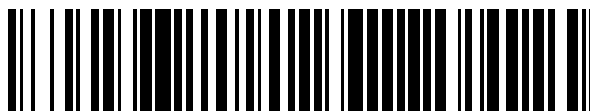


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 577**

51 Int. Cl.:

**A61K 31/202** (2006.01)

**A61P 25/28** (2006.01)

**A61K 31/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.07.2006 PCT/US2006/026331**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.01.2007 WO07008586**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.07.2006 E 06774537 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.12.2016 EP 1904049**

54 Título: **Ácidos grasos poliinsaturados para el tratamiento de la demencia y afecciones relacionadas con la pre-demencia**

30 Prioridad:

**08.07.2005 US 697911 P**  
**02.03.2006 US 779145 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**19.06.2017**

73 Titular/es:

**DSM IP ASSETS B.V. (100.0%)**  
**Het Overloon 1**  
**6411 TE Heerlen , NL**

72 Inventor/es:

**ELLIS, LORIE, A.**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 617 577 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

Ácidos grasos poliinsaturados para el tratamiento de la demencia y afecciones relacionadas con la pre-demencia

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a composiciones para tratar o prevenir la demencia, pre-demencia y/o síntomas o características de dichas afecciones

## 10 Antecedentes de la invención

Un declive en la función de memoria y en la función cognitiva se considera que es una consecuencia normal del envejecimiento en los seres humanos. El declive cognitivo relacionado con la edad es una expresión utilizada para describir el declive de memoria objetiva en los ancianos que tienen un funcionamiento cognitivo que es normal en relación con sus coetáneos. El declive cognitivo relacionado con la edad es diferente del deterioro cognitivo leve (DCL) que es más grave o constante, y puede indicar las primeras etapas de una afección, tal como la demencia (Grupo de Trabajo Presidencial APA sobre la evaluación del declive de la memoria consistente con la edad y la demencia, febrero de 1998). Dada la alta prevalencia del declive cognitivo relacionado con la edad, la pérdida de memoria es un problema de salud prominente para muchos individuos con edades de 55 años y mayores.

20 La demencia se caracteriza por la pérdida de las funciones integradas del sistema nervioso central, lo que resulta en la incapacidad para comprender conceptos simples o instrucciones, para almacenar y recuperar información en la memoria, y en los cambios conductuales y de personalidad. Los criterios más utilizados para el diagnóstico de la demencia son el DSM-IV (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría). Las características del diagnóstico de demencia según el DSM-IV incluyen el deterioro de la memoria y al menos uno de los siguientes: deficiencia del lenguaje (afasia), pérdida de la capacidad para ejecutar funciones motoras aprendidas (apraxia), incapacidad para reconocer objetos familiares (agnosia), o alteraciones en el funcionamiento ejecutivo o la toma de decisiones.

30 Las formas más prevalentes de demencia en los Estados Unidos son la enfermedad de Alzheimer (40 a 60 % de los diagnósticos); demencia vascular (10 a 20 % de todos los diagnósticos); demencia mixta (10 % de todos los diagnósticos); demencia con cuerpos de Lewy (10 % de todos los diagnósticos). Las demencias secundarias causadas por drogas, delirio, o depresión representan el 5 % o menos de todos los diagnósticos de demencia en los Estados Unidos.

35 La enfermedad de Alzheimer (EA) se clasifica como demencia neurodegenerativa, y es prevalente en todo el mundo. El diagnóstico de la EA se confirma *post mortem* por la acumulación de placas amiloides y ovillos neurofibrilares, pérdida sináptica y neurodegeneración en varias regiones del cerebro y aumento de los ventrículos cerebrales. La demencia senil en sí se refiere a todas las demencias en la población de 65 años y más, e incluye EA. No obstante, los mecanismos patogénicos responsables del desarrollo de la EA son poco conocidos.

45 Histológicamente, los hallazgos neuropatológicos clave en la EA incluyen: aumento del péptido amiloide intraneuronal, placas amiloides, ovillos neurofibrilares, pérdida sináptica y muerte de las células neuronales. La carga de placas amiloides es un indicador de riesgo de la gravedad de la EA, aunque el aumento de la carga de placas no se relaciona estrechamente con el deterioro de la función cognitiva. Morris y Price (2001) sugieren que las placas amiloides extendidas en el neocórtex distinguen mejor cada fase temprana de la EA. Otras lesiones de la EA, incluyendo el aumento de la formación de ovillos neurofibrilares y la degeneración neuronal, parecen ser el resultado del proceso patológico iniciado por amiloides, aunque pueden tener un efecto más inmediato sobre la expresión y la gravedad de la demencia.

50 El consumo de pescado en los individuos, y en particular en personas de la tercera edad, se ha vinculado con un mejor rendimiento cognitivo, reducción de las muestras agresivas y reducción del riesgo de padecer la enfermedad de Alzheimer y demencia. La suplementación con una combinación de ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido eicosapentaenoico (AEP) ha demostrado mejorar el rendimiento cognitivo y la agudeza visual en sujetos con y sin demencia (Suzuki *et al* (2001)). Además, los estudios en un modelo de ratón transgénico de la enfermedad de Alzheimer, en el que los ratones tienen una mutación en el gen que codifica la proteína precursora amiloide (PPA), indicaron que ADH reduce los niveles amiloides y la carga de placas. No obstante, el mecanismo de acción de los efectos del consumo de pescado o del consumo de ADH o AEP no se ha determinado antes de la presente invención, particularmente con respecto a la patofisiología de la enfermedad de Alzheimer.

60 El tratamiento o la prevención de enfermedades o lesiones neurológicas se centra tradicionalmente en un enfoque farmacéutico. Por ejemplo, se están desarrollando continuamente fármacos neuropsiquiátricos o neurodegenerativos que alivian los síntomas, pero no logran aliviar la causa inherente del problema neurológico. Por consiguiente, sigue siendo necesario en la técnica nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de trastornos neurológicos que se manifiestan en la demencia, tales como la EA. Adicionalmente, aunque existe una evidencia de que el consumo de pescado y/o la suplementación con ADH y AEP pueden reducir los síntomas relacionados con la EA, es preciso en

la técnica identificar el mecanismo de acción de dicha terapia, de modo que puedan desarrollarse formulaciones y protocolos mejorados y que los individuos en riesgo de desarrollar la EA puedan ser identificados y tratados en un momento específico cuando el tratamiento sea más eficaz, sobre todo antes de la aparición de los síntomas clínicos.

5 Lim P, *et al* "Diets enriched with polyunsaturated DHA can lower amyloid levels and plaque burden in Alzheimer's disease mouse model", *Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary planner*, vol. 2003, 2003 y 33<sup>a</sup> Reunión Anual de la Sociedad de Neurociencia; Nueva Orleans, LA, EE. UU. noviembre de 2003 desvelan que las dietas enriquecidas con ADH pueden reducir los niveles amiloides.

10 El documento EP0342795A2 desvela el uso de ADH para mejorar la función cerebral.

Cole, G. M. *et al*, *Abstracts of the Annual Meeting of the Society of Neuroscience*, Washington D.C., EE. UU, vol. 32, 7 de noviembre de 2012, discuten la supresión de la patogénesis de la enfermedad de Alzheimer por medio de lípidos de la dieta y los AINE.

15 De Wilde, M. C. *et al*. "The omega-3 fatty acid DHA inhibits the formation of beta amyloid in CHO7PA2 cells", *Society for Neuroscience Abstract Viewer and Itinerary planner*, vol. 2003, 2003 y 33<sup>a</sup> Reunión Anual de la Sociedad de Neurociencia; Nueva Orleans, LA, EE.UU. noviembre de 2003 desvelan que el ADH puede inhibir la formación de niveles de beta amiloides en células CHO7PA2.

20 Morihara, T. *et al*, *Society for Neuroscience Resumen Viewer and Itinerary planner*, vol. 2003, 2003 y 33<sup>a</sup> Reunión Anual de la Sociedad de Neurociencia; Nueva Orleans, LA, EE. UU. noviembre de 2003 desvelan la regulación de la grasa en la dieta de la expresión génica inflamatoria en un modelo de Alzheimer.

25 Morimoto Mio *et al*, *Journal of pharmacological sciences*, vol. 94, n.º de suplemento 1, 2004, página 78P y 77<sup>a</sup> Reunión anual de la Sociedad Farmacológica Japonesa, Osaka, Japón, 2004 describen la participación de la cascada de ácido araquidónico y las citoquinas inflamatorias en el deterioro de la memoria de trabajo inducido por una proteína precursora beta-amiloide.

30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona el uso de una composición que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6), en la que la relación de ADH a ADPn-6 es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, en la preparación de un medicamento formulado para administración oral para tratar la demencia o la pre-demencia.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6) en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1 en una dosificación oral para el tratamiento de la demencia o la pre-demencia en un ser humano.

Se describe un método para reducir el nivel de péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) en un individuo. El método descrito incluye administrar a un individuo al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) o un precursor o fuente del mismo para reducir el nivel de péptido  $\beta$ A en el individuo, en el que AGPI se selecciona entre: ácido docosahexaenoico (ADH); ácido docosapentaenoico (ADPn-6); una combinación de ADH y ADPn-6; una combinación de ADH y ácido araquidónico (AAR); y una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. En un aspecto, el péptido  $\beta$ A es el péptido  $\beta$ A soluble.

Otro método descrito se refiere a un método para reducir el nivel de la proteína tau en un individuo. El método descrito incluye administrar a un individuo al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) o un precursor o fuente del mismo para reducir el nivel de la proteína tau en el individuo, en el que el AGPI se selecciona entre: ácido docosahexaenoico (ADH); ácido docosapentaenoico (ADPn-6); una combinación de ADH y ADPn-6; una combinación de ADH y ácido araquidónico (AAR); y una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. En un aspecto, la proteína tau es la proteína tau fosforilada.

Otro método descrito se refiere a un método para reducir el nivel de proteína presenilina-1 (PS1) en un individuo. El método descrito incluye administrar a un individuo al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) o un precursor o fuente del mismo para reducir el nivel de proteína PS1 en el individuo, en el que el AGPI se selecciona entre: ácido docosahexaenoico (ADH); ácido docosapentaenoico (ADPn-6); una combinación de ADH y ADPn-6; una combinación de ADH y ácido araquidónico (AAR); y una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR.

Otro método descrito se refiere a un método para retrasar la aparición o reducir la gravedad de la disfunción sináptica en un individuo. El método descrito incluye administrar al individuo ADH, ADPn-6, o en realizaciones preferentes, una combinación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) o precursores o fuentes de los mismos para retrasar la aparición o reducir la gravedad de la disfunción sináptica en el individuo, en el que la combinación de AGPIs se selecciona entre: una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de AAR y ADH, y una combinación de ADPn-6, AAR y ADH.

Otro método descrito se refiere a un método para retrasar la aparición o reducir la gravedad de la demencia en un individuo. El método descrito incluye administrar a un individuo ADH, ADPn-6, o en realizaciones preferentes, una combinación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) o precursores o fuentes de los mismos para retrasar la aparición o reducir la gravedad de la demencia en el individuo, en el que la combinación de AGPIs se selecciona entre: una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de AAR y ADH, y una combinación de ADPn-6, AAR y ADH.

Otro método descrito se refiere a un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con el aumento de cantidades o de la expresión o de la disfunción del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), proteína presenilina-1 (PS1), proteína tau fosforilada, o proteína tau. El método descrito incluye las etapas de: (a) identificación de un individuo que tiene una mayor cantidad, expresión o actividad biológica de un biomarcador seleccionado entre el péptido  $\beta$ A, proteína PS1, proteína tau fosforilada, proteína tau, y combinaciones de los mismos, en comparación con la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador en un control negativo individual; y (b) administración al individuo de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) o un precursor o fuente del mismo para reducir la cantidad, expresión o actividad biológica del péptido  $\beta$ A, proteína PS1, proteína tau fosforilada, o proteína tau, en el que el AGPI se selecciona entre: ácido docosahexaenoico (ADH); ácido docosapentaenoico (ADPn-6); una combinación de ADH y ADPn-6; una combinación de ADH y ácido araquidónico (AAR); y una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR.

Otro método descrito se refiere a un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con cantidades reducidas de ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6 o un precursor o fuente del mismo. El método descrito incluye las etapas de: (a) identificación de un individuo con cantidades reducidas de ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6 o un precursor o fuente del mismo; y (b) administración al individuo de una combinación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) o precursores o fuentes de los mismos para compensar los efectos de las cantidades reducidas de ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6 o un precursor o fuente del mismo, en el que la combinación de los AGPI se selecciona entre: una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de AAR y ADH, y una combinación de ADPn-6, AAR y ADH.

Otro método descrito se refiere a un método para retrasar la aparición o reducir la gravedad de un declive en la función cerebral en un individuo. El método descrito incluye administrar al individuo un ADH, ADPn-6, o en realizaciones preferentes, una combinación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) o precursores o fuentes de los mismos para retrasar la aparición o reducir la gravedad de un declive de la función cerebral en el individuo, en el que la combinación de los AGPI se selecciona entre: ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de AAR y ADH, y una combinación de ADPn-6, AAR y ADH. En un aspecto descrito, la función cerebral se mide por un método seleccionado entre ensayos neuropsicológicos o cognitivos, métodos de imagenología cerebral (TEP, TCEM, TC, IRM, IRMf), y electroencefalografía (EEG).

Otro método descrito se refiere a un método para retrasar o reducir la gravedad de la desmielinización en un individuo. El método descrito incluye administrar al individuo una combinación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) o precursores o fuentes de los mismos para retrasar o reducir la gravedad de la desmielinización en el individuo, en el que la combinación de los AGPI se selecciona entre: una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de AAR y ADH, y una combinación de ADPn-6, AAR y ADH.

Otro método descrito se refiere a un método para retrasar la aparición o reducir la gravedad de los ovillos neurofibrilares asociados con la enfermedad de Alzheimer en un individuo. El método descrito incluye administrar al individuo ADH, ADPn-6, o en realizaciones preferentes, una combinación de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) o precursores o fuentes de los mismos para retrasar la aparición o reducir la gravedad de los ovillos neurofibrilares en el individuo, en el que la combinación de AGPIs se selecciona entre: una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de AAR y ADH, y una combinación de ADPn-6, AAR y ADH.

Otro método descrito se refiere a un método para estabilizar o normalizar la actividad de ondas theta o para reducir o prevenir el desarrollo de la actividad anormal de las ondas theta en un individuo. El método descrito incluye las etapas de: (a) identificación de un individuo que tiene o va a desarrollar una actividad anormal de ondas theta; y (b) administración al individuo de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) o un precursor o fuente del mismo para estabilizar o normalizar la actividad de ondas theta o para prevenir o reducir el desarrollo de la actividad anormal de ondas theta en un individuo, en el que el AGPI se selecciona entre: ácido docosahexaenoico (ADH); ácido docosapentaenoico (ADPn-6); una combinación de ADH y ADPn-6; una combinación de ADH y ácido araquidónico (AAR); y una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR.

En las realizaciones de la invención, el individuo se identifica como aquel susceptible de padecer o que tiene demencia o pre-demencia. En un aspecto, la demencia es la enfermedad de Alzheimer. Por ejemplo, en un aspecto, el individuo se identifica por tener o ser susceptible de padecer demencia o pre-demencia mediante la medición de un marcador biológico, antecedentes familiares que muestren demencia, deterioro cognitivo leve, o declive cognitivo relacionado con la edad. El marcador biológico puede incluir, entre otros, PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, PS1, y un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6, o un precursor o fuente del mismo. En un aspecto, una cantidad, expresión o actividad biológica del marcador biológico se mide en una muestra biológica procedente del individuo. La muestra biológica puede incluir, entre otros, una muestra celular, una muestra tisular, y

una muestra de fluido corporal, y las muestras particularmente preferentes incluyen el líquido cefalorraquídeo o una muestra sanguínea.

En un método descrito, antes de la etapa de administración, el método descrito puede incluir la medición de una cantidad, expresión o actividad biológica de un biomarcador seleccionado entre PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, y proteína PS1 en una muestra biológica procedente del individuo. En un método descrito, el método descrito puede incluir además la comparación de la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador en la muestra individual con una cantidad, expresión o actividad biológica de valor basal del biomarcador en una muestra del mismo tipo, en el que un aumento en la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador en la muestra individual, en comparación con la cantidad, expresión o actividad biológica de valor basal, indica que el individuo corre el riesgo de desarrollar o tiene demencia.

En un método descrito, antes de la etapa de administración, el método descrito puede incluir la medición de una cantidad o actividad biológica de un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6, o un precursor o una fuente del mismo en una muestra biológica procedente del individuo. En un método descrito, el método puede incluir además la comparación de una cantidad o actividad biológica de un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6, o un precursor o fuente del mismo en la muestra individual con una cantidad o actividad biológica de valor basal del ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6, o un precursor o fuente del mismo en una muestra del mismo tipo, en el que un cambio en la cantidad del ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6, o un precursor o una fuente del mismo en la muestra individual en comparación con la cantidad de valor basal, indica que el individuo corre el riesgo de desarrollar o tiene demencia.

La etapa de medición de una cantidad o actividad de un biomarcador o AGPI omega-3 u omega-6 puede incluir, entre otros, membrana de Western, inmunoelectrotransferencia, ensayo por inmuoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIE), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo (MALDI-TOF), microcitometría, micromatrices, microscopía, clasificación celular activada por fluorescencia (CCAF), citometría de flujo, electroforesis capilar, microchip o micromatrices proteicos, esterificación metílica de ácidos grasos/cromatografía de gases, cromatografía en capa fina, cromatografía de gases/espectroscopia de masas y cromatografía líquida/espectroscopia de masas.

Cualquiera de los métodos descritos previamente puede incluir adicionalmente el seguimiento de la eficacia de la administración del AGPI en los niveles del péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, o proteína PS1 en el individuo al menos un momento posterior a la etapa de administración. Del mismo modo, cualquiera de los métodos descritos previamente puede incluir adicionalmente el seguimiento de la eficacia de la administración de AGPI en los niveles del ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6 en el individuo al menos un momento posterior a la etapa de administración. En base a estos resultados de seguimiento, el método puede incluir además el ajuste de la administración del AGPI al individuo en tratamientos posteriores.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente de la invención, el AGPI puede incluir un aceite que comprende 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, o más de AGPI, en el que el AGPI se encuentra en una forma química seleccionada entre una forma de triglicéridos, aceite de triglicéridos que comprende AGPI, fosfolípidos que comprenden AGPI, una combinación de proteínas y fosfolípidos que comprende AGPI, microalgas marinas secas, esfingolípidos que comprenden AGPI, ésteres, como un ácido graso libre, como un conjugado de AGPI con otra molécula bioactiva, y combinaciones de los mismos.

En la presente invención, AGPI comprende ADPn-6 y ADH, y la relación de ADPn-6 a ADH es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 1:10. En cualquiera de las realizaciones anteriormente descritas de la invención, AGPI puede administrarse, en un aspecto, en una cantidad comprendida entre aproximadamente 50 mg a aproximadamente 20.000 mg por día. En otro aspecto, AGPI se puede administrar en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,025 mg por día a aproximadamente 15 g por día. En otro aspecto, AGPI se puede administrar en una cantidad comprendida entre aproximadamente 0,05 mg/kg de peso corporal por día a aproximadamente 275 mg/kg de peso corporal por día.

En cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente, la fuente de ADH y ADPn6 puede incluir, entre otros, aceite de pescado, microalgas marinas, aceite vegetal, y combinaciones de los mismos.

Otra realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ADH y ADPn6 para el tratamiento o la prevención de la demencia en un individuo que tiene o corre el riesgo de desarrollar demencia. La combinación de AGPIs comprende ADPn-6 y ADH. En un aspecto, la combinación de AGPIs comprende un aceite que comprende 30 % o más o hasta 80 % o más de dicho AGPI, en el que AGPI se encuentra en una forma química seleccionada entre una forma de triglicéridos, aceite de triglicéridos que comprende AGPI, fosfolípidos que comprenden AGPI, una combinación de proteínas y fosfolípidos que comprende AGPI, microalgas marinas secas, esfingolípidos que comprenden AGPI, ésteres, como un ácido graso libre, como un conjugado de AGPI con otra molécula bioactiva, y combinaciones de los mismos. En un aspecto, la fuente de AGPI se selecciona entre: aceite de

pescado, algas marinas, aceite vegetal, y combinaciones de los mismos. En un aspecto, AGPI se proporciona en una formulación seleccionada entre: comprimidos masticables, comprimidos de rápida disolución, comprimidos efervescentes, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, comprimidos de múltiples capas, comprimidos de dos capas, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, cápsulas, pastillas para chupar, pastillas masticables, perlas, polvos, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, sellos, duchas vaginales, supositorios, cremas, productos tópicos, sustancias inhalables, sustancias inhalables en aerosol, parches, partículas inhalables, implantes, implantes de depósito, ingeribles, inyectables, infusiones, barritas saludables, dulces y bombones, cereales, recubrimientos de cereales, alimentos, alimentos nutritivos, alimentos funcionales y combinaciones de los mismos. En un aspecto, el AGPI en la formulación se proporciona en una forma seleccionada entre: un aceite de algas altamente purificado que comprende AGPI, aceite de triglicéridos que comprende AGPI, fosfolípidos que comprenden AGPI, una combinación de proteínas y fosfolípidos que comprende AGPI, microalgas marinas secas que comprenden AGPI, esfingolípidos que comprenden AGPI, ésteres de AGPI, ácido graso libre, un conjugado de AGPI con otra molécula bioactiva, y combinaciones de los mismos.

Un compuesto terapéutico que puede incluirse en una composición de la invención puede incluir, entre otros, una proteína, un aminoácido, un fármaco, y un carbohidrato. En un aspecto, el compuesto terapéutico se selecciona entre: tacrina; donepezilo; rivastigmina; galantamina; memantina; neotropina; nootrópicos; alfa-tocoferol (vitamina E); selezilina; agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs); *gingko biloba*; estrógeno; inhibidores de la  $\beta$ -secretasa; vacunas; vitaminas del complejo B; bloqueadores de los canales de calcio; inhibidores de la HMG-CoA reductasa; estatinas; policosanoles; fibratos; clioquinol; curcumina; lignanos; fitoestrógenos; fitoesteroles; niacina; y suplementos vitamínicos.

Otra realización de la invención es el uso de una composición que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6), en la que la relación de ADH a ADPn-6 es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, en la preparación de un medicamento formulado para administración oral para tratar la demencia o la pre-demencia. Se describe la reducción del nivel de péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A) en un individuo; la reducción del nivel de proteína tau en un individuo; la reducción del nivel de proteína presenilina-1 (PS1) en un individuo; el tratamiento o la prevención de un trastorno asociado con el aumento de las cantidades o la expresión o la disfunción del péptido  $\beta$ -amiloide ( $\beta$ A), proteína presenilina-1 (PS1), proteína tau fosforilada o proteína tau; y/o la estabilización o normalización de la actividad de las ondas theta o la reducción o la prevención del desarrollo de la actividad anormal de las ondas theta en un individuo.

Otra realización de la invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6) en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1 en una dosificación oral para el tratamiento de la demencia o la pre-demencia en un ser humano. Se describe una composición para retrasar la aparición o reducir la gravedad de la disfunción sináptica en un individuo; retrasar la aparición o reducir la gravedad de la demencia en un individuo; tratar o prevenir un trastorno asociado con cantidades disminuidas de ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 u omega-6; retrasar la aparición o reducir la gravedad de un declive de la función cerebral en un individuo; retrasar o reducir la gravedad de la desmielinización en un individuo; y/o retrasar la aparición o reducir la gravedad de los ovillos neurofibrilares asociados con la enfermedad de Alzheimer en un individuo.

#### Breve descripción de las figuras

Las Figs. 1A-1C muestran perfiles de ácidos grasos del cerebro entero en ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético durante 3 meses (Fig. 1A; n=6), 6 meses (Fig. 1B; n=6), o 9 meses (Fig. 1C; n=6).

Las Figs. 2A-2C muestran perfiles de ácidos grasos de glóbulos rojos en ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético durante 3 meses (Fig. 2A), 6 meses (Fig. 2B), o 9 meses (Fig. 2C).

