

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 576 255**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A23L 29/00 (2006.01)

A61K 31/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.03.2006 E 06740067 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.04.2016 EP 1874336**

54 Título: **Un método para mejorar el aprendizaje y la memoria en un infante, que comprende la administración de glicomacropéptido de caseína**

30 Prioridad:

29.04.2005 US 118790

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

06.07.2016

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (50.0%)
2701 Patriot Boulevard, 4th Floor
Glenview, IL 60026, US y
THE UNIVERSITY OF SYDNEY (50.0%)**

72 Inventor/es:

**MCAHON, ROBERT J.;
WANG, BING;
RUMSEY, STEVEN CHARLES y
BRAND-MILLER, JENNIE**

74 Agente/Representante:

LAZCANO GAINZA, Jesús

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 576 255 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

Un método para mejorar el aprendizaje y la memoria en un infante, que comprende la administración de glicomacropéptido de caseína

Fundamento de la invención

5 (1) Campo de la invención:

La presente invención se relaciona con un método para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en mamíferos por medios dietarios, y de modo más particular con un método para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en un mamífero, por administración de una fuente de dieta de ácido siálico.

(2) Descripción de la técnica relacionada:

10 Se reconoce que la leche materna y el amamantamiento es la forma preferida de alimentación del infante humano. Entre los beneficios reconocidos de amamantamiento está el desarrollo mental óptimo. Para los infantes que consumen fórmulas infantiles, ha habido un esfuerzo sustancial para suministrar composiciones de fórmulas que soporten de manera óptima el desarrollo mental, cuando se comparan con el observado en los infantes amamantados.

15 Comparado con otros primates, el cerebro humano adulto es cuatro veces más grande respecto a la masa corporal, pero el infante humano es relativamente inmaduro al momento del nacimiento. Parker, S. T. et al., *Origin of Intelligence*, pp. 313 - 345, The Johns Hopkins Univ. Press, Baltimore, MD (1999). Por ello, el crecimiento del cerebro ocurre rápidamente tanto antes como después del nacimiento, colocando enormes requerimientos sobre el suministro de compuestos precursores requeridos para el desarrollo cerebral. La nutrición subóptima durante una fase crítica del desarrollo temprano del cerebro puede tener efectos de largo plazo sobre la función cognitiva -un tema de salud pública mayor y preocupación clínica. Lucas, A. et al., *BMJ*, 217:1481- 1487 (1998), y Lucas, A. et al., *Lancet*, 339:261-264 (1992). En un ensayo controlado, aleatorizado, ciego, en infantes prematuros, aquellos alimentados con una fórmula infantil estándar en vez de fórmula enriquecida con nutrientes, tuvieron cociente intelectual (IQ) verbal reducido a los 8 años de edad. Véase, Lucas, Id, (1998). De modo preocupante, casi la mitad de los infantes masculinos alimentados con fórmula estándar tuvieron un IQ subnormal comparado con sólo 13% de aquellos alimentados con leche enriquecida. Tales estudios resaltan la vulnerabilidad potencial de las cifras crecientes de infantes prematuros y con bajo peso en el nacimiento, con la nutrición subóptima.

Componentes específicos únicos de la leche humana tienen el potencial para dar soporte al crecimiento rápido del cerebro. En particular, ácidos siálicos (una familia de derivados sustituidos en N y O de ácido neuramínico; y en particular ácido N-acetilneuramínico, o NANA) ocurren en grandes cantidades como componente de oligosacáridos de leche humana (hasta 1 g/l), y también forma el residuo funcional terminal de gangliósidos y glicoproteínas del cerebro. Wang, B. et al., *Am. J. Clin. Nutr.*, 74:510-515 (2001), y Carlson, S. E., *Am J. Clin. Nutr.*, 41:720-726 (1985). Los componentes de ácido siálico ocurren en las más altas concentraciones en leche humana justo después del nacimiento. Idota et al., en *J. of Japanese Soc. of Nutr. and Food Sci.* (*Nihon Eiyo Shokuryo Gakkai-shi*), 47(5):363-367 (1994), muestran un dramático descenso en el contenido de 6'-sialillactosa de leche materna humana de 3 a 482 días después del parto.

En la naturaleza, se encuentran las más altas concentraciones de ácido siálico en el córtex cerebral del cerebro humano. Schauer, R., *sialic acids, Chemistry, Metabolism and Function*, Springer-Verlag, Viena, Nueva York (1982), y Svennerholm, L. et al., *Biochem Biophys Acta*, 1005:109-117 (1989). En particular, la molécula de adhesión celular neural (NCAM) es una proteína sialidada que parece jugar un papel importante en el aprendizaje y la memoria. Se desarrolla en un amplio rango de eventos morfogénicos, incluyendo migración celular, brotes de neurita, hallazgo de rutas, brotes, regeneración y plasticidad sináptica. Nakayama, J. et al., *Virchows Archiv*, 433:419-426 (1998), Mahal, L. K. et al., *J. Biol. Chem.*, 277:9255-9261 (2002), y Ong, E. et al., *Glycobiology*, 8:415-424 (1998). En roedores, el grado de polisialilación de NCAM es asociado con aprendizaje y memoria aumentados. Cremer, H. et al., *Nature*, 367:455-459 (1994).

La investigación ha mostrado que la mayoría del ácido N-acetilneuramínico (NANA) en el cerebro de crías de rata a las que se ha administrado NANA mediante inyección intraperitoneal fue incorporado dentro de la fracción sinaptosomal. Morgan, B. L. G. et al., *Br. J. Nutr.*, 46:231-238 (1981). Posteriormente, Carlson, S. E., et al., en *J. Nutr.*, 116:881-886 (1986) mostraron que la administración tanto oral como intraperitoneal de ácido N-acetilneuramínico dio como resultado significativamente más ácido N-acetilneuramínico de glicoproteína y gangliósido cerebral y cerebelar de lo que hicieron inyecciones de glucosa.

Morgan, B. L. G. et al., en *J. Nutr.*, 110:416-424 (1980), han mostrado también que crías de rata mal nutridas a las que se inyectó por vía intraperitoneal ácido N-acetilneuramínico, conocieron un laberinto más rápidamente que

compañeros de camada a los que se inyectó glucosa, y mostraron reducción en las anomalías esperadas de comportamiento debidas a la mala nutrición.

Generalmente las fórmulas basadas en leche de vaca tienen bajo contenido de ácido siálico. En un estudio, la concentración de ácido siálico en varias fórmulas de combinación caseína/suero fue menor de 200 mg de ácido siálico/L. Además, las fórmulas a base de proteína de soya contienen niveles sustancialmente reducidos de ácido siálico, comparados con las fórmulas a base de leche de vaca. Por ello, las fórmulas que son libres de lactosa y se basan en proteína de soya exhibirían muy bajo contenido de ácido siálico. En algunos casos, la investigación ha mostrado que la suplementación de dieta con ácido siálico, o con un material que contiene ácido siálico, suministra ciertos beneficios.

Existen varias fuentes conocidas de ácido siálico en sus diferentes formas conjugadas. Estas incluyen, pero no están limitadas a, ácido N-acetilneuramínico libre (o ácido siálico), el oligosacárido sialilactosa, gangliósidos que contienen ácido siálico, y la proteína macropéptido de caseína (CMP), también denominada glicomacropéptido (GMP) y, cuando se obtiene leche de vaca, glicomacropéptido de caseína (CGMP), o similares.

En el documento de EEUU 20040022918 se describe un método para producir CGMP, que enseña que la fabricación de queso de leche mediante coagulación de leche de vaca con cuajo, provoca que el coágulo se contraiga en una cuajada en la medida que desprende con suero. El macropéptido de caseína (CMP) es escindido de la proteína caseína, como un resultado de la acción del cuajo sobre la caseína kappa y aproximadamente 90% del CMP es típicamente removido con el suero. El CMP es un grupo heterogéneo de proteínas, que contiene todas las variaciones genéticas y modificaciones posttranscripcionales de caseína kappa (Ivon et al., *Reprod. Nutr. Dev.*, 34:527-537 (1994)). El carbohidrato predominante es ácido siálico. El glicomacropéptido o GMP es el componente principal (50 a 75%) de CMP. El contenido de carbohidrato del GMP lo hace soluble en una solución 12% de ácido tricloroacético. Varias técnicas de medición analítica incluyen un pretratamiento, que involucra una solución de TCA. Este puede remover por lo menos una porción del CMP no-glicosilado. Por ejemplo, el método publicado en *The Official Journal of the European Communities* (L228/10 Anexo IV), detalla un método HPLC para la medición de GMP en productos lácteos y usa el nivel de GMP para calcular el nivel de suero de queso presente en una muestra. Brodi, E. P., en *Br. J. de Nutr.*, 84(Suppl. 1):S39-S46 (2000) describe otros métodos para producir CGMP a partir de leche.

La adición de ácido siálico o fuentes de ácido siálico a ciertas fórmulas nutricionales ha sido discutida en el documento de EEUU No. 6,506,422, que divulga una fórmula nutricional particular que contiene glicomacropéptido de caseína y aminoácidos esenciales complementarios diferentes de fenilalanina, para administración a pacientes que sufren de fenilcetonuria. No se mencionan los niveles de ácido siálico hallados en fórmulas infantiles.

El documento de EEUU No. 6,270,827, divulga una formulación que contiene proteínas de leche humana o factores recombinantes de resistencia al anfitrión, uno de los cuales es caseína kappa humana recombinante, para suplementar fórmulas infantiles sintéticas.

El documento de EEUU No. 4,762,822 divulga el uso de ácido N-acetilneuramínico o gangliósidos que contienen ácido siálico en fórmula infantil, para proteger los recién nacidos de organismos que producen enfermedades gastrointestinales.

El documento WO 01/60346 A2 divulga una formulación nutricional que contiene los oligosacáridos oligofruktosa y sialilactosa como sustancias prebióticas para promover el crecimiento de bifidobacterias en el intestino, que puede ser usada junto con fórmulas infantiles.

