

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 624 702**

51 Int. Cl.:

A61K 31/201 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01)
A61K 31/7068 (2006.01)
A61K 31/7072 (2006.01)
A61K 45/06 (2006.01)
A61K 31/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **23.05.2006 PCT/US2006/019778**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.11.2006 WO06127627**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.05.2006 E 06770871 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.12.2016 EP 1909801**

54 Título: **Composiciones que contienen PUFA y/o uridina y métodos para su uso**

30 Prioridad:

23.05.2005 US 683352 P
13.09.2005 US 716077 P
03.01.2006 US 755058 P
25.01.2006 US 761753 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.07.2017

73 Titular/es:

MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY (100.0%)
Technology Licensing Office, 255 Main Street, Building NE18-501
Cambridge, MA 02142-1601, US

72 Inventor/es:

WURTMAN, RICHARD J. y
RICHARDSON, INGRID

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 624 702 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones que contienen PUFA y/o uridina y métodos para su uso

Campo de la invención

Esta invención proporciona métodos no terapéuticos para mejorar una función cognitiva en un sujeto sano.

- 5 El objeto no cubierto por las reivindicaciones no forma parte de la invención.

Antecedentes de la invención

Los factores subyacentes en el desarrollo correcto del cerebro y los niveles de inteligencia están mal definidos. Son necesarias urgentemente en la técnica terapias para los trastornos neurológicos pediátricos.

- 10 El documento US6509178 describe que se sabe que el ácido docosahexaenoico mejora el aprendizaje de la memoria y se considera que es útil para tratar, entre otras, la enfermedad de Alzheimer. El documento WO00/06174 reivindica uridina o sus fuentes para tratar el deterioro de la memoria y las enfermedades relacionadas, tal como la enfermedad de Pick.

Sumario de la invención

- 15 Esta solicitud describe composiciones y métodos que potencian el desarrollo del cerebro; aumentan o potencian la inteligencia; aumentan o potencian la síntesis y los niveles de fosfolípidos, sinapsis, proteínas sinápticas y membranas sinápticas, por una célula neural o una célula cerebral.

- 20 Por tanto, esta invención proporciona un método no terapéutico para mejorar una función cognitiva en un sujeto sano, comprendiendo dicho método administrar al sujeto: (1) ácido docosahexaenoico (DHA), (2) uridina o uridina-5'-monofosfato (UMP) y (3) colina o una sal de colina. La función cognitiva mejorada puede ser una memoria mejorada. El sujeto puede ser un ser humano.

La sal de colina puede ser cloruro de colina, bitartrato de colina, tartrato de colina o citrato de colina. La composición puede comprender uridina-5'-monofosfato (UMP), cloruro de colina y ácido docosahexaenoico. La uridina o la UMP se pueden dosificar para proporcionar un intervalo de 10 a 500 mg de uridina al día. La colina o sal de colina se puede dosificar en un intervalo de 100 mg a 10 g de colina al día.

- 25 En una realización, el sujeto no tiene deterioro cognitivo ni trastorno de la memoria, ni se le ha diagnosticado un deterioro cognitivo ni trastorno de la memoria. El sujeto puede ser un adulto al que no se le ha diagnosticado ningún trastorno cognitivo ni neurológico. La composición puede estar en forma de un suplemento dietético, por ejemplo en forma de un producto alimenticio, tal como una bebida, que ha sido enriquecido con la composición. El sujeto puede ser un niño menor de 24 meses. En esta realización, la composición puede estar en forma de una fórmula infantil. El sujeto puede ser un niño menor de 18 años.

En otra realización, las composiciones para uso en el método de la presente invención pueden comprender el ácido graso omega-3 DHA, uridina y colina o una sal de colina. En otra realización, las composiciones pueden comprender un ácido graso omega-6, el ácido graso omega-3 DHA, uridina y colina o una sal de colina.

Breve descripción de las figuras

- 35 Figura 1. El DHA aumenta la síntesis de fosfolípidos en células PC12. Las células PC12 se incubaron durante una noche con ácidos grasos, después se incubaron en medios que contenían colina marcada con ¹⁴C. El gráfico representa la incorporación de ¹⁴C en fosfatidilcolina en desintegraciones por minuto (dpm) por microgramo (µg) de DNA. DHA: ácido docosahexaenoico. OA: ácido oleico. PA: ácido palmítico. * - p<0,05.

Figura 2. El aumento de DHA de la síntesis de fosfolípidos es dependiente de la dosis. * - p<0,05. ** - p<0,001.

- 40 Figura 3. A. El ácido araquidónico aumenta la síntesis de fosfolípidos en las células SHSY-5Y. DHA: ácido docosahexaenoico. AA: ácido araquidónico. PA: ácido palmítico. *: p<0,05. **: p<0,001. B. El aumento de AA de la síntesis de fosfolípidos es dependiente de la dosis.

- 45 Figura 4. El DHA y el UMP tienen una acción sinérgica aumentando los niveles de fosfolípidos cerebrales en un estudio en un animal completo. ***: significativamente mayor que el grupo de control por ANOVA unidireccional. A. pmol de fosfolípido por miligramos (mg) de proteína. UMP + DHA fue significativamente mayor que el control (p < 0,05) (ANOVA unidireccional [F (3,28) = 4,12; p = 0,015]). El ANOVA bidireccional reveló efecto estadísticamente significativo de DHA, así como, en relación con el grupo de control [F (1,28) = 8,78; P = 0,006]. B. pmol de fosfolípido por µg de DNA. UMP + DHA fue significativamente mayor que el control (p = 0,020) (ANOVA unidireccional [F (3,28) = 3,215; p = 0,038]).

- 50 Figura 5. Efectos del DHA sobre los niveles de CDP-colina en el cerebro (A) y niveles de CDP-etanolamina (B). Los

grupos de 8 jerbos recibieron una dieta de control o UMP, y por alimentación por sonda nasogástrica, DHA (en un vehículo de solución de goma arábica al 5%) o solución de goma arábica al 5% solo durante 28 días. El día 29 los cerebros se extrajeron y se analizaron para determinar la CDP-colina. Los datos se presentan como medias \pm SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA unidireccional o bidireccional seguido del ensayo de Tukey. a: p<0,05 en comparación con los valores de la dieta de control más el grupo de vehículo; b: p < 0,05 en comparación con los valores de la dieta con UMP más el grupo de vehículo.

Figura 6. Efectos de la dieta con UMP y del DHA sobre los niveles de NF-70 (A) y NF-M (B) en cerebros. Los jerbos recibieron las dietas descritas en la leyenda de la Figura 5 durante 21 (paneles de la izquierda) o 28 (paneles de la derecha) días. Los días 22 y 29, los cerebros se extrajeron y se analizaron para determinar NF-70. Los valores se representan como la media \pm SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA unidireccional y el ensayo de Tukey. A. **: p<0,01; ***: p<0,001 en comparación con los valores para la dieta de control + grupo de vehículo. B. p<0,05; ** p<0,01. No se observaron entre los grupos diferencias significativas en los niveles de la proteína citoesquelética beta-tubulina.

Figura 7. Efectos de la dieta con UMP y del DHA sobre los niveles de PSD-95 y sinapsina-1 en el cerebro. A) Los jerbos recibieron una dieta plus de control, por alimentación por sonda nasogástrica, goma arábica al 5%, o una dieta plus que contenía UMP (0,5%), por alimentación por sonda nasogástrica, DHA (300 mg/kg) disuelto en el vehículo durante 7 (paneles de la izquierda) o 21 (paneles de la derecha) días. Al día siguiente, los cerebros se extrajeron y se analizaron para determinar PSD-95 (A) o sinapsina-1 (B). A. Los valores representan las medias \pm SEM. El análisis estadístico se realizó utilizando ANOVA unidireccional seguido por el ensayo de Tukey. ** p<0,01; *** p<0,001 cuando se comparó con los valores para la dieta de control más el grupo de vehículo. B. * p<0,05; ** p<0,01.

Figura 8. Aumento de la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo de jerbos adultos.

Figura 9. Efecto de la uridina y/o del DHA en el aprendizaje.

Figura 10. Efecto del DHA sobre la síntesis de fosfolípidos en neuronas del hipocampo cultivadas. Eje vertical: ^{14}C DPM/muestra de 50 μL .

Descripción detallada de la invención

Esta solicitud describe composiciones y métodos que potencian el desarrollo del cerebro; aumentan o potencian la inteligencia; aumentan o potencian la síntesis y los niveles de fosfolípidos, sinapsis, proteínas sinápticas y membranas sinápticas por una célula neural o una célula cerebral.

Por tanto, esta invención proporciona un método no terapéutico para mejorar una función cognitiva en un sujeto sano, comprendiendo dicho método administrar al sujeto: (1) ácido docosahexaenoico (DHA), (2) uridina o uridina-5'-monofosfato (UMP) y (3) colina o una sal de colina.

En una realización de la presente invención, el ácido graso omega-3, ácido docosahexaenoico (DHA), la uridina, la colina, la sal de colina o una de sus combinaciones están comprendidos en una composición farmacéutica.

Como se describe en la presente memoria, los resultados presentados en los Ejemplos 1 y 5 demuestran que la administración de ácido docosahexaenoico (DHA), un ácido graso omega-3, a células neurales y cerebrales aumenta su síntesis de fosfolípidos, como se evidencia por el aumento de la incorporación de colina marcada. La administración de DHA aumentó la síntesis de fosfolípidos, fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina totales (Ejemplo 2), mostrando que el efecto no se limita a fosfolípidos particulares. Las células PC12 muestran funciones diferenciadas de células neuronales y se usan comúnmente en la técnica como un modelo de línea celular de células neuronales. Los resultados presentados en el Ejemplo 12 muestran que el DHA aumenta la síntesis de fosfolípidos en las neuronas en cultivos a corto plazo.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar la cantidad de una membrana sináptica de una célula neural o célula cerebral de un sujeto. Los métodos para medir la cantidad de membrana sináptica en el cerebro de un sujeto son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, por Oertner TG et al., (*Facilitation at single synapses probed with optical quantal analysis. Nat Neurosci.* 2002 Jul; 5(7): 657-64); Bloodgood BL et al., (*Neuronal activity regulates diffusion across the neck of dendritic spines. Science.* 2005 Nov 4; 310(5749): 866-9); El Fakhri G et al (*Generalized five-dimensional dynamic and spectral factor analysis. Med Phys.* 2006 Apr; 33(4):1016-24); y Pautler RG. (*Biological applications of manganese-enhanced magnetic resonance imaging. Methods Mol. Med.* 2006;124:365-86).

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral de un sujeto. El fosfolípido que es aumentado por las composiciones de la presente invención puede ser un ácido fosfatídico. El término "ácido fosfatídico" es, en otra realización, sinónimo del término "fosfátido". El fosfolípido puede ser una fosfatidilcolina ("PC", Ejemplo 1), una fosfatidiletanolamina ("PE", Ejemplo 2), una fosfatidilserina ("PS"), un fosfatidilinositol ("PI"), una esfingomielina, un fosfoglicérido o cualquier otro fosfolípido conocido en la técnica.

En otra realización, PI, aumentado enormemente por las composiciones y los métodos de la presente invención, actúa como un depósito de 1 o más moléculas mensajeras secundarias. En otra realización, la segunda molécula mensajera es inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃). En otra realización, la segunda molécula mensajera es diacilglicerol (DAG). En otra realización, la señalización de proteína-quinasa C (PKC) es aumentada por las composiciones y los métodos de la presente invención. En otra realización, una vía de señalización aguas abajo de IP₃ es activada por las composiciones y los métodos de la presente invención. En otra realización, los niveles intracelulares de calcio son aumentados por las composiciones y los métodos de la presente invención. En otra realización, una vía de señalización aguas abajo de DAG es activada por las composiciones y los métodos de la presente invención. En otra realización, una vía de señalización aguas abajo de PKC es activada por las composiciones y los métodos de de la presente invención. En otra realización, una vía de señalización aguas abajo de calcio intracelular es activada por las composiciones y los métodos de la presente invención.

En otra realización, la esfingomielina, aumentada por las composiciones y los métodos de la presente invención actúa como una fuente de ceramida.

En otra realización, el DHA y/o la uridina en las composiciones para uso en la presente invención actúan como precursores en masa de fosfolípidos celulares. En otra realización, la uridina actúa activando los receptores P2Y para el UMP formado a partir de uridina. En otra realización, el DHA actúa activando la sintaxina-3. En otra realización, se emplea una combinación de estos mecanismos.

En otra realización, como se demuestra por los datos incluidos en la presente memoria, la administración de DHA y uridina es eficaz para mejorar una función cognitiva en un sujeto sano.

Como se describe en la presente memoria, la administración de DHA y/o uridina a jerbos, cuyo metabolismo de pirimidina se asemeja al de los seres humanos, aumenta los niveles de las proteínas neurofibrilares en axones NF-70 y NF-M, la proteína de densidad postsináptica PSD-95 y la proteína vesicular sinapsina-1 (Ejemplo 7). Por tanto, la administración de DHA aumenta los niveles de membranas sinápticas en el cerebro y las células neurales. Bajo las condiciones utilizadas en la presente invención, las composiciones y los métodos de la presente invención también tienen utilidad en el aumento de la señalización neuronal, en la potenciación de la función neural y en el aumento de la proliferación de axones.

El ácido graso omega-3 utilizado en las composiciones y los métodos de la presente invención es DHA, un ácido graso poliinsaturado omega-3 (PUFA) (véanse los Ejemplos 1-2). El DHA es un ácido graso omega-3, poliinsaturado, de 22 carbonos, también denominado ácido 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico.

Como se describe en la presente memoria, DHA, EPA y AA aumentan todos los niveles de fosfolípidos cerebrales (Ejemplo 8). Por tanto, los efectos descritos en la presente memoria no son específicos del DHA, sino que son, en las condiciones utilizadas en la presente memoria, generalizables a los PUFA omega-3 y omega-6 como una familia.