Las Figs. 3A-3C muestran perfiles de fosfatidilcolina (FC) en el cerebro de ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético durante 3 meses (Fig. 3A), 6 meses (Fig. 3B), o 9 meses (Fig. 3C).

Las Figs. 4A-4C muestran perfiles de fosfatidiletanolamina (FE) en el cerebro de ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético durante 3 meses (Fig. 4A), 6 meses (Fig. 4B), o 9 meses (Fig. 4C).

Las Figs. 5A-5C muestran perfiles de fosfatidilserina (FS) en el cerebro de ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético durante 3 meses (Fig. 5A), 6 meses (Fig. 5B), o 9 meses (Fig. 5C).

Las Figs. 6A-6F muestran niveles de  $\beta$ A solubles (Figs. 6A, 6C, 6E) e insolubles (Figs. 6B, 6D, 6F) en ratones 3xTg-EA tras el tratamiento dietético con ADH durante 3 meses (Figs. 6A y 6B; n=6), 6 meses (Figs. 6C y 6D; n=6) y 9 meses (Figs. 6E y 6F; n=6).

Las Figs. 6G-6J son imágenes digitalizadas que muestran que la tinción con DAB junto con 6E10 muestra una inmunorreactividad similar a  $\beta$ A en secciones de 40  $\mu$ M de ratones tratados durante 3 meses con la dieta de control (Fig. 6G), dieta de ADH/ADP (Fig. 6H), dieta de ADH (comparativo) (Fig. 6I), y dieta de ADH/AAR (comparativo) (Fig. 6J).

Las Figs. 7A-7D muestran niveles en estado estacionario (Figs. 7A y 7C) y la cuantificación de las membranas proteicas normalizadas a los niveles de  $\beta$ -actina como control de carga (Figs. 7B y 7D) de fragmentos de PPA (Figs. 7A y 7B) y EDI (Figs. 7C y 7D) en ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético con ADH.

Las Figs. 8A-8B muestran niveles en estado estacionario de ADAM10 y BACE (Fig. 8A) y la cuantificación de las

membranas proteicas normalizadas a los niveles de  $\beta$ -actina como control de carga (Fig. 8B) en ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético con ADH.

Las Figs. 8C-8D muestran niveles en estado estacionario de presenilina 1 y nicastrina (Fig. 8C) y la cuantificación de membranas proteicas normalizadas a los niveles de  $\beta$ -actina como control de carga (Fig. 8D) en ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético con ADH.

La Fig. 8E muestra que el ADH redujo significativamente el ARNm de presenilina 1 (\*,  $p < 0,05$ ) en las células SHSY5Y tratadas durante 48 horas con 0,3  $\mu\text{g/ml}$  de ADH complejo 3:1 a SAB ( $n=3$ ), o con solo SAB equivalente ( $n=3$ ).

Las Figs. 9A-9F muestran los niveles en estado estacionario de tau (Figs. 9A, 9C y 9E) y la cuantificación de las membranas proteicas normalizadas a los niveles de  $\beta$ -actina como control de carga (Figs. 9B, 9D y 9F) en ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético con ADH durante 3 meses (Figs. 9A y 9B), 6 meses (Figs. 9C y 9D) y 9 meses (Figs. 9E y 9F).

Las Figs. 10A-10D son imágenes digitalizadas que muestran la inmunorreactividad de tau conformacionalmente alterada en ratones 3xTg-EA después del tratamiento dietético durante 3 meses (Fig. 10A = dieta de control, Fig. 10B = dieta de ADH/ADP, Fig. 10C = dieta de ADH (comparativo), y Fig. 10D = ADH/ácido araquidónico (comparativo)).

La Fig. 10E es una imagen digitalizada de una inmunoelectrotransferencia que muestra tau fosforilada tras 9 meses de tratamiento dietético.

## Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona el uso de una composición que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6), en la que la relación de ADH a ADPn-6 es de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, en la preparación de un medicamento formulado para administración oral para tratar la demencia o la pre-demencia.

La presente invención también proporciona una composición farmacéutica que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6) en una relación de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1 en una dosificación oral para el tratamiento de la demencia o la pre-demencia en un ser humano.

La presente invención se refiere en general al uso de complementos de ácido graso poliinsaturado (AGPI) (ADH y ADPn-6) para retrasar la aparición y/o reducir la gravedad y/o los síntomas de la demencia o la pre-demencia, incluyendo la enfermedad de Alzheimer (EA). Se describen métodos para reducir el nivel de  $\beta$ -amiloide (soluble o insoluble), proteína tau, proteína tau fosforilada y/o proteína presenilina-1 (PS1) en el tejido neural de un individuo; a métodos para retrasar o reducir la gravedad de la disfunción sináptica, declive de la función cerebral, desmielinización, formación de ovillos neurofibrilares, y/o demencia en un individuo; y a métodos para tratar o prevenir un trastorno asociado con el aumento de cantidades de  $\beta$ -amiloide, proteína tau (soluble o insoluble), proteína tau fosforilada y/o proteína presenilina-1 (PS1), o con cantidades reducidas de AGPIs omega-3 y/u omega-6. Se describe asimismo un método para estabilizar o normalizar la actividad de ondas theta o reducir o prevenir el desarrollo de la actividad anormal de ondas theta en un individuo. Los usos médicos de la presente invención comprenden administrar al individuo una combinación de ADPn-6 y ADH. AGPI comprende ADH y ADPn-6 combinados entre sí, y opcionalmente combinados con otros AGPI.

De acuerdo con la presente invención, la demencia se caracteriza por la pérdida de las funciones integradas del sistema nervioso central, lo que resulta en la incapacidad para comprender conceptos simples o instrucciones, para almacenar y recuperar información en la memoria, y en los cambios conductuales y de personalidad. Los criterios más utilizados para el diagnóstico de la demencia son el DSM-IV (Manual diagnóstico y estadístico de los trastornos mentales de la Asociación Americana de Psiquiatría). Las características de diagnóstico de demencia según el DSM-IV incluyen el deterioro de la memoria y al menos uno de los siguientes elementos: deficiencia del lenguaje (afasia), pérdida de la capacidad para ejecutar funciones motoras aprendidas (apraxia), incapacidad para reconocer objetos familiares (agnosia), o alteraciones en el funcionamiento ejecutivo o la toma de decisiones. La enfermedad de Alzheimer (EA) es la forma más frecuente de demencia.

Recientemente, un modelo de ratón triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer se ha desarrollado y expuesto por un grupo de la Universidad de California en Irvine (Oddo *et al.*, 2003). Estos ratones contienen transgenes PS1<sub>M146V</sub>, PPA<sub>Swe</sub>, y tau<sub>P301L</sub>. La presenilina-1 (PS1) es una proteína producida en las células cerebrales, y está vinculada a una mayor cantidad de péptidos  $\beta$ A. Las mutaciones heredadas del gen PS1 en el cromosoma 14 son motivo de la enfermedad de Alzheimer familiar. La proteína precursora amiloide (PPA) es una proteína de función incierta que se encuentra normalmente en el cerebro. En la enfermedad de Alzheimer, PPA se degrada de manera anormal, dando lugar a la formación de amiloides. Tau, una proteína muy asimétrica y estable al calor, se expresa principalmente en el cerebro, en el que se regula la orientación y la estabilidad de los microtúbulos en las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos. Estos ratones triples transgénicos desarrollan una patología de placas y ovillos en las regiones cerebrales relevantes del Alzheimer (hipocampo, amígdala y corteza cerebral). Desarrollan depósitos extracelulares de  $\beta$ A anteriores a la formación de ovillos, en consonancia con la hipótesis de la cascada amiloide. Los ratones exhiben una disfunción sináptica desde los seis meses de edad. Aunque no se localizan depósitos extracelulares de  $\beta$ A en la región del hipocampo a esta edad, la acumulación intracelular del péptido  $\beta$ A, incluyendo

el péptido  $\beta A_{42}$  más patógeno, se ha demostrado a esta edad. Los hallazgos de este modelo sugieren que  $\beta A$  intraneuronal subyace la disfunción sináptica observada. La formación de ovillos se inicia normalmente en las estructuras límbicas del cerebro y progresa a regiones corticales de los individuos humanos, que es el patrón observado en este modelo de ratón.

5 El presente inventor ha utilizado este modelo de ratón que imita estrechamente la EA humana para determinar el mecanismo de acción de los AGPI en el desarrollo y progresión de la EA, y para desarrollar nuevas estrategias y composiciones terapéuticas para la prevención y el tratamiento de la EA. El inventor proporciona grupos de estos ratones con dietas que incluían una fuente dietética significativa de uno o más AGPIs. Las dietas incluyen una dieta enriquecida con ADH, una dieta enriquecida con ADH y ADPn-6, y una dieta enriquecida con ADH y AAR. El inventor ha descubierto sorprendentemente que la administración de AGPIs disminuye en realidad la cantidad de  $\beta A$  soluble, disminuye la cantidad de proteína tau total, y disminuye la cantidad de presenilina-1 en este modelo animal. En particular, el inventor ha descubierto que las dietas que contienen ADH reducen los niveles de  $\beta A$  soluble, aunque los efectos del ADH disminuyen con el tiempo, particularmente en individuos en los que los niveles de ácido adriénico o ácido araquidónico son elevados, o en individuos en los que los niveles de ADPn-6 son reducidos. Las dietas que contienen solo ADH fueron las más efectivas con el tiempo, pero la combinación de ADH y ADPn-6 también fue eficaz en puntos temporales anteriores, y la combinación de ADH y AAR también fue eficaz en los primeros puntos temporales. Además, el inventor halló que la combinación de ADH y ADPn-6 ofrece un beneficio sorprendente e inesperado, ya que los animales que se proveían de una dieta suficiente preformada con ADH en combinación con ADPn-6 habían aumentado significativamente los niveles de ADPn-6 en el tejido en comparación a los animales alimentados solo con ADH. Los animales con niveles mayores en sangre de ADH y AAR tendieron a tener una mayor reducción en la presenilina-1, la proteína asociada a la escisión de PPA en péptidos amiloides tóxicos, aunque las dietas que solo contenían ADH o combinaciones de ADH y ADPn-6 también redujeron los niveles de presenilina-1. El inventor también halló que las dietas que contenían ADH redujeron los niveles de tau totales, incluyendo las dietas que contienen solo ADH, ADH y ADPn-6 o ADH y AAR, aunque los efectos de la combinación de las dietas decrecieron con el tiempo, de manera tal que solo las dietas que contenían ADH como el AGPI predominante dieron lugar a un nivel de tau total reducido. No obstante, con respecto a tau fosforilada, las dietas que contenían ADH o ADH y ADPn-6 redujeron significativamente la tau fosforilada, incluso en puntos temporales posteriores, siendo la combinación de ADH y ADPn-6 eficaz y con una tendencia más eficaz que la dieta enriquecida solamente con ADH. Tomados en conjunto, los resultados de los inventores indican que las dietas que contienen ADH o ADH y ADPn-6 son efectivas para reducir patologías de la EA, y que la formulación de más éxito es en general una dieta que contiene solo ADH como el AGPI predominante, aunque las dietas con ADH y ADPn-6 también son eficaces con respecto a la reducción de al menos la tau fosforilada. Más particularmente, el presente inventor ha descubierto que los AGPI tienen diferentes efectos en la patología de trastornos cognitivos, tales como EA, de modo que los pacientes pueden orientarse de forma selectiva apropiadamente, y/o de modo que los AGPI pueden administrarse en dosis o puntos temporales preferentes para tratar de manera más eficiente la enfermedad. En concreto, el presente inventor ha descubierto que el ADH reduce la amiloide, que se cree que es una patología anterior, mientras que ADPn-6 es, además, eficaz en la reducción de la patología de tau y tau fosforilada, que se considera que son biomarcadores posteriores de la patología. Además, los efectos beneficiosos observados a partir de las dietas que contenían ADPn-6 eran también sorprendentes, puesto que antes de la presente invención, no se había descrito ningún papel para ADPn-6 en la mejora de un síntoma o el tratamiento de una característica de la EA. Los resultados de los inventores también proporcionan nuevos potentes marcadores para identificar a los sujetos que son más propensos a responder positivamente a la suplementación con AGPI o al tratamiento en varios puntos temporales en la enfermedad.

45 Asimismo se describe un método para reducir el nivel del péptido  $\beta A$  en el tejido neural de un individuo, que comprende administrar a un individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/o omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para reducir el nivel de péptido  $\beta A$  en el individuo. El péptido  $\beta A$  que se disminuye puede ser el péptido  $\beta A$  soluble. En ciertos ejemplos, el AGPI comprende ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADPn-6, AAR y ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADPn-6. En otro ejemplo, el AGPI es una combinación de ADH y ADPn-6.

55 En otro ejemplo, se describe un método para mantener el nivel de PPA en el tejido neural de un individuo, o más preferentemente, para evitar o inhibir la escisión de PPA (independientemente del nivel) en el péptido  $\beta A$  por la presenilina-1, y en particular en las formas de tamaño más tóxicas del péptido  $\beta A$ . El método descrito comprende administrar a un individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/o omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para mantener el nivel de PPA en el individuo, o para prevenir o inhibir la escisión de PPA en el péptido  $\beta A$  por la presenilina-1 en las formas de tamaño más tóxicas del péptido  $\beta A$ . En ciertos ejemplos, el AGPI comprende ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, o una combinación de ADPn-6, AAR y ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADH. En una realización, el AGPI comprende ADPn-6. En otro ejemplo, el AGPI es una combinación de ADH y ADPn-6.

65 El principal componente de las placas amiloides extracelulares es la proteína amiloide ( $\beta A$ ), que es un péptido de 42-43 aminoácidos derivado de la escisión proteolítica de la proteína precursora amiloide (PPA), una glicoproteína transmembranal de tipo I de función desconocida. Tres enzimas distintas escinden PPA para producir péptidos beta



amiloides que difieren en tamaño. Las escisiones por alfa-secretasa del extremo C-terminal de PPA en un sitio dentro de la secuencia peptídica  $\beta$ A ( $\beta$ A 16) genera un fragmento C-terminal de 83 aminoácidos y una forma de 26 aminoácidos de  $\beta$ A. La gamma-secretasa escinde posteriormente el péptido de 83 aminoácidos en el extremo C-terminal del péptido  $\beta$ A, libera un péptido corto de 15 aminoácidos (p3) cuyo papel en la amiloidogénesis no está bien definido. La beta-secretasa, o BACE1, corta el extremo N-terminal del péptido  $\beta$ A, mientras que la gamma-secretasa, que puede, de hecho, ser una presenilina, corta el extremo C-terminal del péptido  $\beta$ A. En función de donde escinda la gamma-secretasa exactamente la PPA junto con la beta-secretasa, se produce un péptido de 40 o 42 aminoácidos. Se cree que el péptido de 42-43 aminoácidos es una forma más patogénica de  $\beta$ A en comparación con las formas de 15 o 40 aminoácidos. Los ligandos difusibles derivados de  $\beta$ A (o LDD $\beta$ As) son no fibrilares, agregan derivados de  $\beta$ A 1-42 con una neurotoxicidad supuestamente mayor en comparación con las grandes fibrillas de  $\beta$ A halladas en las placas de Alzheimer. La agregación de fibrillas de  $\beta$ A 1-42 en LDD $\beta$ As oligoméricos se aumenta en presencia de clusterina (Apo J), un componente proteico de las placas seniles.  $\beta$ A 1-42 + clusterina es altamente tóxico en neuronas cultivadas PC12.

Se ha determinado la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína precursora amiloide (PPA) humana, y las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos codificadas para el péptido de PPA pueden hallarse en bases de datos de secuencias públicas, tales como la base de datos del Centro Nacional de Información Biotecnológica (CNIB). Por ejemplo, las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos para el péptido de PPA humano pueden hallarse en la base de datos del CNIB con los números de acceso NM\_000484 (variante 1), NM\_201413 (variante 2), y NM\_201414 (variante 3). La detección y/o medición del péptido  $\beta$ A pueden lograrse por métodos conocidos en la materia y se discuten con detalle a continuación.

Asimismo se describe un método para reducir el nivel de la proteína tau en el tejido neural de un individuo, que comprende administrar a un individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para reducir el nivel de la proteína tau en el individuo. En un ejemplo, la proteína tau a reducir es una proteína tau fosforilada o una proteína tau conformacionalmente cambiada. En ciertos ejemplos, el AGPI comprende ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADPn-6, AAR y ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADPn-6. El AGPI es una combinación de ADH y ADPn-6.

La proteína tau, y en particular, la tau fosforilada, es la proteína predominante hallada en los ovillos neurofibrilares, una lesión en fase avanzada presente en individuos que padecen enfermedad de Alzheimer. Los ovillos neurofibrilares están compuestos principalmente de tau anormalmente fosforilada, una fosfoproteína específica de neuronas que es el constituyente principal de los microtúbulos neuronales. En la enfermedad de Alzheimer, los ovillos neurofibrilares se hallan en las neuronas de la corteza cerebral, pero son más comunes en las regiones del lóbulo temporal, en particular, el hipocampo y la amígdala. La densidad y el patrón de los ovillos neurofibrilares se correlaciona con la gravedad de la EA. La detección y/o medición de la proteína tau y/o la proteína tau fosforilada se pueden lograr por métodos conocidos en la materia y se discuten con más detalle a continuación.

En consecuencia, un método descrito incluye un método para retrasar el desarrollo o reducir la gravedad de la formación de ovillos neurofibrilares en un individuo, que comprende administrar a un individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para retrasar el desarrollo o reducir la gravedad de la formación de ovillos neurofibrilares en el individuo. En ciertos ejemplos, el AGPI comprende ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADPn-6, AAR y ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADPn-6. El AGPI es una combinación de ADH y ADPn-6.

Otro método descrito incluye un método para reducir el nivel de la proteína presenilina-1 (PS1) en el tejido neural de un individuo, que comprende administrar a un individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para reducir el nivel de la proteína PS1 en el individuo. En ciertos ejemplos, el AGPI comprende ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADPn-6, AAR y ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADH. En un ejemplo, el AGPI comprende ADPn-6. En otro ejemplo, el AGPI es una combinación de ADH y ADPn-6.

La presenilina-1 es considerada en la técnica la responsable de la actividad de la gamma-secretasa que escinde la PPA en beta amiloide en péptidos patógenos, o se cree que es un determinante importante de la actividad de la "gamma-secretasa" necesario para la generación de beta-amiloides. Las mutaciones en la proteína precursora amiloide (mPPA) y en la presenilina 1 (mPS1) se han vinculado al aumento de la producción del péptido beta-amiloide ( $\beta$ A). La detección y/o medición de la expresión o actividad de la presenilina-1 pueden lograrse por métodos conocidos en la materia que se discuten más detalladamente a continuación.

Asimismo se describe un método para retrasar la aparición y/o reducir la gravedad de la disfunción sináptica en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para retrasar la aparición y/o reducir la gravedad de la disfunción sináptica en el individuo. En este ejemplo, el AGPI comprende preferentemente ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. En

realizaciones preferentes, el AGPI comprende ADPn-6 o una combinación de ADPn-6 y ADH. La disfunción sináptica es una importante manifestación fenotípica de la neuropatía de la enfermedad de Alzheimer, y figura entre los mejores correlatos para los cambios en la memoria y cognitivos que caracterizan la enfermedad de Alzheimer.

5 Asimismo se describe un método para retrasar la aparición y/o reducir la gravedad de la demencia, que comprende administrar a un individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para retrasar la aparición y/o reducir la gravedad de la demencia en el individuo. En este método, el AGPI comprende preferentemente ADH, o ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. En realizaciones preferentes, el AGPI  
10 comprende ADPn-6 o una combinación de ADPn-6 y ADH.

Asimismo se describe un método para retrasar la aparición y/o reducir la gravedad de un declive en la función cerebral en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para retrasar la aparición y/o  
15 reducir la gravedad de un declive en la función cerebral en el individuo. En este método descrito, el AGPI comprende preferentemente ADH, o ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. En realizaciones preferentes, el AGPI comprende ADPn-6 o una combinación de ADPn-6 y ADH.

20 Asimismo se describe un método para retrasar o reducir la gravedad de la desmielinización en un individuo, que comprende administrar al individuo una cantidad de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo para retrasar o reducir la gravedad de la desmielinización en el individuo. En este método, el AGPI comprende preferentemente ADH o ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y  
25 ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. En algunos métodos, el AGPI comprende ADPn-6 o una combinación de ADPn-6 y ADH. La mielina es la materia de color blanco que recubre los axones de los nervios y permite la conducción neural eficiente de los impulsos entre el cerebro y otras partes del cuerpo. La pérdida de mielina (es decir, desmielinización) o la composición de mielina anormal puede estar asociada con la reducción en la velocidad o actividad de procesamiento neural y posterior declive cognitivo.

30 En otro método, se describe un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con el aumento de las cantidades y/o disfunción de PPA, péptido  $\beta$ A, proteína PS1, proteína tau fosforilada, y/o proteína tau. El método descrito incluye las etapas de: (a) identificación de individuos con cantidades aumentadas y/o disfunción de una proteína o péptido seleccionado entre: PPA, péptido  $\beta$ A, proteína PS1, proteína tau fosforilada, proteína tau, o combinaciones de los mismos; y (b) administración al individuo de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI)  
35 omega-3 y/u omega-6 y/o un precursor o fuente del mismo. En un método descrito, el AGPI se administra en una cantidad que se determina que va a ser suficiente para reducir las cantidades aumentadas o la disfunción de: péptido  $\beta$ A, proteína PS1, proteína tau fosforilada, o proteína tau. En este método descrito, el AGPI comprende preferentemente ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. Los AGPI preferentes incluyen ADH, ADPn-6 o una combinación de ADPn-6 y  
40 ADH.

Asimismo se describe un método para tratar o prevenir un trastorno asociado con cantidades disminuidas de un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6 y/o un precursor o fuente del mismo. El método descrito incluye las etapas de: (a) identificación de individuos con cantidades disminuidas de un ácido graso poliinsaturado  
45 (AGPI) omega-3 y/u omega-6 y/o un precursor o fuente del mismo (por ejemplo, en los tejidos o en la sangre); y (b) administración al individuo de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6 y/o un precursor o fuente del mismo en una cantidad que se determina que es suficiente para compensar los efectos de las cantidades disminuidas de un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6 y/o un precursor o fuente del mismo. En este método descrito, el AGPI comprende preferentemente ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y  
50 ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. Los AGPI preferentes incluyen ADPn-6 o una combinación de ADPn-6 y ADH.

Asimismo se describe un método para retrasar o reducir la gravedad de la disfunción sináptica, declive de la función cerebral, desmielinización, y/o demencia o un trastorno relacionado en un individuo. El método descrito incluye las etapas de: (a) identificación de los individuos con al menos un síntoma o marcador biológico que indica una disfunción sináptica, un declive en la función cerebral, desmielinización, y/o demencia o un trastorno relacionado; y  
55 (b) administración al individuo de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6 y/o un precursor o fuente del mismo en una cantidad que se determina que es suficiente para retrasar o reducir la gravedad de la disfunción sináptica, declive en la función cerebral, desmielinización, y/o demencia o un trastorno relacionado. En este método, el AGPI comprende preferentemente ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. Los AGPI preferentes incluyen ADH,  
60 ADPn-6 o una combinación de ADPn-6 y ADH.

Asimismo se describe un método para estabilizar y normalizar las ondas theta en el electroencefalograma (EEG) en un individuo que tiene pérdida de memoria, enfermedad de Alzheimer precoz, o que es víctima potencial de demencia de cualquier tipo, y que tiene una actividad theta profunda, lenta, anormal en el EEG, concretamente en  
65

los lóbulos frontales. Este método descrito también se puede utilizar para prevenir el desarrollo de la actividad anormal de ondas theta en aquellos que, por antecedentes familiares o por un marcador genético, se presume que son propensos a una actividad anormal de ondas theta. El método descrito incluye las etapas de: (a) identificación de individuos que tienen o se presume que son propensos a un desarrollo de la actividad anormal de ondas theta; y (b) administración al individuo de al menos un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6 y/o un precursor o fuente del mismo en una cantidad que se determina que es suficiente para estabilizar o normalizar la actividad de ondas theta o para prevenir o reducir el desarrollo de la actividad anormal de ondas theta en un individuo. En este método descrito, el AGPI comprende preferentemente ADH, ADPn-6, una combinación de ADPn-6 y ADH, una combinación de ADH y AAR, o una combinación de ADH, ADPn-6 y AAR. Los AGPI preferentes incluyen ADH, ADPn-6 o una combinación de ADPn-6 y ADH.