WO-A-00 49885 describe el uso de un hidrolizado de proteína de leche para tratar desórdenes de huesos o dentales. El glicomacropéptido de caseína (CGMP) es extraído de suero dulce mediante una combinación de electrodiálisis, resina de intercambio catiónico, resina de intercambio aniónico, evaporación, secado por atomización, ultrafiltración y liofilización, y es usado para enriquecer alimentos o composiciones enterales líquidas.

Aunque se ha reportado la administración de ácido siálico en la dieta para varios propósitos, la suplementación de la dieta con ácido siálico no mostrado afectar el comportamiento de aprendizaje o de memoria de un mamífero. Puesto que la suplementación de la dieta es un método fácil y ampliamente aceptado para la administración de diversos agentes a sujetos, y en particular a mamíferos infantiles, sería útil suministrar un método mediante el cual pudiera mejorarse el comportamiento de aprendizaje y memoria de un mamífero, por medio de la dieta. Tal método sería particularmente útil para sujetos mamíferos neonatos que tuviesen necesidad de mejora en su comportamiento de aprendizaje y memoria.

Resumen de la invención

Brevemente, por ello la presente invención se dirige a un método novedoso no terapéutico, para mejorar el

comportamiento de aprendizaje y/o memoria en un infante humano, donde el método comprende la administración al mamífero de glicomacropéptido de caseína en una cantidad suficiente para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en el mamífero,

5 También se describe un método novedoso para incrementar el ácido siálico unido a la proteína del cerebro en un mamífero, donde el método comprende la administración al mamífero de una cantidad de glicomacropéptido de caseína, que es suficiente para incrementar el ácido siálico unido a la proteína del cerebro en el mamífero.

10 También se describe un método novedoso para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en un mamífero, donde el método comprende: determinar si el mamífero es uno que requiere de la mejora en la aprendizaje y/o memoria; y, si es así, administración al mamífero de glicomacropéptido de caseína en una cantidad suficiente para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en el mamífero.

15 Por ello, entre las varias ventajas que se ha encontrado deben ser logradas por la presente invención, debe notarse el suministro de un método mediante el cual se mejore el comportamiento de aprendizaje y/o memoria de un infante humano, en el que la cantidad suficiente para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria suministre por lo menos 100 mg de ácido siálico/kg/día a los medios de dieta del infante, y también el suministro de tal método que es particularmente útil para sujetos mamíferos neonatos que requieren de la mejora en el comportamiento de aprendizaje y memoria.

Breve descripción de las ilustraciones

FIG. 1 es una ilustración esquemática de un laberinto de 8 brazos que es útil para probar el comportamiento de aprendizaje y memoria en lechones;

20 FIG. 2 es una ilustración esquemática de uno de los brazos del laberinto de 8 mostrado en la FIG. 1;

FIG. 3 muestra las señales visuales usadas (A) en la misión de aprendizaje 1, y (B) en la misión de aprendizaje 2, en la prueba de comportamiento de aprendizaje de lechones;

25 FIG.4 es una gráfica que muestra la fracción de lechones en cada uno de cuatro grupos, que aprendió la respuesta correcta a la señal visual en la misión 1 como una función del número de ensayos, donde el grupo 4 de lechones (2º mejor desempeño) recibió una dieta que tenía 842 mg/L de ácido siálico con suplementación por glicomacropéptido de caseína (240 mg/kg/día, de ácido siálico), el grupo 3 de lechones (3er mejor) recibió una dieta que tenía 600 mg/L de ácido siálico con suplementación por glicomacropéptido de caseína (171 mg/kg/día, de ácido siálico), el grupo 2 de lechones (el mejor) recibió una dieta que tenía 250 mg/L de ácido siálico con suplementación de glicomacropéptido de caseína (71 mg/kg/día, de ácido siálico), y el grupo 1 de lechones (peor desempeño) recibió una dieta que suministraba 77 mg/L de ácido siálico (25 mg/kg/día, de ácido siálico) sin suplementación de glicomacropéptido de caseína ;

30 FIG. 5 es una gráfica que muestra la fracción de lechones en cada uno de cuatro grupos que aprendió la respuesta correcta a la señal visual en la misión 2 como una función del número de ensayos, donde el grupo 4 de lechones (mejor desempeño) recibió una dieta que tenía 842 mg/L de ácido siálico con suplementación por glicomacropéptido de caseína (240 mg/kg/día, de ácido siálico), el grupo 3 de lechones (2º mejor) recibió una dieta que tenía 600 mg/L de ácido siálico con suplementación por glicomacropéptido de caseína (171 mg/kg/día, de ácido siálico), el grupo 2 de lechones (3er mejor) recibió una dieta que tenía 250 mg/L de ácido siálico con suplementación de glicomacropéptido de caseína (71 mg/kg/día, de ácido siálico), y el grupo 1 de lechones (peor desempeño) recibió una dieta que suministraba 77 mg/L de ácido siálico (25 mg/kg/día, de ácido siálico) sin suplementación de glicomacropéptido de caseína;

35 FIG. 6 es una gráfica de barras que muestra el número total de errores por cada grupo de lechones en las misiones 1 y 2, e indica que el número total más alto de errores para cada misión fue hecho por lechones en el grupo que no tenía suplementación en la dieta con glicomacropéptido de caseína, y que la suplementación en todos los niveles mejoró la habilidad de aprendizaje de los lechones;

40 FIG. 7 muestra dos gráficas de barras, donde la gráfica (A) muestra el número promedio de errores hecho por lechones en cada uno de los cuatro grupos para la prueba de memoria en la misión 1, y (B) muestra el número promedio de errores hecho por lechones en cada uno de los cuatro grupos para la prueba de memoria en la misión 2;

50 FIG. 8 muestra dos gráficas de barras, donde (A) muestra una comparación de los niveles de cortisol de plasma entre cada uno de los cuatro grupos de lechones para cada semana en el estudio, y (B) muestra una comparación de los niveles de cortisol de plasma entre grupos de tratamiento combinado versus el grupo de control para cada semana del estudio de cinco semanas;

FIG. 9 es una gráfica de barras que muestra una comparación de la concentración de ácido siálico en materia gris de cerebro entre grupos de tratamiento y de control, y que indica mayor contenido de ácido siálico en los cerebros de lechones que reciben suplementación de dieta con glicomacropéptido de caseína;

5 FIG. 10 muestra dos cartas de dispersión de la concentración de ácido siálico unido a proteína en tejido de córtex frontal de cerebro versus el número de ensayos para aprender los indicios visuales para (A) lechones en la misión 1, y (B) lechones en la misión 2, donde ambas cartas indican que mayores niveles de ácido siálico unido a proteína en tejido de córtex frontal de cerebro tienen correlación con la mejora en el comportamiento de aprendizaje en lechones;

10 FIG. 11 muestra dos cartas de dispersión de la concentración de ácido siálico unido a gangliósido en tejido de córtex frontal cerebral versus el número de ensayos para aprender el indicio visual para (A) lechones en la misión 1, y (B) lechones en la misión 2, donde ambas cartas indican que mayores niveles de ácido siálico unido a gangliósido en tejido de córtex frontal cerebral tienen correlación con la mejora en el comportamiento de aprendizaje en lechones;

15 FIG. 12 muestra una gráfica del número de errores hechos en la misión de memoria 1 por el grupo 4 de lechones, como una función de la concentración de ácido siálico unido a proteína en tejido de córtex frontal cerebral, e indica que el tener mayores niveles de ácido siálico unido a proteína en tejido de córtex frontal cerebral, produce menos errores en una prueba de memoria, y tiene comportamiento mejorado de la memoria sobre aquellos que tienen menores niveles de ácido siálico; y

20 FIG. 13 es una carta que muestra la ganancia promedio de peso corporal para los lechones en cada uno de los cuatro grupos durante la duración de la prueba, y la cual muestra que la dieta de cada grupo fue comparable respecto a la satisfacción de los requerimientos nutricionales totales de los lechones.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

25 De acuerdo con la presente invención, se ha descubierto que puede mejorarse el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en un infante humano, mediante administración al mamífero de glicomacropéptido de caseína en una cantidad suficiente para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en el mamífero. En una realización útil, el glicomacropéptido de caseína puede ser incluido en una fórmula.

30 Se ha mostrado ahora que lechones alimentados con dietas que contienen 77 mg/L de ácido siálico (sin suplementación), y 250 mg/L, 600 mg/L, y 842 mg/L de ácido siálico suministrado por la suplementación de las dietas con glicomacropéptido de caseína, exhibieron diferencias en el comportamiento tanto de aprendizaje como de memoria. En efecto, se mostró que el comportamiento tanto de aprendizaje como de memoria mejoraron en lechones que recibieron las dietas que habían sido suplementadas con glicomacropéptido de caseína, respecto a los lechones que recibieron las dietas no suplementadas, pero que de otro modo eran nutricionalmente suficientes.

35 Esta mejora fue inesperada, porque existe conciencia de que no había hallazgos previos de mejora en aprendizaje y memoria, debidos a la suplementación de dietas con glicomacropéptido de caseína, dietas que de otro modo son nutricionalmente suficientes. También, los estudios previos habían mostrado una correlación entre reducción en la ingesta de alimentos e inclusión de CGMP en la dieta. Véanse por ejemplo los documentos de EEU Nos. 20040077530, y 20030059495. Dado que la reducción en la ingesta de alimentos está asociada más frecuentemente con baja agudeza mental, más que con mejora en el aprendizaje y la memoria, no se esperaba que la suplementación de la dieta con CGMP mejorara realmente tal desempeño, como se mostró en la presente invención.

40 Se ha hallado que el glicomacropéptido de caseína es una fuente sorprendentemente buena para la suplementación de dietas, para mejorar el comportamiento de aprendizaje y memoria. Esto es sorprendente porque la leche de vaca, en general, es baja en ácido siálico, y también, las macromoléculas a las cuales está unido el ácido siálico son diferentes a aquellas encontradas en la leche humana, por ejemplo. Sin embargo, se ha hallado que el glicomacropéptido de caseína es un suplemento de dieta sorprendentemente efectivo para mejorar el comportamiento de aprendizaje y memoria, y además, el CGMP es relativamente barato, fácilmente disponible y nutricionalmente seguro para infantes.