Un precursor metabólico de DHA es un ácido alfa-linolénico, que sirve como precursor del EPA (ácido icosapentaenoico) y DHA (ácido docosahexaenoico). Como se describe en la presente memoria, los resultados presentados en el Ejemplo comparativo 3 demuestran que la administración de ácido araquidónico, un ácido graso omega-6, a células neurales y cerebrales aumenta su síntesis de fosfolípidos, como se evidencia por un aumento de la incorporación de colina marcada a partir de entonces. Las células SHSY-5Y proceden de un neuroblastoma humano y se usan como un sistema modelo para funciones neuronales. El aumento de la síntesis de los fosfolípidos da como resultado un aumento en sus niveles.

La composición se puede proporcionar como una composición farmacéutica que comprende: (a) uridina o uridina-5'-monofosfato (UMP); y (b) el ácido graso omega-3, DHA, y una colina o una sal de colina. La colina o sal de colina presente en la composición farmacéutica puede ser cualquier colina o sal de colina descrita en la presente memoria.

El ácido graso omega-3, DHA, presente en la composición farmacéutica puede estar presente en cualquier dosificación descrita en la presente memoria. La uridina o UMP presente en la composición farmacéutica puede estar presente en cualquier dosificación descrita en la presente memoria. La colina o sal de colina presente en la composición farmacéutica puede estar presente en cualquier dosificación descrita en la presente memoria.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar el nivel de un fosfolípido de una célula neural o célula cerebral de un sujeto. Como se describe en la presente memoria, los ácidos grasos omega-3 y los ácidos grasos omega-6 actúan cada uno sinérgicamente con la uridina (por ejemplo, UMP) para aumentar la síntesis de fosfolípidos y los niveles de fosfolípidos.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar o potenciar una síntesis de un fosfolípido por una célula neural o una célula cerebral de un sujeto.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar una cantidad de una membrana sináptica de una célula neural o célula cerebral de un sujeto.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de estimular la síntesis de

fosfolípidos que aumenta los niveles de fosfolípidos en el cerebro o célula neural diana. Suficientes niveles de fosfolípidos son importantes en muchos aspectos de la función neural, por ejemplo, la señalización sináptica, la función neurotransmisora, la ramificación y proliferación de los axones etc., y también son importantes en la función cerebral adecuada.

- 5 Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de elevar el nivel de la PC cerebral en un sujeto, aumentando la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral del sujeto, elevando así el nivel de la PC cerebral en el sujeto.

- 10 Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de elevar el nivel de la SM cerebral en un sujeto aumentando la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral del sujeto, elevando con ello el nivel de la SM cerebral en el sujeto.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de elevar el nivel del PI cerebral en un sujeto aumentando la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral del sujeto, elevando con ello un nivel del PI cerebral en el sujeto.

- 15 Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de elevar el nivel de la PE cerebral en un sujeto aumentando la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral del sujeto, elevando con ello el nivel de la PE cerebral en el sujeto.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de elevar el nivel de la PS cerebral en un sujeto aumentando la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral del sujeto, elevando con ello el nivel de la PS cerebral en el sujeto.

- 20 En otra realización, la presente invención proporciona un método no terapéutico para mejorar una función cognitiva en un sujeto sano por la administración al sujeto de una composición de la presente invención, con lo que la composición aumenta la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o una célula cerebral del sujeto, mejorando así una función cognitiva en el sujeto. En otra realización, la diana de acción de esta composición es un cerebro en desarrollo o una de sus células neurales. En otra realización, el sujeto es un adulto al que no se ha diagnosticado
25 ningún trastorno cognitivo ni neurológico. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

Como se describe en la presente memoria, el DHA y el UMP mejoraron el comportamiento de animales en un ensayo de memoria (Ejemplo 10). Por tanto, las composiciones y los métodos de la presente invención son eficaces para mejorar y potenciar la memoria y otras funciones cognitivas.

- 30 Como se describe en la presente memoria, la administración de DHA y/o uridina aumenta los niveles y la síntesis de fosfolípidos cerebrales, los niveles de proteínas neurofibrilares de axones y la cantidad de membranas sinápticas. De este modo, las composiciones y métodos de la presente invención aumentan y potencian la función cognitiva, la función neurológica, la inteligencia, la transmisión sináptica y los niveles y actividad de los neurotransmisores.

- 35 Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria actúan para mejorar una función neurológica en un sujeto aumentando la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral del sujeto. La función neurológica que es mejorada puede ser una transmisión sináptica, tal como una transmisión sináptica adyacente a una neurona motora, adyacente a una interneurona o adyacente a una neurona sensorial.

- 40 En otra realización, la función neurológica que se mejora o potencia puede ser una función de un neurotransmisor. Mejorar o potenciar una función de un neurotransmisor puede tener lugar aumentando el nivel del neurotransmisor en las sinapsis, aumentando la liberación de los neurotransmisores en las sinapsis o sin cambiar el nivel o la liberación de los neurotransmisores en las sinapsis.

- 45 En otra realización, "mejorar" una función cognitiva o neurológica o la inteligencia se refiere a efectuar una mejora del 10% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 20% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 30% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 40% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 50% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 60% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 70% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 80% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 90% en dicha función. En otra realización, el término se refiere a efectuar una mejora del 100% en dicha función. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

- 50 En otra realización, la mejora de una función o inteligencia cognitiva o neurológica se evalúa con relación a la función antes de comenzar el tratamiento. En otra realización, la mejora se evalúa con relación a un sujeto no tratado. En otra realización, la mejora se evalúa de acuerdo con un criterio normalizado tal como, por ejemplo, un ensayo o similar. Cada tipo de mejora de la actividad cognitiva representa una realización separada de la presente
55 invención.

En otra realización, la mejora de una función o inteligencia cognitiva o neurológica se evalúa por el número de conexiones entre neuronas en el cerebro del sujeto. En otra realización, la mejora se evalúa por el número de capilares en el cerebro del sujeto, o en una región específica del cerebro del sujeto. En otra realización, la mejora se evalúa por la actividad neural. En otra realización, la mejora se evalúa por la función neural. En otra realización, la mejora se evalúa por la función lingüística. En otra realización, la mejora se evalúa por la capacidad de comunicación. En otra realización, la mejora se evalúa por la medición de los niveles de acetilcolina u otros neurotransmisores o compuestos químicos cerebrales correlacionados con la función cognitiva. En otra realización, la mejora se evalúa por escaneo por tomografía por emisión de positrones (PET) del cerebro del sujeto. En otra realización, la mejora se evalúa por escaneo por formación de imagen por resonancia magnética (MRI) del cerebro del sujeto. En otra realización, la mejora se evalúa por el instrumento para la selección de las capacidades cognitivas (CASI) (Peila R et al., *Stroke*. 32:2882-9, 2001). En otra realización, la mejora se evalúa por un ensayo tal como, por ejemplo, los ensayos descritos en la presente memoria (Ejemplo 13). En otra realización, se utiliza el ensayo Mini-Mental (Tsai L et al, *The Mini-Mental State Test and computerized tomography*. *Am. J. Psychiatry*. 1979 Apr; 136(4A): 436-8). Métodos adicionales para evaluar la mejora de la función cognitiva son bien conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo en Antonova E. et al. (*Schizophr Res*. 2004 Oct 1; 70(2-3):117-45) y en *Cognitive Function Analysis* (Greenwood Pub Group, 1998).

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar la cantidad o el nivel de un neurotransmisor en el cerebro o el SNC de un sujeto, con lo que la composición aumenta la síntesis de un fosfolípido en el cerebro o el SNC, aumentando con ello la cantidad o el nivel de un neurotransmisor en el cerebro o el SNC de un sujeto. El neurotransmisor cuyos niveles o actividad o liberación están afectados pueden ser acetilcolina, dopamina, glutamato, serotonina, 5-hidroxitriptamina (5-HT), GABA o cualquier otro neurotransmisor conocido en la técnica.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar o potenciar la capacidad de una célula cerebral de un sujeto para liberar repetidamente una cantidad eficaz de un neurotransmisor en una sinapsis aumentando la síntesis de un fosfolípido por la célula cerebral.

Como se describe en la presente memoria, la densidad de las espinas dendríticas aumentó en animales a los que se había administrado DHA y/o uridina (Ejemplo 9). Por tanto, las composiciones y los métodos de la presente invención aumentan el número y el tamaño de las sinapsis en el cerebro y la capacidad de las células cerebrales para señalizar a través de los neurotransmisores.

Como se describe en la presente memoria, la administración de DHA y/o uridina aumenta los niveles y la síntesis de fosfolípidos cerebrales, los niveles de proteínas neurofibrilares de axones y la cantidad de membranas sinápticas. Así, las composiciones y los métodos de la presente invención aumentan y potencian la liberación y las cantidades de neurotransmisores.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de mejorar o potenciar la inteligencia de un sujeto, aumentando la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral del sujeto. La diana de acción de la composición puede ser un cerebro en desarrollo o una de sus células neurales. El sujeto puede ser un adulto al que no se ha diagnosticado ningún trastorno cognitivo ni neurológico.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar el número de espinas dendríticas en el cerebro o una de sus regiones de un sujeto, aumentando la síntesis de un fosfolípido por una célula neural o célula cerebral del sujeto.

La inteligencia que es mejorada o potenciada por las composiciones y los métodos de la presente invención puede ser inteligencia lingüística, inteligencia musical, inteligencia espacial, inteligencia corporal, inteligencia interpersonal, inteligencia intrapersonal, inteligencia lógico-matemática o cualquier otro tipo de inteligencia conocida en la técnica.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de facilitar o potenciar la reparación del cerebro en un sujeto. La reparación del cerebro puede ser facilitada o potenciada después de un accidente cerebrovascular, después de una lesión cerebral o después de cualquier otro episodio, enfermedad o trastorno conocido en la técnica que requiera la reparación del cerebro.

Las composiciones y los métodos de la presente invención, cuando se administran a madres gestantes o lactantes, dan como resultado eficazmente la administración de DHA y uridina a la descendencia. Como se describe en la presente memoria, la administración de las composiciones que comprenden DHA y uridina aumenta los niveles y la síntesis de los fosfolípidos cerebrales, los niveles de las proteínas neurofibrilares de axones y las cantidades de membranas sinápticas. Por tanto, la administración de estas composiciones mejora el desarrollo del cerebro y aumenta la inteligencia y función cognitiva y la inteligencia en la descendencia de las madres gestantes o lactantes.

Como se describe en la presente memoria, se alcanzaron mayores niveles del número de espinas dendríticas en la descendencia de animales gestantes y lactantes a los que se había administrados DHA y/o uridina (Ejemplo 9). Además, la administración de DHA y/o uridina a madres gestantes y lactantes aumentó los niveles de fosfolípidos en la descendencia (Ejemplo 11). De este modo, las composiciones de la presente invención influyen positivamente en el desarrollo del cerebro en la descendencia, cuando se administran a madres gestantes y lactantes.

En una realización, al sujeto cuya función cognitiva es potenciada o mejorada por una composición o un método de la presente invención no le ha sido diagnosticado un trastorno de deterioro cognitivo o de memoria. En otra realización, el sujeto está sano. En otra realización, el sujeto no tiene deterioro cognitivo ni trastorno de la memoria. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

5 Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar la sensibilidad de una neurona a un estímulo. Como se describe en la presente memoria, la administración de DHA y/o uridina aumenta los niveles y la síntesis de los fosfolípidos cerebrales, los niveles de proteínas neurofibrilares de axones y la cantidad de membranas sinápticas. Por tanto, las composiciones y los métodos de la presente invención aumentan y potencian la sensibilidad de las neuronas a los estímulos y el tamaño y número de sinapsis en el cerebro y el sistema nervioso central (SNC).

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar el tamaño medio de las sinapsis en un cerebro de un sujeto y de aumentar el número de sinapsis en un cerebro de un sujeto. La diana de acción de la composición puede ser un cerebro en desarrollo o una de sus células neurales. El sujeto puede ser un adulto al que no se le ha diagnosticado ningún trastorno cognitivo ni neurológico.

15 Los métodos para medir y estimar el tamaño medio de las sinapsis, el número de sinapsis y el nivel de actividad sináptica y liberación de neurotransmisores en el cerebro y en el SNC de un sujeto son muy conocidos en la técnica, y están descritos, por ejemplo, por Wheeler DW et al. (*Estimating use-dependent synaptic gain in autonomic ganglia by computational simulation and dynamic-clamp analysis. J. Neurophysiol.* 2004 Nov; 92(5):2659-71), Viele K et al. (*Estimating the number of release sites and probability of firing within the nerve terminal by statistical analysis of synaptic charge. Sinapsis.* 2003 Jan; 47(1):15-25) y DeFelipe J et al. (*Estimation of the number of de synapses in the cerebral cortex: methodological considerations. Cereb Cortex.* 1999 Oct-Nov; 9(7):722-32).

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de estimular o potenciar la producción de una membrana de una célula cerebral o una célula neural de un sujeto.

25 Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar los niveles de fosfolípidos al tiempo que se preservan sustancialmente las relaciones de 2 o más fosfolípidos en las células cerebrales o neurales diana. En otra realización, las composiciones aumentan los niveles de fosfolípidos, al tiempo que preservan sustancialmente las relaciones de 3 o más fosfolípidos en las células cerebrales o neurales diana. En otra realización, las composiciones aumentan los niveles de fosfolípidos al tiempo que preservan sustancialmente las relaciones de 4 o más fosfolípidos en las células cerebrales o neurales diana. En otra realización, los fosfolípidos se seleccionan entre PC, PE, PS y esfingomielina (SM). En otra realización, la preservación sustancial de estas relaciones es importante en los aspectos anteriores de la función neural y cerebral.

30 “Preservar sustancialmente” se refiere, en otra realización, a una desviación inferior al 10% de la relación previa. En otra realización, “preservar sustancialmente” se refiere a una desviación menor del 15%. En otra realización, la desviación es menor del 20%. En otra realización, es menor del 25%. En otra realización, es menor del 30%. En otra realización, es menor del 35%. En otra realización, es menor del 40%. En otra realización, es menor del 45%. En otra realización, es menor del 50%. En otra realización, es menor del 55%. En otra realización, es menor del 60%. En otra realización, es menor del 65%. En otra realización, es menor del 70%. En otra realización, es menor del 75%. En otra realización, es menor del 80%. En otra realización, es menor del 85%. En otra realización, es menor del 90%. En otra realización, es menor del 95%. En otra realización, es menor del 90%.