En un aspecto de las realizaciones descritas anteriormente de la invención, el individuo se identifica como aquel susceptible de padecer demencia o pre-demencia. En otro aspecto, el individuo ha sido diagnosticado positivamente con demencia o pre-demencia. En otro aspecto, el individuo ha sido diagnosticado positivamente con la enfermedad de Alzheimer. Los métodos para determinar si un individuo tiene o es susceptible de padecer demencia o pre-demencia, incluyendo la enfermedad de Alzheimer, incluyen la medición de un marcador biológico (por ejemplo, PPA, péptido  $\beta$ A, proteína PS1, proteína tau fosforilada, o proteína tau, como se describe en la presente memoria), o la determinación de los antecedentes familiares que muestran demencia, o la detección del deterioro cognitivo leve corriente, o la detección del deterioro cognitivo relacionado con la edad.

El deterioro cognitivo leve (DCL) es una forma de pérdida de memoria que pueda afectar a la capacidad de una persona para realizar ensayos neuropsicológicos. Los individuos con DCL tienen por lo general problemas de memoria de acuerdo con las puntuaciones en los ensayos convencionales normativos, pero no tienen deterioro en otros tipos de funciones cerebrales, tales como la planificación o la atención. Estos individuos no tienen problemas significativos en la gestión de las competencias requeridas para la vida cotidiana. Los individuos con DCL han incrementado significativamente el riesgo de desarrollar la enfermedad de Alzheimer u otras formas de demencia.

El declive cognitivo relacionado con la edad (DCRE), también referido como el deterioro de la memoria asociado a la edad (DMAE), declive de la memoria consistente con la edad, olvido senescente benigno (OSB), declive cognitivo (relacionado con la edad), olvido (senescente benigno), o declive de la memoria (consistente con la edad) no se considera como enfermedad, aunque las autoridades difieren en si el declive cognitivo relacionado con la edad está, en parte, relacionado con la enfermedad de Alzheimer y otras formas de demencia o si se trata de una entidad completamente distinta. Las personas con DCRE experimentan el empeoramiento de la memoria y el aprendizaje, la atención y la concentración, el pensamiento, el uso del lenguaje y otras funciones mentales.

El deterioro cognitivo leve (DCL) y el declive cognitivo relacionado con la edad (DCRE) pueden ser identificados por varios ensayos neurológicos y cognitivos, incluyendo, entre otros, mini examen del estado mental (MEEM), batería automatizada del ensayo neuropsicológico de Cambridge (BAENC), ensayo cognitivo por la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer (EcogEEEE), presencia de péptidos beta amiloides o tau fosforilada en el líquido cefalorraquídeo, ventrículos cerebrales aumentados determinados por tomografía por emisión de positrones (TEP) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU), detección de la presencia de placas amiloides u ovillos neurofibrilares en el cerebro por estudio por TEP o TCEFU, electroencefalograma (EEG), y en algunos casos, ensayos genéticos. El DCL puede determinarse por una combinación de exámenes clínicos, ensayos neuropsicológicos que muestran problemas de memoria, memoria anormal para la edad, capacidad para llevar a cabo las actividades normales de la vida diaria, función cognitiva general normal, falta de demencia. Además, los niveles de líquido cefalorraquídeo (LCR), tau, péptidos beta amiloides, y la imagenología cerebral (TEP, TCEFU, imagenología de resonancia magnética (IRM)) pueden utilizarse para descartar la enfermedad de Alzheimer o como factores de riesgo secundarios.

La disfunción sináptica se puede medir de diversas maneras, incluyendo, entre otros, la utilización de oxígeno y glucosa (TEP - tomografía por emisión de positrones, tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU)) y espectroscopia de resonancia magnética funcional (ERMf), electroencefalograma, y potenciación a largo plazo.

La función cerebral puede medirse con diferentes métodos conocidos en la materia, incluyendo varios ensayos cognitivos para evaluar la velocidad del procesamiento de la información, la función ejecutiva y la memoria. Los ejemplos incluyen, entre otros, mini examen del estado mental (MEEM), batería automatizada del ensayo neuropsicológico de Cambridge (BAENC), ensayo cognitivo por la escala de evaluación de la enfermedad de Alzheimer (EcogEEEE), ensayo de clasificación de tarjetas de Wisconsin, ensayo de la fluidez verbal y figural y ensayo de trazados A y B, electroencefalografía (EEG), magnetoencefalografía (MEG), tomografía por emisión de positrones (TEP), tomografía computarizada por emisión de fotón único (TCEFU), imagenología de resonancia magnética (IRM), imagenología de resonancia magnética funcional (IRMf), tomografía computarizada, y potenciación a largo plazo.

EEG, una medida de la actividad eléctrica del cerebro, se logra mediante la colocación de electrodos en el cuero cabelludo en varios puntos de referencia y registra las señales cerebrales amplificadas en gran medida.

MEG es aliado de EEG puesto que mide los campos magnéticos que están vinculados a los campos eléctricos. MEG se utiliza para medir la actividad cerebral espontánea, incluyendo ondas sincronas en el sistema nervioso (Joliot *et al.*, 1994; Deutsch, 1998).

5 TEP proporciona una medida de la utilización de oxígeno y el metabolismo de la glucosa. En esta técnica, se administra un trazador radiactivo emisor de positrones, y la captación del trazador por el cerebro se correlaciona con la actividad cerebral. Estos trazadores emiten rayos gamma que son detectados por los sensores que rodean la cabeza, lo que produce un mapa en 3D de la activación cerebral. Tan pronto como el trazador sea absorbido por el cerebro, la radiactividad detectada se produce como una función del flujo sanguíneo cerebral regional (Frackowiak, 1989), y durante la activación, se puede detectar en cuestión de segundos un aumento de FUN y el metabolismo neuronal de la glucosa.

15 La IRM y la IRMf aprovechan el hecho de que una propiedad de los núcleos atómicos, sus espines, puede manipularse exponiéndolos a una gran fuerza magnética. Mientras que el sujeto recuesta su cabeza en un poderoso imán (1,5 a 5 teslas de fuerza magnética), una antena de radio de onda corta varía el campo magnético de una manera que es mucho más débil que el imán principal. El impulso variable produce una señal de resonancia de los núcleos que se pueden cuantificar en 3D y digitalizarse.

20 Los individuos a tratar mediante los métodos de la invención también pueden ser identificados a través de ensayos neuropsiquiátricos, exámenes clínicos, y las molestias de la pérdida de la función cognitiva individual (por ejemplo, pérdida de la memoria subjetiva).

25 Los marcadores biológicos preferentes a evaluar para identificar los individuos que se van a tratar o para controlar el tratamiento de los individuos utilizando los presentes métodos incluyen, entre otros: PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, PS1, y/o un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6 (y preferentemente ADH, AAR y/o ADPn-6), y/o un precursor o fuente del mismo (por ejemplo, el contenido de estos biomarcadores en una muestra biológica). Preferentemente, la expresión (por ejemplo, detección de ARN o de la proteína) o la actividad biológica de cualquiera de estos marcadores biológicos se mide en una muestra biológica procedente del individuo antes de la etapa de administración de un AGPI de acuerdo con la presente invención. La cantidad, la expresión o actividad biológica de estos biomarcadores se puede medir después de la etapa de administración de un AGPI de acuerdo con la invención, por ejemplo, para controlar el efecto de un método dado en el tratamiento del síntoma o afección.

35 La determinación de la importancia del nivel de cantidad, expresión o actividad biológica del marcador biológico (por ejemplo, determinar si un individuo tiene o es susceptible de padecer demencia o pre-demencia, o determinar si un protocolo de administración de AGPI dado es eficaz) implica comparar el nivel de expresión y/o una actividad biológica de un marcador biológico (también llamado biomarcador) en la muestra individual con un nivel de valor basal de la cantidad, expresión y/o actividad biológica del biomarcador en una muestra de control o valor basal. Un aumento en la cantidad del biomarcador en la muestra individual (para los biomarcadores de PPA,  $\beta$ A, PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, y PS1) en comparación con la cantidad de valor basal, o una disminución en la cantidad de un ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6 en comparación con la cantidad de valor basal, indica que el individuo corre el riesgo, o tiene, disfunción sináptica, declive de la función cerebral, desmielinización, y/o pre-demencia o demencia o un trastorno relacionado (por ejemplo, enfermedad de Alzheimer).

45 Los biomarcadores se evalúan normalmente mediante la evaluación de la cantidad, expresión y/o actividad biológica del biomarcador en una muestra biológica obtenida del individuo. Una muestra biológica puede incluir una muestra celular, una muestra tisular y/o una muestra de fluido corporal. El término "muestra celular" puede utilizarse generalmente para referirse a una muestra de cualquier tipo que contiene células a evaluar por el presente método, incluyendo, entre otros, una muestra de células aisladas, una muestra tisular y/o una muestra de fluido corporal. Como se describe, una muestra de células aisladas es un espécimen de células, generalmente en suspensión o separado del tejido conectivo que puede haber conectado las células en un tejido *in vivo*, que se ha recogido de un órgano, tejido o fluido mediante cualquier método adecuado que da lugar a la recogida de un número adecuado de células para la evaluación por el método de la presente invención. Las células en la muestra celular no tienen que ser necesariamente del mismo tipo, aunque los métodos de purificación pueden utilizarse para aislar las células que se evalúan preferentemente. Las células pueden obtenerse, por ejemplo, raspando un tejido, procesando una muestra tisular para liberar las células individuales, o aislando células de un fluido corporal.

60 Una muestra tisular, aunque similar a una muestra de células aisladas, se define en la presente memoria como una sección de un órgano o tejido del cuerpo que incluye normalmente varios tipos celulares y/o una estructura del citoesqueleto que cohesiona las células. Un experto en la materia apreciará que la expresión "muestra tisular" puede utilizarse, en algunos casos, de manera intercambiable con una "muestra celular", aunque se utiliza preferentemente para designar una estructura más compleja que una muestra celular. Una muestra tisular puede obtenerse por medio de una biopsia, por ejemplo, por corte, corte en rodajas, o utilizando un punzón.

65 Una muestra de fluido corporal, similar a la muestra tisular, también puede contener células y puede obtenerse por cualquier método adecuado para el fluido corporal particular que se va a muestrear. Los fluidos corporales

adecuados para la toma de muestras incluyen, entre otros, sangre, líquido cefalorraquídeo, mucosa, fluido seminal, saliva, leche materna, bilis y orina. En un ejemplo, la muestra biológica es una muestra sanguínea, incluyendo cualquier fracción de sangre (por ejemplo, sangre entera, plasma, suero), o una muestra de líquido cefalorraquídeo.

5 En general, el tipo de muestra (es decir, célula, tejido o fluido corporal) se selecciona basándose en la accesibilidad de la muestra y el fin del método. Normalmente, se describen muestras biológicas que pueden obtenerse por el método menos invasivo (por ejemplo, sangre), aunque en algunos métodos descritos, puede resultar útil o necesario obtener una muestra celular o tisular para su evaluación. Los tejidos individuales también pueden ser evaluados por métodos no invasivos, tales como los métodos de imagenología.

10 Una vez que se obtiene una muestra del individuo, la muestra se evalúa para detectar la presencia, la expresión, o la actividad biológica de cualquier biomarcador descrito en la presente memoria, incluyendo: PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, y/o PS1, y/o ácido graso poliinsaturado (AGPI) omega-3 y/u omega-6, y/o un precursor o fuente del mismo en la muestra. La referencia para detectar la "expresión" de un biomarcador se refiere en general a la detección de la transcripción del ARNm o la traducción de proteínas, incluyendo la detección del procesamiento post-traducciona

15 la detección de la "presencia" de un biomarcador se refiere a cualquier método para detectar si un biomarcador está o no presente en una muestra, y puede, en la mayoría de los casos, utilizarse indistintamente con la detección de la expresión o la detección de la cantidad. Preferentemente, el método de detección de la presencia, cantidad, expresión o actividad biológica en el individuo es idéntico o cualitativamente equivalente al método utilizado para la detección de la presencia, cantidad, expresión o actividad biológica en la muestra que se utiliza para establecer el nivel del valor basal o de control del biomarcador.

20 Los métodos adecuados para la detección de la transcripción del biomarcador incluyen cualquier método adecuado para detectar y/o medir los niveles de ARNm de un fluido, célula o extracto celular. Dichos métodos incluyen, entre otros: reacción en cadena de la polimerasa (PCR), transcriptasa inversa de la PCR (RT-PCR), hibridación *in situ*, membrana de Northern, análisis secuencial, análisis de micromatrices, y detección de un gen indicador. Dichos métodos de detección de los niveles de transcripción se conocen adecuadamente en la materia, y muchos de estos métodos se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Labs Press, 1989 y/o en Glick *et al.*, *Molecular Biotechnology: Principles and Applications of Recombinant DNA*, ASM Press, 1998; Sambrook *et al.*, *ibid.*, y Glick *et al.*, *ibid.* Y se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad. La medición de la transcripción del biomarcador es principalmente adecuada cuando la muestra es una muestra celular o tisular; por lo tanto, cuando la muestra es una muestra de fluido corporal que contiene células o extractos celulares, las células se aíslan normalmente a partir del fluido corporal para realizar el ensayo de expresión.

35 La expresión del biomarcador también puede identificarse mediante la detección de la traducción (es decir, la detección de la proteína en la muestra). Los métodos adecuados para la detección de proteína incluyen cualquier método adecuado para detectar y/o medir proteínas a partir de un fluido, célula o extracto celular. Dichos métodos incluyen, entre otros, membrana de Western, inmunoelectrotransferencia, ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIE), inmunoprecipitación, resonancia de plasmón superficial, quimioluminiscencia, polarización fluorescente, fosforescencia, análisis inmunohistoquímico, espectrometría de masas de desorción/ionización por láser asistida por matriz acoplada a un analizador tiempo de vuelo (MALDI-TOF), microcitometría, micromatrices, microscopía, clasificación celular activada por fluorescencia (CCAF), citometría de flujo, y microchip o micromatrices proteicos, cromatografía líquida de alto rendimiento o cromatografía de exclusión por tamaños. Dichos métodos se conocen adecuadamente en la materia. Los anticuerpos contra los biomarcadores descritos en la presente memoria se han producido y descrito en la materia y se pueden utilizar en muchos de los ensayos para la detección de los biomarcadores.

40 Alternativamente, se puede producir con facilidad anticuerpos que se unen selectivamente a los biomarcadores utilizando técnicas bien conocidas en la materia. La expresión "se une selectivamente" se refiere a la unión específica de una proteína a otra (por ejemplo, un anticuerpo, fragmento del mismo, o coligando a un antígeno), en el que el nivel de unión, como se mide mediante cualquier ensayo convencional (por ejemplo, un inmunoensayo), es estadísticamente significativamente mayor que el control de fondo para el ensayo. Por ejemplo, cuando se realiza un inmunoensayo, los controles incluyen normalmente una pocillo/tubo de reacción que contiene solo un fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno (es decir, en ausencia de antígeno), en el que una cantidad de reactividad (por ejemplo, unión no específica al pocillo) por el fragmento de unión al anticuerpo o al antígeno del mismo en ausencia del antígeno se considera que es de fondo. La unión puede medirse utilizando una variedad de métodos convencionales en la materia incluyendo inmunoensayos enzimáticos (por ejemplo, ELISA), ensayos de inmunoelectrotransferencia, etc.). Los anticuerpos pueden incluir anticuerpos policlonales y monoclonales, anticuerpos divalentes y monovalentes, anticuerpos bi- o multi-específicos, suero que contiene dichos anticuerpos, anticuerpos que se han purificado en diversos grados, y cualquier equivalente funcional de anticuerpos completos (por ejemplo, fragmentos Fv, Fab, Fab', o F(ab)<sub>2</sub>).

65 Como se ha discutido previamente, los péptidos  $\beta$ A se encuentran en los individuos en una o más "formas de tamaño" diferentes. Estas "formas de tamaño" también pueden detectarse y compararse entre sí, o una forma de tamaño

particular de estas proteínas puede ser comparada con el mismo resto en una muestra de valor basal o control. Además, se puede detectar la relación, o el perfil, de diferentes péptidos  $\beta$ A o cualquiera de las formas de tamaño de los otros péptidos mencionados anteriormente en una muestra biológica procedente de un individuo, y comparar el perfil con los de un control de valor basal. Las formas tamaño (restos) de  $\beta$ A particularmente útiles para detectar incluyen los productos de escisión de PPA con una longitud de 15 aminoácidos, 40 aminoácidos, 42 aminoácidos o 43 aminoácidos. Las formas de tamaño pueden detectarse y distinguirse entre sí utilizando muchos de los métodos anteriormente identificados para la detección de la proteína.

Los biomarcadores también pueden medirse en una muestra mediante la detección de una actividad biológica del biomarcador (por ejemplo, una actividad biológica de una proteína). De acuerdo con la presente invención, "actividad biológica" se refiere a cualquier acción biológica de un biomarcador descrito en la presente memoria, incluyendo, entre otros, actividad enzimática; unión de la proteína a otra proteína (por ejemplo, un receptor, proteína de señalización, sustrato, etc.); activación de una proteína; activación de una vía de transducción de señales celulares; y acontecimientos biológicos aguas abajo que se producen como resultado de la expresión, presencia, o activación del biomarcador. Los métodos para detectar la actividad biológica de los biomarcadores desvelados en la presente memoria se conocen en la materia e incluyen, entre otros, ensayos de unión, ensayos enzimáticos, y ensayos de fosforilación.

En consecuencia, varios de los métodos de la presente invención que incluyen una etapa de identificación de un individuo, diagnóstico de un individuo para el tratamiento, y/o el seguimiento de la eficacia de un tratamiento o protocolo, incluyen una etapa para comparar el nivel de expresión o actividad de un biomarcador detectado en los individuos o individuo (por ejemplo, PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, PS1, AGPI omega-3 y/o AGPI omega-6) o el resultado de un ensayo particular relacionado con la disfunción sináptica, función cerebral, desmielinización, y/o demencia o un trastorno relacionado, con un nivel de valor basal o control de la expresión o actividad del biomarcador o el resultado del ensayo. De acuerdo con la presente invención, un "nivel de valor basal" es un nivel de control, y en algunas realizaciones, un nivel normal (por ejemplo, un nivel del biomarcador que se encuentra o que se espera encontrar en un individuo que no tiene demencia o pre-demencia o una afección relacionada con la misma), de la expresión o actividad de un biomarcador o resultado del ensayo contra el cual puede compararse un nivel de ensayo de la expresión o actividad del biomarcador (es decir, en la muestra individual) o resultado del ensayo. Por lo tanto, se puede determinar, basándose en el nivel de control o valor basal del biomarcador o resultado del ensayo, si una muestra a evaluar tiene un aumento, disminución medibles o sin cambio sustancialmente en el nivel de expresión o actividad del biomarcador, o el resultado del ensayo, en comparación con el nivel de valor basal o control. La expresión "control negativo" utilizada en referencia a un nivel de valor basal se refiere a un nivel de valor basal establecido en una muestra procedente de un individuo o procedente de una población de individuos que se cree normal con respecto a la expresión o actividad del biomarcador o con respecto al resultado de un ensayo particular para la función. En otra realización, un valor basal puede ser indicativo de un diagnóstico positivo de demencia u otra afección y/o enfermedad como se discute en la presente memoria. Dicho nivel de valor basal, también denominado en la presente memoria como un valor basal de "control positivo", se refiere a un nivel de una expresión o actividad del biomarcador, o un resultado del ensayo, establecido en una muestra procedente del individuo, otro individuo, o una población de individuos, en el que se cree que el nivel de expresión o actividad del biomarcador en la muestra o el resultado del ensayo del control corresponde a un nivel de biomarcador o un resultado del ensayo que indica una disfunción, pre-demencia o demencia en el individuo. En otro método descrito, el nivel de valor basal puede establecerse a partir de una muestra previa procedente del individuo que se va a ensayar, de modo que el estado del biomarcador o el resultado del ensayo de un individuo puede controlarse con el tiempo.

El método para establecer un nivel de valor basal del biomarcador o el resultado del ensayo se selecciona basándose en el tipo de muestra, el tejido u órgano del que se obtiene la muestra, el estado del individuo a evaluar, y, como se ha discutido previamente, el enfoque u objetivo del ensayo (por ejemplo, diagnóstico inicial, seguimiento). Preferentemente, el método es el mismo método que se utilizará para evaluar la muestra o el individuo.

En un método descrito, el nivel de valor basal de la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador se establece en una muestra de control autólogo obtenida del individuo. La muestra de control autólogo puede ser una muestra de células aisladas, una muestra tisular o una muestra de fluido corporal, y es preferentemente una muestra de fluido corporal (por ejemplo, LCR o sangre). De acuerdo con el método descrito, y como se utiliza en la técnica, el término "autólogo" significa que la muestra se obtiene del mismo individuo del cual se obtiene la muestra a evaluar. Preferentemente, la muestra de control se obtiene del mismo fluido, órgano o tejido que la muestra a evaluar, de manera que la muestra de control sirve como el mejor valor basal posible para la muestra a evaluar. Este método descrito se utiliza con mayor frecuencia cuando se ha establecido una lectura previa del individuo como un diagnóstico positivo o negativo para el biomarcador. Este valor basal puede utilizarse entonces para controlar la progresión continuada del individuo hacia o lejos de una enfermedad o afección, o para controlar el éxito de la terapia (por ejemplo, suplementación con AGPI). En este método descrito, una nueva muestra se evalúa periódicamente (por ejemplo, en los exámenes físicos anuales, lo cual es particularmente útil para los individuos sanos que no han sido diagnosticados con demencia o pre-demencia, pero que desean vigilar los signos de la enfermedad, o en un calendario determinado por el clínico para tratar a un individuo), y el tratamiento preventivo o terapéutico a través de la suplementación con ácidos grasos se determina en cada punto. Para la primera

evaluación, puede utilizarse un control alternativo, como se describe a continuación, o el ensayo adicional puede realizarse para confirmar un diagnóstico inicial negativo o positivo en relación con el biomarcador o el resultado del ensayo y la indicación de pre-demencia o demencia, si se desea, y este nivel de biomarcador o resultado del ensayo se puede utilizar como un valor basal a partir de entonces. Este tipo de control de valor basal se utiliza con frecuencia en otros procedimientos de diagnóstico clínico, en el que un nivel "normal" puede diferir de individuo a individuo y/o en el que no es posible la obtención de una muestra de control autólogo en el momento del diagnóstico, no es práctico ni beneficioso.

Otro método para establecer un nivel de valor basal del biomarcador o resultado del ensayo es establecer un nivel de valor basal de la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador a partir de las muestras de control o un resultado del ensayo de los sujetos de control, en el que los sujetos de control son preferentemente una población de individuos emparejados. Resulta preferente que las muestras de control son del mismo tipo de muestra que el tipo de muestra a evaluar para la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador. De acuerdo con el método descrito, la expresión "individuos emparejados" se refiere a un emparejamiento de los individuos de control sobre la base de una o más características que son adecuadas para el parámetro, tipo de célula, muestra tisular, o una muestra de fluido corporal a evaluar. Por ejemplo, los individuos de control pueden emparejarse con el individuo a evaluar sobre la base de género, edad, raza, o cualquier factor biológico o sociológico relevante que pueda afectar al valor basal de los individuos y el individuo de control (por ejemplo, condiciones preexistentes, consumo de sustancias particulares, niveles de otros factores biológicos o fisiológicos). Por ejemplo, los niveles de los biomarcadores descritos en la presente memoria en la sangre de un individuo normal pueden ser mayores en los individuos de una clasificación dada (por ejemplo, ancianos frente a adolescentes, mujeres frente a hombres). Para establecer un nivel de control o de valor basal de la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador, las muestras de un número de individuos emparejados se obtienen y se evalúan para la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador. El número de individuos emparejados de los cuales se ha de obtener muestras de control para establecer un nivel adecuado de control (por ejemplo, una población) se puede determinar por los expertos en la materia, pero debe ser estadísticamente apropiado para establecer un valor basal adecuado para la comparación con el individuo a evaluar (es decir, el individuo del ensayo). Los valores obtenidos de las muestras de control se procesan estadísticamente para establecer un nivel de valor basal adecuado utilizando métodos convencionales en la materia para establecer dichos valores.