45 La presente invención es útil para cualquier mamífero. Sin embargo, es particularmente útil para humanos. El mamífero puede tener cualquier edad. Sin embargo, se ha hallado que el presente método es particularmente útil cuando el mamífero está entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 4 años de edad. Se entiende que este intervalo de edad incluye infantes y niños pequeños, cuando el mamífero es un humano. Se prefiere que el mamífero sea un mamífero neonato. Como se usa aquí, se entiende que el término "neonato" describe las edades entre el nacimiento y aproximadamente dos años.

El presente método es particularmente útil cuando el infante humano es uno que requiere de mejora en el comportamiento de aprendizaje y/o memoria. Cuando se usan aquí los términos "que requiere de mejora en el comportamiento de aprendizaje y/o memoria", significa que ellos describen un sujeto que podría beneficiarse, sin importar si en grado mayor o menor, de una mejora en el comportamiento de aprendizaje y/o comportamiento de memoria. El presente método incluye opcionalmente el paso de determinar si el infante humano es uno que requiere de una mejora en el aprendizaje y/o memoria; y, si es así administrar al infante humano una fórmula que comprende glicomacropéptido de caseína en una cantidad efectiva.

El significado de los términos "mejora en el comportamiento de aprendizaje" incluye cualquier mejora, no importa qué tan leve, en la habilidad de aprendizaje del sujeto. El significado de los términos "mejora en el comportamiento de memoria", incluye cualquier mejora, no importa qué tan leve sea, en el comportamiento de memoria del sujeto. La mejora en el comportamiento de aprendizaje y/o memoria puede ser medida por cualquiera de uno o más de los diferentes métodos que son útiles para la medición del comportamiento de aprendizaje y memoria en infantes humanos. Ejemplos de tales pruebas incluyen, sin limitación, la prueba de Fagan de inteligencia infantil (FTII), la adaptación de Dunst de la Escala de Permanencia de Objeto Uzgiris-Hunt (OP), la prueba de Transferencia Modal Cruzada (CMT), las Escalas de Desarrollo Infantil de Bayley, segunda edición, Índice de Desarrollo Mental (MDI), Tamizador de Neurodesarrollo Infantil de Bayley (BINS), y el Examen Neurológico de Amiel-Tison (AT). Mayor información sobre la prueba de memoria y aprendizaje en infantes puede hallarse en Bayley, N., Manual for the Bayley scales of infant development, Psychological Corporation, Nueva York (1969); Bates, J. E. et al., Child Dev., 50:794-803 (1979); y Black, M. M. et al., Bayley Scales of Infant Development II Assessment, Unlimited Learning Resources, Winston-Salem, NC (2003).

Se cree que una necesidad de mejora en el comportamiento de aprendizaje y/o memoria puede ser causada en un infante humano, por cualquiera de varios factores que son conocidos en la técnica. A modo de ejemplo, desnutrición, la presencia de factores ambientales - tales como la ingestión de ciertos metales, privación de oxígeno, trauma, enfermedad y otros factores, pueden causar una necesidad de tal mejora. En una situación, como se discutió arriba, la técnica anterior ha inferido alguna relación entre la habilidad cognitiva de algunos mamíferos neonatos y el nivel de ciertos nutrientes en la dieta - y se ha probado que el ácido siálico es uno de estos nutrientes. De acuerdo con ello, se cree que en la presente invención se muestra la necesidad de mejora en el comportamiento de aprendizaje y/o memoria, o puede determinarse que el mamífero es uno que tiene necesidad de mejora en el aprendizaje y/o memoria, donde por lo menos una porción de los requerimientos nutricionales del mamífero ha sido suplida por una fórmula que tiene menos de 100 mg/L de ácido siálico y, en particular, sustancialmente todos los requerimientos nutricionales del mamífero ha sido suplidos mediante la administración de una fórmula que tiene menos de 100 mg/L de ácido siálico.

Cuando se dice que "por lo menos una porción de los requerimientos nutricionales del infante humano ha sido suplida" por una cierta fórmula, se entiende que por lo menos 25% de los requerimientos nutricionales del infante humano han sido suplidos por la fórmula, por al menos una mayoría del periodo desde el nacimiento hasta la edad actual del infante humano. Se prefiere que la porción de los requerimientos nutricionales del infante humano que ha sido suplida por al menos una mayoría del periodo desde el nacimiento hasta la edad actual del infante humano, sea de por lo menos 50%, más preferido es 75%, y aún más preferido sean sustancialmente todos los requerimientos nutricionales del infante humano.

Debido al bajo nivel de ácido siálico en proteína de soya y proteína de leche de vaca, comparado con los niveles de ácido siálico en leche humana - especialmente en calostro y leche producida durante la lactación temprana, se cree que un mamífero que recibe una fórmula en la que la mayor parte de la proteína es proteína de soya o proteína de leche de vaca y en la cual el nivel de ácido siálico es inferior a aproximadamente 100 mg/L, es uno que tiene necesidad de una mejora en el comportamiento de aprendizaje y/o memoria, se cree que este es el caso cuando por lo menos aproximadamente 75% en peso de la proteína contenida en la fórmula es proteína de soya o proteína de leche de vaca, y es más cierto aun cuando sustancialmente toda la proteína presente en la fórmula es proteína de soya o proteína de leche de vaca.

En efecto, se cree que la necesidad de mejora en el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en un infante humano es mostrada cuando los requerimientos nutricionales del mamífero han sido suplidos por una dieta que suministra ácido siálico en una cantidad que es inferior a la que sería obtenida normalmente del amamantamiento. Cuando se dice que "los requerimientos nutricionales del infante ha sido suplidos", significa que los requerimientos nutricionales del infante han sido suplidos por lo menos por una mayoría de periodo desde el nacimiento hasta la edad actual del mamífero. Los términos "una dieta que suministra ácido siálico en una cantidad que es inferior a la que sería obtenida normalmente por amamantamiento", significa una dieta que comprende una fórmula líquida que tiene un contenido de ácido siálico que es inferior a 100 mg/L. En otras realizaciones, y en algunas realizaciones, una fórmula líquida que tiene un contenido de ácido siálico que está por debajo de 200 mg/L.

En la presente invención, la fórmula que comprende glicomacropéptido de caseína puede ser administrada al

infante humano por cualquier tipo de administración enteral. Como se usa aquí, la administración enteral incluye administración de una fórmula a cualquier punto del tracto GI del infante, e incluye sin limitación, administración oral y administración tubular enteral.

5 Aunque el glicomacropéptido de caseína puede ser administrado a un infante humano como es, y sin ningún compuesto o material de acompañamiento, es útil suministrar el CGMP como un ingrediente de una fórmula. La fórmula que comprende glicomacropéptido de caseína puede ser cualquier forma nutricional, pero preferiblemente es una fórmula infantil. En algunas realizaciones, la fórmula infantil es una fórmula infantil nutricionalmente completa que comprende carbohidratos, lípidos y proteína. La fórmula infantil para uso en la presente invención puede ser nutricionalmente completa, o puede ser una fórmula de suplemento. Típicamente, la fórmula contiene 10 tipos y cantidades adecuados de lípidos, carbohidratos, proteínas, vitaminas y minerales. Típicamente, la cantidad de lípidos o grasas puede variar desde 3 hasta 7 g/100 kcal. Típicamente la cantidad de proteínas puede variar desde 1 hasta 5g/100 kcal. La cantidad de carbohidratos puede variar típicamente desde 6 hasta 16 g/100 kcal.

Como se usa aquí como el término "fórmula" significa una composición hecha por el hombre, y no debe interpretarse que incluye leche materna, por ejemplo.

15 Las fuentes de proteína pueden ser cualquier usada en la técnica, y pueden incluir, por ejemplo, leche descremada, proteína de suero, caseína, proteína de soya, proteína hidrolizada y aminoácidos. Las fuentes de lípidos pueden ser cualquiera usadas en la técnica tales como, por ejemplo, aceites vegetales tales como aceite de palma, aceite de soja, aceite de oleína de palma, aceite de maíz, aceite de canola, aceite de coco, aceites de triglicéridos de cadena media, aceite de girasol alto en ácido oleico y aceite de cártamo alto en ácido oleico. Las fuentes de 20 carbohidrato pueden ser cualquiera conocida en la técnica tal como, por ejemplo, lactosa, polímeros de glucosa, sólidos de jarabe de maíz, maltodextrinas, sacarosa, almidón y sólidos de jarabe de arroz.

De modo conveniente, varias fórmulas infantiles disponibles comercialmente pueden ser usadas como la fórmula básica para la adición de CGMP. Por ejemplo, Enfamil® Lipil con hierro (disponible de Mead Johnson & Company, Evansville, Indiana, EEUU) puede ser suplementada con una cantidad efectiva de CGMP y usada para practicar el 25 método de la presente invención. Las fórmulas infantiles particulares adecuadas para uso en la presente invención son descritas por ejemplo aquí.

La proteína total en la formulación de todas las fuentes de proteínas debería ser nutricionalmente apropiada para infantes, lo cual es 12 g por litro a 18 g por litro y, en algunas realizaciones, puede ser 14 g por litro. El ácido siálico total en la formulación puede estar entre 200 y 1500 mg por litro. Se prefiere que la presente fórmula 30 comprenda un líquido que tiene una concentración de ácido siálico de por lo menos 200 mg/litro. En algunas realizaciones, se prefiere más que la fórmula comprenda un líquido que tiene un nivel de ácido siálico de al menos 300 mg/litro, y es aún más preferido un nivel de ácido siálico de al menos 600 mg/litro. Se prefiere que la fórmula contenga hasta 6 g por litro de glicomacropéptido de caseína (CGMP) o fracción relacionada de proteína, como se obtiene comercialmente de diferentes fuentes, que contienen 81% de proteína y entre 40 y 300 mg de ácido siálico 35 por gramo de proteína, pero típicamente entre 40 y 60 mg de AS/gm de proteína, y, así, contribuyendo entre 194 y 1458 mg de ácido siálico por litro de fórmula, pero típicamente entre 194 y 290 mg AS/litro de formula; o hasta 6 g/litro de una fracción de CGMP que tiene un nivel mejorado de ácido siálico.