40 La estimulación de la síntesis de fosfolípidos por las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria potencian la ramificación neurítica o la proliferación neurítica y aumenta el conjunto de restos de fosfolípidos que se pueden liberar por la activación de las fosfolipasas. Algunos de los restos de fosfolípidos son bioactivos, tales como el inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃), el diacilglicerol (DAG) y el factor activador plaquetario lyso (lyso-PAF), que al continuar el metabolismo, dan lugar al lípido bioactivo, PAF (1-0-alquil-2-acetil-sn-3-glicerol-3-fosfocolina).

45 En otra realización, la estimulación de la síntesis de fosfolípidos por las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria protegen las membranas sinápticas contra el estrés, tal como el estrés oxidante o cualquier otro tipo de estrés conocido en la técnica.

Cada uno de estos efectos de estimulación de la síntesis de fosfolípidos potencia la señalización mediada por neurotransmisores, mejorando así la memoria, la inteligencia y otras funciones cognitivas.

50 El sujeto de la presente invención, en una realización, es un ser humano. En otra realización, el sujeto es de sexo femenino. En otra realización, el sujeto es de sexo masculino. En otra realización, el sujeto es una mujer gestante. En otra realización, el sujeto es una mujer lactante. En otra realización, el sujeto es un recién nacido. En otra realización, el sujeto es un bebé. En otra realización, el sujeto es un bebé mayor. En otra realización, el sujeto es un niño. En otra realización, el sujeto es un joven. En otra realización, el sujeto es un adulto. En otra realización, el sujeto es un adulto envejecido. En otra realización, “envejecer” se refiere a cualquiera de las realizaciones enumeradas anteriormente.

“Recién nacido” se refiere, en otra realización, a un sujeto menor de 6 meses. En otra realización, el término se

refiere a un sujeto menor de 5 meses, menor de 4 meses, menor de 3 meses, menor de 2 meses, menor de 1½ meses o menor de 1 mes. En otra realización, el término se refiere a un sujeto menor de 10 semanas, o menor de 9 semanas, menor de 7 semanas, menor de 6 semanas o menor de 5 semanas.

5 "Bebé" se refiere, en otra realización, a un sujeto menor de 1 año. En otra realización, el término se refiere a un sujeto menor de 18 meses. En otra realización, el término se refiere a un sujeto menor de 6 meses, menor de 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 13 meses, 14 meses, 16 meses o menor de 20 meses. En otra realización, el término se refiere a un sujeto menor de 2 años. En otra realización, el término se refiere a un sujeto que todavía no ha sido destetado. En otra realización, el término se refiere a un sujeto que ha sido destetado, pero que se encuentra incluido dentro de los intervalos etarios antes citados.

10 "Bebé mayor" se refiere, en otra realización, a un sujeto de 1-2 años. En otras realizaciones, el término se refiere a un sujeto de 6-24 meses, de 8-24 meses, de 10-24 meses, de 13-24 meses, de 14-24 meses, de 16-24 meses, de 18-24 meses, de 12-18 meses, de 13-18 meses, de 15-18 meses, de 12-20 meses o de 14-20 meses. En otra realización, el término se refiere a un sujeto que ha sido destetado, pero es menor de 20 meses. En otra realización, el término se refiere a un sujeto que ya ha sido destetado, pero es menor de 24 meses.

15 "Niño" se refiere, en otra realización, a un sujeto menor de 18 años. En otra realización, el término se refiere a un sujeto menor de 17 años o menor de 16 años, 15 años, 14 años, 13 años, 12 años, 11 años, 10 años, 9 años, 8 años, o menor de 7 años.

"Niño pequeño" se refiere, en otra realización, a un sujeto menor de 7 años. En otra realización, el término se refiere a un sujeto menor de 6 años o 5 años, 4 años, 3½ años, 3 años o menor de 2½ años.

20 "Adulto" se refiere a un sujeto que supera una de las edades mencionadas anteriormente como el límite superior para un niño.

En otra realización de las composiciones y los métodos de la presente invención, el ácido graso omega-3, DHA, o la composición de la presente invención ejercen uno de los efectos enumerados en la presente memoria aumentando la síntesis de un fosfolípido. En otra realización, el efecto se manifiesta sin aumentar la síntesis de un fosfolípido.
25 Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

El fosfato de uridina utilizado en las composiciones y los métodos de la presente invención es uridina-5'-monofosfato.

30 En otras realizaciones, los compuestos basados en uridina distintos de la uridina propiamente dicha, sirven como fuentes de uridina. Estos son, en otras realizaciones, alimentos ricos en uridina o productos dietéticos como algas; sales de uridina como fosfatos de uridina, uridina acilada o similares. En otra realización también se administran derivados de acilo de uridina o sus mezclas, por ejemplo los descritos en la patente de EE.UU. N° 5.470.838.

35 Las composiciones para uso en los métodos de la presente invención comprenden, colina o una sal de colina. En otra realización, la administración de uno de los compuestos anteriores aumenta el efecto del DHA y la uridina en la síntesis de los fosfolípidos de membrana. Como se describe en la presente memoria (ejemplos), la administración de colina y DHA exhibe un aumento inesperado de los niveles de fosfolípidos, las proteínas sinápticas y las membranas sinápticas en las neuronas y el tejido cerebral y de las funciones de la memoria, de la inteligencia y cognitivas y neurológicas.

En otra realización, las composiciones

40 una para uso en los métodos de la presente invención comprenden el ácido graso omega-3, DHA, una uridina y una colina o una sal de colina.

En otra realización, las composiciones para uso en los métodos de la presente invención comprenden un ácido graso omega-3, el ácido graso omega-3 DHA, una uridina y colina o una sal de colina.

En otra realización, se incluyen 2 ácidos grasos omega-3 diferentes. 1 de los 2 ácidos grasos omega-3 es el DHA. En otra realización, los 2 ácidos grasos omega-3 son ácido icosapentaenoico (EPA) y DHA.

45 En otra realización, la relación entre los 2 ácidos grasos omega-3 es 0,05:1. En otra realización, la relación es 0,1:1. En otra realización, la relación es 0,15:1. En otra realización, la relación es 0,2:1. En otra realización, la relación es 0,3:1. En otra realización, la relación es 0,4:1. En otra realización, la relación es 0,5:1. En otra realización, la relación es 0,6:1. En otra realización, la relación es 0,7:1. En otra realización, la relación es 0,8:1. En otra realización, la relación es 0,9:1. En otra realización, la relación es 1:1. En otra realización, el DHA y el EPA se incluyen en una de las relaciones anteriores (DHA:EPA).
50 En otra realización, el DHA y el EPA se incluyen en una de las relaciones anteriores (EPA:DHA).

En otra realización, la sal de colina es una sal sulfonato; por ejemplo, una sal sulfonato con cadena de alquilo larga. En otra realización, la sal de colina es cloruro de colina, bitartrato de colina, tartrato de colina, un complejo de hierro-citrato de colina o cualquier otra sal de colina conocida en la técnica.

- 5 En otra realización, las composiciones y los métodos de la presente invención ejercen sus efectos incluso en sujetos que no tienen deficiencia de ácidos grasos omega-3 o ácidos grasos omega-6. En otra realización, se utiliza una dosis farmacológica de DHA en las composiciones y los métodos de la presente invención. En otra realización, se utiliza una dosis terapéutica. En otra realización, las dosis farmacológicas son mayores que las que normalmente se ingerirían en una dieta rica en PUFA. En otra realización, los niveles de membrana de un sujeto que no tiene una deficiencia de PUFA se incrementan por administración de dosis farmacológicas de DHA y uridina. En otra realización, los resultados de la presente invención demuestran que el DHA ejerce un efecto bioquímico en el cerebro, apoyando así el uso de dosis farmacológicas de DHA.
- 10 La dosificación del ácido graso omega-3, DHA, incluido en las composiciones para uso en los métodos de la presente invención está, en otra realización, en el intervalo de aproximadamente 400-2000 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 500-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 600-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 800-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1000-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1200-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1500-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 400-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 500-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 600-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 800-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1000-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1200-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1500-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 2000-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 400-4000 mg/día. En otra realización, la dosificación está en el intervalo de aproximadamente 500-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 600-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 800-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1000-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1200-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1500-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 2000-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 3000-4000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 400-1000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 500-1000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 600-1000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 800-100 mg/día.
- 20 En otra realización, la dosificación de DHA es al menos 400 mg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 500 mg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 600 mg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 700 mg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 800 mg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 900 mg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 1 g/día. En otra realización, la dosificación es al menos 1200 mg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 1,5 g/día. En otra realización, la dosificación es al menos 2 g/día.
- 25 En otra realización, la dosificación de DHA es 5-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 2-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 7-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 15-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 20-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 30-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 5-30 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 7-30 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 10-30 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 15-30 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 5 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 7 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 10 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 15 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 20 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 30 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 40 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 5 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 8 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 10 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 15 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 20 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 30 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 40 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es al menos 70 mg/kg/día. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un recién nacido. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un bebé. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un bebé mayor. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.
- 30 En otra realización, las mujeres gestantes reciben una dosificación particular para satisfacer sus necesidades. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 200-2000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 400-1700 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 600-1500 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 800-1300 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 200-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 400-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 600-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 800-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 1000-3000 mg/día. En otra realización, el intervalo es aproximadamente 2000-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación para las mujeres gestantes es aproximadamente 1000 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1500 mg/día. En otra

realización, la dosificación es aproximadamente 2000 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 3000 mg/día.

En otra realización, a los sujetos con niveles elevados de colesterol se les administra una dosificación particular para satisfacer sus necesidades. En otra realización, la dosificación para los sujetos con niveles elevados de colesterol está en el intervalo de aproximadamente 200-4000 mg/día. En otra realización, la dosificación para los sujetos con niveles elevados de colesterol está en el intervalo de aproximadamente 400-3500 mg/día. En otra realización, la dosificación para los sujetos con niveles elevados de colesterol está en el intervalo de aproximadamente 600-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación para los sujetos con niveles elevados de colesterol está en el intervalo de aproximadamente 1000-2500 mg/día. En otra realización, la dosificación para los sujetos con niveles elevados de colesterol está en el intervalo de aproximadamente 1500-2300 mg/día. En otra realización, la dosificación para los sujetos con niveles elevados de colesterol es aproximadamente 2000 mg/día.

En las composiciones para uso en la presente invención, el DHA se incluye en una de las dosis anteriores. En otra realización, la dosificación de DHA es 1-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación de DHA es 400-1000 mg/día. En otra realización, el EPA se incluye, además, en una de las dosis anteriores. En otra realización, la dosificación de EPA es 1-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación de EPA es 400-1000 mg/día. Cada dosificación representa una realización separada de la presente invención.

La dosificación de ácido graso omega-6 opcionalmente incluida en las composiciones para uso en la presente invención es, en otras realizaciones, cualquiera de las dosificaciones mencionadas anteriormente para los ácidos grasos omega-3. En otra realización, el ácido araquidónico está incluido en una de las dosis anteriores. En otra realización, la dosificación de ácido araquidónico es 1-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación de ácido araquidónico es 400-1000 mg/día. Cada dosificación representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, el ácido icosaheanoico (EPA) se administra junto con, o además de, DHA. En otra realización, el EPA se añade en una dosificación de aproximadamente 200 mg/día. En otra realización, la dosificación es 100-300 mg/día. En otra realización, el intervalo es 150-250 mg/día. En otra realización, el intervalo es 170-230 mg/día. En otra realización, el intervalo es 100-1000 mg/día. En otra realización, el intervalo es 150-800 mg/día. En otra realización, el intervalo es 200-600 mg/día. En otra realización, el intervalo es 300-500 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 300 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 400 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 500 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 600 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 800 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1000 mg/día.

En otra realización, la dosificación de EPA es 1-12 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 1,5-12 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 2-12 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 3-12 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 4-12 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 5-12 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 6-12 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 8-12 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 1-8 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 1,5-8 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 3-8 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 4-8 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1,5 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 2 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 4 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 8 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 10 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 12 mg/kg/día. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un recién nacido. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un bebé. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un bebé mayor. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

En otra realización, a las mujeres gestantes se les administra una mayor dosis de EPA. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1200 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1500 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1800 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 2000 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 2500 mg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 3000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 500-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 800-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 1000-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 1500-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 2000-3000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 500-2000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 800-2000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 1000-2000 mg/día. En otra realización, la dosificación es 1500-2000 mg/día.

La dosis de uridina incluida en las composiciones para uso en la presente invención está, en otra realización, entre 10-500 mg/día (inclusive). En otra realización, la dosis es 20-500 mg/día. En otra realización, la dosis es 30-500 mg/día. En otra realización, la dosis es 50-500 mg/día. En otra realización, la dosis es 100-500 mg/día. En otra realización, la dosis es 150-500 mg/día. En otra realización, la dosis es 200-500 mg/día. En otra realización, la dosis es 300-500 mg/día. En otra realización, la dosis de uridina está entre 10-400 mg/día. En otra realización, la dosis es

20-400 mg/día. En otra realización, la dosis es 30-400 mg/día. En otra realización, la dosis es 50-400 mg/día. En otra realización, la dosis es 100-400 mg/día. En otra realización, la dosis es 150-400 mg/día. En otra realización, la dosis es 200-400 mg/día. En otra realización, la dosis de uridina está entre 10-300 mg/día. En otra realización, la dosis es 20-300 mg/día. En otra realización, la dosis es 30-300 mg/día. En otra realización, la dosis es 50-300 mg/día. En otra realización, la dosis es 100-300 mg/día. En otra realización, la dosis es 150-300 mg/día. En otra realización, la dosis es 200-300 mg/día. En otra realización, la dosis es aproximadamente 50 mg/día. En otra realización, la dosis es aproximadamente 70 mg/día. En otra realización, la dosis es aproximadamente 100 mg/día. En otra realización, la dosis es aproximadamente 150 mg/día. En otra realización, la dosis es aproximadamente 200 mg/día. En otra realización, la dosis es aproximadamente 300 mg/día. En otra realización, la dosis es aproximadamente 400 mg/día. En otra realización, la dosis es aproximadamente 500 mg/día.