Un valor basal de este tipo como el que se ha descrito previamente puede ser un valor basal de control negativo, tal como un valor basal establecido a partir de una población de individuos de control aparentemente normales. Alternativamente, como se ha discutido previamente, un valor basal de este tipo puede establecerse a partir de una población de individuos que han sido diagnosticados positivamente por tener niveles anormales de biomarcadores, disfunción en un biomarcador, disfunción sináptica, declive de la función cerebral, desmielinización, y/o demencia o pre-demencia, de modo que uno o más niveles de valor basal pueden establecerse para su uso en la evaluación de un individuo. El nivel de cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador en la muestra individual o el resultado del ensayo del individuo se compara entonces con cada uno de los niveles de valor basal para determinar a qué tipo de valor basal (positivo o negativo) el nivel de biomarcador o resultado del ensayo del individuo es estadísticamente más cercano. Se apreciará que una muestra individual dada puede caer entre los niveles de valor basal, de modo que el mejor diagnóstico es que el individuo se encuentre tal vez comenzado a manifestar una disfunción indicativa de la necesidad de al menos alguna suplementación de ácidos grasos, y se encuentre quizás en proceso de avanzar a la fase más avanzada. El objetivo de la invención consiste en invertir, corregir o compensar dicho avance de la enfermedad.

Los expertos en la materia apreciarán que un valor basal no tiene por qué establecerse para cada ensayo o evaluación cuando el ensayo o evaluación se lleve a cabo, sino más bien, un valor basal puede establecerse tomando como referencia una forma de la información almacenada con respecto a un nivel de valor basal determinado previamente para una muestra de control dado, tal como un nivel de valor basal establecido por cualquiera de los métodos descritos anteriormente. Dicha forma de información almacenada puede incluir, por ejemplo, entre otros, un gráfico de referencia, listado o archivo electrónico de los datos de la población o de un individuo con respecto a los controles "normales" (control negativo) o positivos; un expediente médico de los datos de registro individuales a partir de las evaluaciones previas; o cualquier otra fuente de datos con respecto a la expresión o actividad del biomarcador de valor basal o un resultado del ensayo que es útil para el individuo que va a diagnosticarse o evaluarse.

Al comparar los resultados del ensayo individual o muestra individual con el control o controles de valor basal, se determina si la muestra de ensayo tiene una disminución o aumento medible en la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador sobre el nivel de valor basal, o si no hay diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de ensayo y de valor basal. Tras esta etapa, se puede realizar la etapa final de efectuar un diagnóstico, tratar un individuo, controlar el individuo, o determinar un tratamiento adicional del individuo.

La detección de un aumento del nivel de la cantidad, expresión o actividad biológica de PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, y/o PS1, o la detección de un aumento del procesamiento de PPA en las formas de tamaño más tóxicas de  $\beta$ A, en la muestra a evaluar (es decir, la muestra de ensayo), o la detección de un aumento o ningún declive en la disfunción sináptica, declive de la función cerebral, desmielinización, y/o un síntoma de

demencia, o detección de cantidades reducidas de AGPIs omega-3 u omega-6, en comparación con el nivel de valor basal, indica en general que, en comparación con la muestra de valor basal o el resultado de valor basal, el individuo puede haber aumentado la susceptibilidad o tener cualquiera de las enfermedades o afecciones discutidas en la presente memoria (por ejemplo, demencia). Si la muestra de valor basal es una muestra o evaluación previa del individuo (o un control de la población) y es representativa de un diagnóstico positivo de demencia o pre-demencia en el individuo, una detección del aumento de la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador en la muestra o la detección de un incremento o ningún declive en la disfunción sináptica, declive de la función cerebral, desmielinización, y/o demencia, o la detección de la disminución de AGPIs omega-3 u omega-6, en comparación con el valor basal, indica que la afección del individuo está empeorando, en lugar de mejorar y que el tratamiento debe de ser reevaluado o ajustado.

La detección de una cantidad normal o saludable de la cantidad, expresión o actividad biológica PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, y/o PS1, la detección del procesamiento de PPA a la forma de tamaño menos tóxica de  $\beta$ A en la muestra a evaluar (es decir, la muestra de ensayo), o la detección de: disfunción sináptica reducida o sin disfunción sináptica, declive de la función cerebral reducida o sin declive de la función cerebral, desmielinización reducida, y/o síntomas de demencia reducidos o sin síntomas de demencia, o la detección de niveles normales o aumentados o la detección de AGPIs omega-3 u omega-6, en comparación con el valor basal, indica que, en comparación con la muestra del valor basal, el individuo puede haber disminuido la susceptibilidad o no tiene cualquiera de las enfermedades o afecciones discutidas en la presente memoria. Si la muestra de valor basal es una muestra previa del individuo (o de un control de la población) y es representativa de un diagnóstico positivo de demencia o pre-demencia en el individuo (es decir, un control positivo), una detección de este resultado en la muestra o individuo en comparación con el valor basal indica que el individuo está experimentando una mejora de las enfermedades o afecciones discutidas en la presente invención.

Finalmente, la detección de una expresión o actividad del biomarcador, o un resultado del ensayo, que no es estadísticamente significativamente diferente de la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador, o el resultado del ensayo en la muestra de valor basal indica que, en comparación con la muestra de valor basal, no se indica diferencia alguna en las enfermedades o afecciones discutidas en la presente memoria en el individuo. Si la muestra de valor basal es una muestra previa del individuo (o de un control de la población) y es representativa de un diagnóstico positivo de la demencia o pre-demencia en el individuo (es decir, un control positivo), una detección de la expresión o actividad del biomarcador o un resultado del ensayo que no es estadísticamente significativamente diferente del valor basal indica que el individuo no ha sufrido cambio alguno en la afección, lo que podría sugerir a un clínico que un tratamiento se encuentra actualmente prescrito, por ejemplo, es ineficaz en el control de la afección.

Con el fin de establecer un diagnóstico de un cambio en comparación con un nivel de valor basal de la expresión o actividad de un biomarcador o con respecto a un resultado del ensayo, el nivel de expresión o actividad de un biomarcador o el valor del resultado del ensayo se cambia en comparación con el valor basal establecido por una cantidad que es estadísticamente significativa (es decir, con al menos un nivel de confianza del 95 %, o  $p < 0,05$ ). Preferentemente, la detección de al menos aproximadamente un cambio del 5 %, y más preferentemente, al menos aproximadamente un cambio del 10 %, y más preferentemente, al menos aproximadamente un cambio del 20 %, y más preferentemente, al menos aproximadamente un cambio del 30 %, y más preferentemente, al menos aproximadamente un cambio del 40 %, y más preferentemente, al menos aproximadamente un cambio del 50 %, en la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador en la muestra o en un valor del resultado del ensayo, en comparación con el nivel de valor basal, resulta en un diagnóstico de una diferencia entre la muestra de ensayo y la muestra de valor basal. En un ejemplo descrito, un cambio en la proporción de 1,5 veces en la cantidad, expresión o actividad biológica del biomarcador en la muestra o en un valor del resultado del ensayo en comparación con el valor basal, y más preferentemente, la detección de al menos aproximadamente un cambio en la proporción de 3 veces, y más preferentemente, al menos aproximadamente un cambio en la proporción de 6 veces, y aún más preferentemente, al menos aproximadamente un cambio en la proporción de 12 veces, y aún más preferentemente, al menos aproximadamente un cambio en la proporción de 24 veces, da como resultado un diagnóstico de un cambio significativo en la expresión o actividad del biomarcador o en un valor del resultado del ensayo, en comparación con la muestra de valor basal.

Los métodos descritos incluyen el seguimiento de la eficacia de la administración de AGPIs en los niveles de PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, proteína PS1, y en algunas realizaciones, los niveles de AGPI omega-3 y/o AGPI omega-6 en el individuo al menos un momento posterior a la etapa de administración. La eficacia puede medirse por un cambio en la cantidad y/o actividad biológica de uno o más biomarcadores, mejora del deterioro cognitivo leve, mejora del declive cognitivo relacionado con la edad, y/o cualquier otro método conocido en la materia que se ha discutido con más detalle anteriormente. El método puede incluir opcionalmente además el ajuste de la administración de AGPI al individuo en tratamientos posteriores basados en los resultados del seguimiento de la eficacia del tratamiento.

Los métodos de diagnóstico y seguimiento descritos tienen varios usos diferentes. En primer lugar, el método se puede utilizar para diagnosticar y controlar un subconjunto de individuos que tienen un exceso de expresión de PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, y/o PS1 o disfunción en un grupo mayor de individuos que tienen



una afección dada (por ejemplo, una afección neurológica), con el fin de identificar a los individuos que tienen más probabilidades de beneficiarse de los métodos de la presente invención. De hecho, se cree que el método descrito es eficaz en el desarrollo precoz de la demencia y pre-demencia, antes de que los síntomas patentes del declive cognitivo puedan ser evidentes. El método también puede utilizarse para diagnosticar y controlar individuos mediante la identificación de individuos que tengan deficiencia de AGPI (por ejemplo, deficiencia de ADH, ADPn-6 y/o AAR), o el potencial de deficiencia de AGPI en un individuo. El individuo puede ser un individuo que se sospecha que tiene una deficiencia de AGPI o un individuo que se presume que es sano, pero que se somete a una evaluación rutinaria para la deficiencia de AGPI. El individuo también puede ser un individuo que ha sido previamente diagnosticado con deficiencia de AGPI y tratado, y que ahora está bajo vigilancia rutinaria para la deficiencia recurrente de AGPI.

Los términos "diagnosticar", "diagnóstico", "diagnóstico" y variantes de los mismos se refieren a la identificación de una enfermedad o afección sobre la base de sus signos y síntomas. Como se utiliza en la presente memoria, un "diagnóstico positivo" indica que se ha identificado la enfermedad o afección, o un potencial para el desarrollo de la enfermedad o afección. Por el contrario, un "diagnóstico negativo" indica que no se ha identificado la enfermedad o afección, o un potencial para el desarrollo de la enfermedad o afección. En el caso de un diagnóstico positivo, al individuo se le puede prescribir un tratamiento para invertir o eliminar los signos de demencia o pre-demencia, la deficiencia de AGPI, y/o la cantidad, expresión y/o actividad anormal de PPA, péptido  $\beta$ A, proteína tau, proteína tau fosforilada, y/o PS1. En el caso de un diagnóstico negativo (es decir, una evaluación negativa), al individuo no se le prescribe normalmente ningún tratamiento, o puede situarse en un nivel bajo de suplementación de AGPI, pero puede ser reevaluado en uno o más puntos temporales en el futuro para evaluar de nuevo el nivel de los biomarcadores o indicadores de la disfunción sináptica, función cerebral, desmielinización, y/o un síntoma de demencia. Los niveles de valor basal para este ejemplo particular descrito del método de evaluación se basan normalmente en una muestra "normal" o "sana" de la misma fuente corporal que la muestra de ensayo (es decir, el mismo tejido, células o fluidos corporales), como se discute con detalle a continuación.

El método descrito que también puede utilizarse se utiliza para controlar el éxito, o la falta del mismo, de un tratamiento para la demencia o pre-demencia o un síntoma o indicador de la misma (por ejemplo, un nivel de biomarcador como se describe en la presente memoria) en un individuo al que se le ha dado un diagnóstico negativo con respecto a las afecciones descritas en la presente memoria. Esto permite al médico o al profesional controlar el éxito, o la falta del mismo, de un tratamiento (por ejemplo, suplementación con AGPI) que el individuo está recibiendo para una afección dada y puede ayudar al médico a determinar si el tratamiento debe ser modificado (por ejemplo, si la suplementación con AGPI se debe aumentar, disminuir o mantenerse sustancialmente idéntica). En un ejemplo, el método incluye etapas adicionales para proporcionar otro tratamiento al individuo que es útil para el tratamiento y/o prevención de la demencia o pre-demencia o síntomas de la misma.

La administración de AGPI o AGPIs con el fin de regular el nivel de un biomarcador o el nivel tisular de AGPI, o para retrasar la aparición/desarrollo o reducir la gravedad de una demencia o pre-demencia o un síntoma o afección relacionada con la misma debe proporcionar algún beneficio (por ejemplo, beneficio terapéutico o para la salud) tanto a individuos sanos, normales, así como a individuos que puedan estar desarrollando demencia o pre-demencia, o que tienen demencia o pre-demencia. Como tal, un beneficio terapéutico no es necesariamente una cura para una enfermedad o afección particular, sino más bien, abarca preferentemente un resultado que incluye normalmente el alivio de la enfermedad o afección, la eliminación de la enfermedad o afección, la reducción de un síntoma asociado con la enfermedad o afección, el retraso de la aparición o el desarrollo de un síntoma de una enfermedad, afección o síntoma, la prevención o el alivio de una enfermedad o afección secundaria resultante de la ocurrencia de una enfermedad o afección primaria, y/o la prevención de la enfermedad o afección. Como se utiliza en la presente memoria, la expresión "protegido de una enfermedad" se refiere a la reducción de los síntomas de la enfermedad o afección, a la reducción de la ocurrencia de la enfermedad o afección, al retraso de la aparición o el desarrollo de la enfermedad o afección, y/o a la reducción de la gravedad de la enfermedad o afección. Como tal, para proteger a un individuo de una enfermedad se incluye tanto la prevención o el retraso o reducción de la ocurrencia de la enfermedad (tratamiento profiláctico) y el tratamiento de un individuo que tiene una enfermedad (tratamiento terapéutico). Un efecto beneficioso puede evaluarse con facilidad por un experto en la materia y/o por un clínico entrenado que está tratando a un individuo. El término "enfermedad" se refiere a cualquier desviación de la salud normal de un mamífero e incluye un estado cuando se presentan los síntomas de la enfermedad; así como las afecciones en las que se ha producido una desviación, pero los síntomas aún no se han manifestado.

Los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) son componentes cruciales de los lípidos de membrana en la mayoría de las eucariotas (Lauritzen *et al.*, *Prog. Lipid. Res.* 40 1 (2001); McConn *et al.*, *Plant J.* 15, 521 (1998)) y son precursores de ciertas hormonas y moléculas de señalización (Heller *et al.*, *Drugs* 55, 487 (1998); Creelman *et al.*, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 48, 355 (1997)).

Los AGPI son ácidos grasos con una longitud de cadena de carbono de al menos 16 carbonos, y más preferentemente al menos 18 carbonos, y más preferentemente al menos 20 carbonos, y más preferentemente 22 o más átomos de carbono, con al menos 3 o más dobles enlaces, y preferentemente 4 o más, y más preferentemente 5 o más, e incluso más preferentemente 6 o más dobles enlaces, en los que todos los dobles enlaces se encuentran en la configuración *cis*. La referencia a los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (AGPICLs) en la presente

memoria, se refiere más particularmente a los ácidos grasos con una longitud de cadena de 18 y más carbonos, y preferentemente con una longitud de cadena de 20 y más carbonos, que contienen 3 o más dobles enlaces. AGPICLs de la serie omega-6 incluyen: ácido gamma-linolénico (C18:3), ácido dihomogammalinolénico (C20:3n-6), ácido araquidónico (C20:4n-6), ácido adrenico (también llamado ácido docosatetraenoico o ADT) (C22:4n-6), y ácido docosapentaenoico (C22:5n-6). Los AGPICL de la serie omega-3 incluyen: ácido alfa-linolénico (C18:3), ácido eicosatrienoico (C20:3n-3), ácido eicosatetraenoico (C20:4n-3), ácido eicosapentaenoico (C20:5n-3), ácido docosapentaenoico (C22:5n-3), y ácido docosahexaenoico (C22:6n-3). Los AGPCLI también incluyen ácidos grasos con más de 22 carbonos y 4 o más dobles enlaces, incluyendo, entre otros, C28:8(n-3).

Como se utiliza en la presente memoria, el término "lípidos" incluye fosfolípidos (FL); ácidos grasos libres; ésteres de ácidos grasos; triacilglicérolos (TAG); diacilglicéridos; monoacilglicéridos; fosfátidos; ceras (ésteres de alcoholes y ácidos grasos); esteroides y ésteres de esteroides; carotenoides; xantofilas (por ejemplo, oxicarotenoides); hidrocarburos; y otros lípidos conocidos por un experto en la materia. Las expresiones "ácido graso poliinsaturado" y "AGPI" incluyen no solo la forma de ácidos grasos libres, sino también otras formas, tales como la forma de TAG y la forma de FL.

Las combinaciones de ácidos grasos, y en particular, los ácidos grasos omega-3 y los ácidos grasos omega-6 pueden utilizarse en los métodos de la invención. Los AGPI descritos incluyen los ácidos grasos poliinsaturados omega-3 y omega-6 con tres o más dobles enlaces. Los AGPI omega-3 son ácidos grasos polietilénicos en los que el enlace etilénico final consiste en tres carbonos e incluyen el grupo metilo terminal del ácido graso e incluyen, por ejemplo, ácido docosahexaenoico C22:6(n-3) (ADH) y ácido docosapentaenoico omega-3 C22:5(n-3) (ADPn-3). Los AGPI omega-6 son ácidos grasos polietilénicos en los que el enlace etilénico final consiste en seis carbonos e incluyen el grupo metilo terminal del ácido graso e incluyen, por ejemplo, ácido araquidónico C20:4(n-6) (AAR); C22:4(n-6), ácido docosapentaenoico omega-6 C22:5(n-6) (ADPn-6); y ácido dihomogammalinolénico C20:3(n-6) (AdihomoGL). La presente invención utiliza una composición que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico (ADPn-6), en el que la relación de ADH a ADPn-6 oscila entre aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1.

Cualquier fuente de AGPI puede utilizarse en las composiciones y métodos de la presente invención, incluyendo, por ejemplo, fuentes animales, vegetales y microbianas. Las fuentes preferentes de ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) pueden ser cualquier fuente de AGPIs que sean adecuadas para su uso en la presente invención. Las fuentes preferentes de ácidos grasos poliinsaturados incluyen fuentes de biomasa, tales como fuentes animales, vegetales y/o microbianas.

Ejemplos de fuentes animales incluyen animales acuáticos (por ejemplo, peces, mamíferos marinos, crustáceos, rotíferos, etc.) y lípidos extraídos de los tejidos animales (por ejemplo, cerebro, hígado, ojos, etc.). Ejemplos de fuentes vegetales incluyen microalgas, semillas de lino, semillas de colza, maíz, onagra, soja y borraja. Ejemplos de microorganismos incluyen microalgas, protistas, bacterias y hongos (incluyendo levaduras). El uso de una fuente de microorganismos, tales como microalgas, puede proporcionar ventajas organolépticas, es decir, los ácidos grasos a partir de una fuente de microorganismos pueden no tener el sabor y el olor a pescado que tienden a tener los ácidos grasos a partir de una fuente de pescado. Más preferentemente, la fuente de ácido graso de cadena larga comprende microalgas o aceites de microalgas.

Preferentemente, cuando los microorganismos son la fuente de los ácidos grasos de cadena larga, los microorganismos se cultivan en un medio de fermentación en un fermentador. Alternativamente, los microorganismos pueden cultivarse fotosintéticamente en un fotobiorreactor o estanque. Preferentemente, los microorganismos son microorganismos ricos en lípidos, más preferentemente, los microorganismos se seleccionan entre el grupo que consiste en microalgas, bacterias, hongos y protistas, más preferentemente, los microorganismos se seleccionan entre el grupo que consiste en algas doradas, algas verdes, dinoflagelados, levaduras, hongos del género *Mortierella* y *Stramenopiles*. Preferentemente, los microorganismos comprenden microorganismos del género *Cryptocodinium* y orden *Thraustochytriales* y hongos filamentosos del género *Mortierella*, y más preferentemente, los microorganismos se seleccionan entre el género *Thraustochytrium*, *Schizochytrium*, *Ulkenia* o mezclas de los mismos, más preferentemente, los microorganismos se seleccionan entre el grupo que consiste en microorganismos que tienen las características identificativas de la CCTA número 20888, CCTA número 20889, CCTA número 20890, CCTA número 20891 y CCTA número 20892, cepas de *Mortierella schmuckeri* y *Mortierella alpina*, cepas de *Cryptocodinium cohnii*, cepas mutantes derivadas de cualquiera de las anteriores, y sus mezclas. La información con respecto a estas algas se puede hallar en las patentes de Estados Unidos n.º 5.407.957, 5.130.242 y 5.340.594, que se incorporan en la presente memoria por referencia en su totalidad.

De acuerdo con la invención, la expresión "microalgas marinas" incluye microalgas que pueden habitar naturalmente en entornos marinos o salinos. Las microalgas marinas, como se hace referencia en la presente memoria, incluyen microorganismos del orden *Thraustochytriales* (también denominado en la presente memoria como *Thraustochytridos*) y microorganismos del orden *Labyrinthulales* (también denominado en la presente memoria como *Labyrinthulidos*). Se reconoce que en el momento de la presente invención, la revisión en la taxonomía de los *Thraustochytridos* coloca al género *Labyrinthuloides* en la familia de *Labyrinthulaceae* y confirma el emplazamiento de las dos familias *Thraustochytriaceae* y *Labyrinthulaceae* en el linaje *Stramenopile*. Cabe destacar que

*Labyrinthulaceae* se llama comúnmente a veces *labyrinthulidos* o *labyrinthula* o *labyrinthuloides* y *Thraustochytriaceae* se llaman comúnmente *thraustochytridos*. Los miembros de la familia *Labyrinthulaceae* se han considerado previamente como miembros del orden *Thraustochytriales*, pero la familia se considera ahora que es un miembro del orden *Labyrinthulales*, y se considera que tanto *Labyrinthulales* como *Thraustochytriales* son miembros del filo *Labyrinthulomycota*. En consecuencia, como se utiliza en la presente memoria, el término "*Thraustochytrido*" se refiere a cualquier miembro del orden de *Thraustochytriales*, que incluye la familia *Thraustochytriaceae*, y el término "*Labyrinthulido*" se refiere a cualquier miembro del orden de *Labyrinthulales*, que incluye la familia *Labyrinthulaceae*.

Los avances han dado lugar a frecuentes revisiones de la taxonomía de los *Thraustochytridos* (*thraustochytridos*). Los teóricos taxonómicos suelen situar los *Thraustochytridos* con las algas o protistas similares a algas. No obstante, debido a la incertidumbre taxonómica, sería mejor para fines de la presente invención tener en cuenta que las cepas descritas en la presente invención como *Thraustochytridos* incluyan los siguientes organismos: orden: *Thraustochytriales*; familia: *Thraustochytriaceae*; género: *Thraustochytrium* (especie: sp., *arudimentale*, *aureum*, *benthicola*, *globosum*, *kinnei*, *motivum*, *multirudimentale*, *pachydermum*, *proliferum*, *roseum*, *stratum*), *Ulkenia* (anteriormente considerada por algunos como un miembro de *Thraustochytrium*) (especie: sp., *amoeboidea*, *keruelensis*, *minuta*, *profunda*, *radiata*, *sailens*, *sarkariana*, *schizochytrids*, *visurgensis*, *yorkensis*), *Schizochytrium* (especie: sp., *aggregatum*, *limnaceum*, *mangrovei*, *minutum*, *octosporum*), *Japonochytrium* (especie: sp., *marinum*), *Aplanochytrium* (especie: sp., *haliotidis*, *keruelensis*, *profunda*, *stocchinoi*), *Althornia* (especie: sp., *crouchii*), o *Elina* (especie: sp., *marisalba*, *sinorifica*).

Las cepas descritas en la presente invención como *Labyrinthulidos* incluyen los siguientes organismos: orden: *Labyrinthulales*, familia: *Labyrinthulaceae*, género: *Labyrinthula* (especie: sp., *algeriensis*, *coenocystis*, *chattonii*, *macrocystis*, *macrocystis atlantica*, *macrocystis macrocystis*, *marina*, *minuta*, *roscoffensis*, *valkanovii*, *vitellina*, *vitellina pacifica*, *vitellina vitellina*, *zopfii*), *Labyrinthuloides* (especie: sp., *haliotidis*, *yorkensis*), *Labyrinthomyxa* (especie: sp., *marina*), *Diplophrys* (especie: sp., *archeri*), *Pyrrhosorus* (especie: sp., *marinus*) *Sorodiplophrys* (especie: sp., *stercorea*) o *Chlamydomyxa* (especie: sp., *labyrinthuloides*, *montana*) (en la actualidad no existe consenso alguno sobre el emplazamiento taxonómico exacto de *Pyrrhosorus*, *Sorodiplophrys* o *Chlamydomyxa*).