El glicomacropéptido de caseína que es útil en la presente invención, en general, puede ser de cualquier fuente y de cualquier pureza o grado que es adecuado para uso nutricional, o para inclusión en una fórmula infantil. El 40 glicomacropéptido de caseína puede ser extraído de la leche usando procesos adecuados. Por ejemplo, el glicomacropéptido de caseína puede ser extraído de la fracción retenida obtenida de la concentración de proteína de suero. Esto puede ser hecho mediante remoción al menos parcial de lactosa de la fracción retenida y añadiendo luego etanol para causar la precipitación. El sobrenadante es entonces recolectado y secado para suministrar el glicomacropéptido de caseína. El documento de EEUU No. 5,216,129 suministra una descripción más detallada de este proceso. El CGMP que es útil en el presente método puede ser producido también de acuerdo con las 45 técnicas descritas en los documentos de EEUU Nos. 6,555,659, 5,280,107, 5,968,586, y 5,075,424, y en PCT/US94/15952, y WO 03/049547. De modo alternativo, el CGMP puede ser comprado de fuentes comerciales tales como, por ejemplo, The Tatua Co-Operative Dairy Company Limited, Tatuani, Morrinsville, Nueva Zelanda, MD Foods Ingredients amba de DK-6920 Videbaek, Dinamarca o de DMV International de NCB-Iaan 80, NL-5460 50 BA Veghel, Países Bajos.

En el presente método, se prefiere que el glicomacropéptido de caseína, o la fórmula que comprende glicomacropéptido de caseína, sea administrada en una cantidad suficiente para suministrar 100 mg de ácido siálico /kg/día al mamífero, y en algunas realizaciones, se prefiere más la provisión de 200 mg de ácido siálico/kg/día al mamífero.

55 En una realización de la presente invención, se prefiere que la fórmula tenga un contenido total de proteína de

entre 12 y 16 gramos/litro de los cuales no más de 40% en peso es suministrado por glicomacropéptido de caseína. Se prefiere más que la fórmula comprenda un contenido total de proteína de entre 13 y 15 gramos/litro de los cuales no más de 30% son suministrados por glicomacropéptido de caseína. En una realización, el contenido de proteína de la fórmula es suministrado por glicomacropéptido de caseína y proteína de soja.

5 Algunas de las realizaciones de la presente invención involucran el uso de novedosos productos de CGMP que contienen niveles de ácido siálico, que son mayores a los normalmente hallados en productos estándar de CGMP que están comercialmente disponibles. Estos productos novedosos pueden ser usados solos o en combinación para alcanzar niveles de ácido siálico que imitan los hallados en la leche materna, con base en el contenido de ácido siálico de los diversos ingredientes fuente. En una realización, el glicomacropéptido de caseína comprende un glicomacropéptido de caseína que tiene una concentración mejorada de ácido siálico.

10 Como se usan aquí, los términos "CGMP que tiene una concentración mejorada de ácido siálico" indican una fracción que contiene glicomacropéptido de caseína (CGMP) de leche, que ha sido tratada para incrementar el nivel de ácido siálico, y en la cual el nivel de ácido siálico es más alto, en cualquier cantidad, que antes del tratamiento. Los productos de CGMP con niveles mejorados de ácido siálico son descritos abajo en los ejemplos de referencia 2 y 3.

15 Un producto así, un ejemplo del cual es descrito en el ejemplo de referencia 2, puede ser denominado aquí como "CGMP que tiene un nivel mejorado de ácido siálico", o "CGMP alto en ácido siálico". El CGMP alto en ácido siálico tiene un contenido de ácido siálico superior a aproximadamente 60 mg/gm de proteína. Se prefiere que el contenido de ácido siálico esté por encima de aproximadamente 100 mg/gm de proteína, más preferido está por encima de aproximadamente 150 mg/gm de proteína, y aún más preferido es un contenido de ácido siálico por encima de 200 mg/gm de proteína. Típicamente, este producto tiene un contenido de proteína de 50% - 60% en peso para un producto en polvo seco, un contenido de ácido siálico de 190 - 230 mg/gm de proteína, o por encima de 100-130 mg/gm de polvo. En comparación, el polvo seco regular de CGMP (por ejemplo, glicomacropéptido disponible de Tatura Co-Operative Dairy Company Limited) contiene 81% de proteína en peso, y tiene un contenido de ácido siálico de 52 mg/gm de proteína, o 42 mg/gm de polvo. Por ello, es aparente que el contenido de ácido siálico de CGMP alto en ácido siálico ha sido mejorado sobre el del polvo de glicomacropéptido regular en aproximadamente 3 veces sobre la base del polvo seco, y 4 veces sobre la base del contenido de proteína de los productos. Para propósitos de comparación, el suero en polvo electrodiálizado (ED) contiene 14% de proteína sobre una base seca, y contiene 30 mg de ácido siálico/gm de proteína, o 4.3 mg de ácido siálico/gm de polvo.

20 Una ventaja de usar un CGMP alto en ácido siálico como una fuente de proteína en una fórmula infantil, es que el contenido de ácido siálico de la fórmula puede ser aumentado sin reemplazar una calle indebida de las fuentes convencionales de proteína que son usadas en la fórmula. Este rasgo es útil en que permite una interrupción mínima del perfil de aminoácidos de la proteína en la fórmula.

25 En una realización particular de un CGMP alto en ácido siálico, el producto tiene un nivel del aminoácido treonina que es inferior al nivel de aquel aminoácido en el glicomacropéptido del cual se deriva el producto novedoso. Como se usa aquí, este tipo de CGMP alto en ácido siálico es denominado como "CGMP que tiene un nivel mejorado de ácido siálico y treonina reducida", o "CGMP alto en ácido siálico con treonina reducida". Un ejemplo de este tipo de producto es descrito abajo en el ejemplo de referencia 3.

30 CGMP alto en ácido siálico con treonina tiene un contenido de ácido siálico superior a 60 mg/gm de proteína y una concentración de treonina que es inferior a 15 gm/16 gm de nitrógeno. Se prefiere que el contenido de ácido siálico esté por encima de 100 mg/gm de proteína, más preferido un contenido por encima de 150 mg/gm de proteína, y más preferido aún un contenido de ácido siálico por encima de 200 mg/gm de proteína. Típicamente, CGMP alto en ácido siálico con treonina reducida puede tener un contenido de ácido siálico desde 85 a 150 mg de ácido siálico (SA)/gramo de polvo, preferiblemente desde 90 a 140 mg SA/g de polvo, el cual es comparable con el contenido de ácido siálico de CGMP alto en ácido siálico. Sin embargo, el contenido de treonina de CGMP alto en ácido siálico con treonina reducida es sólo aproximadamente un cuarto de un producto CGMP comercial. Preferiblemente, el contenido de treonina está por debajo de aproximadamente 10 g/16 g de nitrógeno, más preferiblemente por debajo de 7 gm/16 gm de nitrógeno, incluso más preferiblemente por debajo de 5 g/16 g de nitrógeno, y aún más preferiblemente por debajo de 4 g/16 g de nitrógeno. Expresado de una forma alternativa, el contenido de treonina está por debajo de 8% en peso del peso total de aminoácidos de la proteína, preferiblemente por debajo de 6%, más preferiblemente por debajo de 4%, y aún más preferiblemente por debajo de 3%.

35 Una ventaja suministrada por este tipo de producto con ácido siálico mejorado es que adicionalmente al incremento en ácido siálico con reducida interrupción del perfil de aminoácidos, como se discutió anteriormente, puede controlarse el nivel de treonina de las fuentes de proteína en la fórmula infantil. Esto es deseable en algunas realizaciones con objeto de reducir o eliminar el potencial de hipertreoninuria, u otros desórdenes causados por, o exacerbados por, elevados niveles de treonina en la dieta.

5 A modo de ejemplo, una fórmula infantil que es útil en la presente invención puede ser formulada para que tenga un contenido de ácido siálico de al menos 200 mg/litro y tenga un contenido total de proteína de entre 12 y 16 gramos/litro los cuales no más de 40% en peso son suministrados por un CGMP que tiene una concentración mejorada de ácido siálico. Preferiblemente, tal fórmula infantil tiene un contenido total de proteína de entre 13 y 15 gramos/litro de los cuales no más de 30% en peso son suministrados por un CGMP que tiene una concentración elevada de ácido siálico, más preferiblemente, la fórmula infantil tiene un contenido total de proteína de entre 13 y 15 gramos/litro de los cuales no más de 15% en peso son suministrados por un CGMP que tiene una concentración mejorada de ácido siálico.

10 También como un ejemplo, una fórmula infantil que es útil en la presente invención puede ser formulada para que tenga un contenido de ácido siálico de al menos 400 mg/litro y tenga un contenido total de proteína de entre 13 y 15 gramos/litro de los cuales no más de 15% en peso son suministrados por un CGMP que tiene una concentración mejorada de ácido siálico.

15 Las fórmulas suplementadas con glicomacropéptido de caseína que son útiles en la presente invención pueden ser usadas de la misma manera que cualquier otra fórmula infantil comercial. Pueden ser producidas en forma de polvo, para posterior reconstitución con un líquido, o pueden ser preparadas en forma líquida. La fórmula debería estar empacada, almacenada, manipulada y distribuida de la misma forma que cualquier otro producto similar, y debería, en general, ser usada del mismo modo.

20 Los siguientes ejemplos describen realizaciones que sirven de ejemplo de la invención. Se pretende que la especificación, junto con los ejemplos, sean considerados sólo como ejemplos. En los ejemplos, todos los porcentajes son dados sobre base en peso, a menos que se indique de otro modo.

Ejemplo de referencia 1.

Este ejemplo ilustra los componentes nutrientes en una fórmula infantil comercial adecuada para adición de ácido siálico, para uso en la presente invención.