En otra realización, la dosificación de uridina es 0,1-6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,2-6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,3-6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,5-6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 1-6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 1,5-6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 2-6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 3-6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,1-3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,15-3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,2-3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,3-3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,5-3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 0,8-3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 1-3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 0,1 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 0,15 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 0,2 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 0,3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 0,4 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 0,6 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 0,8 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1,5 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 2 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 4 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 6 mg/kg/día. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un recién nacido. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un bebé. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un bebé mayor. Cada posibilidad representa una realización separada de la presente invención.

La dosis de colina incluida en las composiciones para uso en la presente invención, está, en otra realización, entre 100 mg-10 g/día (inclusive). En otra realización, la dosis es 1 g-3 g. En otra realización, la dosis es 150 mg-8 g. En otra realización, la dosis es 200 mg-6 g. En otra realización, la dosis es 300 mg-5 g. En otra realización, la dosis es 400 mg-4,5 g. En otra realización, la dosis es 500 mg-4 g. En otra realización, la dosis es 600 mg-4 g. En otra realización, la dosis es 800 mg-3,5 g. En otra realización, la dosis es 1,2 g-3 g. En otra realización, la dosis es 1,5 g-2,5 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 0,5 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 0,7 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 1 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 1,2 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 1,5 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 2 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 2,5 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 3 g. En otra realización, la dosis es aproximadamente 4 g.

En otra realización, la dosificación de colina es 1-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 2-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 3-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 5-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 8-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 10-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 20-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 30-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 50-100 mg/kg/día. En otra realización, la dosis es 1-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 1,5-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 2-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 3-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 5-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 8-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es 10-50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 1,5 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 2 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 3 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 5 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 7 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 10 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 15 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 20 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 30 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 40 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 50 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 60 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 80 mg/kg/día. En otra realización, la dosificación es aproximadamente 100 mg/kg/día. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un recién nacido. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un bebé. En otra realización, una de las dosis anteriores se administra a un bebé mayor.

Cada una de las dosis anteriores es la cantidad de equivalentes de colina; por tanto, las dosis reales de un compuesto de colina (por ejemplo, cloruro de colina o tartrato de colina) serán correspondientemente mayores.

En otra realización, una composición de la presente invención se debe administrar crónicamente. "Crónicamente" se

refiere, en otra realización, a la administración durante al menos 1 semana. En otra realización, el término se refiere a la administración durante al menos 2 semanas. En otra realización, el período de tiempo es al menos 10 días, o al menos 3 semanas, al menos 4 semanas, al menos 5 semanas, al menos 6 semanas, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 6 meses, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 5 años, o el período de tiempo es al menos 10 años.

En otra realización, la composición de la presente invención se administra durante uno de los períodos de tiempo anteriores.

El término "poner en contacto", en otra realización, se refiere a administrar directamente al sujeto o célula cerebral una composición de la presente invención. En otra realización, el término "poner en contacto" se refiere a administrar indirectamente al sujeto o célula cerebral una composición de la presente invención. Por tanto, en otra realización, el sujeto se puede poner en contacto con un compuesto o composición que se metaboliza en un ácido graso omega-3 u omega-6 en el líquido cefalorraquídeo, el torrente sanguíneo, etc., después de lo cual el ácido graso omega-3 u omega-6 se pone en contacto con la célula cerebral por difusión o cualquier otro proceso de transporte activo o de transporte pasivo conocido en la técnica, por lo que los compuestos circulan dentro del cuerpo. En otra realización, el compuesto es metabolizado por las células diana en un ácido graso omega-3 u omega-6.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar la ramificación de los axones de una célula neural o célula cerebral de un sujeto, aumentando la síntesis de un fosfolípido por la célula neural, aumentando con ello su ramificación de axones.

Las composiciones y los métodos descritos en la presente memoria son capaces de aumentar la proliferación de axones de una célula neural o célula cerebral de un sujeto, aumentando la síntesis de un fosfolípido por la célula neural, aumentando de este modo su proliferación de axones.

El término "composición farmacéutica" se refiere, en otra realización, a un suplemento dietético. En otra realización, el término se refiere a una fórmula infantil. En otra realización, el término se refiere a un alimento procesado para bebés. En otra realización, el término se refiere a un suplemento nutricional. En otra realización, el término se refiere a un producto alimenticio de cualquier tipo que haya sido enriquecido con el ácido graso omega-3, DHA, la uridina y la colina o sal de colina.

"Producto alimenticio" se refiere, en otra realización, a un alimento sólido. En otra realización, el término se refiere a una bebida. En otra realización, el término se refiere a una mezcla en polvo para una bebida. En otra realización, el término se refiere a una preparación basada en un alimento, un alimento funcional, un suplemento dietético o nutracéutico.

En otra realización, un producto alimenticio puede presentarse de varias maneras, incluso en forma líquida, en suspensión, en polvo, en forma semisólida y sólida. Por forma semisólida deben entenderse natillas, pudines, cremas espesas, espumas, postres helados, yogures y gelatinas edulcoradas. Sin limitarse a realizaciones particulares, la forma sólida se puede preparar como una barra, similar a una barra energética, una viruta, una galleta, una galleta salada, pasta o un material hinchado, por ejemplo, palomitas de maíz o un producto alimenticio parecido a una galleta de arroz. Algunas realizaciones requieren que el individuo disuelva, ponga en suspensión o rehidrate el producto alimenticio para aperitivo.

En otra realización, la presente invención se refiere al uso del DHA y/o de su isómero óptico, de una sal farmacéuticamente aceptable, un producto farmacéutico, hidrato, N-óxido o una de sus combinaciones. Por tanto, en otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden un isómero óptico del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden una sal farmacéuticamente aceptable del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden un producto farmacéutico del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden un hidrato del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden un N-óxido del DHA. En otra realización, las composiciones de la presente invención comprenden cualquiera de una combinación de isómero óptico, sal farmacéuticamente aceptable, producto farmacéutico, hidrato o N-óxido del DHA.

La presente invención incluye, asimismo, en otra realización, derivados de DHA. El término "derivados" incluye, aunque sin limitación, derivados de éter, derivados de ácido, derivados de amida, derivados de éster y similares. Además, la presente invención incluye, asimismo, hidratos del DHA. El término "hidrato" incluye, aunque sin limitación, hemihidrato, monohidrato, dihidrato, trihidrato y similares.

La presente invención incluye, asimismo, productos farmacéuticos de los compuestos de DHA. La frase "producto farmacéutico" se refiere a una composición adecuada para uso farmacéutico (composición farmacéutica), según se define en la presente memoria.

Además, la invención abarca isómeros (Z) y (E) puros del DHA y sus mezclas, así como también parejas de enantiómeros (RR, SS) y (RS, SR) puras y sus mezclas.

Composiciones farmacéuticas y vías de administración

- 5 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para ser administradas a un sujeto por cualquier método conocido por los expertos en la técnica, tales como, por las vías parenteral, paracancer, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, subcutánea, intraperitoneal, intraventricular, intracraneal, intravaginal o intratumoral.
- 10 En otra realización de las composiciones de la presente invención, las composiciones farmacéuticas se han de administrar por vía oral y por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir, como un sólido o una preparación líquida. Las formulaciones orales sólidas adecuadas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, pelets y similares. Las formulaciones orales líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se han de administrar por vía intravenosa y en consecuencia, se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se han de administrar por vía intraarterial y de este modo, se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se han de administrar por vía intramuscular y por tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.
- 15 En otra realización, las composiciones farmacéuticas se formulan para ser administradas por inyección intravenosa, intraarterial o intramuscular de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas adecuadas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se han de administrar por vía intravenosa y en consecuencia, se formulan en una forma adecuada para la administración intravenosa. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se han de administrar por vía intraarterial y de este modo, se formulan en una forma adecuada para la administración intraarterial. En otra realización, las composiciones farmacéuticas se han de administrar por vía intramuscular y por tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración intramuscular.
- 20 En otra realización, las composiciones farmacéuticas se han de administrar tópicamente a las superficies del cuerpo y por tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración tópica. Las formulaciones tópicas adecuadas incluyen, en otra realización, geles, pomadas, cremas, lociones, gotas y similares.
- 25 En otra realización, la composición farmacéutica se formula para ser administradas como un supositorio, por ejemplo, un supositorio rectal o un supositorio uretral. En otra realización, la composición farmacéutica se administra por implantación subcutánea de un pelet. En otra realización, el pelet proporciona la liberación controlada de DHA y/o uridina durante un período de tiempo.
- En otra realización, el compuesto activo se suministra en una vesícula, por ejemplo, un liposoma.
- 30 En otras realizaciones, los vehículos o diluyentes usados en las composiciones de la presente invención incluyen, aunque sin limitación, una goma, un almidón (por ejemplo, almidón de maíz, almidón pregelatinizado), un azúcar (por ejemplo, lactosa, manitol, sacarosa, dextrosa), un material celulósico (por ejemplo, celulosa microcristalina), un acrilato (por ejemplo, poli(acrilato de metilo)), carbonato de calcio, óxido de magnesio, talco o sus mezclas.
- 35 En otras realizaciones, los vehículos farmacéuticamente aceptables para formulaciones líquidas son soluciones, suspensiones, emulsiones acuosas o no acuosas o aceites. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol y ésteres orgánicos inyectables, tal como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, que incluyen solución salina y medios tamponados. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, aceite de otros animales marinos o un lípido de leche o huevos.
- 40 En otra realización, los vehículos parenterales (para inyección subcutánea, intravenosa, intraarterial o intramuscular) incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites fijos y de Ringer con lactato. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y de nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Los ejemplos son líquidos estériles, tales como agua y aceites, con o sin la adición de un tensioactivo y otros adyuvantes farmacéuticamente aceptables. En general, los vehículos líquidos preferidos son agua, solución salina, dextrosa acuosa y soluciones de azúcares relacionadas y glicoles, tales como propilenglicoles o polietilenglicoles, en particular para soluciones inyectables. Los ejemplos de aceites son los de origen animal, vegetal o sintético, por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de oliva, aceite de girasol, aceite de hígado de pescado, aceite de otros animales marinos o un lípido de leche o huevos.
- 45 En otras realizaciones, las composiciones comprenden además aglutinantes (por ejemplo goma arábiga, almidón de maíz, gelatina, carbómero, etilcelulosa, goma guar, hidroxipropil-celulosa, hidroxipropil-metilcelulosa, povidona), agentes disgregantes (por ejemplo, almidón de maíz, almidón de patata, ácido algínico, dióxido de silicio, croscarmelosa sódica, crospovidona, goma guar, almidón-glicolato de sodio), tampones (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato) de diversos pH y fuerza iónica, aditivos, tales como albúmina o gelatina para evitar la absorción en las superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácidos biliares), inhibidores de proteasa, tensioactivos (por ejemplo, laurilsulfato de sodio), potenciadores de la permeación, agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicerol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio, hidroxianisol butilado), estabilizadores (por ejemplo, hidroxipropil-celulosa, hidroxipropil-metil-celulosa),
- 50
- 55

5 agentes para aumentar la viscosidad (por ejemplo, carbómero, dióxido de silicio coloidal, etilcelulosa, goma guar), edulcorantes (por ejemplo, aspartamo, ácido cítrico), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), lubricantes (por ejemplo, ácido esteárico, estearato de magnesio, polietilenglicol, laurilsulfato de sodio), auxiliares de la fluidez (por ejemplo, dióxido de silicio coloidal), plastificantes (por ejemplo, ftalato dietílico, citrato de trietilo), emulsionantes (por ejemplo, carbómero, hidroxipropil-celulosa, laurilsulfato de sodio), recubrimientos de polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas), agentes de recubrimiento y formadores de película (por ejemplo, etilcelulosa, acrilatos, polimetacrilatos) y/o adyuvantes. Cada uno de los excipientes anteriores representa una realización separada de la presente invención.

10 En otra realización, las composiciones farmacéuticas provistas en la presente memoria son composiciones de liberación controlada, es decir, composiciones en las que el DHA y/o la uridina se liberan durante un cierto período de tiempo después de su administración. Las composiciones de liberación controlada o prolongada incluyen la formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). En otra realización, la composición es una composición de liberación inmediata, es decir, una composición en la que todo el PUFA y/o la uridina se liberan inmediatamente después de su administración.

15 En otra realización, la composición farmacéutica se formula para ser suministrada en un sistema de liberación controlada. Por ejemplo, el agente se puede administrar usando una infusión intravenosa, una bomba osmótica implantable, un parche transdérmico, liposomas u otros modos de administración. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14:201 (1987); Buchwald et al., *Surgery* 88:507 (1980); Saudek et al., *N. Engl. J. Med.* 321:574 (1989)). En otra realización, se emplean materiales poliméricos; por ejemplo, en microesferas en un implante. Todavía en otra realización más, se coloca un sistema de liberación controlada cerca del objetivo terapéutico, por ejemplo, el cerebro, requiriendo solo una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release, supra*, vol. 2, pp. 115-138 (1984); y Langer R, *Science* 249: 1527-1533 (1990)).

25 Las composiciones también incluyen, en otra realización, la incorporación del material activo en o sobre preparaciones en partículas de compuestos poliméricos, tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), hidrogeles, etc. o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, rastros de eritrocitos o esferoplastos). Tales composiciones influirán en el estado físico, la solubilidad, la estabilidad, la velocidad de liberación *in vivo* y la velocidad de eliminación *in vivo*.

30 En la presente invención también se incluyen las composiciones en partículas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas) y el compuesto acoplado a anticuerpos dirigidos contra receptores específicos de tejidos, ligandos o antígenos o acoplados a ligandos receptores específicos de tejidos.