La presente invención se refiere al uso de ácido docosahexaenoico (ADH; al menos aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30 o aproximadamente 35 por ciento en peso) y ácido docosapentaenoico (ADPn-6; al menos aproximadamente 5, aproximadamente 10, aproximadamente 15, o aproximadamente 20 por ciento en peso). Igualmente se describe ácido araquidónico (AAR; al menos aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40 o aproximadamente 50 por ciento en peso). Otros AGPIs pueden incluir ácido eicosapentaenoico (AEP). Los AGPI incluyen ácidos grasos libres y compuestos que comprenden residuos de AGPI, incluyendo fosfolípidos; ésteres de ácidos grasos; triglicéridos; diacilglicéridos; monoacilglicéridos; lisofosfolípidos; fosfátidos; etc.

Fuentes de fosfolípidos incluyen huevos de aves de corral, huevos de aves de corral enriquecidos, algas, peces, huevas, y semillas vegetales modificadas por ingeniería genética (IG) o microalgas. Las fuentes de AGPIs particularmente preferentes, incluyendo ADH, incluyen, entre otros, aceite de pescado, microalgas marinas, y aceites vegetales, incluyendo aceites de microalgas modificadas por ingeniería genética y plantas. Los precursores preferentes del AGPI, ADH, incluyen, entre otros, ácido  $\alpha$ -linolénico (ALN); ácido eicosapentaenoico (AEP); ácido docosapentaenoico (ADP); combinaciones de ALN, AEP, y/o ADP.

De conformidad con la presente invención, los ácidos grasos de cadena larga que se utilizan en los complementos y las composiciones terapéuticas descritas en la presente memoria se encuentran en diversas formas. Por ejemplo, tales formas incluyen, entre otros: un aceite de algas altamente purificado que comprende AGPI, un aceite vegetal que comprende AGPI, aceite de triglicéridos que comprende AGPI, fosfolípidos que comprenden AGPI, una combinación de proteínas y fosfolípidos que comprende AGPI, microalgas marinas secas que comprenden AGPI, esfingolípidos que comprenden AGPI, ésteres de AGPI, ácido graso libre, un conjugado de AGPI con otra molécula bioactiva, y combinaciones de los mismos. Los ácidos grasos de cadena larga pueden proporcionarse en cantidades y/o relaciones que son diferentes de las cantidades o relaciones que se producen en la fuente natural de los ácidos grasos, tales como por combinación, purificación, enriquecimiento e ingeniería genética de la fuente. Las moléculas bioactivas pueden incluir cualquier molécula adecuada, incluyendo, entre otros, una proteína, un aminoácido (por ejemplo, aminoácidos de origen natural, tales como ADH-glicina, ADH-lisina, o análogos de aminoácidos), un fármaco, y un carbohidrato. Las formas descritas en la presente memoria permiten proporcionar una flexibilidad en la formulación de alimentos con alta calidad sensorial, complementos dietéticos y agentes farmacéuticos. Por ejemplo, los aceites de microalgas disponibles actualmente contienen aproximadamente ADH al 40 %. Estos aceites pueden ser convertidos en forma de éster y luego purificados utilizando técnicas, tales como destilación molecular para ampliar el contenido de ADH al 70 % y superior, proporcionando un producto concentrado que puede ser útil en los productos con limitaciones de tamaño, es decir, pequeños tamaños de porciones, tales como alimentos infantiles o complementos dietéticos con un tamaño factible limitado de píldora. El uso de combinaciones de aceite y fosfolípidos ayuda a potenciar la estabilidad oxidativa y por lo tanto la calidad sensorial y nutritiva del aceite de microalgas. La descomposición por oxidación compromete la calidad nutricional y sensorial de los AGPI en forma de triglicéridos. Mediante el empleo de la forma de fosfolípidos, los AGPI deseados son más estables y los ácidos grasos son más

biodisponibles cuando se encuentran en forma de triglicéridos. Aunque los aceites microbianos son más estables que los aceites de pescado típicos, ambos están sujetos a la degradación oxidativa. La degradación oxidativa disminuye el valor nutricional de estos ácidos grasos. Adicionalmente, se cree que los ácidos grasos oxidados son perjudiciales para una buena salud. El uso del fosfolípido ADH/ADPn-6, un sistema de ácido graso más estable, potencia la salud y el valor nutricional de estos complementos. Los fosfolípidos son también más fáciles de combinar en sistemas acuosos que los aceites de triglicéridos. El uso de combinaciones de proteínas y fosfolípidos permite la formulación de alimentos nutricionalmente más complejos a medida que se proporcionan las proteínas y los ácidos grasos. El uso de microalgas marinas secas proporciona estabilidad a alta temperatura para el aceite en esta y es ventajoso para la formulación de alimentos horneados a alta temperatura.

En una realización de la invención, una fuente de los fosfolípidos deseados incluye fosfolípidos purificados de huevos, aceites vegetales, y órganos de animales preparados mediante el proceso de Friolex y el proceso de extracción de fosfolípidos (PEF) (o procesos relacionados) para la preparación de complementos nutricionales ricos en ADH, ADP, AAR y/o AdihomoGL. Friolex y PEF, y los procesos relacionados se describen con mayor detalle en las patentes PCT n.º PCT/IB01/00841, titulada "*Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials*", presentada el 12 de abril de 2001, publicada como documento WO 01/76715 el 18 de octubre de 2001; PCT/IB01/00963, titulada "*Method for the Fractionation of Oil and Polar Lipid-Containing Native Raw Materials Using Alcohol and Centrifugation*", presentada el 12 de abril de 2001, publicada como WO 01/76385 el 18 de octubre de 2001; y PCT/DE95/01065, titulada "*Process For Extracting Native Products Which Are Not Water-Soluble From Native Substance Mixtures By Centrifugal Force*", presentada el 12 de agosto de 1995, publicada como WO 96/05278 el 22 de febrero de 1996.

Preferentemente, el aceite de algas altamente purificado que comprende AGPI deseado en forma de triglicéridos, el aceite de triglicéridos combinado con fosfolípidos, solo fosfolípidos, combinación de proteínas y fosfolípidos, o microalgas marinas secas, comprende residuos de ADH y ADPn-6. Más preferentemente, el aceite de algas altamente purificado que comprende AGPI deseado en forma de triglicéridos, aceite de triglicéridos combinado con fosfolípidos, solo fosfolípidos, combinación de proteínas y fosfolípidos, o microalgas marinas secas, comprende ADH y ADPn-6. Más preferentemente, el aceite de algas altamente purificado que comprende AGPI deseado en forma de triglicéridos, aceite de triglicéridos combinado con fosfolípidos, solo fosfolípidos, combinación de proteínas y fosfolípidos, o microalgas marinas secas, comprende ADH y ADPn-6.

El AGPI comprende una combinación de ADPn-6 y ADH. El inventor ha descubierto que esta combinación de AGPIs ofrece un beneficio sorprendente e inesperado sobre la administración de solo ADH. Es inesperado que la combinación de ADPn-6 y ADH en particular ofrezca cualquier beneficio sobre la administración de solo ADH o ADH en combinación con otros AGPIs omega-6. Es sorprendente porque las funciones de ADPn-6 en los tejidos se elevan cuando se consume una dieta insuficiente en ADH. El aumento de ADPn-6 en los tejidos de un animal con deficiencia de ADH se asocia a menudo con la función tisular sub-óptima. En los presentes ejemplos, a los animales a los que se les proporcionó una dieta suficiente en ADH preformado en combinación con ADPn-6 habían aumentado significativamente los niveles de ADPn-6 en el tejido y los niveles de AAR fueron superiores en comparación con los animales alimentados con solo ADH. Los animales con niveles de ADH y AAR superiores en sangre tendieron a tener una mayor reducción de PS-1, la proteína asociada a la escisión de PPA en péptidos amiloides tóxicos. Es más, a los animales que se les proporcionó una dieta suficiente en ADH preformado en combinación con ADPn-6 habían reducido los niveles de tau fosforilada, que se asocia con el desarrollo de ovillos neurofibrilares en pacientes con demencia.

En otra realización preferente, el AGPI comprende un aceite o una formulación que comprende aproximadamente 30 % o más, aproximadamente 35 % o más, aproximadamente 40 % o más, aproximadamente 45 % o más, aproximadamente 50 % o más, aproximadamente 55 % o más, aproximadamente 60 % o más, aproximadamente 65 % o más, aproximadamente 70 % o más, aproximadamente 75 % o más, o aproximadamente 80 % o más de una combinación de ADPn-6 y ADH. La relación de ADH a ADPn-6 en el aceite o la formulación oscila entre aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1, o cualquier relación entre 1:1 y 10:1.

El AGPI puede comprender una combinación de ADH, AAR y ADPn-6, que ofrece un beneficio sorprendente e inesperado sobre la administración de solo ADH por motivos discutidos previamente. En otra realización preferente, el AGPI comprende un aceite o una formulación que comprende aproximadamente 30 % o más, aproximadamente 35 % o más, aproximadamente 40 % o más, aproximadamente 45 % o más, aproximadamente 50 % o más, aproximadamente 55 % o más, aproximadamente 60 % o más, aproximadamente 65 % o más, aproximadamente 70 % o más, aproximadamente 75 % o más, o aproximadamente 80 % o más de una combinación de ADPn-6, AAR y ADH. Preferentemente, la relación de ADH a AAR a ADPn-6 es de aproximadamente 1:1:1 a aproximadamente 10:1:1, o cualquier relación entre 1:1:1 y 10:1:1.

La ingesta diaria de AGPI oscila preferentemente entre aproximadamente 0,025 mg a aproximadamente 15 gramos diarios, incluyendo cualquier incremento intermedio, en incrementos de 0,005 (por ejemplo, 0,025, 0,030, 0,035, etc.). En una realización, un AGPI se administra en una dosificación de aproximadamente 0,05 mg de AGPI por kg de peso corporal del individuo a aproximadamente 200 mg de AGPI por kg de peso corporal del individuo o superior, incluyendo cualquier incremento intermedio, en incrementos de 0,01 mg (por ejemplo, 0,06 mg, 0,07 mg, etc.), o en

cantidades que oscilan entre aproximadamente 50 mg y aproximadamente 20,000 mg por sujeto por día (por ejemplo, mediante administración oral, inyección, emulsión o nutrición parenteral total, tópica, intraperitoneal, placentaria, transdérmica, o intracraneal). En otra realización, un AGPI se administra en una dosificación de aproximadamente 0,45 mg de AGPI por kg de peso corporal por día a aproximadamente 275 mg de AGPI por kg de peso corporal por día. En otra realización, un AGPI se administra en una dosificación de aproximadamente 0,025 mg de AGPI por kg de peso corporal por día a aproximadamente 275 mg de AGPI por kg de peso corporal por día, incluyendo cualquier incremento intermedio, en incrementos de 0,005 (por ejemplo, 0,025, 0,030, 0,035, etc.). En otra realización, un AGPI se administra en una dosificación de aproximadamente 0,05 mg de AGPI por kg de peso corporal por día a aproximadamente 275 mg de AGPI por kg de peso corporal por día. Un complemento de ADH en cápsula típica, por ejemplo, se puede producir en dosis de 100 mg a 200 mg por cápsula, aunque la invención no se limita a formas de cápsulas o cápsulas que contienen estas cantidades de ADH u otro AGPI.

Aunque los ácidos grasos, tales como ADH pueden administrarse por vía tópica o como un inyectable, la vía de administración más preferente es la administración oral. Preferentemente, los ácidos grasos (por ejemplo, AGPIs) se administran a los individuos en forma de complementos nutricionales y/o alimentos y/o formulaciones farmacéuticas y/o bebidas, más preferentemente alimentos, bebidas, y/o complementos nutricionales, más preferentemente, alimentos y bebidas, más preferentemente, alimentos. Un tipo preferente de alimento es un alimento médico (por ejemplo, un alimento que está en una formulación que va a consumirse o administrarse externamente bajo la supervisión de un médico y que tiene por objeto el tratamiento dietético específico de una enfermedad o afección para la cual los requerimientos nutricionales distintivos, basados en principios científicos reconocidos, son establecidos por una evaluación médica). Para los infantes, los ácidos grasos se administran a los infantes como un preparado para lactantes, alimentos de destete, potitos, y cereales infantiles.

Cualquier forma de dosificación biológicamente aceptable, y sus combinaciones, se contemplan en la materia objeto de la invención. Ejemplos de tales formas de dosificación incluyen, sin limitación, comprimidos masticables, comprimidos de rápida disolución, comprimidos efervescentes, polvos reconstituibles, elixires, líquidos, soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, comprimidos de múltiples capas, comprimidos de dos capas, cápsulas, cápsulas de gelatina blanda, cápsulas de gelatina dura, cápsulas, pastillas para chupar, pastillas masticables, perlas, polvos, gránulos, partículas, micropartículas, gránulos dispersables, sellos, duchas vaginales, supositorios, cremas, productos tópicos, sustancias inhalables, sustancias inhalables en aerosol, parches, partículas inhalables, implantes, implantes de depósito, ingeribles, inyectables, infusiones, barritas saludables, dulces y bombones, cereales, recubrimientos de cereales, alimentos, alimentos nutritivos, alimentos funcionales y combinaciones de los mismos. Las preparaciones de las formas de dosificación anteriores son conocidas adecuadamente por los expertos en la materia. Preferentemente, un alimento que está enriquecido con el AGPI deseado se selecciona entre el grupo que incluye, entre otros: productos y mezclas de panadería; chicles; cereales de desayuno; productos de queso; frutos secos y productos a base de frutos secos; gelatinas, pudines, y rellenos; productos lácteos congelados; productos lácteos; análogos de productos lácteos; caramelos blandos; sopas y mezclas para sopas; aperitivos; zumo de fruta procesado; zumo de vegetales procesados; grasas y aceites; productos pesqueros; productos de proteínas vegetales; productos avícolas; y productos cárnicos.

Otra realización de la presente invención incluye una composición farmacéutica que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6) en una relación comprendida entre aproximadamente 1:1 a aproximadamente 10:1 en una dosificación oral para el tratamiento de la demencia o pre-demencia en un ser humano.

Los compuestos terapéuticos apropiados para su uso con la presente invención incluyen cualquier terapéutico que se pueda utilizar para proteger un individuo contra cualquiera de las afecciones o enfermedades discutidas en la presente memoria, y pueden incluir una proteína, un aminoácido, un fármaco, otros productos naturales y un carbohidrato. Dichos compuestos terapéuticos serán adecuadamente conocidos por los expertos en la materia para la enfermedad o afección particular que está siendo tratada. Algunos compuestos terapéuticos preferentes que se incluyen en una composición o formulación de la invención incluyen, entre otros: tacrina (COGNEX); donepezil (ARICEPT); rivastigmina (EXELON); galantamina (REMINYL); memantina (AKATINOL); neotropina; nootrópicos; alfa-tocoferol (vitamina E); selegilina (ELDEPRYL); agentes antiinflamatorios no esteroideos (AINEs); *Gingko biloba*; estrógeno; inhibidores de  $\beta$ -secretasa; vacunas, incluyendo vacunas lipídicas o basadas en liposomas, que disuelven placas en el cerebro; vitaminas del complejo B; bloqueadores de los canales de calcio; inhibidores de la HMG-CoA reductasa; estatinas; policosanoles; fibratos; clioquinol; y otros productos naturales (por ejemplo, curcumina, lignanos, fitoestrógenos, fitoesteroles, niacina y complementos vitamínicos).

Las dosificaciones y vías de administración se conocen en la materia y pueden ser determinadas por los expertos en la materia.

La presente invención también incluye un método de fabricación de cualquiera de las composiciones descritas anteriormente de la invención, por ejemplo, mediante la combinación de los componentes de la composición en cualquier forma de administración adecuada utilizando cualquier método adecuado conocido en la materia.

De acuerdo con la presente invención, los métodos de la presente invención son adecuados para su uso en un

individuo que es un miembro de la clase de vertebrados, *Mammalia*, incluyendo, entre otros, primates, ganado y mascotas domésticas (por ejemplo, un animal de compañía). Normalmente, un individuo será un ser humano. El término "individuo" puede intercambiarse con el término "sujeto" o "paciente" y se refiere al sujeto de un protocolo o método de acuerdo con la invención. En consecuencia, un individuo puede incluir un individuo sano, normal (no enfermo), así como un individuo que tiene o corre el riesgo de desarrollar pre-demencia o demencia o un síntoma o indicador de la misma como se describe en la presente memoria.

Los siguientes ejemplos se proporcionan con fines de ilustración y no tienen por objeto limitar el alcance de la presente invención.

## Ejemplos

Los siguientes materiales y métodos se utilizaron en los ejemplos descritos a continuación.

### Generación de ratones 3xTg-EA

La generación de los ratones 3xTg-EA se realizó de la forma descrita en Oddo, "*Triple-transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular A $\beta$  and Synaptic Dysfunction*", *Neuron*, vol. 39, 409-21 (2003). Brevemente, el ADNc de PPA humana (isoforma 695) que alberga la mutación doble sueca (KM670/671NL) se subclonó en el exón 3 del casete de expresión Thy1.2. La tau humana con cuatro repeticiones sin inserciones amino terminales (4R0N) que albergan la mutación P30IL también se subclonó en el casete de expresión Thy1.2. Después de la digestión de restricción para liberar el transgén, cada fragmento se purificó por fraccionamiento en gradiente de sacarosa, seguido por diálisis durante la noche en tampón de inyección (10 mM de Tris [pH 7,5], 0,25 mM de EDTA). Cantidades molares idénticas de cada construcción se co-microinyectaron en los pronúcleos de embriones de células individuales recogidos de homocigotos de ratones con exclusión génica PS 1M146V (Guo *et al.*, *Arch. Pathol. Lab. Med.* 125, 489-492 (2001). Los ratones con exclusión génica PS1 se generaron originalmente como un híbrido antecedente 129/C57BL6. Los ratones transgénicos se identificaron por análisis de membrana de Southern de la cola de ADN como se ha descrito previamente (Sugarman *et al. Natl. Acad. Sci* 99, 6334-6339 (2002). Los ratones fundadores se retrocruzaron con los ratones con exclusión génica PS1 parentales.

### Dietas

Todos los ratones descritos en estos ejemplos recibieron dietas experimentales a partir de los 3 meses de edad para la compleción del experimento a los 6, 9, o 12 meses de edad. La formulación de la dieta era la dieta para roedores AIN-76 que contenía un 5 % de grasa total. La composición de ácidos grasos diana de cada dieta se describe en la TABLA 1 y se logró mediante la mezcla de una combinación de aceites vegetales y de microalgas como se expone en la TABLA 2. Debido a que el estudio se llevó a cabo inicialmente en una forma ciega, las dietas se codificaron por colores de la siguiente manera, que se mencionan en algunas tablas y figuras: dieta en AZUL (comparativa) (maíz/soja); dieta comparativa en AMARILLO (DHASCO®; también conocida como dieta suplementada con ADH, o dieta enriquecida con ADH); dieta en VERDE (DHA™-S, también conocida como dieta suplementada con ADH y ADPn-6 o dieta enriquecida con ADH y ADPn-6); y dieta comparativa en ROJO (DHASCO®/ARASCO®; también conocida como dieta suplementada con ADH y AAR o dieta enriquecida con ADH y AAR). Colectivamente, las dietas que contienen DHASCO®, DHA™-S, o DHASCO®/ARASCO® pueden ser referidas como las dietas que contienen aceites de microalgas.

DHASCO® es un aceite derivado de *Cryptocodinium cohnii* que contiene altas cantidades de ácido docosahexaenoico (ADH), y más específicamente, contiene las siguientes cantidades aproximadas a modo de ejemplo de estos ácidos grasos, como porcentaje de ácidos grasos totales: ácido mirístico (14:0) al 10-20 %; ácido palmítico (16:0) al 10-20 %; ácido palmitoleico (16:1) al 0-2 %; ácido esteárico (18:0) al 0-2 %; ácido oleico (18:1) al 10-30 %; ácido linoleico (18:2) al 0-5 %; ácido araquídico (20:0) al 0-1 %; ácido behénico (22:0) al 0-1 %; ácido docosapentaenoico (22:5) al 0-1 %; ácido docosahexaenoico (22:6) (ADH) al 40-45 %; ácido nervónico (24:1) al 0-2 %; y otros al 0-3 %.

DHA™-S (también citado anteriormente como DHASCO®-S) es un aceite derivado de *Thraustochytrid, Schizochytrium sp.*, que contiene una alta cantidad de ADH y también contiene ácido docosapentaenoico (n-6) (ADPn-6), y más específicamente contiene las siguientes cantidades aproximadas a modo de ejemplo de estos ácidos grasos, como porcentaje de ácidos grasos totales: ácido mirístico (14:0) al 8,71 %; ácido palmítico (16:0) al 22,15 %; ácido esteárico (18:0) al 0,66 %; ácido linoleico (18:2) al 0,46 %; ácido araquídico (20:4) al 0,52 %; ácido eicosapentenoico (20:5, n-3) al 1,36 %; ácido docosapentaenoico (22:5, n-6) (ADPn-6) al 16,28 %; ácido docosahexaenoico (ADH) (22:6, n-3) al 41,14 %; y otros al 8 %.

ARASCO® es un aceite derivado de *Mortierella alpina* que contiene una alta cantidad de ácido araquídico (AAR), y más específicamente contiene las siguientes cantidades aproximadas a modo de ejemplo de estos ácidos grasos: ácido mirístico (14:0) al 0-2 %; ácido palmítico (16:0) al 3-15 %; ácido palmitoleico (16:1) al 0-2 %; ácido esteárico (18:0) al 5-20 %; ácido oleico (18:1) al 5-38 %; ácido linoleico (18:2) al 4-15 %; ácido linolénico (18:3) al 1-5 %; ácido araquídico (20:0) al 0-1 %; ácido eicosatrienoico (20:3) al 1-5 %; ácido araquídico (20:4) (AAR) al 38-44 %; ácido

ES 2 617 577 T3

behénico (22:0) al 0-3 %; ácido docosapentaenoico (22:5) al 0-3 %; y ácido lignócerico (24:0) al 0-3 %.

TABLA 1

Contenido de ácidos grasos n-3 y n-6 en las dietas para ratas				
Ácido graso	Gramos de ácido graso de aceite dietético ensayado/100 gramos por dieta			
	Maíz/soja (AZUL) Comparativa	DHASCO® (AMARILLO) Comparativa	DHA™-S (VERDE)	DHASCO®/ARASCO® (ROJO) Comparativa
series n-6				
ácido linoleico 18:2	2,34	1,28	0,68	0,84
AAR 20:4	0	0	0,03	0,048
ADP 22:5	0	0,01	0,51	0,01
series n-3				
ácido linolénico 18:3	0,23	0,01	0,01	0,05
AEP 20:5	0	0	0,08	0
ADH 22:6	0	1,27	1,25	1,27
% SAT	27,4 %	27,3 %	26,4 %	26,7 %
% MONO	21,0 %	20,8 %	20,1 %	19,9 %
% POLI	51,6 %	51,9 %	53,5 %	53,3 %
relación n-6 a n-3	10,10	1,00	0,91	1,01

5

TABLA 2

Composición de la mezcla de aceite utilizada para las dietas experimentales

TIPO DE ACEITE	Comparativa		Invención	Comparativa
	Dieta de control	DHASCO®	DHA™-S	ARASCO®/DHASCO®
	Maíz/soja	ADH	ADH + ADP	AAR + ADH
	g/100g de dieta	g/100g de dieta	g/100g de dieta	g/100g de dieta
DHASCO®	0	30	0	30
Maíz	15	9	0	0
Soja	27	0	0	2
Cártamo	0	9	8	8
Coco	8	2	1	0
DHA™-S	0	0	31	0
ARASCO®	0	0	0	11
GIRASOL	0	0	10	0
suma	50	50	50	51

Todas las dietas contenían 50 g de grasa/100 g de alimento balanceado comercial para roedores. Cada una de las

dietas que contenía ADH tenía 1,3 g de ADH/100 g de alimento balanceado comercial para roedores y con aproximadamente una relación 1:1 de ácidos grasos n-6 a n-3, en comparación con la dieta de control que tenía aproximadamente una relación 10:1 de ácidos grasos n-6 a n-3. El porcentaje de ácidos grasos saturados, monoinsaturados y poliinsaturados fueron equivalentes en las dietas. La cantidad de proteína total (20 %) y carbohidratos (66 %), así como la energía total (3,9 Kcal/g) también fue equivalente en todas las dietas.