Tabla 1: información de nutrientes para fórmula infantil (Enfamil® Lipil con hierro)

Nutrientes (dilución normal)	Por 100 calorías (5 onzas)
Proteína, g	2.1
Grasa, g	5.3
Carbohidrato, g	10.9
Agua, g	134
Ácido linoleico, mg	860
Vitaminas:	
A, IU	300
D, IU	60
E, IU	2
K, µg	8
Tiamina (Vitamina B1), µg	80
Riboflavina (Vitamina B2), µg	140
B6, µg	60
B12, µg	0.3
Niacina, µg	1000
Ácido fólico (Folacina), µg	16
Ácido pantoténico, µg	500

ES 2 576 255 T3

Biotina, µg	3
C (Ácido ascórbico), mg	12
Colina, mg	12
Nutrientes (dilución normal)	Por 100 calorías (5 onzas)
Inositol, mg	6
Minerales:	
Calcio, mg	78
Fósforo, mg	53
Magnesio, mg	8
Hierro, mg	1.8
Zinc, mg	1
Manganeso, µg	15
Cobre, µg	75
Yodo, µg	10
Selenio, µg	2.8
Sodio, mg	27
Potasio, mg	108
Cloruro, mg	63

- Los ingredientes de esta fórmula particular son: suero reducido en minerales, leche descremada, aceite vegetal (oleína de palma, aceites de soja, coco y de girasol alto en oleico), lactosa, y menos de 1%: aceite alpina mortierella, aceite crypthecodinio cohnii, palmitato de vitamina A, vitamina D3, acetato de vitamina E, vitamina K1, clorhidrato de tiamina, clorhidrato de vitamina B6, vitamina B12, niacinamida, ácido fólico, pantotenato de calcio, biotina, ascorbato de sodio, inositol, cloruro de calcio, fosfato de calcio, sulfato ferroso, sulfato de zinc, sulfato de manganeso, sulfato cúprico, cloruro de sodio, citrato de sodio, hidróxido de potasio, selenito de sodio, taurina, nucleótidos (adenosina 5'-monofosfato, citidina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato de disodio, uridin 5'-mono fosfato de disodio).
- 5
- 10 Para usar esta fórmula particular para practicar la presente invención sería necesario añadir a la fórmula, por ejemplo, glicomacropéptido de caseína en una cantidad suficiente para asumir desde aproximadamente 250 mg por litro hasta aproximadamente 1500 mg por litro de ácido siálico, a la composición descrita en la Tabla 1. Esta cantidad añadida de ácido siálico sería parte de la cantidad total proteína (proteína de aproximadamente 2.1 gramos por 100 calorías).
- 15 Ejemplo 1.
- Este ejemplo ilustra una combinación de fuente particular de proteína para un contenido total de ácido siálico de aproximadamente 250 mg por litro. Los ingredientes listados en Tabla 2 serían usados para reemplazar el componente de proteína de la fórmula descrita en la Tabla 1.

Tabla 2: Composición de Fuente de Proteína A

Ingrediente	mg SA/ Proteína ^a	gm	% de Proteína en ingrediente	g ingrediente/ L	g proteína/ L	mg SA/ L
Concentrado de proteína de suero	23.00		35.00	20.26	7.09	163.08

ES 2 576 255 T3

Ingrediente	mg SA/ Proteína ^a gm	% de Proteína en ingrediente	g ingrediente/ L	g proteína/ L	mg SA/ L
Leche en polvo descremada, bajo calor	6.37	34.00	15.38	5.23	33.31
Ingrediente	mg SA/ Proteína ^a gm	% de Proteína en ingrediente	g ingrediente/ L	g proteína/ L	mg SA/ L
CGMP ^b	52.00	81.00	1.45	1.17	61.07

Nota: a. "SA" en la Tabla significa ácido siálico.
b. CGMP significa Glicomacropéptido de caseína.

Ejemplo 2.

5 Este ejemplo ilustra una combinación de fuente particular de proteína para un contenido total de ácido siálico de aproximadamente 360 mg por litro. Los ingredientes listados en la tabla 3 reemplazan el componente de proteína de la fórmula descrita en la tabla 1.

Tabla 3: Composición B de fuente de proteína

Ingrediente	mg SA/ proteína ^a gm	% de Proteína en ingrediente	g ingrediente/ L	g proteína/ L	mg SA/ L
Concentrado de proteína de suero	23.00	35.00	37.00	12.95	297.85
CGMP ^b	52.00	81.00	1.45	1.17	61.07

Nota: a. "SA" en la Tabla significa ácido siálico.
b. CGMP significa glicomacropéptido de caseína.

Ejemplo 3.

10 Este ejemplo ilustra una combinación de fuente particular de proteína para un contenido total de ácido siálico de aproximadamente 600 mg por litro. Los ingredientes listados en la tabla 4 reemplazan el componente de proteína de la fórmula descrita en la tabla 1.

Tabla 4: Composición B de fuente de proteína

Ingrediente	mg SA/ proteína ^a gm	% de Proteína en ingrediente	g ingrediente/ L	g proteína/ L	mg SA/ L
Concentrado de proteína de suero	23.00	35.00	13.00	4.55	104.65
CGMP ^b	52.00	81.00	12.00	9.72	505.44

Nota: a. "SA" en la Tabla significa ácido siálico.
b. CGMP significa glicomacropéptido de caseína.

Ejemplo 4.

15 La Tabla 5 ilustra un ejemplo de una formulación nutricional completa de una fórmula infantil con un contenido total de ácido siálico de aproximadamente 250 mg por litro.

ES 2 576 255 T3

Tabla 5: Formulación infantil de ejemplo con ácido siálico.

Ingrediente	Peso	Composición B de fuente de cantidad por 10.000 litros
Lactosa (95% Sólidos)		573.000 kg
Mezcla de grasa		332.500 kg
Concentrado de proteína de suero (36% de proteína, 5.8% de cenizas)		202.578 kg
Sólidos lácteos no grasos (36% de prot., 52% de CHO)		153.844 kg
Glicomacropéptido de caseína (CGMP, 81.18% de prot.)		14.500 kg
Mono- y diglicéridos		7.233 kg
Fosfato tribásico de calcio		6.520 kg
Aceite de ácido araquidónico de celda individual		6.485 kg
Premezcla seca de vitamina para Enfamil AR líquido		5.250 kg
Ácido ascórbico	2924.250 g	
Inositol	834.750 g	
Sólidos de jarabe de maíz	654.938 g	
Taurina	582.750 g	
Niacinamida	119.438 g	
Pantotenato de calcio	44.730 g	
Vitamina B12, 0.1% en almidón	29.400 g	
Biotina, 1 % trituración	25.095 g	
Clorhidrato de tiamina	13.913 g	
Riboflavina	10.238 g	
Clorhidrato de piridoxina	8.138 g	
Ácido fólico	2.363 g	
Concentrado de lecitina		3.694 kg
Citrato de potasio		3.350 kg
Aceite de ácido docosahexaenoico de celda individual		3.243 kg
Pre mezcla de nucleótido para Enfamil en polvo		2.900 kg

ES 2 576 255 T3

Maltodextrina, 15 DE	2552.290 g	
Citidina 5'-monofosfato, ácido libre	202.710 g	
Uridina 5'-monofosfato, sal de sodio	59.740 g	
Adenosina 5'-monofosfato, ácido libre	47.357g	
Ingrediente	Peso	Composición B de fuente de cantidad por 10.000 litros
Guanosina 5'-monofosfato, sal de sodio	37.903 g	
Carragenina		2.826 kg
Cloruro de magnesio		1.657 kg
Cloruro de calcio, Dihidrato		1.200 kg
Cloruro de colina		0.700 kg
Sulfato ferroso heptahidrato		0.682 kg
Citrato de sodio, dihidrato, granular		0.455 kg
Premezcla de minerales traza w/selenito trituración		0.392 kg
Sulfato de zinc, monohidrato	276.238 g	
Selenito de sodio, trituración, 0.5%	65.907 g	
Sulfato cúprico, polvo	29.510 g	
Lactosa, molienda A	16.323 g	
Sulfato de manganeso, monohidrato	4.022 g	
Premezcla de vitamina A,D,E,K Enfamil líquido		0.324 kg
Acetato de tocoferol	160.882 g	
Aceite de soja	139.612 g	
Palmitato de vitamina A	17.253 g	
Concentrado de colecalciferol	5.715 g	
Vitamina K1, líquida	0.538 g	
Ácido ascórbico		0.150 kg
L-Carnitina		0.150 kg
Agua, desfluorada, q.s. hasta		10310.986 kg
Hidróxido de potasio		---

La Tabla 6 y la Tabla 7 muestran el contenido de componentes específicos de la población descrita en la Tabla 5 como un porcentaje de 1) peso a peso, 2) peso a volumen, y 3) calorías. La gravedad específica de esta formulación particular es 1.0310986.

Tabla 6: Composición de formulación infantil.

Componente	% peso/peso	% peso/volumen
Proteína	1.38	1.42
Grasa	3.50	3.61
Componente	% peso/peso	% peso/volumen
Carbohidrato	7.20	7.43
Cenizas	0.37	0.38
Sólidos totales	12.45	12.84

Tabla 7: Distribución calórica de fórmula infantil

Componente	%
Proteína	8.38
Grasa	47.83
Carbohidrato	43.79

Ejemplo 5.

- 5 La Tabla 8 ilustra el contenido nutricional de la formulación presentada en el ejemplo 4 por 100 calorías, así como por 100 mililitros de fórmula.

Tabla 8: contenido nutricional de formulación infantil.