35 También están abarcados por la invención los compuestos modificados por la unión covalente de polímeros hidrosolubles, tales como polietilenglicol, copolímeros de polietilenglicol y polipropilenglicol, carboximetil-celulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona o poliprolina. Se sabe que los compuestos modificados exhiben semividas sustancialmente más prolongadas en sangre después de una inyección intravenosa que los correspondientes compuestos sin modificar (Abuchowski et al., 1981; Newmark et al., 1982; and Katre et al., 1987). Estas modificaciones también pueden aumentar la solubilidad del compuesto en solución acuosa, eliminar la agregación, potenciar la estabilidad física y química del compuesto y reducir en gran medida la inmunogenicidad y reactividad del compuesto. Como resultado de ello, puede lograrse la actividad biológica *in vivo* por administración de dichos aductos de polímero-compuesto con menor frecuencia o en menores dosis que con el compuesto sin modificar.

45 La preparación de las composiciones farmacéuticas que contienen un componente activo, por ejemplo por procesos de mezclado, granulación o formación de comprimidos, es muy conocida en la técnica. El principio activo terapéutico se mezcla frecuentemente con excipientes que son farmacéuticamente aceptables y compatibles con el principio activo. Para la administración oral, el PUFA y/o la uridina o sus derivados fisiológicamente tolerados, tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares, se mezclan con aditivos habituales para este fin, tales como vehículos, estabilizadores o diluyentes inertes, y se convierten por métodos habituales en formas adecuadas para su administración, tales como comprimidos, comprimidos recubiertos, cápsulas de gelatina duras o blandas, soluciones acuosas, alcohólicas u oleosas. Para la administración parenteral, el PUFA y/o la uridina o sus derivados fisiológicamente tolerados, tales como sales, ésteres, N-óxidos y similares se convierten en una solución, suspensión o emulsión, si se desea con las sustancias habituales y adecuadas para este propósito, por ejemplo, solubilizantes u otras sustancias.

55 Un componente activo, en otra realización, se formula en la composición como formas de sales farmacéuticamente aceptables neutralizadas. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácidos (formados con los grupos amino libres de la molécula de polipéptido o anticuerpo), que se forman con ácidos inorgánicos tales como, por ejemplo, ácidos clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. Las sales formadas a partir de los grupos carboxilo libre también pueden obtenerse a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxidos de sodio, potasio, amonio, calcio o férrico, y bases orgánicas, tales como isopropilamina, trimetilamina, 2-etilamino-etanol, histidina, procaína y similares.

Sección experimental detallada

Ejemplo 1

El tratamiento de las células PC-12 con ácidos grasos omega-3 aumenta la síntesis de fosfolípidos.

Materiales y métodos experimentales

5 *Reactivos*

El cloruro de colina marcado con ^{14}C se obtuvo de Perkin-Elmer (Boston, MA). El DHA, el ácido oleico o el ácido palmítico se obtuvieron de Biomol, (Plymouth Meeting, PA). La ^{14}C -colina se obtuvo de Amersham Biosciences Corp (Piscataway, NJ).

Cultivo celular

10 Las células PC-12 se mantuvieron en medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, *Dulbecco's modified Eagle's medium*) + suero bovino fetal al 10% (FBS, *fetal bovine serum*). Para los experimentos, las células se cultivaron por quintuplicado en placas de 35 milímetros (mm) recubiertas con colágeno. Las células se incubaron durante 18 horas (h) en DMEM exento de suero, que contenía colina 28 μM +/- DHA 5 μM , ácido oleico o ácido palmítico. Luego las células se marcaron durante 2,5 h con 0,5 microcurie (μCi)/ml de ^{14}C -colina en DMEM exento de suero que contenía colina 10 μM .

Cuantificación de los fosfolípidos marcados

Las células se homogenizaron en 100 volúmenes de agua desionizada enfriada con hielo, usando un degradador de tejido (Politron PT 10-35, Kinematica AG, Suiza); partes alícuotas de 1 mL se mezclaron luego con 3 mL de una mezcla de cloroformo + metanol (2:1 v/v) y se centrifugaron vigorosamente con vórtice durante 30 segundos. Tras enfriar durante 1 h sobre hielo, la mezcla se mezcló secuencialmente con 3 mL de una mezcla de cloroformo + metanol (2:1 v/v) y 1 mL de agua desionizada enfriada con hielo. La mezcla se agitó vigorosamente con vórtice y se dejó reposar durante una noche en un recinto frío (18 h). La fase orgánica (inferior) y la fase acuosa (superior) de las mezclas se separaron por centrifugación (10 minutos a 4°C; 1000 g). Se usó una parte alícuota (2 mL) de la fase superior para la determinación de CDP-colina (véase más adelante) y partes alícuotas de 0,1-0,4 mL de la fase inferior se secaron a vacío para análisis de los fosfolípidos. Los residuos de las partes alícuotas de 0,1 mL de la fase inferior se sometieron a análisis para determinar el contenido total de fosfolípidos midiendo el fósforo. Los residuos de las partes alícuotas de 0,4 mL de la fase inferior se reconstituyeron en 40 μL de metanol y se sometieron a cromatografía en capa fina usando placas de sílice G (Adsorbosil Plus-1®, Alltech), y un sistema que consistía en cloroformo/etanol/trietilamina/agua (30:34:30:8) como fase móvil. Se usaron patrones de fosfolípidos para identificar las bandas correspondientes bajo luz UV después de que las placas se rociaran con difenil-hexatrieno al 0,1% en éter de petróleo. Las bandas para las clases de fosfolípidos individuales (PC, PE, SM, PS y PI) se rasparon para separarlas de las placas y se extrajeron en 1 mL de metanol; se secaron a vacío y se analizaron para determinar el contenido de fósforo. El fósforo total se determinó por comparación con las curvas patrón, usando un experimento con KH_2PO_4 en cada ensayo. A cada muestra se le añadieron 0,5 mL de HClO_4 al 4,5%/ H_2SO_4 al 27% y los tubos se calentaron a 180°C durante 3 h. Después de enfriar hasta la temperatura ambiente, se añadieron 5 mL del reactivo de color (una dilución 10:1 de soluciones que contenían 2,5 mg/mL de molibdato de amonio, 8,2 mg/mL de acetato de sodio y 100 mg/mL de ácido ascórbico, respectivamente), y los tubos se incubaron durante 2 horas, a 37°C. La absorbancia se midió por espectrofotometría a 820 nm. La masa de fosfolípidos se determinó multiplicando el contenido de fósforo por 25.

40 *Análisis estadístico*

Los datos se analizaron por ANOVA (análisis de varianza) unidireccional y luego por la prueba t de Student.

Resultados

Para evaluar el efecto de los ácidos grasos omega-3 sobre la síntesis de los fosfolípidos, las células PC-12 se incubaron con colina marcada con ^{14}C , después de una preincubación de 18 horas con o sin DHA. Después se midió la incorporación del marcador en los fosfolípidos. Se usaron ácido oleico y ácido palmítico, que no son ácidos grasos omega-3, como controles negativos. La síntesis de fosfatidilcolina (PC) aumentó significativamente por la preincubación con DHA, pero no con el ácido oleico ni con el ácido palmítico, tal como se evidenció por el aumento de la incorporación del marcador en PC (Figura 1). Por tanto, el tratamiento con ácidos grasos omega-3 aumenta la síntesis celular de fosfolípidos.

50 **Ejemplo 2**

Los ácidos grasos omega-3 aumentan la síntesis de un número de fosfolípidos de un modo dependiente de la dosis

Para caracterizar aún más la estimulación de síntesis de fosfolípidos por los ácidos grasos omega-3, las células PC-12 se trataron previamente con diferentes dosis de DHA y se expusieron a colina marcada, tal como se describe en

el ejemplo 1, y luego se midió la incorporación del marcador ¹⁴C en los fosfolípidos. El tratamiento previo con DHA aumentó la síntesis de fosfolípidos (Figura 2). El aumento de la síntesis dependía de la dosis. Así, los ácidos grasos omega-3 estimulan la síntesis de los fosfolípidos de un modo dependiente de la dosis.

Ejemplo comparativo 3

5 El tratamiento de las células SHSY-5Y con ácidos grasos omega-6 aumenta la síntesis de fosfolípidos

Materiales y métodos experimentales

Cultivo celular

10 Las células SHSY-5Y se cultivaron hasta casi la confluencia en DMEM + FBS al 10% en placas de 35 mm. Las células se incubaron durante 18 h en DMEM exento de suero + FBS al 1% que contenía colina 30 μM +/- DHA 10 μM, ácido araquidónico o ácido palmítico. Luego las células se marcaron y los fosfolípidos marcados se cuantificaron como se describe en el ejemplo 1.

Preparación del complejo DHA-BSA

15 El DHA se disolvió en etanol a una concentración 100 micromolar y se congeló en partes alícuotas de 10 microlitros a -80°C. Para cada experimento, se diluyó una parte alícuota en etanol hasta 10 micromolar; el volumen con el que se obtenía la solución final deseada en el medio de incubación se mezcló con un volumen igual de solución de BSA (1 mg/mL).

Resultados

20 El efecto de los ácidos grasos omega-6 sobre la síntesis de fosfolípidos se examinó luego en células SHSY-5Y, sobre una línea celular de neuroblastoma humano. En este caso, la síntesis de fosfolípidos fue potenciada por el ácido araquidónico, un ácido graso omega-6, pero no así por el DHA o el ácido palmítico (Figura 3A).

Ejemplo comparativo 4

Los ácidos grasos omega-6 aumentan la síntesis de un número de fosfolípidos de un modo dependiente de la dosis.

25 El efecto del ácido araquidónico sobre la síntesis de fosfolípidos en células SHSY-5Y se caracterizó adicionalmente, tal como se describe para los ácidos grasos omega-3 y las células PC-12 en el ejemplo 2. El ácido araquidónico aumentó la síntesis de los fosfolípidos totales, de la PC y de la fosfatidiletanolamina en un intervalo de dosificaciones de un modo dependiente de la dosis, tal como se observa por el DHA (Figura 3B). Por tanto, los ácidos grasos omega-6 estimulan la síntesis de una variedad de fosfolípidos de un modo dependiente de la dosis.

Ejemplo 5

30 La administración de PUFA aumenta los niveles de fosfolípidos en el cerebro y la adición de uridina da como resultado un aumento sinérgico adicional.

Materiales y métodos experimentales

Dietas

35 La dieta de control estándar (Tabla 4) consistía en una dieta Teklad Global para roedores con un contenido proteínico del 16% (Harlan Teklad, Madison, WI), que contenía cloruro de colina (CC) al 0,1% correspondiente a una dosis diaria de 50 mg/kg/día. Se proveyó el UMP como UMP al 0,5% · 2Na⁺ peso/peso y se añadió a la dieta de control, también preparada por Harlan Teklad, correspondiente a 240 mg/kg/día de UMP. El DHA se administró como 300 mg/kg/día en 200 microlitros (μL)/día de solución de goma arábiga al 5%, mientras que a los grupos que no recibían DHA se les administró el vehículo solo (goma arábiga al 5%). El DHA fue proporcionado por Nu-Chek Prep (Elysian, MN) y el UMP por Numico (Wagenigen, NL). Ninguno de los grupos presentó cambios significativos en el peso corporal durante el curso del experimento.

Tabla 4. Dieta estándar de control.

Análisis aproximado (%)	
Proteína	16,7%
Carbohidrato	60,9%
Aceite, fibra, ceniza	13,7%
Colina	0,1%

Ácidos grasos (g/kg)	
Saturados	7,34
Insaturados	
Ácido oleico C18:1n-9	8,96
Ácido linoleico C18:2n-6	23,12
Ácido linolénico C18:3n-3	1,53

Extracción de cerebros

5 Se anestesiaron jerbos con ketamina y xilazina (80 y 10 mg/kg de peso, i.p.) y se sacrificaron por inmersión de la cabeza en nitrógeno líquido durante 2 minutos, a lo cual siguió la decapitación. Los cerebros se extrajeron inmediata y rápidamente (30 segundos), usando un trepanador de huesos y se conservaron a -80°C.

Mediciones de los fosfolípidos en el cerebro

Se pesaron hemisferios de cerebros congelados y se homogenizaron en 100 volúmenes de agua desionizada enfriada con hielo, usando un degradador de tejidos (Politron PT 10-35, Kinematica AG, Suiza); y luego se analizaron tal como se describe en el ejemplo 1.

10 Ensayos de DNA y proteínas

Se midió la proteína en la muestra de homogeneizado de cerebro entero usando reactivo de ácido bicinconínico (Perkin Elmer, Norwalk, CT, EE. UU.). El DNA se calculó midiendo la emisión a 460 nm de las muestras en un fluorímetro, en presencia de bisbencimidazol, un colorante fluorescente conocido como Hoechst H 33258 (American Hoechst Corporation), que tiene un máximo de excitación a 356 nm y un máximo de emisión de 458 cuando está unido al DNA.

Resultados

Jerbos machos que pesaban 80-100 g se dividieron en 4 grupos de 8 jerbos y se les administraron los suplementos que se describen en la Tabla 1:

Tabla 1. Grupos de tratamiento.

Grupo	Suplemento	Cantidad/método
1	Dieta de control + vehículo (goma arábica al 5%)	
2	UMP de sodio + vehículo (goma arábica al 5%)	Na-UMP al 0,5% de comida.
3	DHA	300 mg/kg diarios, por sonda nasogástrica
4	DHA + UMP de sodio	Como se indica anteriormente

20 Después de 4 semanas, los animales se sacrificaron y se analizó un hemisferio del cerebro, menos el cerebelo y el tronco encefálico, para determinar los fosfolípidos totales y el contenido de PC, fosfatidiletanolamina (PE) esfingomielina (SM), fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilserina (PS). Los ácidos grasos omega-3 (DHA) aumentaron los niveles de fosfolípidos totales a valores significativamente superiores a los observados en el grupo de control (Figura 4 y Tablas 2 y 3). La combinación de DHA con UMP dio como resultado un aumento adicional (26%) que era sinérgico (o sea, mayor que la suma de los aumentos observados en los grupos con DHA (12%) y UMP (5%)). Se observaron resultados similares con cada uno de los fosfolípidos individuales (Tablas 2 y 3). Se observó significación estadística si los valores de los fosfolípidos estaban normalizados a las cantidades de proteína (Figura 4A y Tabla 2) o al DNA (Figura 4B y Tabla 3).