#### ELISA e inmunoelectrotransferencia

Se llevaron a cabo ELISAs para  $\beta$ A esencialmente como se ha descrito previamente (Suzuki *et al.*, *Science* 264, 1336-1340 (1994). Para inmunoelectrotransferencia, los cerebros de los ratones transgénicos y de control fueron homogeneizados con un Dounce en una solución de SDS al 2 % en H<sub>2</sub>O que contenía 0,7 mg/ml de pepstatina A suplementada con un mini-comprimido de un inhibidor de la proteasa completo (Roche 1836153). Las mezclas homogeneizadas se sometieron brevemente a ultrasonidos para cizallar el ADN y se centrifugaron a 4 °C durante 1 hora a 100.000 x g. El sobrenadante se utilizó para el análisis de inmunoelectrotransferencia. Las proteínas se resolvieron por SDS/PAGE (Bis-Tris al 10 % de Invitrogen) en condiciones reductoras y se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La membrana se incubó en una solución de leche descremada al 5 % durante 1 hora a 20 °C. Después de la incubación durante la noche a 4 °C con el anticuerpo primario, las membranas se lavaron en Tween-SSTT durante 20 minutos y se incubaron a 20 °C con el anticuerpo secundario. Las membranas se lavaron en T-SSTT durante 20 minutos y se incubaron a 20 °C con el anticuerpo secundario. Las membranas se lavaron en T-SSTT durante 20 minutos y se incubaron durante 5 minutos con Super Signal (Pierce).

#### Marcadores bioquímicos

*Mediciones de  $\beta$ A:* se obtuvieron los datos cuantitativos sobre los efectos del ADH en varias especies de  $\beta$ A (por ejemplo,  $\beta$ A40 frente a  $\beta$ A42;  $\beta$ A soluble frente a insoluble) (Oddo *et al.*, 2003). La proteína extraída del tejido cerebral de los ratones tratados con ADH se utilizó para generar extractos proteicos solubles e insolubles y se analizó por ELISA de tipo sándwich. Las membranas de Western se utilizaron para medir los niveles del estado estacionario de la holoproteína de PPA, fragmentos C99/C83, y PPAAs para determinar los efectos del ADH sobre estos biomarcadores.

*Hiperfosforilación de tau:* Debido a que los ratones 3xTg-EA acumulan inclusiones neuronales con inmunorreactividad de tau argirófilas y filamentosas con incremento de edad en la corteza y el hipocampo, (Oddo *et al.*, 2003), los efectos del ADH en la hiperfosforilación de tau se midieron como un biomarcador funcional. Esto se logró con la inmunoelectrotransferencia cuantitativa con anticuerpos (tales como AT8, AT100, o PHF1) que reconocen específicamente la tau hiperfosforilada.

Los cerebros se diseccionaron en la corteza, hipocampo y cerebelo.

#### Inmunohistoquímica

Para evaluar las placas y ovillos totales y también la activación microglial, los cerebros embebidos en parafina, fijados con formalina se seccionaron en 5  $\mu$ m, se montaron en un portaobjetos recubierto de silano y se procesaron como se describe. El uso de diversos anticuerpos frente a diversas formas de  $\beta$ A (1-40, 1-42 y oligoméricas) y las formas fosforiladas de tau, las placas y ovillos se visualizaron para la localización y la gravedad en el cerebro. Además, se utilizaron anticuerpos, tales como CD45 para teñir la activación microglial para determinar si las placas y los ovillos aún inician una respuesta inmunológica. Se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti- $\beta$ A 6E10 y 4G8 (Signet Laboratories, Dedham, MA), anti- $\beta$ A 1560 (Chemicon), A11 (Kayed *et al.*, 2003), anti-PPA 22C11 (Chemicon), anti-tau HT7, AT8, AT180 (Innogenetics), tau C17 (Santa Cruz), tau 5 (Calbiochem), anti-PFAG (Dako) y anti-actina (Sigma). Los anticuerpos primarios se aplicaron en diluciones de 1:3000 para PFAG; 1:1000 para 6E10; 1:500 para 1560, AT8, AT180, tau5; y 1:200 para HT7.

#### Extracción de lípidos totales en el cerebro

Los cerebros se mantuvieron a -80 °C hasta su análisis. Los cerebros se liofilizaron y los lípidos se extrajeron en 4 ml de 2:1 (v/v) cloroformo:metanol con BHT al 0,5 % como antioxidante. La mezcla se sometió a ultrasonidos durante 10 minutos y se centrifugó para sedimentar los sólidos.

#### Análisis de ácidos grasos

##### *Análisis de lípidos totales en el cerebro*

1,2 mg del extracto lipídico cerebral se analizaron para determinar los ácidos grasos totales en el cerebro. Los lípidos totales en el cerebro se convirtieron en ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) con BF3/metanol al 14 % a 100 °C durante 30 minutos (Morrison, W.R. y Smith, L.M. (1964) *J Lipid Res.* 5:600-8). El hidroxitolueno butilado se añadió antes de la saponificación y todas las muestras se purgaron con N<sub>2</sub> durante todo el proceso para minimizar la oxidación. A cada muestra se añadió ácido graso libre tricosenoico (23:0) como un patrón interno antes del



análisis de EMAG.

*Análisis de fosfolípidos en el cerebro*

5 Se separaron fosfatidilcolina (FC), fosfatidilserina (FS), y fosfatidiletanolamina (FE) cerebrales utilizando los métodos de Gilfillan *et al* (Gilfillan *et al* (1983), *J Lipid Res.* 24: 1651-1656). Placas de gel de sílice K con un grosor de 0,25 mm, 20 x 20 cm (Whatman, Clifton, NJ) se activaron durante 60 minutos en un horno de 100 °C. Una muestra (0,6 mg) de extracto cerebral total se detectó en la placa y se desarrolló en una cámara para CCF utilizando cloroformo: metanol:éter de petróleo:ácido acético:ácido bórico 40:20:30:10:1,8 (v/v/v/v/p). La placa se desarrolló hasta 1 cm de la parte superior de la placa. La placa se pulverizó con acetato cúprico para visualizar las bandas. Las bandas de FC, FS y FE se rasparon en tubos de ensayo y los lípidos se convirtieron en ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAG) con BF3/metanol al 14 % a 100 °C durante 30 minutos (Morrison y Smith, 1964, *supra*). Hidroxitolueno butilado se añadió antes de la saponificación y todas las muestras se purgaron con N2 durante todo el proceso para minimizar la oxidación. A cada muestra se añadió ácido graso libre tricosanoico (23:0) como un patrón interno antes del análisis de EMAG.

*Análisis de glóbulos rojos*

20 Los lípidos totales se extrajeron a partir de 400 µl de glóbulos rojos sedimentados (GRs) utilizando los métodos de Bligh y Dyer (Bligh, E.G. y Dyer, W.J. (1959), *Can. J. Biochem. Physiol.* 37:911). A cada muestra se añadió ácido graso libre tricosanoico (23:0) como patrón interno antes de la extracción. Los lípidos en los GR se saponificaron con hidróxido de sodio metanólico 0,5 N y los ácidos grasos se convirtieron en ésteres metílicos con BF3/metanol al 14 % a 100 °C durante 30 minutos (Morrison y Smith, 1964, *supra*). Se añadió hidroxitolueno butilado antes de la saponificación y todas las muestras se purgaron con N2 durante todo el proceso para minimizar la oxidación.

*Análisis por cromatograma de gases*

30 Los ésteres metílicos de ácidos grasos (EMAGs) se analizaron por CGL utilizando un Hewlett Packard 6890 equipado con un detector de ionización de llama. Los ésteres metílicos de ácidos grasos se separaron en una columna capilar FAMEWAX de 30 metros (Restek, Bellefonte, PA; 0,25 mm de diámetro, 0,25 mm de grosor de revestimiento) utilizando helio a un caudal de 2,1 ml/min con relaciones de división de 48:1 y 20:1. Los parámetros de ejecución cromatográficos incluyen un horno de temperatura inicial de 130 °C que se aumentó a 6 °C/min hasta 225 °C, en la que se mantuvo durante 20 minutos antes de aumentarse hasta 250 °C a 15 °C/min, con una retención final de 5 minutos. Las temperaturas del inyector y del detector fueron constantes a 220 °C y 230 °C, respectivamente. Los picos se identificaron por comparación de los tiempos de retención con mezclas convencionales externas del éster metílico de ácido graso de NuCheck Prep (Elysian, MN, EE. UU.). Los perfiles de ácidos grasos se expresaron como un porcentaje de mg totales de ácidos grasos (porcentaje en peso).

Ejemplo 1

40 El siguiente ejemplo describe la evaluación del potencial de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPIs) dietéticos, ácido docosahexaenoico (ADH; 22:6 n-3), ácido docosapentaenoico (ADPn-6; 22:5 n-6), o ácido araquidónico (AAR; 20:4 n-6) para modular la aparición o la gravedad de los síntomas patofisiológicos de una enfermedad en un nuevo modelo de ratón triple transgénico de la enfermedad de Alzheimer (3xTg-EA).

45 Los grupos de ratones 3x-Tg-EA homocigotos se alimentaron con una de las cuatro dietas que contenía ADH, ADH y ADPn-6, ADH y AAR, o una dieta deficiente en estos AGPIs (control), como se ha descrito anteriormente en los materiales y métodos (véanse las Tablas 1 y 2). Las tres dietas experimentales contenían cantidades similares de ADH, y ácido linoleico, ADPn-6 o AAR como la fuente n-6, como se ha discutido previamente (véase la discusión de las dietas en materiales y métodos). Los beneficios terapéuticos de las dietas de control y suplementadas con AGPI se evaluaron después de varios puntos temporales del tratamiento examinando el desarrollo patológico en estos ratones.

55 En concreto, a partir de los 3 meses de edad, los ratones 3xTg-EA fueron alimentados con las dietas prescritas como se muestra en las Tablas 1 y 2, hasta un máximo de 12 meses de edad. Cada dieta contenía los números de referencia y estaba codificada por colores sin información alguna sobre el nivel de compuesto experimental contenido en la dieta. Las dietas almacenadas se mantuvieron a 0 °C durante todo el estudio. El inicio del experimento en animales de 3 meses de edad se seleccionó para evitar interferir con el crecimiento y desarrollo normales de los ratones, mientras que el tratamiento con dietas experimentales antes de la emergencia de  $\beta$ A y la neuropatología de tau. Los tratamientos se detuvieron a los 6, 9, 12 meses de vida y se realizó una variedad de evaluaciones neuropatológicas en el cerebro y en la sangre, incluyendo PPA, péptidos beta amiloides, número de placas, tamaño de placas totales, y los niveles de PPA que escinden las enzimas (alfa y beta secretasas, presenilina-1). También se midieron los ácidos grasos totales del cerebro y de la sangre y los fosfolípidos cerebrales.

65 En cada punto temporal, los análisis inmunohistoquímicos y neuropatológicos completos se completaron en el cerebro y en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de al menos 6 ratones para proporcionar un análisis estadístico válido.

La sangre se recogió y se procesó en sedimentos de glóbulos rojos y suero, y se almacenó a -80 °C. Otros seis ratones adicionales de cada grupo dietético se sacrificaron y la sangre, y las secciones del cerebro se enviaron congeladas para análisis adicionales. La neuropatología y la inmunohistoquímica se evaluaron en 3 puntos temporales cuando los ratones tenían 6, 9, y 12 meses de edad.

5 La Tabla 3 muestra los pesos corporales medios después de 3 meses, 6 meses y 9 meses de haberse producido la alimentación con las dietas que contenían AGPI descritas previamente.

TABLA 3

Peso corporal medio después de 3 meses de dieta				
	Machos	+/-	Hembras	+/-
Azul	38,50	1,88	29,00	2,32
Amarillo	32,08	0,68	28,43	0,33
Verde	40,54	2,31	32,10	1,42
Rojo	31,23	1,23	27,43	0,73
Peso corporal medio después de 6 meses de dieta				
	Machos	+/-	Hembras	+/-
Azul	39,60	5,42	26,46	0,81
Amarillo	47,10	5,27	32,50	1,79
Verde	50,13	1,74	34,53	4,22
Rojo	39,26	3,77	32,83	2,82
Peso corporal medio después de 9 meses de dieta				
	Machos	+/-	Hembras	+/-
Azul	39,68	1,688	35,40	3,15
Amarillo	45,81	6,16	46,44	3,95
Verde	46,56	1,69	37,53	6,08
Rojo	47,51	2,89	32,45	0

10 Como se muestra en la Tabla 3, la media de pesos corporales de los ratones machos y hembras no difiere de las dietas a los 3, 6 o 9 meses de tratamiento. Los ratones continuaron creciendo y se mantuvieron saludables en todas las dietas en el transcurso del estudio.

#### 15 Resultados del análisis de ácidos grasos

Las Figs. 1A-C muestran perfiles de ácidos grasos en homogeneizados de cerebro entero de los cuatro grupos de tratamiento dietético después de 3 meses (Fig. 1A; n=6), 6 meses (Fig. 1B; n=6), o 9 meses (Fig. 1C; n=6) de tratamiento dietético (los valores se expresan como un porcentaje de ácidos grasos cerebrales totales). Las Figs. 2A-2C muestran los perfiles de ácidos grasos en homogeneizados de glóbulos rojos de los cuatro grupos de tratamiento dietético después de 3 meses (Fig. 2A), 6 meses (Fig. 2B), o 9 meses (Fig. 2C) (los valores se expresan como un porcentaje de ácidos grasos de glóbulos rojos totales). Las Figs. 3A-3C muestran los perfiles de fosfatidilcolina (FC) cerebral de los cuatro grupos de tratamiento dietético después de 3 meses (Fig. 3A), 6 meses (Fig. 3B), o 9 meses (Fig. 3C) (los valores se expresan como un porcentaje de ácidos grasos de FC cerebral totales). Las Figs. 4A-4C muestran los perfiles de fosfatidiletanolamina (FE) cerebral de los cuatro grupos de tratamiento dietético después de 3 meses (Fig. 4A), 6 meses (Fig. 4B), o 9 meses (Fig. 4C) (los valores se expresan como un porcentaje de ácidos grasos de FE cerebral totales). Las Figs. 5A-5C muestran los perfiles de fosfatidilserina (FS) cerebral de los cuatro grupos de tratamiento dietético después de 3 meses (Fig. 5A), 6 meses (Fig. 5B), o 9 meses (Fig. 5C) (los valores se expresan como un porcentaje de ácidos grasos de FS cerebral totales). En cada una de las Figs. 1-5, las cuatro dietas se muestran como control (azul), ADH (amarillo, ejemplo comparativo), ADH/ADP (verde) y ADH/AAR (ejemplo comparativo) (rojo). En cada una de las Figs. 1-5, DMA = dimetilacetales; AAR = ácido araquidónico (n-6); ADH = ácido docosahexaenoico (n-3); AEP = ácido eicosapentaenoico (n-3); AL = ácido linoleico (n-6); AAL = ácido

alfa-linolénico (n-3); ADPn-6 = ácido docosapentaenoico (n-6); ADP n-3 = ácido docosapentaenoico (n-3); y adrélico = ácido adrélico (n-6).

Los resultados mostraron que los glóbulos rojos (GRs) y los ácidos grasos cerebrales se alteraron en los ratones de 6 meses (3 meses de tratamiento dietético), 9 meses (6 meses de tratamiento dietético) y 12 meses (9 meses de tratamiento dietético) como resultado de las dietas enriquecidas con AGPI (Figs. 1A-C y 2A-C). Los niveles de porcentaje en peso de 22:6 n-3 (ADH) en GRs eran más del doble que los niveles de control con todas las dietas suplementadas con AGPI en todos los puntos temporales. Los niveles de 22:6 n-3 (ADH) en cerebro totales se aumentaron también del 1 al 3 por ciento en peso en todas las dietas suplementadas con AGPIs, pero no son tan grandes como en los GR. Los ratones alimentados con la dieta de ADH (amarillo) presentaron los mayores cambios en los porcentajes en peso de 22:6 n-3 (ADH) tanto en los lípidos totales en GRs como en el cerebro. Como porcentaje en peso de ácidos grasos, 22:6 n-3 (ADH) y 20:4 n-6 (AAR) son los AGPI de cadena larga más abundantes en los lípidos totales en el cerebro y en los GR. Los niveles de 20:5 n-3 (AEP) en el cerebro y en los GRs son bajos y normalmente, los niveles de porcentaje en peso de 22:6 n-3 (ADH) en el cerebro son aproximadamente quince veces mayores que 20:5 n-3 (AEP), y aproximadamente cinco veces mayor en los GR.

Mientras que los niveles de ADH aumentaron, hubo una disminución posterior en los lípidos totales del cerebro 20:4 n-6 (AAR) con las tres dietas enriquecidas con AGPI en comparación con la dieta de control (que tenía una relación n-6 a n-3 de 10:1). Los niveles de ácidos grasos cerebrales ADH y AAR se mantuvieron durante todo el periodo de suplementación. En los GR, los niveles de 20:4 n-6 (AAR) en los GR disminuyen en gran medida con la dieta con ADH (amarillo) en un 11,75 por ciento en peso en comparación con el grupo de control en todos los puntos temporales. Como era de esperar, los ratones con la dieta en rojo (suplementada con ADH y AAR) tenían unos niveles de 20:4 n-6 (AAR) en los GR más cercanos a los ratones de control.

Los niveles de 22:5 n-6 (ADPn-6) en los lípidos totales cerebrales y de GR eran más del doble que los niveles de control en la dieta con ADH y ADPn-6 (verde) en todos los puntos temporales. Los niveles de 22:5 n-6 (ADP) en el cerebro y en los GR eran muy bajos o no detectables en los ratones alimentados con dietas con ADH (amarillo) o ADH y AAR (rojo). Existe un mínimo de 18:3 n-3 (AAL) en los lípidos en el cerebro y en los GR y se observaron cambios muy pequeños de ácidos grasos en cualquiera de los tipos tisulares para este precursor de AGPIs de cadena larga. Los niveles de 18:2 n-6 (AL) son aproximadamente quince veces mayores en GRs en comparación con el cerebro. Los niveles de porcentaje en peso de 18:2 n-6 (AL) en GRs eran más bajos que los controles con todas las dietas enriquecidas con AGPI en los puntos temporales. Estos cambios son un reflejo de las composiciones de ácidos grasos de las dietas administradas. Los niveles de porcentaje en peso de 20:5 n-3 (AEP) en GRs eran mayores en todas las dietas suplementadas con AGPI frente a los niveles de control, a pesar de que estas dietas no contenían cantidades apreciables de 20:5 n-3 (AEP). Esto puede significar la retroconversión de 22:6 n-3 (ADH) a 20:5 n-3 (AEP) en las células sanguíneas. No se detectaron cantidades apreciables de 20:5 n-3 (AEP) en los lípidos cerebrales en las distintas dietas suplementadas con AGPIs y periodos temporales.

Los ácidos grasos fosfolípidos cerebrales FC, FS y FE también se alteraron en ratones de 6 meses (3 meses de tratamiento dietético), 9 meses (6 meses de tratamiento dietético) y 12 meses (9 meses de tratamiento dietético) con dietas enriquecidas con AGPI (véanse las Figs. 3A-3C, 4A-4C y 5A-5C). Como porcentaje en peso, 22:6 n-3 (ADH) es 5 veces más abundante en las fracciones de FS (Fig. 5) y FE (Fig. 4) en comparación con la fracción de FC (Fig. 3), y 20:4 n-6 (AAR) es más abundante en la fracción de FE. Los niveles de 20:5 n-3 (AEP), 18:2 n-6 (AL) y 18:3 n-3 (AAL) en los fosfolípidos cerebrales son muy bajos. La dieta con ADH (amarillo) condujo al mayor aumento del control en los porcentajes en peso de 22:6 n-3 (ADH) en el fosfolípido cerebral para los tres fosfolípidos. También se produjo una disminución correspondiente en los niveles de 20:4 n-6 (AAR) con la dieta con ADH (amarillo) en comparación con los controles en los tres fosfolípidos cerebrales. Como se aprecia en GRs y en los lípidos cerebrales totales, los niveles de porcentaje en peso de 22:5 n-6 (ADP) de todas las fracciones de fosfolípidos cerebrales aumentaron más en los ratones alimentados con la dieta enriquecida con ADH y ADPn-6 (verde).

En resumen, las relaciones de composiciones de ácidos grasos n-6 a n-3 de las dietas se reflejaron en los niveles de ácidos grasos de GRs y cerebrales. El aumento del contenido de 22:6 n-3 (ADH) en las dietas condujo a un aumento significativo en los niveles de ADH en los niveles de GRs y en el cerebro. Con el aumento de los niveles de 22:6 n-3 (ADH) en la dieta, hubo una disminución posterior en los ácidos grasos n-6. Cuando se añadieron otros ácidos grasos (es decir, ADP y AAR) a las dietas, sus niveles de ácidos grasos correspondientes se aumentaron también en los tejidos. En general, los niveles de ácidos grasos cerebrales se mantuvieron adecuadamente durante todo el periodo de suplementación para cada dieta.

#### Análisis del marcador bioquímico

Las Figs. 6A-6J muestran el efecto de las dietas sobre los niveles de beta-amiloide ( $\beta$ A) en ratones 3X-TG-EA de 6 meses de edad después de 3 meses, 6 meses y 9 meses de tratamiento dietético. Como se ha descrito previamente, los animales recibieron una de las cuatro dietas que se muestran en la Tabla 1 anterior. El péptido  $\beta$ A soluble (Figs. 6A, 6C y 6E) e insoluble (Figs. 6B, 6D y 6F) total se midió a partir de un extracto proteico cerebral con anticuerpos específicos para  $\beta$ A 1-40 y  $\beta$ A 1-42 y amiloide total. Como se muestra en la Fig. 6A, después de 3 meses de alimentación, los animales alimentados con dietas que contenían ADH de microalgas (dietas en amarillo,

verde y rojo) tenían niveles significativamente más bajos de péptidos beta amiloides solubles en comparación con los animales alimentados con aceite de maíz-soja. A los 6 meses de alimentación con los complementos dietéticos (Fig. 6C), los animales alimentados con dietas que contenían ADH (amarillo) o ADH y ADPn-6 (verde) aún tenían niveles significativamente más bajos de péptidos beta amiloides en comparación con los animales de control, pero el nivel de péptido beta amiloide en los animales alimentados con una dieta que contenía ADH y AAR (rojo) ya no era significativamente diferente de los controles. A los 9 meses de alimentación (Fig. 6E), solo los animales alimentados con una dieta que contenía ADH (amarillo) habían reducido significativamente  $\beta$ A en comparación con el control. No se observaron diferencias en los niveles totales de amiloide insoluble entre las dietas que contenían aceites de maíz/soja y microalgas. Las Figs. 6G-6J muestran una intensidad relativa de amiloide total intracelular presente en secciones coronales de animales alimentados con maíz/soja (grupo azul), DHASCO® (grupo amarillo), DHA™-S (grupo verde), y DHASCO®/ARASCO® (grupo rojo). Los animales alimentados con dietas de maíz-soja y ARASCO®/DHASCO® contenían relativamente más amiloide intracelular total que los animales alimentados con las dietas que contenían DHASCO® o DHA™-S después de 3 meses de alimentación.

Las Figs. 7A y 7B muestran los efectos de las dietas en el procesamiento de PPA en ratones 3x-TG-EA de 6 meses de edad después de 3 meses de tratamiento. Los niveles totales de PPA, C83 y C99 no difirieron significativamente entre los animales alimentados con dietas que contenían aceite de maíz-soja o aceites de microalgas.