	Por 100 Cal	Por 100 ml
Calorías, Cal	100	68
Proteína, g	2.1	1.42
Grasa, g	5.3	3.6
Carbohidrato, g	10.9	7.4
Ácido linoleico, mg	860	580
Ácido linolénico, mg	80	54
Ácido araquidónico, mg	34	23
Ácido docosahexaenoico, mg	17	11.5
Vitamina A, IU	300	200
Vitamina D, IU	60	41
Vitamina E, IU	2	1.35
Vitamina K1, mcg	12	8.1
Tiamina, mcg	120	81
Riboflavina, mcg	140	95

ES 2 576 255 T3

Vitamina B6, mcg	60	41
Vitamina B12, mcg	0.5	0.3
Niacina, mcg	1200	812
	Por 100 Cal	Por 100 ml
Ácido fólico, mcg	16	10.8
Ácido pantoténico, mcg	500	340
Biotina, mcg	3	2
Vitamina C, mg	14	9.5
Colina, mg	12	8.1
Inositol, mg	6	4.1
Taurina, mg	6	4.1
L-Carnitina, mg	2	1.35
Calcio, mg	78	53
Fósforo, mg	53	36
Magnesio, mg	8	5.4
Hierro, mg	1.8	1.2
Zinc, mg	1	0.68
Manganeso, mcg	26	17.6
Cobre, mcg	85	57
Yodo, mcg	15	10
Sodio, mg	27	18.3
Potasio, mg	108	73
Cloruro, mg	63	43
Selenio, mcg	2.8	1.89
Ácido siálico, mg	37	25
Relación calcio/fósforo	---	---
Equivalentes de AMP, mg (a)	0.5	0.34
Equivalentes de CMP, mg (a)	2.5	1.69
Equivalentes de GMP, mg (a)	0.3	0.20
Equivalentes de UMP, mg (a)	0.9	0.61
Equivalentes de nucleótido, mg (a)	4.2	2.84

ES 2 576 255 T3

TPAN-AMP, mg	--	--
TPAN-CMP, mg	--	--
	Por 100 Cal	Por 100 ml
TPAN-GMP, mg	--	--
TPAN-UMP, mg	--	--
Total TPAN, mg	--	--
Relación TPAN-CMP/TPAN-GMP	--	--
Nota: suma de nucleótido y el nucleósido correspondiente expresado como pesos de nucleótido.		

Ejemplo de referencia 2.

Este ilustra la producción de un producto de CGMP que tienen niveles mejorados de ácido siálico.

5 Una fracción de suero de queso que está enriquecida con GMP es fraccionada usando cromatografía aniónica para dar una fracción que está mejorada en ácido siálico. Este producto exhibe un perfil de aminoácidos similar al que es comúnmente disponible comercialmente de GMP (disponible de Tatua Co-Operative Dairy Company Limited, Tatuani, Morrinsville, Nueva Zelanda), pero contiene de 1.5 - 3 veces el contenido de ácido siálico de los productos GMP comúnmente disponibles.

10 A la fracción mejorada en ácido siálico pueden retirarse las sales, si se desea, por electrodiálisis, por ejemplo y puede ser secada para dar un producto en polvo seco, que es utilizable entonces para la introducción dentro de una mezcla de fórmula infantil líquida o seca. Este producto es un CGMP alto en ácido siálico y está disponible a partir de la fecha de registro del presente documento, de Tatua Co-Operative Dairy Company Limited, como productos designados como X4738, X4739, X4740, y X4741. El contenido de proteína, contenido de ácido siálico, y perfil de aminoácidos en aquellos materiales es descrito en la Tabla 9.

15 Tabla 9: Perfil de aminoácidos y contenido de ácido siálico de cuatro ejemplos de productos de CGMP alto en ácido siálico.

Aminoácido	Muestras de producto CGMP alto en ácido siálico				Promedio	Polvo de CGMP	Suero en polvo ED
	X4738	X4739	X4740	X4741			
Arginina	1.22	0.96	0.69	0.7	0.89	1.4	
Histidina	0.76	0.7	0.59	0.59	0.66	1	
Isoleucina	10.36	8.42	11.28	11.51	10.39	11.6	
Leucina	4	3.36	3.19	3.21	3.44	4.6	
Lisina	7.48	7.91	6.89	7.08	7.34	8.3	
Metionina	2	2.04	1.63	1.63	1.83	1.5	
Cistina	0.21	0.47	0.13	0.09	0.23	0.2	
Fenilalanina	1.54	5.88	1.96	2.08	2.87	1.8	
Tirosina	0.35	0.17	0.1	0.09	0.18	0.4	
Treonina	13.13	15.16	17.18	17.57	15.76	15.9	

ES 2 576 255 T3

Triptofano	0	0	0	0	0.00	0	
Valina	8.69	7.55	9.38	9.51	8.78	9.7	
	X4738	X4739	X4740	X4741	Promedio	Polvo de CGMP	Suero en polvo ED
Alanina	6.8	6.58	6.41	6.53	6.58	6.6	
Ácido aspártico	10.61	12.12	9.93	10	10.67	11.1	
Ácido glutámico	22.91	24.23	23.28	23.14	23.39	26.2	
Glicina	1.37	1.46	1.31	1.34	1.37	1.5	
Prolina	11.13	10.19	10.78	9.57	10.42	14.1	
Serina	8.14	9.66	8.74	9.06	8.90	8.1	
TOTAL	110.7	116.86	113.47	113.7	113.68	124.1	
% de proteína	51.88	49.92	57.87	60.05	54.93	81	14.31
mgSA/gm de proteína	188.43	227.25	224.83	215.68	214.05	52	29.92
mgSA/gm de polvo	97.76	113.44	130.11	129.52	117.71	42.12	4.28
Promedio							
Los niveles de aminoácidos están expresados como gramos del aminoácido por 16 gramos de nitrógeno.							
El polvo de CGMP es glicomacropéptido comercial de Tatua Co-Operative Dairy Company Ltd.							
Suero en polvo ED es suero en polvo electrodiализado comercial							
Las muestras X4738 - X4741 son muestras de CGMP alto en ácido siálico disponible de Tatua Co-Operative Dairy Company Limited, Tatuani, Morrinsville, Nueva Zelanda.							

Ejemplo de referencia 3.

Este ilustra la producción de un producto de CGMP que tienen niveles mejorados de ácido siálico y bajos niveles de treonina.

- 5 Una fracción de suero de queso que es enriquecida en GMP es sometida a una hidrólisis proteolítica parcial, seguida por fraccionamiento usando cromatografía aniónica para dar una fracción mejorada en ácido siálico y tiene un contenido bajo de treonina. Este producto contiene de 1.5 - 3 veces el contenido de ácido siálico de los productos de GMP disponibles corrientemente, pero el nivel de treonina es reducido hasta aproximadamente un cuarto del material de GMP de partida.
- 10 A la fracción mejorada en ácido siálico, con baja fracción de treonina pueden retirarse las sales, si se desea, por

ES 2 576 255 T3

electrodialisis, por ejemplo, y puede ser secada para dar un producto en polvo seco, que es entonces utilizable para introducción en una mezcla de fórmula infantil líquida o sólida. Este producto es un CGMP alto en ácido siálico con treonina reducida y está disponible desde la fecha de registro del presente documento, de Tatura Co-Operative Dairy Company Limited, Taturaui, Morrisville, Nueva Zelanda, como producto designado como W4733.

- 5 El contenido de proteína, contenido de ácido siálico, y perfil de aminoácidos de aquel material son descritos en la Tabla 10.

Tabla 10: Perfil de aminoácidos y contenido de ácido siálico de CGMP alto en ácido siálico con treonina reducida.

	CGMP alto en ácido siálico con treonina reducida		
	W4733	Polvo CGMP	Suero en polvo ED
Arginina	2.3	1.4	
Histidina	0	1	
Isoleucina	13.1	11.6	
Leucina	5.3	4.6	
Lisina	3.2	8.3	
Metionina	0.7	1.5	
Cistina	0.1	0.2	
Fenilalanina	0	1.8	
Tirosina	0	0.4	
Treonina	3.8	15.9	
Triptofano	0	0	
Valina	16.3	9.7	
Alanina	15.9	6.6	
Ácido aspártico	6.3	11.1	
Ácido glutámico	38.9	26.2	
Glicina	2.5	1.5	
Prolina	16.9	14.1	
Serina	0	8.1	
TOTAL	125.4	124.1	
% de proteína		81	14.31
mgSA/gm de proteína		52	29.92

ES 2 576 255 T3

mgSA/gm polvo	de	138.03	42.12	4.28
(Análisis repetido)		117.02		
Promedio		127.525		
		W4733	Polvo CGMP	Suero en polvo ED
Los niveles de aminoácidos están expresados como gramos de aminoácidos por 16 g de nitrógeno				
El polvo de CGMP es glicomacropéptido comercial de Tatua Co-Operative Dairy Company Ltd.				
Suero en polvo ED es suero en polvo comercial electrodiализado				
Las muestras W4731, W4733, y W4735 son muestras de CGMP alto en ácido siálico con treonina reducida disponible de Tatua Co-Operative Dairy Company Limited, Tatanui, Morrinsville, Nueva Zelanda.				

- 5 Se nota que el nivel de treonina del producto novedoso es aproximadamente un cuarto del de CGMP comercial. De acuerdo con ello, se cree que el uso de un CGMP alto en ácido siálico con treonina reducida en una fórmula infantil, puede suministrar una fórmula que tiene un elevado nivel de ácido siálico a niveles normales, deseables de proteína de aproximadamente 14 g proteína/litro, y aún suministrar un perfil deseado de aminoácidos y bajos niveles de treonina.

Ejemplo 6.

Este ilustra el uso de una fracción de CGMP que tiene niveles mejorados de ácido siálico en una fórmula infantil.

- 10 El producto de CGMP que tiene niveles mejorados de ácido siálico puede ser usado como una fuente de proteína en una fórmula infantil, del mismo modo que suero en polvo o polvo de CGMP normal. A modo de ejemplo, la Tabla 11 muestra el contenido de ácido siálico que podría esperarse para una fórmula infantil en la cual el contenido de proteína es suministrado por fuentes convencionales. La cantidad de polvo de CGMP que es usada es limitada, con objeto de evitar desviaciones indebidas del perfil de aminoácidos de la proteína que es suministrada de un perfil estándar infantil deseado.