30

Tabla 2. Efectos del tratamiento con DHA, UMP o con ambos sobre los niveles de fosfolípidos en el cerebro, normalizados a los niveles de proteínas. Los datos se presentan como la media +/- error estándar de la media (SEM). El análisis estadístico utilizó ANOVA bidireccional y el ensayo de Tukey.

Tratamiento/lípido	PL totales	PC	PE	SM	PS	PI
Control	351 ± 8	152 ± 6	64 ± 4	45 ± 2	33 ± 3	21 ± 2
UMP	367 ± 22	171 ± 8*	84 ± 8*	52 ± 5	35 ± 3	31 ± 2**
DHA	392 ± 20	185 ± 12*	78 ± 5*	56 ± 3*	39 ± 3	32 ± 2**
UMP + DHA	442 ± 24***	220 ± 12***	113 ± 6***	73 ± 4***	46 ± 6***	36 ± 6***

*** indica p<0,05;
 **** - p<0,01; con relación al grupo de control
 ***** - p< 0,001

5 Tabla 3. Efectos del tratamiento con DHA, UMP o con ambos sobre los niveles fosfolípidos en el cerebro, normalizados a los niveles de DNA. El análisis estadístico/la presentación de datos son como en la Tabla 2.

Tratamiento/lípido	PL totales	PC	PE	SM	PS	PI
Control	885 ± 45	332 ± 12	176 ± 13	112 ± 5	79 ± 8	54 ± 5
UMP	878 ± 18	368 ± 10*	195 ± 9	111 ± 4	86 ± 7	78 ± 6**
DHA	909 ± 77	366 ± 13*	196 ± 18	126 ± 8	98 ± 7	84 ± 13**
UMP + DHA	1058 ± 25***	462 ± 26***	261 ± 30***	169 ± 11 ***	110 ± 5***	85 ± 10***

10 Estos hallazgos confirman los resultados de los ejemplos anteriores, que muestran que tanto los ácidos grasos omega-3 como los ácidos omega-6 aumentan la síntesis de fosfolípidos en el cerebro y los niveles de fosfolípidos en el cerebro, tanto los niveles totales como los de los fosfolípidos individuales. Estos hallazgos muestran además que la combinación de PUFA con uridina da como resultado aumentos sinérgicos adicionales. Además, estos hallazgos muestran que la estimulación de la síntesis de los fosfolípidos por los PUFA es un fenómeno general, no restringido a un fosfolípido particular o modelo experimental.

15 Los aumentos proporcionales en los 4 fosfolípidos estructurales que comprenden la masa de las membranas celulares en el cerebro (los 4 fosfátidos: PC, PE, PS y esfingomielina) fueron aproximadamente iguales, habiendo aumentado los niveles de cada uno de estos cuatro compuestos en aproximadamente 20%. Por tanto, se mantuvieron las proporciones de los 4 fosfolípidos estructurales en las membranas. En consecuencia, la masa de las membranas aumentó sin alterar la estructura y la función normales de las membranas. Estos hallazgos corroboran los datos de los ejemplos anteriores, aportando más evidencias de que las composiciones de la presente invención
 20 mejoran y potencian la función del cerebro.

Ejemplo 6

La administración de ácidos grasos omega-3 a jerbos disminuye los niveles de CDP-colina en el cerebro, al tiempo que aumenta los de los fosfolípidos en el cerebro

Materiales y métodos experimentales

25 Ensayo de CDP-colina

Partes alícuotas (2 mL) de la fase superior (acuosa) se secaron a vacío, se reconstituyeron y se inyectaron en un HPLC. Las muestras secas se reconstituyeron en 100-200 µL de agua y se analizaron por HPLC en una columna de intercambio aniónico (Alltech Hypersil APS-2, 5 mm, 250 X 4,6 mm). Se eluyó CDP-colina con un gradiente lineal de tampones A (H₃PO₄, 1,75 mM, pH 2,9) y B (NaH₂PO₂, 500 mM, pH 4,5) desde 0 a 100% de B durante un período de
 30 30 minutos. Con este sistema, la CDP-colina se resolvió a partir de sustancias de coelución próxima, tales como UMP en un sistema isocrático, durante un periodo de 40 minutos. El tiempo de retención para CDP-colina fue 9,5 minutos. La columna se lavó con tampón B al final de cada experimento y cada varios días para eliminar los nucleótidos retenidos. Los picos de nucleótidos individuales se detectaron por absorción de UV a 280 nm y se identificaron por comparación con las posiciones de patrones auténticos, así como también por la adición de

patrones de nucleótidos a las muestras.

Resultados

5 Para determinar el efecto de la administración de PUFA sobre los niveles de CDP-colina, en los animales del ejemplo anterior se midieron los niveles de CDP-colina en el cerebro. La administración de DHA y/o UMP disminuyó los niveles de CDP-colina (Figura 5A) y los niveles de CDP-etanolamina (Figura 5B). El DHA disminuyó los niveles de CDP-colina en 26% (en comparación con los que recibieron solo la dieta de control y el vehículo de DHA) y en los

10 jerbos tratados con UMP en 21% (en comparación con los que recibieron la dieta que contenía UMP y el vehículo de DHA) (ambos $p < 0,05$). El ANOVA bidireccional reveló un efecto significativo de DHA [$F(1,28) = 31,7$; $p < 0,001$].

En otro estudio, la adición de UMP a la dieta estándar sin tratamiento concurrente con DHA aumentó significativamente los niveles de PC, PE y PI en el cerebro, en 13%, 29% y 48%, respectivamente (Tabla 5A). La administración de DHA sin UMP también aumentó significativamente los niveles de estos fosfátidos en el cerebro, en 22%, 20% y 52%, respectivamente, así como también de esfingomielina (en 24%). UMP + DHA aumentó todos los fosfolípidos en más de la suma de los aumentos producidos por UMP o DHA solos.

15 Luego se examinó el curso temporal de estos aumentos. Después de 1 semana de tratamiento, el UMP no produjo efectos significativos, mientras que la combinación de UMP + DHA causó aumentos pequeños pero significativos en la PC (21%) y la PS (38%) en el cerebro. El tratamiento con UMP + DHA durante 3 semanas causó aumentos significativos (21-48%) en los 5 fosfolípidos; el UMP solo produjo aumentos menores, pero todavía significativos (Tabla 5B).

Tabla 5. Efectos de UMP y/o PUFA sobre los niveles de fosfolípidos en el cerebro.

Tratamientos (grupos)	PL totales (nmol/mg de proteína)	PC (nmol/mg de proteína)	PE (nmol/mg de proteína)	SM (nmol/mg de proteína)	PS (nmol/mg de proteína)	PI (nmol/mg de proteína)
A						
Dieta de control + vehículo	351 ± 8	152 ± 6	65 ± 4	45 ± 2	33 ± 3	21 ± 2
Dieta de UMP + vehículo	367 ± 22	171 ± 8*	84 ± 8*	52 ± 5	35 ± 3	31 ± 2**
Dieta de control + DHA	392 ± 20	185 ± 12*	78 ± 5*	56 ± 3*	39 ± 3	32 ± 2**
Dieta de UMP + DHA	442 ± 24***	220 ± 12***	113 ± 6***	73 ± 4***	46 ± 6***	36 ± 6***
B						
Control + vehículo	403 ± 23	155 ± 8	69 ± 3	47 ± 3	34 ± 1	20 ± 2
Una semana						
UMP + vehículo	390 ± 21	154 ± 6	63 ± 4	49 ± 3	39 ± 1	20 ± 4
UMP + DHA	436 ± 15	188 ± 8*	79 ± 6	57 ± 6	47 ± 1***	23 ± 1
Tres semanas						
UMP + vehículo	479 ± 6**	199 ± 5***	87 ± 4*	70 ± 4*	42 ± 2*	25 ± 1
UMP + DHA	502 ± 12***	217 ± 5***	102 ± 4***	73 ± 5**	41 ± 1*	27 ± 1*

20

Así, en estas condiciones, el efecto de la administración de PUFA en los fosfolípidos en el cerebro es atribuible a un aumento de la conversión de CDP-colina en PC y los fosfátidos relacionados.

Ejemplo 7

La administración de ácidos grasos omega-3 y/o uridina a jerbos aumenta los niveles de proteínas sinápticas

Materiales y métodos experimentales*Análisis de los niveles de proteínas sinápticas*

5 Las proteínas sinápticas se sometieron se analizaron por ensayo de transferencia por ranuras (*Slot-Blot*) y por transferencia de Western. Para la transferencia de Western, las partes alícuotas de los homogeneizados de cerebro se mezclaron con tampón de carga 2X KFL y se hirvieron durante 5 minutos antes de electroforesis en gel. Se cargaron cantidades iguales de proteína y se separaron usando SDS-PAGE (4-20%; Bio-Rad, Hercules, CA, EE. UU.). Luego las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.).
10 Los restantes sitios de unión se bloquearon con leche deshidratada descremada al 4% (Varnation, Glendale, CA, EE. UU.), durante 30 minutos, en solución salina tamponada con Tris-Tween (TBST). Se preparó un tampón de carga 2X KFL combinando lo siguiente: 3,76 mL de TRIS 1M, pH 6,8; 6 mL de dodecilsulfato de sodio al 20%; 6 mL de glicerol; 1,5 mL de mercaptoetanol; 2 mL de azul de bromfenol al 1%; y 10,74 mL de agua.

15 Para el ensayo transferencia por ranuras, dos grupos de partes alícuotas (18-21 μ L; que contenían 20 μ g de proteína) de los homogeneizados de cerebro en agua desionizada se transfirieron directamente sobre membranas de poli(difluoruro de vinilideno) (Immobilon-P, Millipore, Billerica, MA, EE. UU.) por filtración a vacío, usando un aparato de microfiltración para transferencia por ranuras [Minifold® II Slot Blot System (SCR 072/0); Schleicher & Schuell, Inc., Keene, NH, EE. UU.]. Los restantes sitios de unión se bloquearon con leche deshidratada descremada al 4% (Varnation, Glendale, CA, EE. UU.) durante 30 minutos en TBST. Las membranas (de las transferencias por ranuras y las transferencias de Western) se lavaron luego 5 veces en tampón TBST y se sumergieron en una solución de TBST que contenía el anticuerpo de interés (anti-NF-70 de ratón, anti-NF-M de conejo, anti-PSD-95 de ratón y anti-sinapsina-1 de ratón). Después de incubación de una noche y cinco lavados en tampón TBST, las transferencias se incubaron durante 1 h con el anticuerpo secundario unido a peroxidasa apropiado. Las transferencias se lavaron luego cinco veces en tampón TBST y se detectaron los complejos de proteína-anticuerpo y se visualizaron usando el sistema ECL (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, EE. UU.) y una película Kodak X-AR. Las películas se digitalizaron usando un escáner Supervista S-12 con un adaptador para transparencias (UMAX Technologies, Fremont, CA, EE. UU.). Las bandas inmunorreactivas se compararon por densitometría, usando el programa NIH Image de dominio público. Las áreas bajo la curva de absorbancia se normalizaron como porcentajes de las generadas en los grupos de control en la misma transferencia. Los niveles de proteínas se expresaron como un porcentaje de estos en los animales de control.

Resultados

Los niveles cerebrales de 4 proteínas sinápticas se midieron en animales (n = 8) que recibieron tanto UMP como DHA en las cantidades descritas en el ejemplo 5. Después de 3 o 4 semanas de tratamiento, las proteínas neurofibrilares de los axones NF-70 y NF-M aumentaron en 43% (p<0,01) o en 102% (p<0,001) y en 19% (p<0,05) o 48% (p<0,01), respectivamente (Figura 6). Los niveles de la proteína de densidad postsináptica PSD-95 y la proteína vesicular sinapsina-1 aumentaron en 38% y en 41% después de 3 semanas (ambos p<0,001) y en 35% (p<0,01) o 25% (p<0,05) después de 1 semana (Figura 7).

Estos hallazgos aportan más evidencias de que la administración de PUFA y uridina aumenta la cantidad de membranas sinápticas. Estos aumentos fueron similares a los observados en los niveles de fosfolípidos, lo que demuestra que los niveles de sinapsis aumentaron en el cerebro.

Ejemplo 8

El DHA, el EPA y el AA aumentan los niveles de fosfolípidos en el cerebro

Materiales y métodos experimentales

A jerbos adultos se les administraron la dieta estándar de control (Tabla 4) con o sin UMP al 0,5% y/o 300 mg/kg/día de DHA, EPA o AA. A los grupos que no recibieron DHA se les administró el vehículo (goma arábica al 5%) solo.

Resultados

Se administraron a jerbos UMP y/o PUFA durante 3 semanas y luego se sacrificaron, para medir los niveles de los diversos fosfolípido en el cerebro. Tal como se muestra en la Tabla 6, el DHA, el EPA y el AA, aumentaron todos los niveles de fosfolípidos.

50

Tabla 6. Niveles de fosfolípidos en el cerebro después de administración de PUFA y/o uridina.

Tratamiento	PL totales	PC	PE	SM	PS	PI
Control + vehículo	333 ± 9	113 ± 6	63 ± 4	19 ± 1	25 ± 2	15 ± 1
UMP + vehículo	332 ± 5	131 ± 2	70 ± 1	22 ± 1	29 ± 1	16 ± 1
Control + DHA	344 ± 16	133 ± 6	77 ± 2	24 ± 2	34 ± 3	18 ± 2
Control + EPA	347 ± 19	125 ± 8	76 ± 4	26 ± 3	31 ± 1	22 ± 2
UMP + DHA	374 ± 17	147 ± 6	88 ± 3	28 ± 3	39 ± 2	22 ± 2
UMP + EPA	407 ± 22	148 ± 3	91 ± 4	30 ± 1	41 ± 2	26 ± 2
UMP + AA	389 ± 28	127 ± 8	88 ± 10	25 ± 2	31 ± 3	22 ± 2

Ejemplo 9

5 Los ácidos grasos omega-3 y la uridina aumentan los números de espinas dendríticas en cerebros de jerbos y ratas adultos y en desarrollo.