Las Figs. 7C y 7D muestran los efectos de las dietas sobre la depuración enzimática del péptido  $\beta$ A (enzima degradante de insulina, EDI) después de 3 meses de tratamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de EDI en los animales alimentados con dietas que contenían varios aceites de maíz/soja o microalgas.

Las Figs. 8A y 8B muestran los efectos de las dietas en secretasas de PPA en animales 3X-TG de 6 meses de edad después de 3 meses de tratamiento dietético experimental. No fueron evidentes diferencias significativas en la  $\beta$ -secretasa (BACE) o ADAM 10 en los animales alimentados con dietas que contenían aceites de maíz-soja o microalgas.

Las Figs. 8C y 8D muestran que, en comparación con los animales alimentados con dietas de maíz-soja, los animales alimentados con dietas que contenían aceites de microalgas habían reducido significativamente los niveles de la enzima, presenilina 1, pero no de nicastrina.

La Fig. 8E muestra que ADH reduce significativamente el ARNm de presenilina 1 (\*,  $p < 0,05$ ) en células SHSY5Y.

Las Figs. 9A-9F muestran los efectos de las dietas sobre los niveles de tau totales después de 3 meses, 6 meses y 9 meses de tratamiento dietético. Como se muestra en las Figs. 9A y 9B, las dietas que contienen ADH y que contienen aceites de microalgas (dietas en amarillo, verde y rojo) redujeron significativamente los niveles de tau totales en comparación con las dietas que contenían aceite de maíz-soja. Después de 6 meses de alimentación, los animales alimentados con dietas que contenían ADH como el AGPI predominante (amarillo) o ADH y ADPn-6 (verde) mantuvieron niveles significativamente más bajos de tau totales en comparación con las dietas que contenían aceite de maíz-soja, pero los animales alimentados con dietas que contenían una combinación de ADH y AAR (rojo) no tenían niveles significativamente diferentes de tau totales en comparación con los controles. Después de 9 meses de alimentación, solo los animales alimentados con dietas que contenían ADH como el AGPI predominante (amarillo) habían reducido significativamente los niveles de tau totales en comparación con los controles.

Las Figs. 10A-10D muestran que la dieta con ADH y ADPn-6 (verde) redujo significativamente la expresión de tau conformacionalmente alterada en comparación con las otras 3 dietas después de 3 meses de alimentación.

Como se muestra en las Figs. 10E y 10F, después de 9 meses de tratamiento dietético, tau fosforilada se reduce significativamente en animales alimentados con dietas que contenían ADH como el AGPI predominante (amarillo) o ADH y ADPn-6 (verde), en comparación con los animales alimentados con dietas que contenían aceite de maíz-soja. Los animales alimentados con dietas que contenían una combinación de ADH y AAR (rojo) no tuvieron niveles significativamente diferentes de tau fosforilada en comparación con los controles.

(es decir, ADP y AAR) se añadieron a las dietas, sus niveles de ácidos grasos correspondientes aumentaron también en los tejidos. En general, los niveles de ácidos grasos cerebrales se mantuvieron adecuadamente durante el periodo de suplementación para cada dieta.

#### Análisis del marcador bioquímico

Las Figs. 6A-6J muestran el efecto de las dietas sobre los niveles de beta-amiloide ( $\beta$ A) en ratones 3X-TG-EA de 6 meses de edad después de 3 meses, 6 meses y 9 meses de tratamiento dietético. Como se ha descrito previamente, los animales recibieron una de las cuatro dietas que se muestran en la Tabla 1 anterior. El péptido  $\beta$ A soluble (Figs. 6A, 6C y 6E) e insoluble (Figs. 6B, 6D y 6F) total se midió a partir de un extracto proteico cerebral con anticuerpos específicos para  $\beta$ A 1-40 y  $\beta$ A 1-42 y amiloide total. Como se muestra en la Fig. 6A, después de 3 meses de alimentación, los animales alimentados con dietas que contenían ADH de microalgas (dietas en amarillo,

- verde y rojo) tenían niveles significativamente más bajos de péptidos beta amiloides solubles en comparación con los animales alimentados con aceite de maíz-soja. A los 6 meses de alimentación con los complementos dietéticos (Fig. 6C), los animales alimentados con dietas que contenían ADH (amarillo) o ADH y ADPn-6 (verde) aún tenían niveles significativamente más bajos de péptidos beta amiloides en comparación con los animales de control, pero el nivel de péptido beta amiloide en los animales alimentados con una dieta que contenía ADH y AAR (rojo) ya no era significativamente diferente de los controles. A los 9 meses de alimentación (Fig. 6E), solo los animales alimentados con una dieta que contenía ADH (amarillo) habían reducido significativamente  $\beta$ A en comparación con el control. No se observaron diferencias en los niveles totales de amiloide insoluble entre las dietas que contenían aceites de maíz/soja y microalgas. Las Figs. 6G-6J muestran una intensidad relativa de amiloide total intracelular presente en secciones coronales de animales alimentados con maíz/soja (grupo azul), DHASCO® (grupo amarillo), DHA™-S (grupo verde), y DHASCO®/ARASCO® (grupo rojo). Los animales alimentados con dietas de maíz-soja y ARASCO®/DHASCO® contenían relativamente más amiloide intracelular total que los animales alimentados con las dietas que contenían DHASCO® o DHA™-S después de 3 meses de alimentación.
- Las Figs. 7A y 7B muestran los efectos de las dietas en el procesamiento de PPA en ratones 3x-TG-EA de 6 meses de edad después de 3 meses de tratamiento. Los niveles totales de PPA, C83 y C99 no difirieron significativamente entre los animales alimentados con dietas que contenían aceite de maíz-soja o aceites de microalgas.
- Las Figs. 7C y 7D muestran los efectos de las dietas sobre la depuración enzimática del péptido  $\beta$ A (enzima degradante de insulina, EDI) después de 3 meses de tratamiento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de EDI en los animales alimentados con dietas que contenían varios aceites de maíz/soja o microalgas.
- Las Figs. 8A y 8B muestran los efectos de las dietas en secretasas de PPA en animales 3X-TG de 6 meses de edad después de 3 meses de tratamiento dietético experimental. No fueron evidentes diferencias significativas en la  $\beta$ -secretasa (BACE) o ADAM 10 en los animales alimentados con dietas que contenían aceites de maíz-soja o microalgas.
- Las Figs. 8C y 8D muestran que, en comparación con los animales alimentados con dietas de maíz-soja, los animales alimentados con dietas que contenían aceites de microalgas habían reducido significativamente los niveles de la enzima, presenilina 1, pero no de nicastrina.
- La Fig. 8E muestra que ADH reduce significativamente el ARNm de presenilina 1 (\*,  $p < 0,05$ ) en células SHSY5Y.
- Las Figs. 9A-9F muestran los efectos de las dietas sobre los niveles de tau totales después de 3 meses, 6 meses y 9 meses de tratamiento dietético. Como se muestra en las Figs. 9A y 9B, las dietas que contienen ADH y que contienen aceites de microalgas (dietas en amarillo, verde y rojo) redujeron significativamente los niveles de tau totales en comparación con las dietas que contenían aceite de maíz-soja. Después de 6 meses de alimentación, los animales alimentados con dietas que contenían ADH como el AGPI predominante (amarillo) o ADH y ADPn-6 (verde) mantuvieron niveles significativamente más bajos de tau totales en comparación con las dietas que contenían aceite de maíz-soja, pero los animales alimentados con dietas que contenían una combinación de ADH y AAR (rojo) no tenían niveles significativamente diferentes de tau totales en comparación con los controles. Después de 9 meses de alimentación, solo los animales alimentados con dietas que contenían ADH como el AGPI predominante (amarillo) habían reducido significativamente los niveles de tau totales en comparación con los controles.
- Las Figs. 10A-10D muestran que la dieta con ADH y ADPn-6 (verde) redujo significativamente la expresión de tau conformacionalmente alterada en comparación con las otras 3 dietas después de 3 meses de alimentación.
- Como se muestra en las Figs. 10E y 10F, después de 9 meses de tratamiento dietético, tau fosforilada se reduce significativamente en animales alimentados con dietas que contenían ADH como el AGPI predominante (amarillo) o ADH y ADPn-6 (verde), en comparación con los animales alimentados con dietas que contenían aceite de maíz-soja. Los animales alimentados con dietas que contenían una combinación de ADH y AAR (rojo) no tuvieron niveles significativamente diferentes de tau fosforilada en comparación con los controles.
- Cada referencia y publicación citadas en la presente memoria se incorporan por referencia en su totalidad. La divulgación completa de cada solicitud provisional de EE. UU n.º 60/697.911 y solicitud provisional de EE. UU n.º 60/779.145 se incorpora en la presente memoria por referencia.
- Si bien varias realizaciones de la presente invención se han descrito con detalle, resulta evidente que las modificaciones y adaptaciones de estas realizaciones serán producidas por los expertos en la materia. No obstante, queda expresamente entendido, que tales modificaciones y adaptaciones están dentro del alcance de la presente invención, como se expone en las siguientes reivindicaciones.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Uso de una composición que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6), en el que la relación de ADH a ADPn-6 es de 1:1 a 10:1, en la preparación de un medicamento formulado para administración oral para el tratamiento de la demencia o la pre-demencia.
2. El uso según la reivindicación 1, en el que el ADH ha de administrarse en una cantidad de 50 mg por día a 20 gramos por día.
- 10 3. El uso según la reivindicación 1, en el que la formulación oral comprende un aceite o una formulación que comprende un 40 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
- 15 4. El uso según la reivindicación 1, en el que la formulación oral comprende un aceite o una formulación que comprende un 50 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
- 20 5. El uso según la reivindicación 1, en el que la formulación oral comprende un aceite o una formulación que comprende un 60 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
6. El uso según la reivindicación 1, en el que la formulación oral comprende un aceite o una formulación que comprende un 70 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
- 25 7. El uso según la reivindicación 1, en el que la formulación oral comprende un aceite o una formulación que comprende un 80 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
8. El uso según la reivindicación 1, en el que el ADH se encuentra en forma de aceite de triglicéridos.
9. El uso según la reivindicación 1, en el que el ADH se encuentra en forma de éster.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende ácido docosahexaenoico (ADH) y ácido docosapentaenoico n-6 (ADPn-6) en una relación de 1:1 a 10:1 en una dosificación oral para el tratamiento de la demencia o pre-demencia en un ser humano.
- 35 11. La composición de la reivindicación 10, en la que la cantidad de ADH administrada a dicho ser humano es de 50 mg a 20 gramos por día.
- 40 12. La composición de la reivindicación 10, en la que la composición comprende un aceite o una formulación que comprende un 40 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
- 45 13. La composición de la reivindicación 10, en la que la composición comprende un aceite o una formulación que comprende un 50 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
- 50 14. La composición de la reivindicación 10, en la que la composición comprende un aceite o una formulación que comprende un 60 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
15. La composición de la reivindicación 10, en la que la composición comprende un aceite o una formulación que comprende un 70 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
16. La composición de la reivindicación 10, en la que la composición comprende un aceite o una formulación que comprende un 80 % o más en peso de una combinación de ADH y ADPn-6.
17. La composición de la reivindicación 10, en la que el ADH se encuentra en forma de aceite de triglicéridos.
18. La composición de la reivindicación 10, en la que el ADH se encuentra en forma de éster.

FIG. 1A

Ácidos grasos cerebrales a los 6 meses

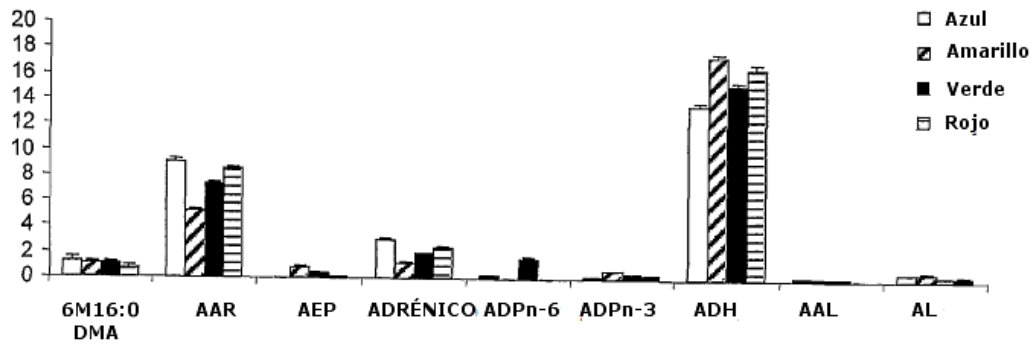


FIG. 1B

Ácidos grasos cerebrales a los 9 meses

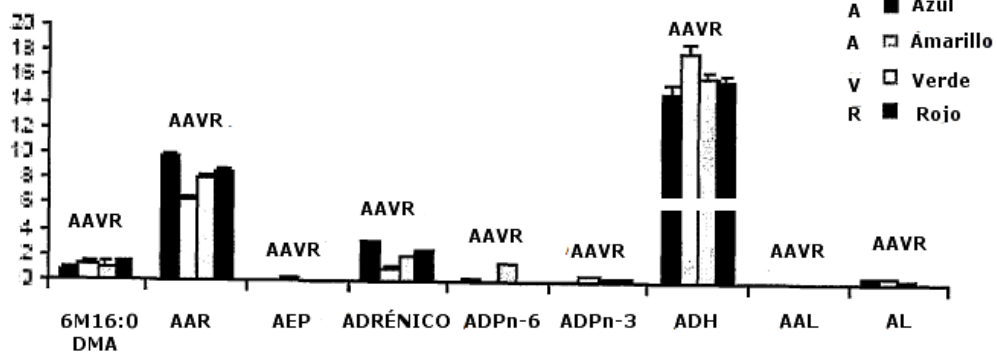


FIG. 1C

Ácidos grasos cerebrales a los 12 meses

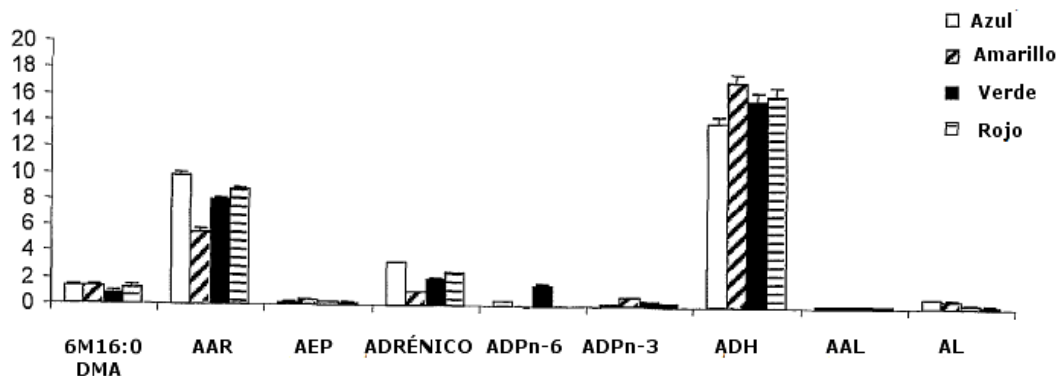


FIG. 2A

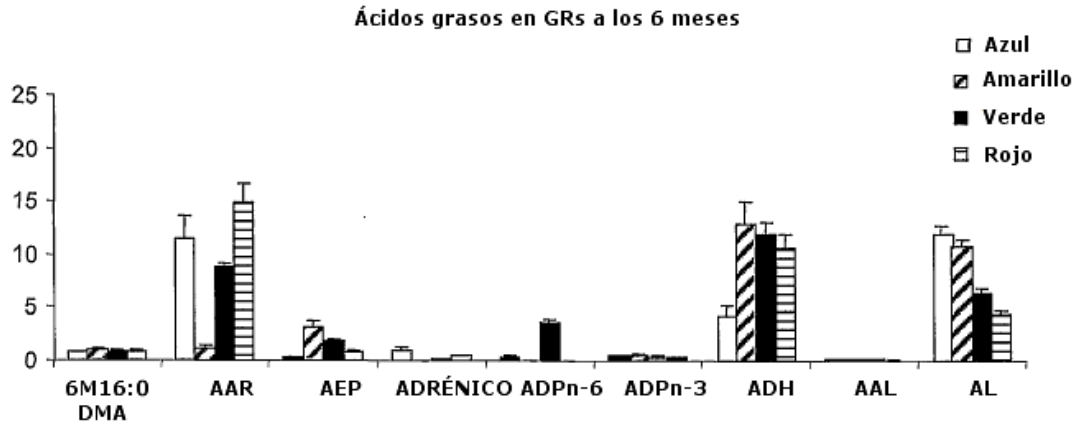


FIG. 2B

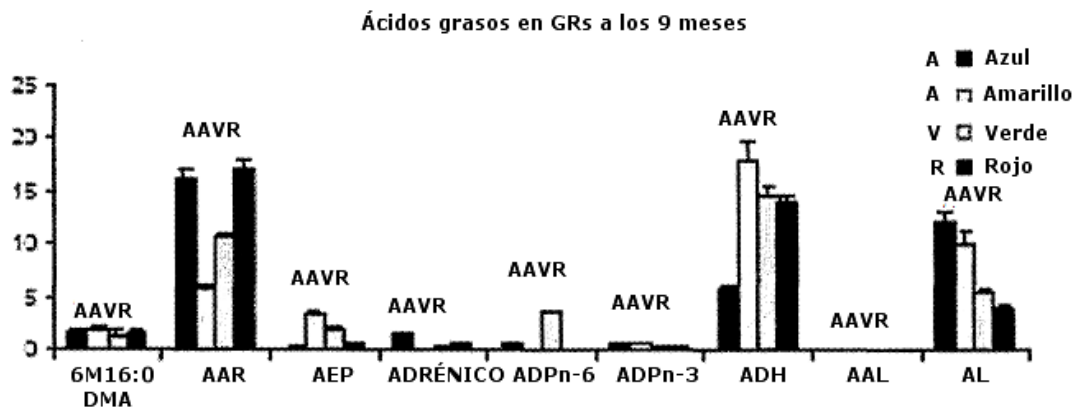
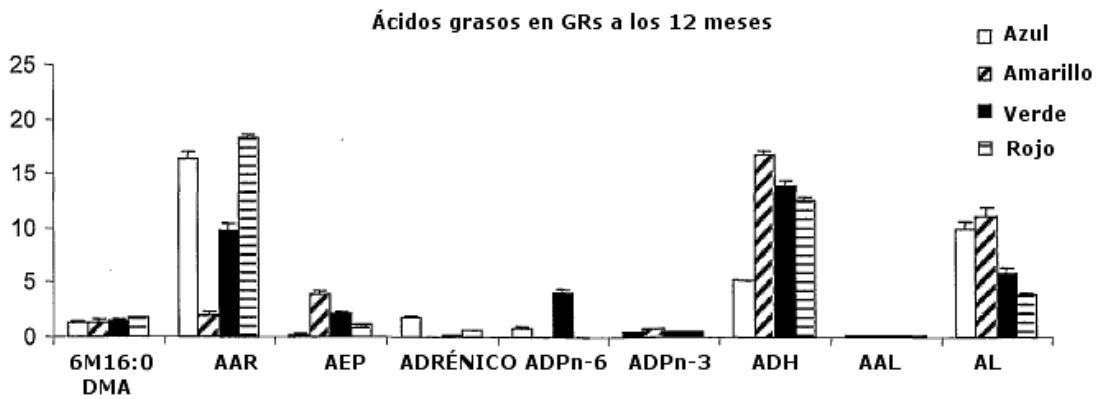
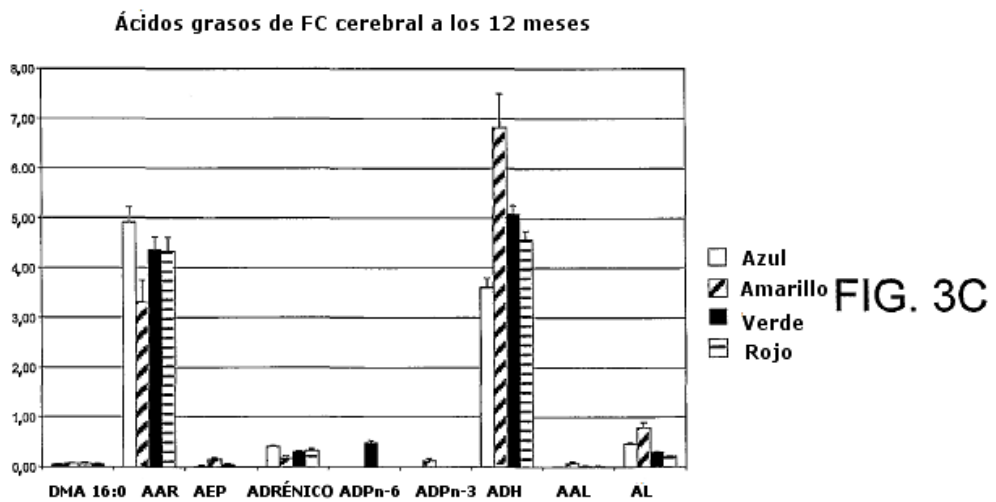
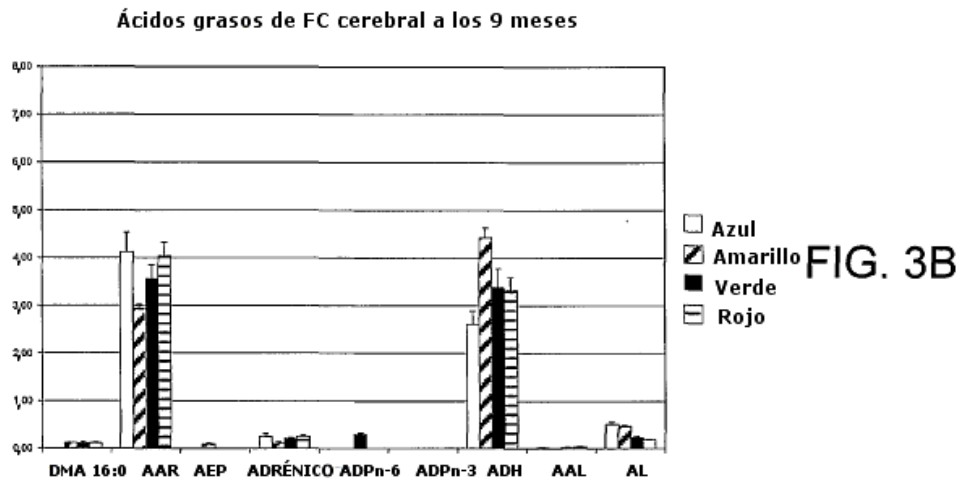
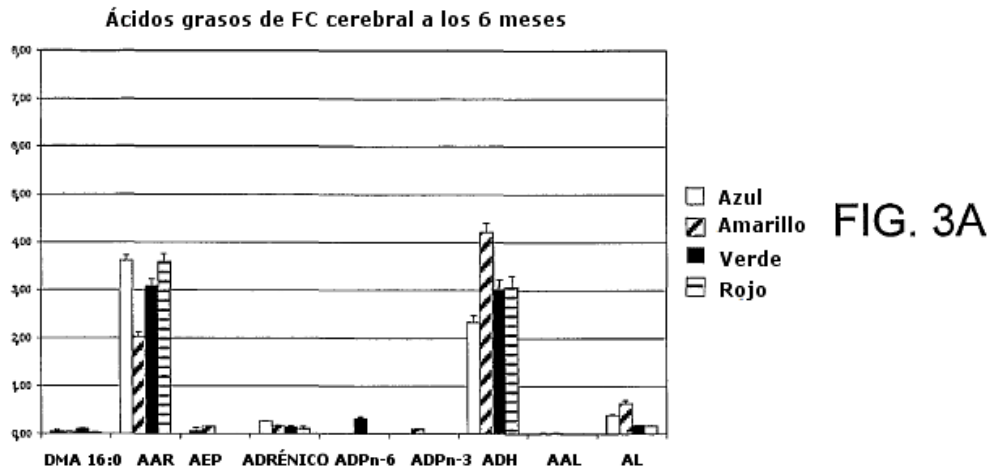
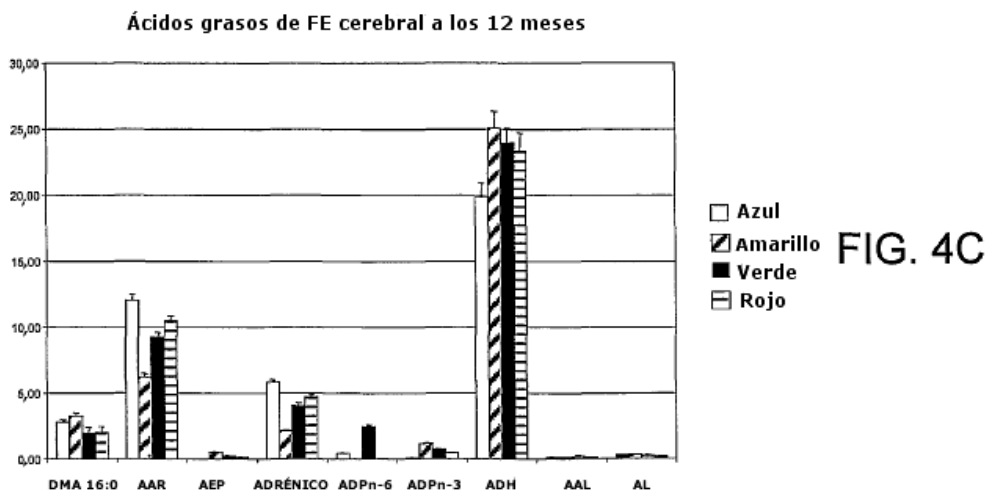
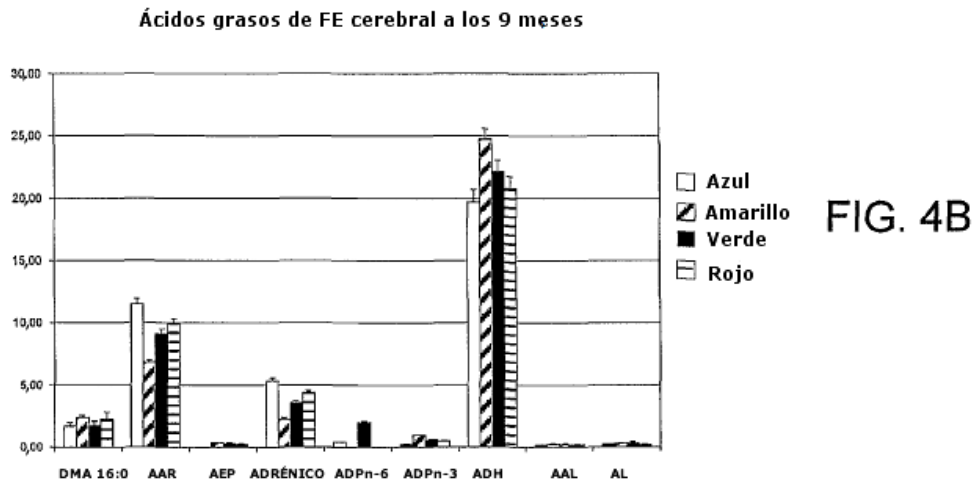
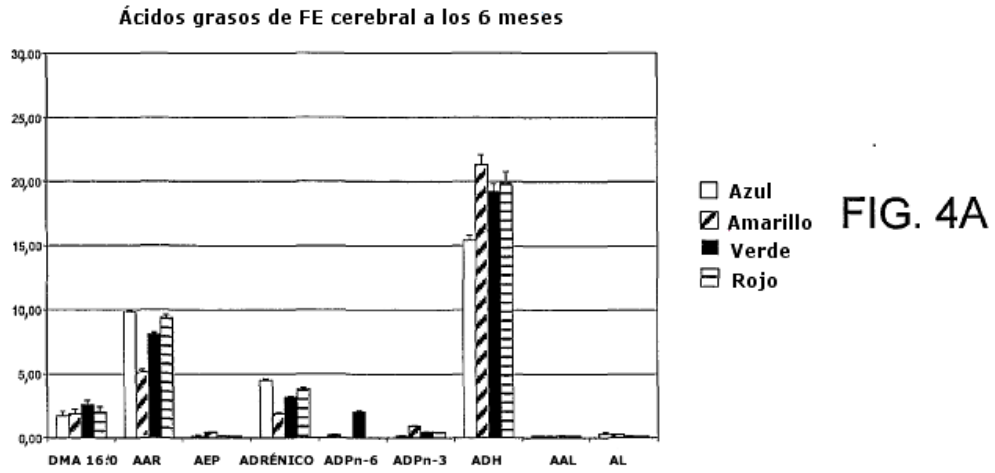