- 15 Tabla 11: Contenido de ácido siálico en la fórmula infantil con proteína suministrada por fuentes convencionales:

Fuente de proteína	mg ácido siálico/ gm de proteína	Porcentaje de proteína	Gramos de proteína/litro	mg ácido siálico/litro
Concentrado de proteína de suero	23	35%	6.82	156.77
Leche en polvo descremada, bajo calor	6.37	34%	6.25	39.8
CGMP en polvo	52	81%	1.11	57.62
Total			14.17	254.18

- 20 El CGMP en polvo que es usado en esta formulación puede ser reemplazado por el producto novedoso de CGMP que tiene un nivel mejorado de ácido siálico, como se describe arriba en el ejemplo de referencia 3. La Tabla 12 muestra que cuando esto se hace, el contenido de ácido siálico de la formulación es más que doblado sin interrupción adicional del perfil de aminoácidos de la proteína.

Tabla 12: contenido de ácido siálico de fórmula infantil con proteína suministrada por fuentes convencionales, más un producto de CGMP que tiene un nivel mejorado de ácido siálico:

Fuente de proteína	mg ácido siálico/ gm de proteína	Porcentaje de proteína	Gramos de proteína/litro	mg ácido siálico/litro
Concentrado de proteína de suero	23	35%	6.82	156.77
Fuente de proteína	mg ácido siálico/ gm de proteína	Porcentaje de proteína	Gramos de proteína/litro	mg ácido siálico/litro
Leche en polvo descremada, bajo calor	6.37	34%	6.25	39.8
Producto de CGMP mejorado en ácido siálico	214	54.93%	1.11	237.54
Total			14.17	434.12

Si los polvos de CGMP que tienen niveles mejorados de ácido siálico fueran a ser usados al doble de los niveles descritos arriba, a costa de la leche en polvo descremada, el contenido de ácido siálico de la fórmula podría incrementarse hasta el nivel mostrado en la Tabla 13.

- 5 Tabla 13: Contenido de ácido siálico de fórmula infantil, con proteína suministrada por fuentes convencionales más un producto de CGMP con un nivel mejorado de ácido siálico:

Fuente de proteína	mg ácido siálico/ gm de proteína	Porcentaje de proteína	Gramos de proteína/litro	mg ácido siálico/litro
Concentrado de proteína de suero	23	35%	6.82	156.77
Leche en polvo descremada, bajo calor	6.37	34%	5.14	32.74
Producto de CGMP mejorado en ácido siálico	214	54.93%	2.22	475.08
Total			14.18	664.59

Ejemplo 7.

- 10 Este ejemplo ilustra la eficacia de una dieta que contiene glicomacropéptido de caseína, sobre el comportamiento de aprendizaje y memoria de lechones.

Métodos

Animales

- 15 Durante un periodo de 20 meses, se compraron a una porqueriza comercial lechones domésticos machos de 3 días (*Sus scrofa*) que pesaban de 1.5 a 2.4 kg de 14 diferentes camadas. Ellos fueron clasificados de acuerdo con el peso y destinados aleatoriamente a 1 de 4 tratamientos. Los lechones fueron alojados en pares de acuerdo con el tratamiento, en corrales de alambre con suelo de concreto en una sala de temperatura controlada. Los corrales hogar contenían un "nido" (una rueda de caucho cubierta con una toalla), una lámpara de calentamiento y un juguete idéntico de plástico. Los lechones fueron animados a usar el extremo más lejano del corral como un sanitario y los corrales fueron limpiados diariamente. Las luces se mantuvieron sobre un ciclo de 12 horas de luz (8 am - 8 pm)/oscuridad (8 pm - 8 am).
- 20

Suplementación con CGMP

- 25 El glicomacropéptido de caseína (CGMP) que contenía 60 mg/g de ácido siálico fue suministrado por Tatura Dairy Cooperative (Morrinsville, Nueva Zelanda) y mezclado dentro del alimento de reemplazo de leche de los cerdos, a niveles especificados por Wombaroo Food Products (Glen Osmond, Australia). La cantidad de ácido siálico en la leche final varió de acuerdo al grupo: 77 mg/L (grupo 1, el grupo de control sin CGMP añadido), 250 mg/L (grupo

2, dosis baja), 600 mg/L (grupo 3, dosis media) y 842 mg/L (grupo 4, dosis más alta). Estos niveles representaron una ingesta de 25, 71, 171 y 240 mg/kg de peso corporal/día respectivamente. Los alimentos de reemplazo fueron formulados de modo que la ingesta total de proteína permaneció igual, independientemente de la cantidad añadida de CGMP. Para mantener las velocidades normales de crecimiento, los lechones recibieron 285 ml de leche/kg en las primeras 2 semanas del estudio y 230 ml/kg en las semanas restantes. Los tiempos de alimentación fueron a las 8:00, 13:00, 18:00 y 22.30, con un extra de 50 ml de leche suministrados en la noche. Se registraron diariamente peso corporal, ingesta de leche y medicación.

Evaluación de la habilidad de aprendizaje y desempeño de la memoria

Las pruebas formales de aprendizaje comenzaron a los 23 días de edad usando un laberinto radial de 8 brazos (FIG. 1 y FIG.2). El laberinto era una estructura de madera construida para el propósito, ubicada en un área de aprendizaje (4.2 m x 4.4 m) adyacente a los corrales hogar. Se instaló una cámara de video encima, para registrar las pruebas de aprendizaje y memoria. Con objeto de reducir la tensión, se permitió que los pares de lechones exploraran el laberinto un día antes del inicio de la prueba formal. Se ejecutaron dos pruebas de aprendizaje: misión 1 y misión 2. Ambas pruebas tenían leche accesible en un brazo, y leche inaccesible en los restantes 7 brazos, tal que todos los 8 brazos del laberinto dieron la misma señal olfativa. En ambas pruebas, se colocó aleatoriamente una señal visual consistente en 3 puntos negros, sobre una puerta con leche accesible en el brazo (FIG. 3). En la misión 1 (la misión fácil), se colocó un punto negro en las 7 puertas restantes. En la misión 2 (la más difícil), se colocaron dos puntos negros en las 7 puertas restantes.

Todos los lechones fueron probados en el laberinto de manera individual. Se realizaron 40 ensayos de la misión 1 durante 5 días (8 ensayos/día) y 40 ensayos de la misión 2 por 6 días. La evaluación de la velocidad de aprendizaje fue determinada como el número de ensayos tomados para aprender de manera exitosa la señal visual y el número de errores (puerta equivocada) y éxitos (puerta correcta) para hallar el brazo con leche accesible durante cada ensayo. Se registró un error cada vez que el lechón ingresó o colocó la totalidad de su cabeza a través de la puerta equivocada. Se registró un éxito sólo cuando los lechones ingresaron por la puerta correcta y encontraron una leche accesible. El criterio para aprendizaje de la señal visual fue un máximo de 1 error en 3 ensayos consecutivos. Dos días después de completar los ensayos de la misión 1 y ensayos de la misión 2, se presentó la misma misión como una "prueba de memoria" para un ensayo solamente. Todas las pruebas fueron conducidas por 2 personas entrenadas que no eran ciegas al nivel de la ingesta de ácido siálico, pero los resultados fueron corroborados posteriormente por análisis independiente del material de video.

Evaluación de la tensión

Dado que la tensión puede influir en el aprendizaje y en la memoria, se midieron las concentraciones de cortisol en la sangre en la mañana, a intervalos semanales, comenzando el día 7 usando un kit comercial (Coat-A-Count Cortisol, Diagnostic Products, Doncaster, Australia). Las variaciones entre los diferentes ensayos y dentro de un mismo ensayo fueron 9% y 12%, respectivamente.

Análisis de ácido siálico unido a gangliósido y unido a proteína

El día 34 o 35, se practicó eutanasia a los lechones mediante inyección de pentotal de sodio (50 mg/kg). Se recolectaron tejidos cerebrales del córtex frontal cerebral y se almacenaron a -80° hasta que se analizaron. Se determinaron separadamente los ácidos siálicos unidos a gangliósido y unidos a proteína, usando métodos publicados (véase, Mahal, Id.). Todos estos fueron analizados en duplicado y la concentración final de ácido siálico en cada fracción se expresó en µg/g de tejido húmedo.

Análisis estadístico

Se compararon las diferencias en velocidad de aprendizaje (número de ensayos para aprender la señal visual), usando el análisis de supervivencia de Kaplan-Meier con regresión de Cox para examinar los covariados potenciales que pueden influir en la velocidad de aprendizaje. Las comparaciones entre los promedios (con o sin covariados) fueron ejecutadas usando el modelo lineal general (ANOVA univariado). Se usó la correlación de Pearson para examinar la relación entre el número de errores, éxitos, peso corporal y desempeño de memoria. Todos los análisis estadísticos fueron completados usando SPSS para Windows 11 Inc, Chicago. Se usó un nivel de significancia de 0.05.

Resultados

Velocidad de aprendizaje

Tanto en las misiones fácil como en la más difícil, los grupos suplementados con ácido siálico aprendieron la señal visual más rápido que el grupo de control (Kaplan-Meier, P = 0.0014 en misión 1 y P = 0.0177 en misión 2, véanse

FIG. 4 y FIG. 5). En la misión 1, sólo el 45% del grupo de control alcanzó los criterios dentro de 40 ensayos mientras el mejor desempeño en aprendizaje estuvo en el grupo 2 (el 100% aprendió dentro de 40 ensayos) seguido por el grupo 4 (80%) y grupo 3 (70%). En la misión 2, hubo una relación dosificación-respuesta ($P = 0.0177$), con todos los lechones en grupo 4 alcanzando los criterios dentro de 30 ensayos. La diferencia entre grupos fue aun significativa cuando se ajustó para diferencias en peso corporal al momento del ensayo ($P < 0.05$).

