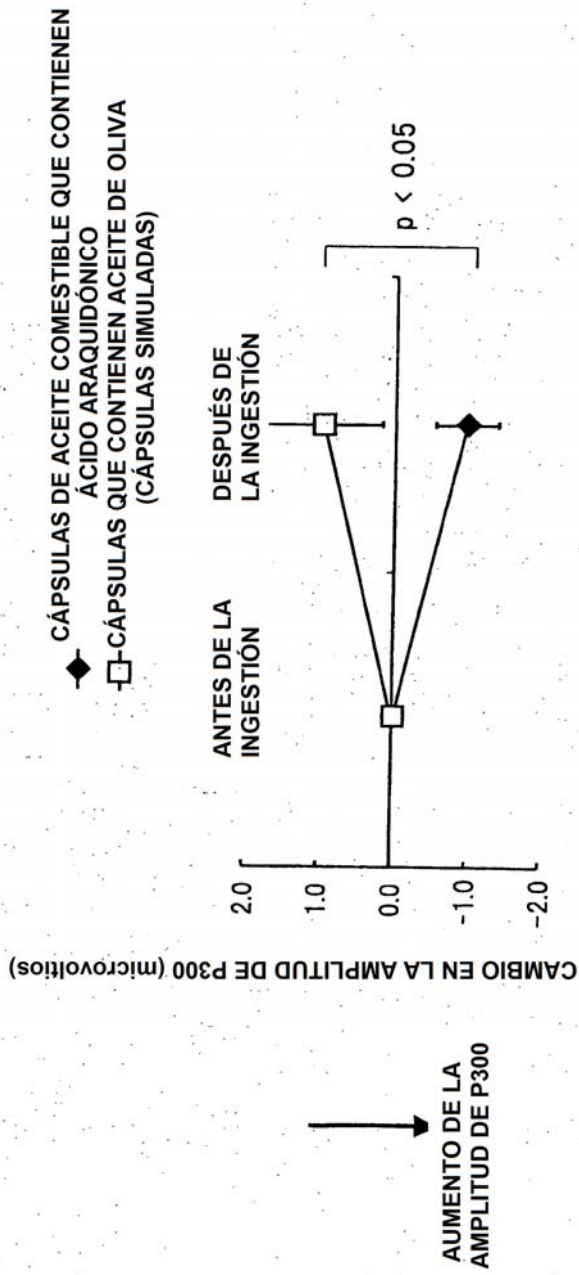


Fig.4