FIG. 2C

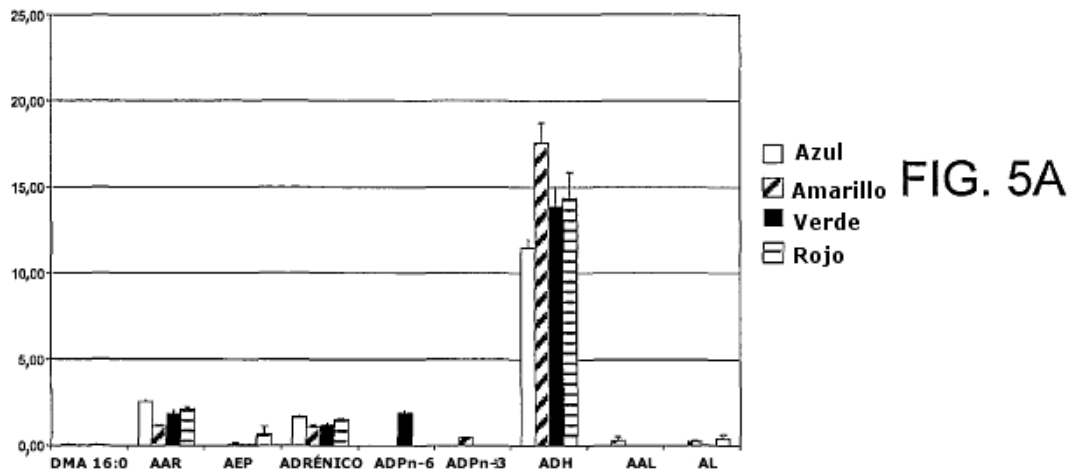




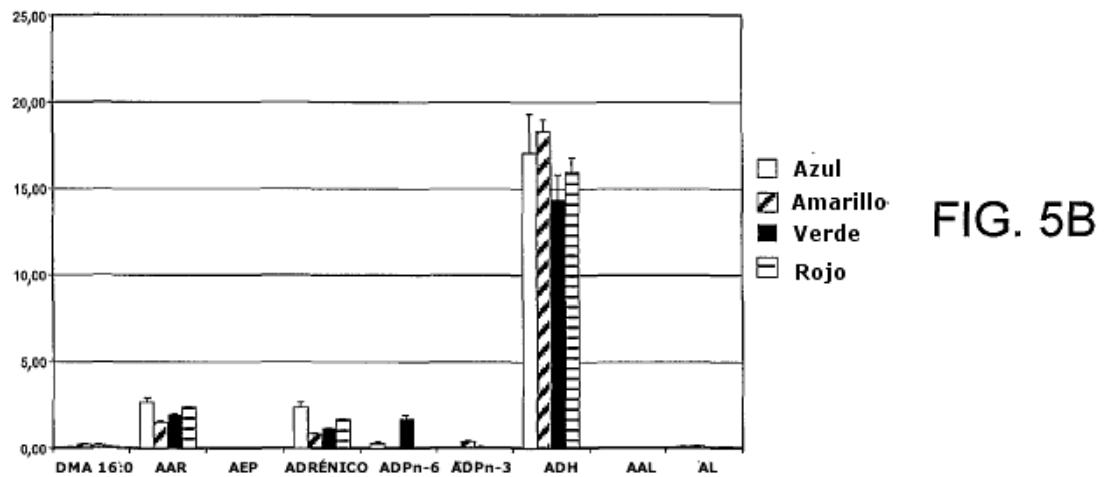




Ácidos grasos de FS cerebral a los 6 meses



Ácidos grasos de FS cerebral a los 9 meses



Ácidos grasos de FS cerebral a los 12 meses

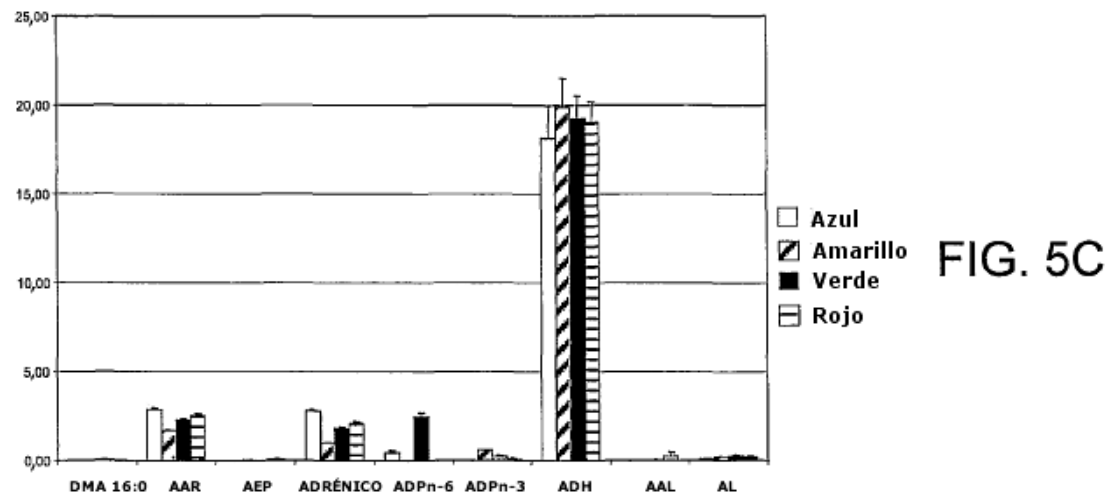


FIG. 6A

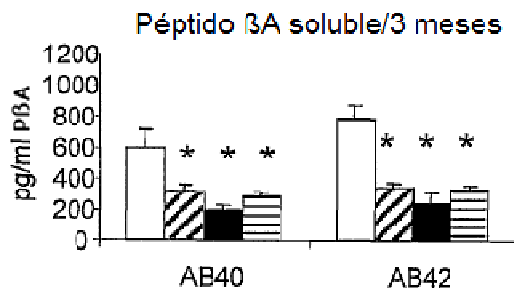


FIG. 6B

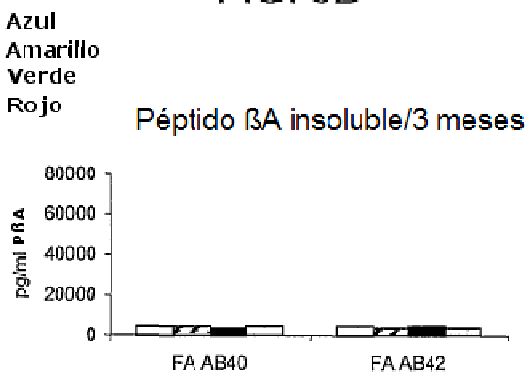


FIG. 6C

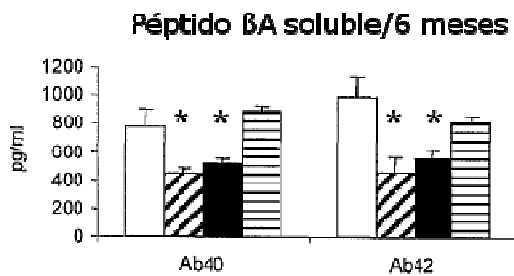


FIG. 6D

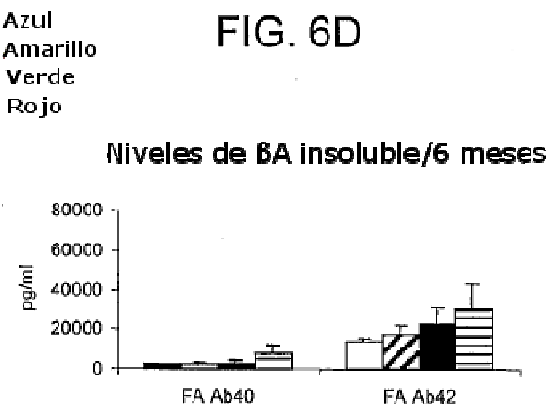


FIG. 6E

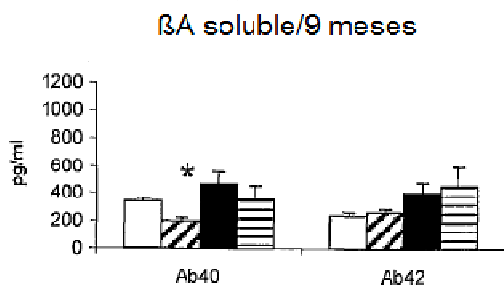


FIG. 6F

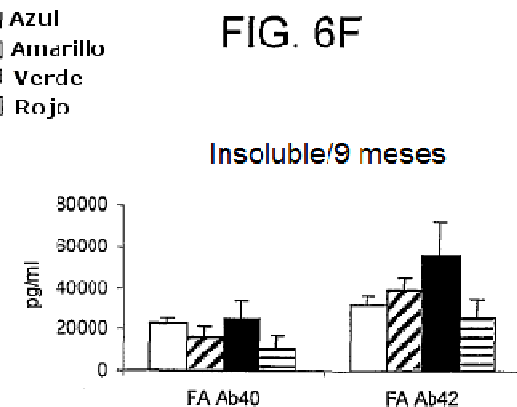


FIG. 6G

FIG. 6H

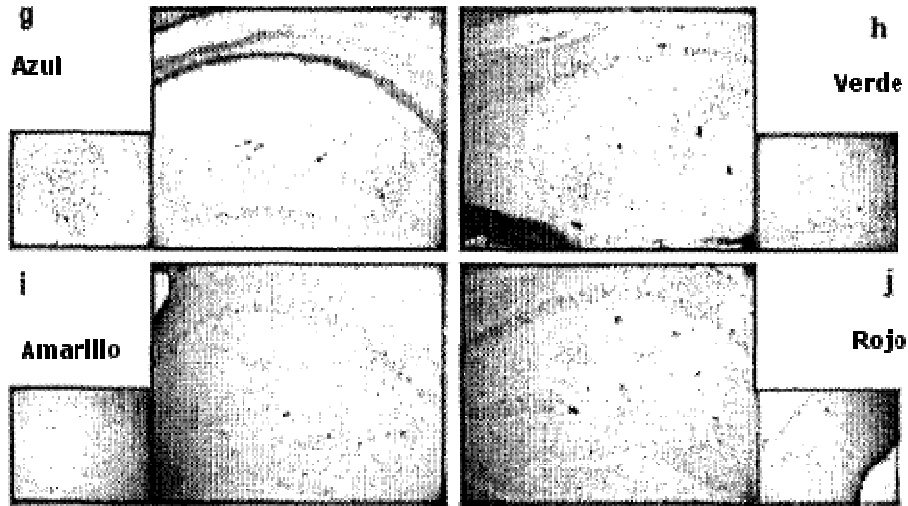


FIG. 6I

FIG. 6J

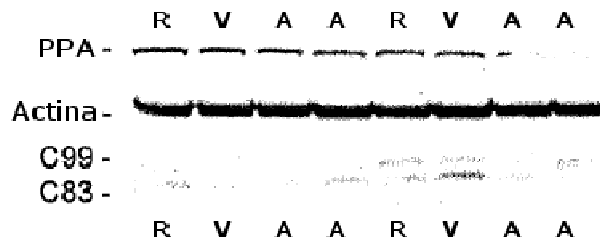


FIG. 7A

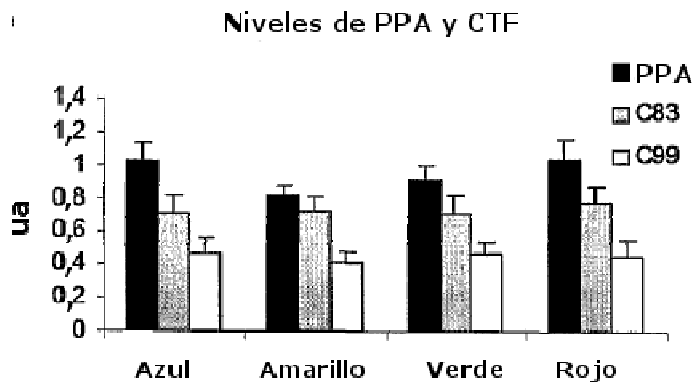


FIG. 7B

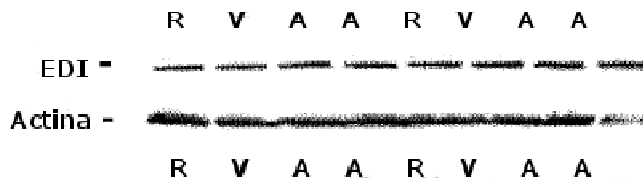


FIG. 7C

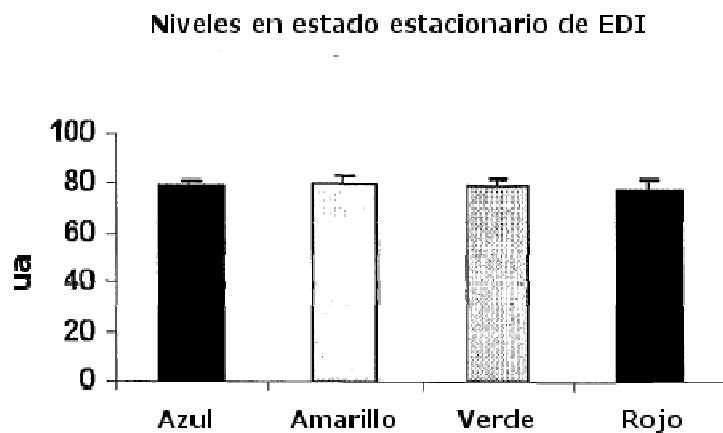


FIG. 7D

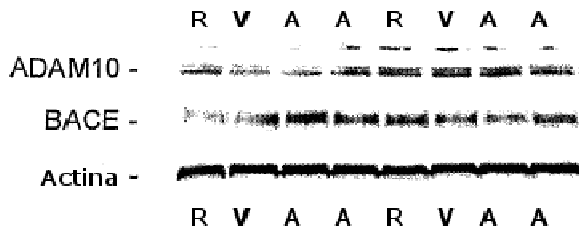


FIG. 8A

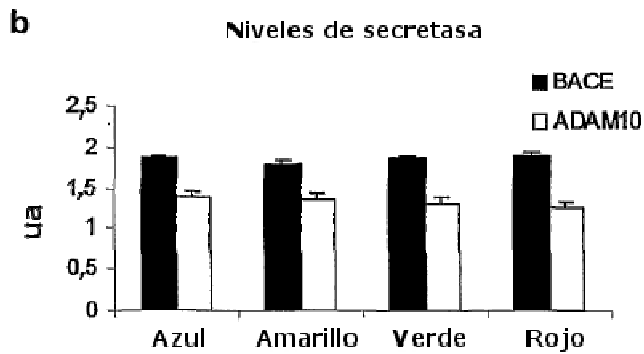


FIG. 8B

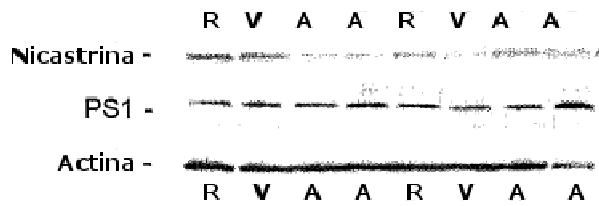


FIG. 8C

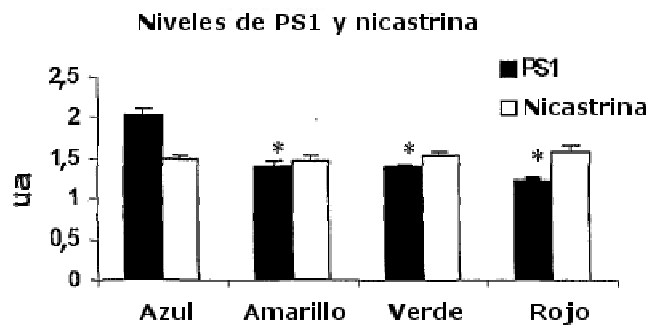


FIG. 8D

Tratamiento de células SHSY5Y tratadas durante 48 horas con 0,3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de ADH en niveles de ARNm de PS1

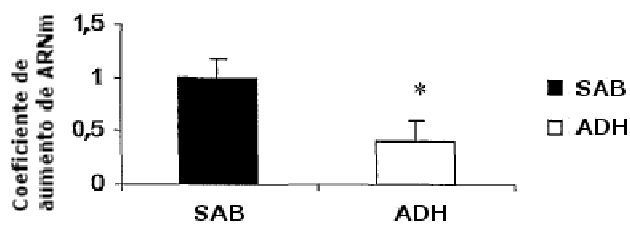


FIG. 8E

FIG. 9A



FIG. 9B

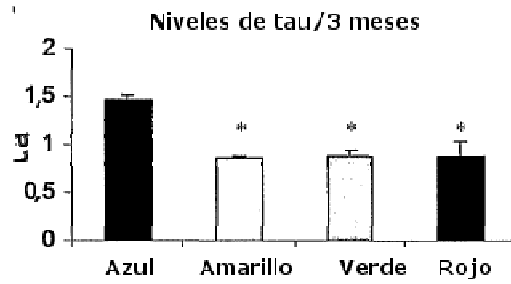


FIG. 9C

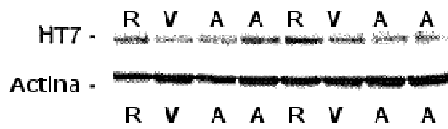


FIG. 9D

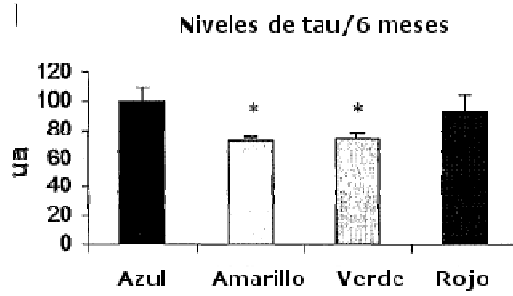


FIG. 9E

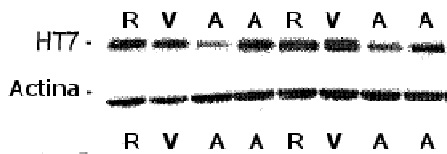


FIG. 9F

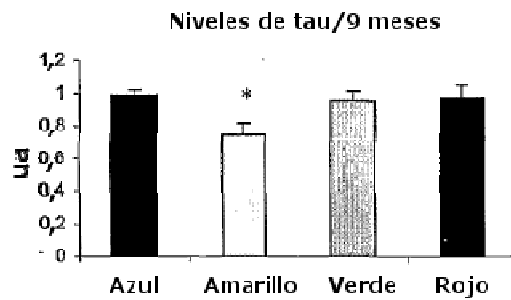




FIG. 10A

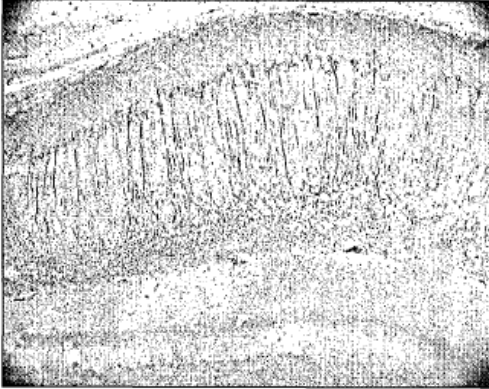


FIG. 10B

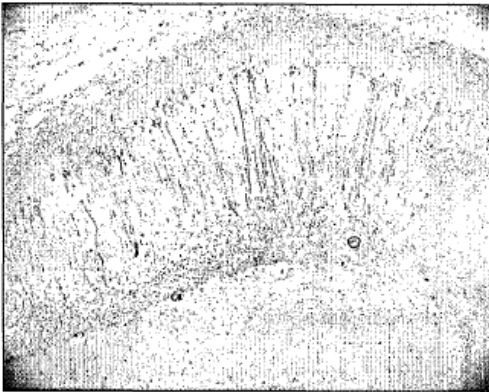


FIG. 10C



FIG. 10D

FIG. 10E