10 A jerbos adultos normales se les suministró una dieta de control o una dieta suplementada con UMP (240 mg de uridina/kg) y DHA (300 mg/kg, por sonda nasogástrica) diariamente durante 2 semanas. Los animales fueron decapitados y los cortes del hipocampo fijados se tiñeron con el trazador de membranas carbanocianina Dil (C18)3 ("Dil", Molecular Probes, Eugene, OR) al final del tratamiento. Las imágenes de las neuronas del hipocampo se obtuvieron por microscopía de dos fotones. En los animales que recibieron DHA + UMP, la densidad de espinas dendríticas (número de espinas por longitud unitaria de dendritas) aumentó significativamente en las neuronas piramidales CA1 del hipocampo (aumento del 27%, $p = 0,001$ frente al grupo de control; (Figura 8)).

15 En otro estudio, a ratas preñadas se les permitió ingerir a voluntad, durante 10 días antes del parto y 20 días mientras amamantaban, ya sea una dieta de control que contenía colina, o esta dieta suplementada con uridina como UMP; la mitad de cada grupo también recibió DHA o su diluyente diariamente, por sonda nasogástrica. Luego las crías se sacrificaron y los cortes de los cerebros se examinaron para determinar los números de espinas dendríticas del hipocampo. El UMP solo y el DHA solo, cada uno de ellos aumentaron los números de espinas dendríticas, en tanto que la combinación dio como resultado aumentos adicionales (Tabla 7).

20 Tabla 7. Aumentos en los números de espinas dendríticas en animales en desarrollo, en respuesta a la administración de UMP y DHA.

Tratamiento	Número de espinas	Aumento respecto del control (%)
Control	53	-
UMP	68	28%
DHA	70	32%
UMP + DHA	75	42%

Ejemplo 10

El DHA y el UMP mejoran el aprendizaje

Materiales y métodos experimentales

25 Se ofreció comida y agua a voluntad hasta el día de la prueba experimental, en el que en primer lugar se dejó a los jerbos en ayunas durante 17 horas, en el transcurso de una noche y luego se les dio de comer desde las 11 de la mañana hasta las 6 de la tarde. Los jerbos comieron la dieta suplementada con UMP y/o 300 mg/kg de DHA desde los 3 meses ($n = 8$ por grupo), 4 semanas antes del entrenamiento conductual, hasta el final del período de entrenamiento. Primeramente los animales fueron atendidos a diario, durante 4 días, para acostumbrarlos al contacto rutinario. Se les familiarizó con el laberinto durante otros 4 días, para lo que se les distribuían pelets de alimento en los caminos del laberinto y se les permitían 3 minutos para la exploración. Los jerbos hicieron 1 prueba/día, y todas las superficies se desinfectaron con etanol al 10% entre pruebas. El entrenamiento consistía en colocarles un pelet de alimento en el extremo distal de los 2 mismos caminos para todos los ensayos. Cada jerbo se

colocó en el centro del laberinto y se le dejó 2 minutos para que encontrase los pelets de comida. Los errores de memoria de trabajo ocurrían siempre y cuando un jerbo volviera a entrar en un camino que contuviera un pelet de alimento y que ya había visitado previamente durante el ensayo. Los errores de memoria de referencia ocurrían siempre y cuando un jerbo entrara a un camino que nunca había tenido un pelet de alimento en las pruebas previas. Se registró el porcentaje de pelets de alimento encontrados.

Resultados

Para determinar el efecto de la uridina y/o DHA sobre el aprendizaje, a los animales se les administraron dietas que contenían uridina y/o DHA y luego se les sometió a una prueba de memoria. El DHA y el UMP mejoraron el porcentaje de animales capaces de completar la tarea (Figura 9).

Ejemplo 11

El DHA y el UMP administrados a madres gestantes y lactantes aumentan los niveles de fosfolípidos cerebrales en la descendencia.

Se administraron a ratas gestantes y lactantes DHA y/o uridina como se describe en el ejemplo 9. A los 20 días del parto, se sacrificaron las ratas y se obtuvieron muestras de cerebro y se analizaron los fosfolípidos. La administración de DHA solo aumentó el PC, PI, PE y la esfingomielina (SM) cerebrales por célula (DNA) en 36, 166, 38 y 78%, respectivamente. El UMP amplificó notablemente los efectos del DHA hasta 66, 210, 68 y 99% del porcentaje de control, respectivamente (Tabla 8). Estos aumentos fueron mayores que los observados en animales adultos. Se obtuvieron resultados similares cuando se normalizaron a proteína (Tabla 9). Por tanto, la administración de DHA y/o uridina a madres gestantes y lactantes es capaz de aumentar los niveles de fosfolípidos en la descendencia.

Tabla 8. Niveles medios de fosfolípidos en crías de rata el día 20 postnatal (nmol/mg de proteína).

	Fosfolípidos totales	PC	PE	SM	PI
Control	277,3	94,2	76,7	4,73	2,28
UMP	282,2	95,3	75,6	5,27	3,92
DHA	322,8** (16)	115,7 (23)	95,7* (24)	7,52* (59)	5,49** (141)
UMP + DHA	348,4** (26)	139,8** (48)	115,6** (51)	8,41* (78)	6,32** (177)

* p<0,05;
 ** p<0,001 frente al grupo de control. Los valores entre paréntesis son el aumento porcentual sobre el control.

Tabla 9. Niveles medios de fosfolípidos en crías de rata el día 20 postnatal (nmol/microgramo de DNA).

	Fosfolípidos totales	PC	PE	SM	PI
Control	26,05	8,85	7,25	0,444	0,215
UMP	24,78	8,11	6,56	0,458	0,352
DHA	33,80** (30)	12,02* (36)	9,98** (38)	0,792* (78)	0,571** (166)
UMP + DHA	36,71** (41)	14,73** (66)	12,21** (68)	0,884* (99)	0,667** (210)

* p<0,05;
 ** p<0,001 frente al grupo de control. Los valores entre paréntesis son el aumento porcentual sobre el control.

Ejemplo 12

Los ácidos grasos omega-3 aumentan la síntesis de fosfolípidos en neuronas en materiales de cultivo a corto plazo y métodos experimentales

- 5 Se cultivaron células de hipocampo de rata durante 3 semanas en medio Neurobasal plus B27, para alcanzar la maduración completa. El día del experimento, las células se incubaron con DMEM + colina, con o sin adición de DHA. Se añadió ¹⁴C-colina, se incubaron las células durante 2 h más y se extrajo y midió el PC marcado con ¹⁴C recién formado como se describe en el ejemplo 1.

Resultados

- 10 Para determinar el efecto de DHA sobre los fosfolípidos en neuronas en cultivo a corto plazo, se trataron previamente las neuronas con DHA + colina. El DHA aumentó la síntesis de fosfolípidos con relación a las células a las que se había administrado colina sola ("control") más de dos veces (Figura 10; p = 0,04). Estos hallazgos confirman que el DHA aumenta los niveles de fosfolípidos en las células cerebrales y neurales.

REIVINDICACIONES

1. Un método no terapéutico para mejorar una función cognitiva en un sujeto sano, comprendiendo dicho método administrar al sujeto, una composición que comprende:
 - (1) ácido docosahexaenoico;
 - 5 (2) uridina o uridina-5'-monofosfato (UMP); y
 - (3) colina o una sal de colina.
2. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el sujeto es un ser humano.
3. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde al sujeto no le ha sido diagnosticado un deterioro cognitivo ni trastorno de la memoria.
- 10 4. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el sujeto es un adulto al que no le ha sido diagnosticado ningún trastorno cognitivo ni neurológico.
5. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el sujeto no presenta deterioro cognitivo ni trastorno de la memoria.
- 15 6. Un método no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la composición está en forma de un suplemento dietético.
7. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la composición está en forma de un producto alimenticio, tal como una bebida, que ha sido enriquecido con la composición.
8. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el sujeto es menor de 24 meses.
- 20 9. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 8, en donde la composición está en forma de una fórmula para recién nacidos.
10. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en donde el sujeto es un niño menor de 18 años.
11. Un método no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la sal de colina es cloruro de colina, bitartrato de colina, tartrato de colina o citrato de colina.
- 25 12. Un método no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la uridina o uridina-5'-monofosfato (UMP) se dosifica para proporcionar un intervalo de 10 a 500 mg de uridina al día
13. Un método no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la colina o sal de colina se dosifica para proporcionar un intervalo de 100 mg a 10 g de colina al día.
- 30 14. Un método no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la composición comprende ácido docosahexaenoico (DHA) y uridina-5'-monofosfato (UMP)
15. Un método no terapéutico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en donde la composición comprende ácido docosahexaenoico (DHA), uridina-5'-monofosfato (UMP) y cloruro de colina.
16. Un método no terapéutico de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la función cognitiva mejorada es la memoria mejorada.

35

Efecto de los ácidos grasos saturados e insaturados sobre la síntesis de PC en células PC12

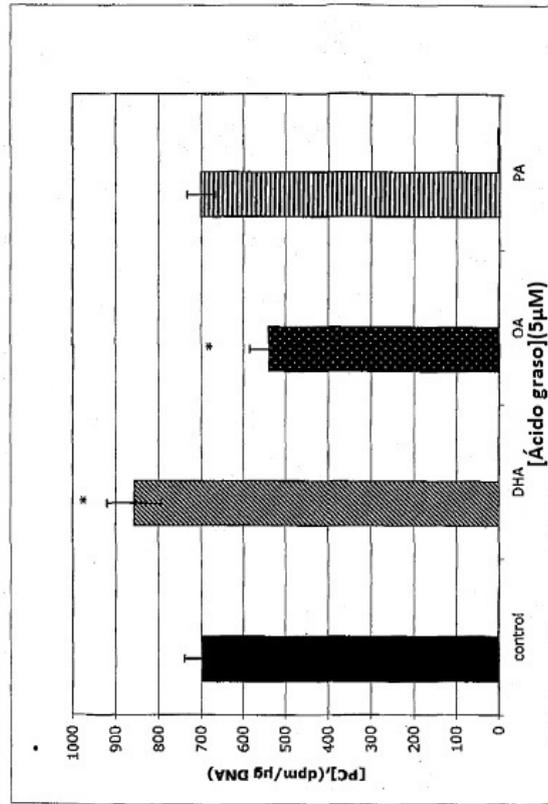


FIGURA 1

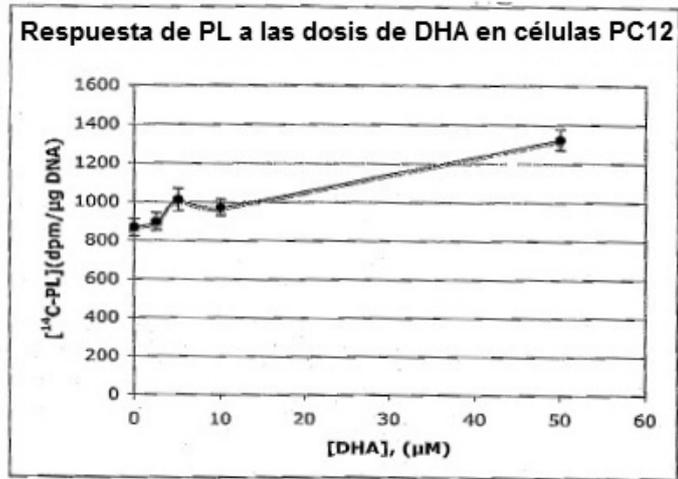


FIGURA 2

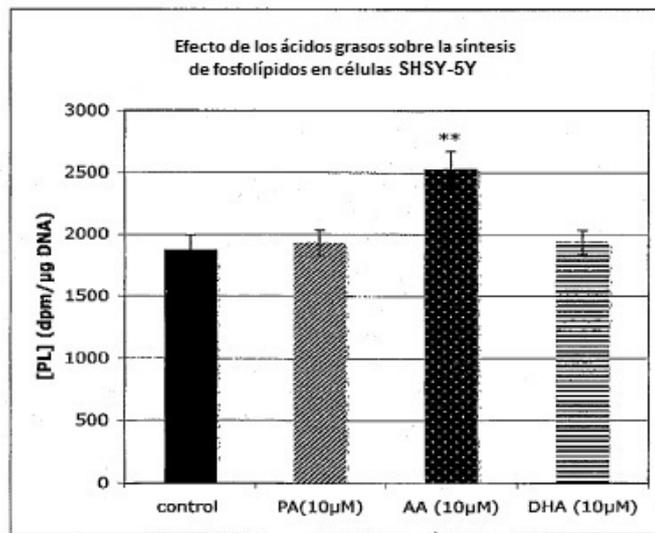


FIGURA 3A

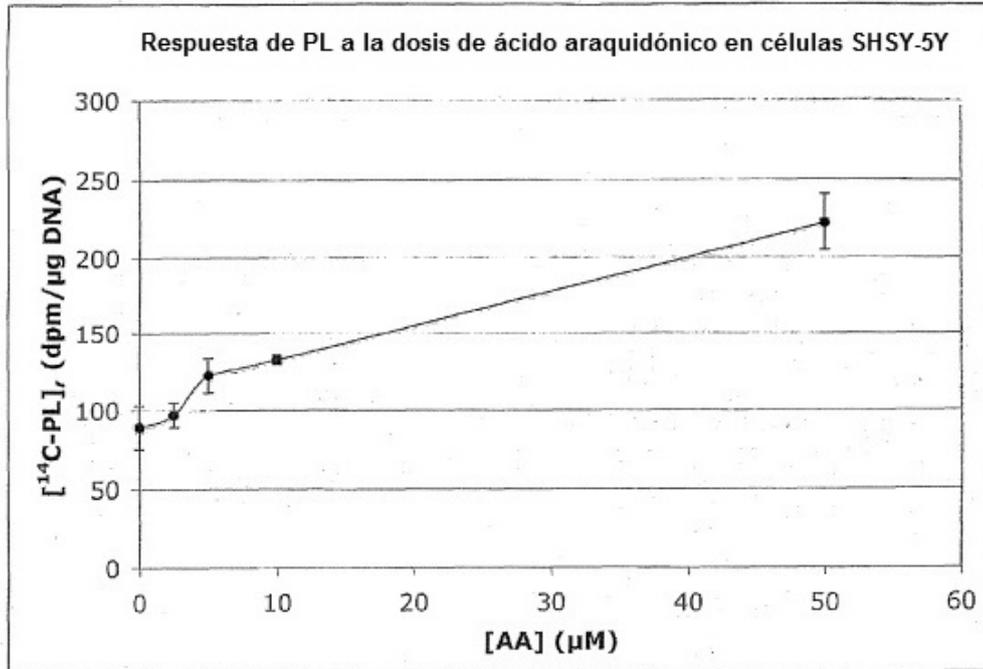
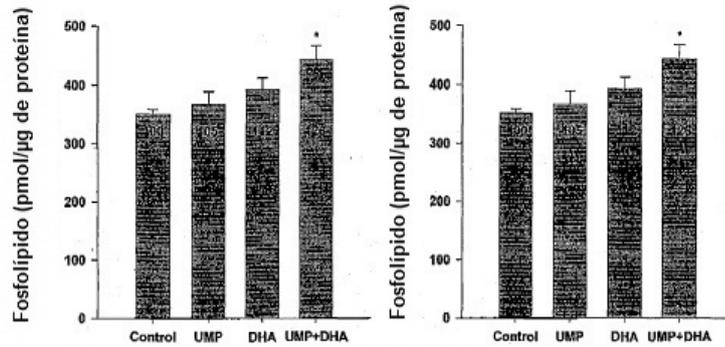
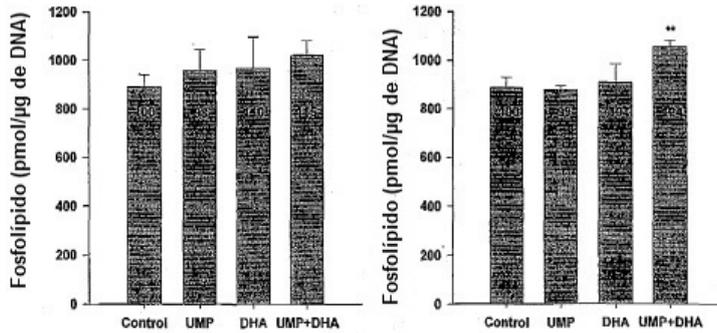


FIGURA 3B



*Superior ($p=0,05$) al control (ANOVA unidireccional [F(3,28)=4,12; $p=0,015$]). La ANOVA bidireccional reveló un efecto significativo del DHA [F(1,28)=8,78; $p=0,006$]. Los valores absolutos en los grupos de control y con UMP+DHA fueron 351 ± 8 y 442 ± 24 pmol/mg de proteína, respectivamente



*Superior ($p=0,020$) al control; la ANOVA bidireccional indicó una diferencia significativa [F(3,28) = 3,215; $p=0,038$] entre grupos. Los valores absolutos en jerbos de control y con UMP+DHA fueron 885 ± 45 y 1094 ± 33 pmol/μg de DNA, respectivamente

FIGURA 4

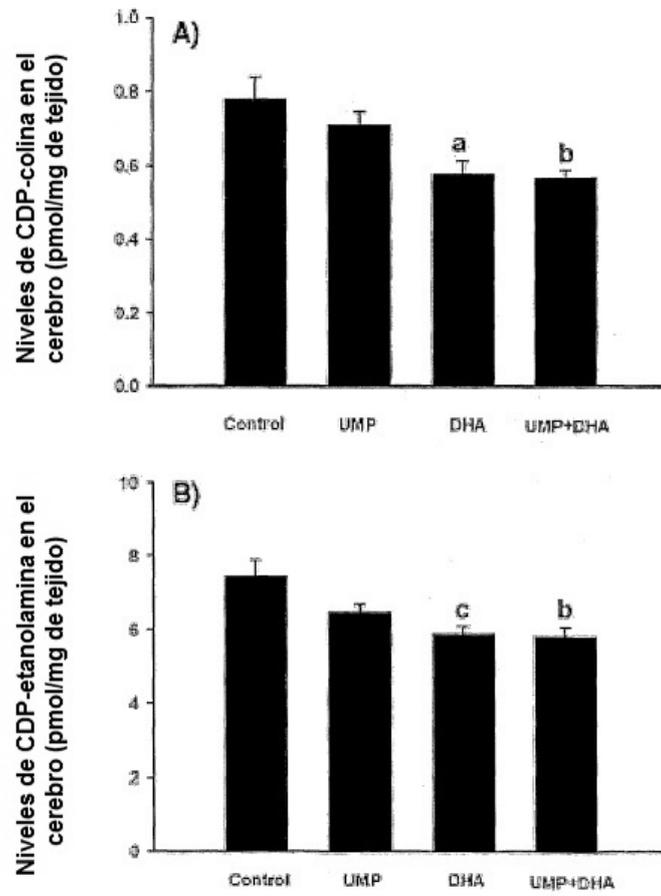


FIGURA 5

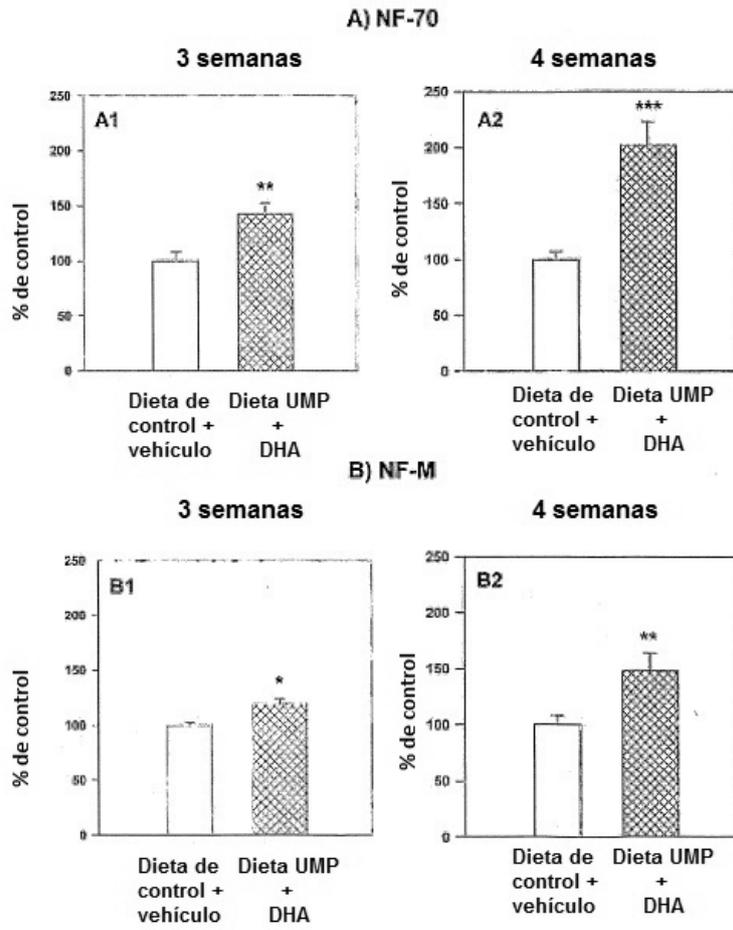


FIGURA 6

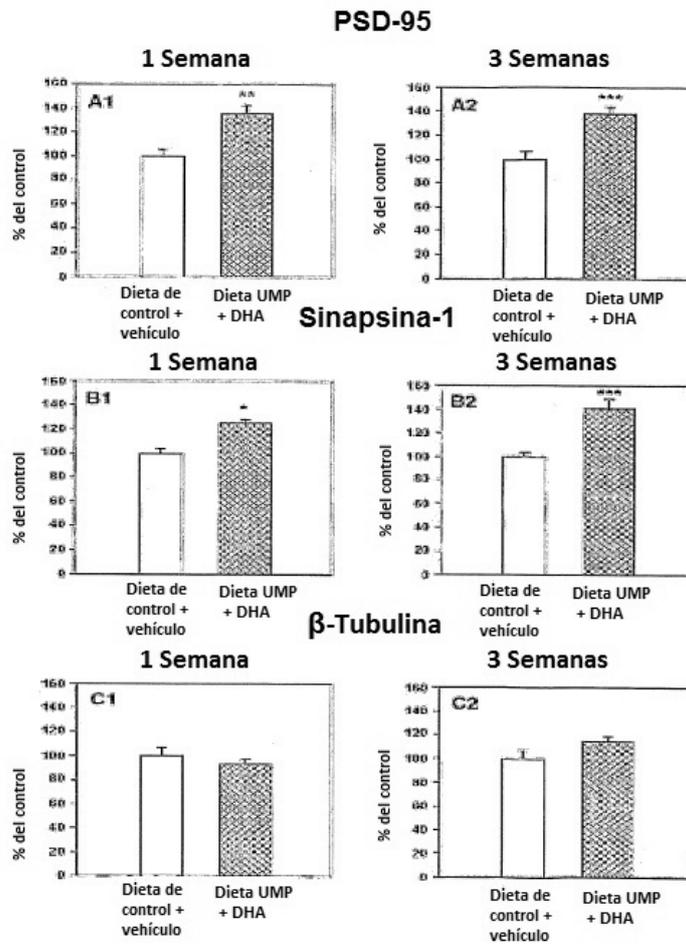
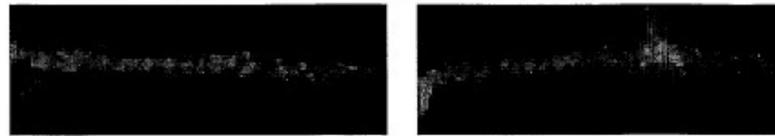


FIGURA 7

Aumento de la densidad de espinas dendríticas en el hipocampo de jerbos adultos



Control

UMP+DHA

$p = 0,001$

(n=10 por grupo)

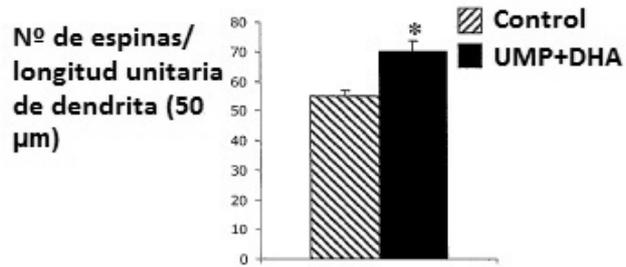


FIGURA 8

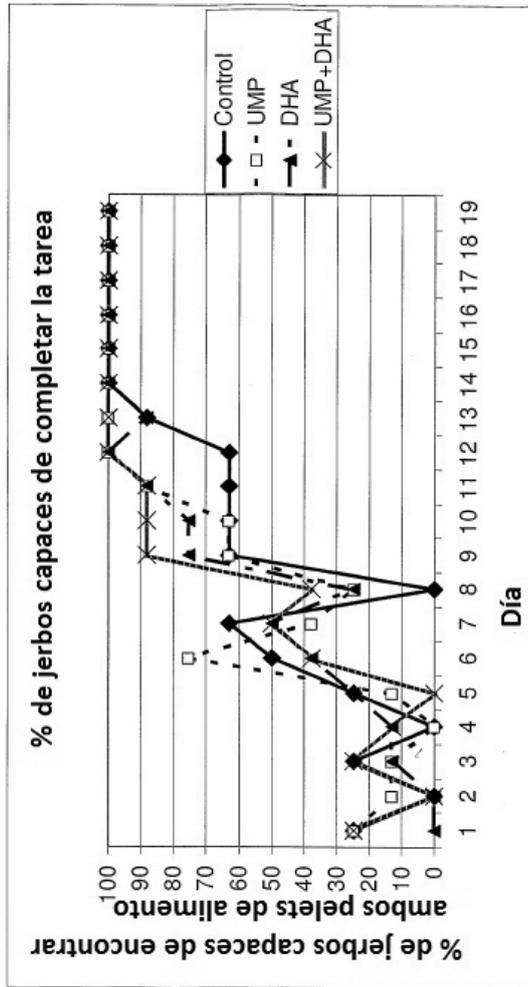


FIGURA 9

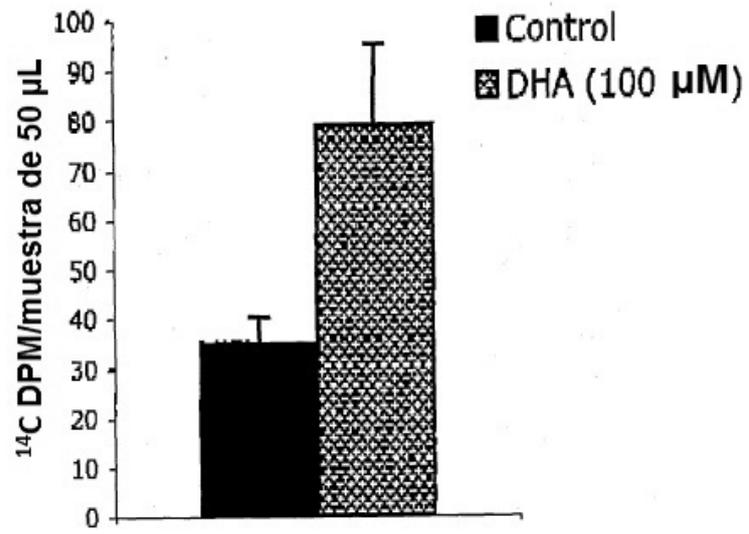


FIGURA 10