Covariados para aprendizaje

Es probable que en los lechones usaran la información que ellos obtuvieron en la misión 1 para ayudarse a aprender la señal visual en la misión 2. Por ello se usó el número total de errores y éxitos en la misión 1 como covariados para el análisis de la velocidad de aprendizaje en la misión 2. La diferencia entre grupos después del ajuste permaneció altamente significativa ($P = 0.002$ errores como covariados & 0.004 éxitos como covariados) y el orden de respuesta-dosificación en la velocidad de aprendizaje la misión 2 no cambió. Los hallazgos fueron similares si todos los 40 ensayos en la misión 1 fueron considerados o sólo los últimos 20 ensayos. El número de errores en los ensayos 21 - 40 de la misión 1 también varió de manera significativa entre los grupos. Este fue el caso con o sin el uso de errores en los ensayos 1-10 como un covariado ($P = 0.016$). El grupo de control hizo de manera significativa más errores que el grupo 2 ($P = 0.005$) y el grupo 4 ($P = 0.006$), pero sólo de manera marginal más que el grupo 3 ($P = 0.06$). En un análisis similar para la misión 2, el covariado fue significativo, pero los grupos no fueron significativamente diferentes (con o sin el covariado) ($P > 0.05$) (FIG. 6). Análisis similares usando el número total de errores en todos los ensayos revelaron una diferencia significativa entre los grupos de tratamiento (grupos combinados 2, 3 & 4) vs el grupo de control ($P = 0.009$) y una diferencia marginal entre los grupos en la misión 2 ($p = 0.048$).

Prueba de memoria

Los lechones que fueron capaces de alcanzar el criterio de aprendizaje, fueron evaluados en cuanto a su habilidad para recordar la señal visual 48 hr después. La diferencia total entre los grupos fue estadísticamente significativa para la misión 2 ($P = 0.036$), pero no para la misión 1 ($P = 0.165$, FIG. 7(A)).

No hubo efecto de dosificación-respuesta en ninguna misión. En la misión 2, el grupo 3 y el control fueron aproximadamente equivalentes (FIG. 7(B)). Combinando los grupos 2, 3 y 4 como el grupo tratado, hubo 35% menos errores (promedio = 1.5) comparado con el grupo de control (promedio = 2.4, $p = 0.036$).

De modo no sorprendente, el número de errores y éxitos durante el periodo de aprendizaje influyó significativamente en el desempeño de la memoria en todos los lechones. Así, un mayor número de errores en el periodo de aprendizaje predijo un mayor número de errores en la prueba de memoria ($P = 0.03$ en la misión 1 y $P = 0.029$ en la misión 2, correlaciones de Spearman de 2 colas). De modo similar, un número mayor de éxitos en el periodo de aprendizaje estuvo asociado significativamente con un menor número de errores en la prueba de memoria en la misión 1 ($P = 0.007$), pero no en la misión 2 ($P = 0.20$). El peso corporal, rata de ganancia de peso y velocidad de aprendizaje no afectaron de manera significativa el desempeño en la prueba de memoria ($P > 0.05$).

Cortisol en plasma

En la FIG. 8(A) se muestra la concentración promedio de cortisol en cada grupo durante el periodo de estudio de cinco semanas. A través de todos grupos, la diferencia entre la primera y todas las otras semanas fue significativamente diferente (semana 1 vs semanas 2, 3, 4 y 5; $P = 0.031$, 0.015 , 0.001 , y 0.001 respectivamente). A partir de la semana 2, las concentraciones de cortisol para todos los lechones descendió en promedio, aunque no de manera significativa ($P > 0.05$). Cuando se combinaron todos los grupos suplementados hasta un grupo, la diferencia entre el grupo de tratamiento y el de control no fue significativa ($P > 0.05$, FIG. 8(B)). En la semana 2, la diferencia entre el grupo 2 y el grupo 3 fue significativa ($P = 0.044$). Cuando se usó la concentración de cortisol en plasma sanguíneo como un covariado durante el aprendizaje, no se observaron efectos significativos ($P > 0.05$).

Concentración de ácido siálico en el cerebro

La mayoría del ácido siálico en el córtex frontal cerebral de lechón (86%) estaba unida a gangliósidos con una pequeña fracción (~13%) unida a glicoproteína y menos de 2% en la forma libre. Esto es comparable con el trabajo previo publicado por Brunngraber, E. G. et al., *Brain Res.*, 38:151-162 (1972), y Mahal, L. K. et al., en *J. Biolo. Chem.*, 277:9255-9261 (2002). hubo una relación significativa dosificación-respuesta entre ácido siálico unido a la proteína cerebral y niveles de suplementación con CGMP, por ejemplo el grupo 4 contenía el nivel más alto, seguido por los grupos 3, 2 y 1. El nivel en el grupo 1 fue significativamente inferior al grupo 4 ($P = 0.001$) y el grupo 3 ($P = 0.001$) pero no el grupo 2 ($P = 0.126$). En promedio, el ácido siálico unido a la proteína en la materia gris fue 6-10% mayor en los grupos suplementados con CGMP vs el control ($P = 0.000$, Tabla 14).

Tabla 14: El nivel promedio de ácido siálico unido a gangliósido, unido a proteína y libre en córtex frontal cerebral, de acuerdo con el nivel de nivel de suplementación de CGMP.

Grupo	n ^a	Unido a gangliósido (µg/g)		Unido a proteína (µg/g)		Libre (µg/g)		Total (µg/g)	
		Prome-dio	SE	Prome-dio	SE	Prome-dio	SE	Prome-dio	SE
Grupo 1	14	162	9	114	2	3.0	0.2	279	10
Grupo 2	13	176	9	121	2	3.1	0.2	300	10
Grupo 3	14	182	9	126	2	3.0	0.2	311	10
Grupo 4	12	185	10	127	2	3.2	0.2	315	10
Valor P		0.307		0.001		0.876		0.068	

Notas: a. "n" es el número de lechones por grupo.

La concentración promedio de ácido siálico unido a gangliósido también siguió un orden dosificación-respuesta (13%, 11% y 8% mayor en el grupo 4, grupo 3 y grupo 2 respectivamente vs el control), pero las diferencias no alcanzaron significancia estadística ($P = 0.089$, 0.124 y 0.299 respectivamente, Tabla 14). Cuando se combinaron todos los grupos suplementados con CGMP hasta un grupo, la diferencia entre el grupo de tratamiento vs control fue marginalmente significativa ($P = 0.07$, FIG. 9). La variación interindividual en ácido siálico unido a gangliósido fue mayor que la de ácido siálico unido a proteína ($CV = \sim 5\%$ en ácido siálico unido a gangliósido vs 2% en ácido siálico unido a proteína). El mismo fenómeno ha sido reportado en un estudio de cerebros infantiles humanos reportado por Mahal, L. K., Id..

La concentración de ácido siálico total (unido a gangliósido + unido proteína) fue marginalmente más alta en los grupos de tratamiento con CGMP combinados vs grupo de control ($P = 0.051$), pero el ácido siálico libre no lo fue ($P = 0.58$, FIG. 9).

Correlación de ácido siálico cerebral con desempeño en el aprendizaje

Una mayor concentración de ácido siálico unido a gangliósido, unido a proteína y total en córtex frontal cerebral estuvo asociado con un aprendizaje más rápido tanto en la misión 1 y como en la misión 2 (véanse FIG. 10(A), FIG. 10(B), FIG. 11 (A), y FIG. 11 (B)).

Ninguna de las correlaciones, sea paramétrica o no paramétrica, alcanzó significancia estadística (véanse todas las FIGS. 10 y FIGS. 11). En un análisis similar para la misión de memoria, se halló una correlación negativa (alto contenido de ácido siálico, pocos errores) tanto en la misión 1 y como en la misión 2, pero nuevamente los resultados no alcanzaron significancia estadística ($P > 0.05$), excepto para la forma unida a proteína en el grupo 4 para la misión 1 ($P = 0.045$, FIG. 12). Hubo una correlación positiva significativa entre el número total de éxitos y ácido siálico unido a gangliósido en la misión 1 ($P = 0.045$), pero no en la misión 2 ($P < 0.05$).

Ganancia de peso corporal

El peso corporal inicial promedio (\pm SE) fue el mismo en cada grupo (2.1 ± 0.04 kg) y los animales ganaron peso a ratas similares (FIG. 13). Aunque el grupo de control pesó ligeramente más que los otros grupos al final del estudio, la tasa de ganancia de peso (g/día) no varió significativamente entre los grupos ($P = 0.503$). Se pretende que la discusión de las referencias aquí, resuma simplemente las afirmaciones hechas por los autores y no se admite que ninguna referencia constituya técnica previa. Los autores se reservan el derecho a desafiar la exactitud y pertinencia de las referencias citadas.

En vista de lo anterior, se verá que las varias ventajas de la invención son logradas y se obtienen otros resultados ventajosos.

Reivindicaciones

- 5 1. Un método no terapéutico para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en un infante humano, que comprende la administración al infante de glicomacropéptido de caseína en una cantidad suficiente para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en el infante, en el que la cantidad suficiente para mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria en el infante, suministra al infante por lo menos 100 mg/kg/día de ácido siálico.
2. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que a dicho infante se administra una fórmula infantil que comprende dicho glicomacropéptido de caseína.
- 10 3. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el infante tiene entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 4 años de edad.
4. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el infante es un infante neonato.
- 15 5. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la necesidad de mejorar el comportamiento de aprendizaje y/o memoria es mostrada donde sustancialmente todos los requerimientos nutricionales del infante han sido suplidos mediante administración de una fórmula que tiene menos de aproximadamente 100 mg/L de ácido siálico.
6. El método de acuerdo con la reivindicación 5, en el que una gran parte de la proteína presente en dicha fórmula que tiene menos de 100 mg/L de ácido siálico, es proteína de soja o proteína de leche de vaca.
- 20 7. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que por lo menos aproximadamente 75% en peso de la proteína contenida en dicha fórmula que tiene menos de 100 mg/L de ácido siálico, es proteína de soja o proteína de leche de vaca.
8. El método de acuerdo con la reivindicación 6, en el que sustancialmente toda la proteína contenida en dicha fórmula que tiene menos de 100 mg/L de ácido siálico, es proteína de soja o proteína de leche de vaca.
- 25 9. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fórmula infantil es una fórmula infantil nutricionalmente completa que comprende carbohidratos, lípidos y proteína.
10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en el que la proteína comprende un material que es seleccionado de proteína de leche de vaca, proteína de soja y mezclas de ellas.
11. El método de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la cantidad de glicomacropéptido de caseína es suficiente para suministrar al infante al menos 200 mg/kg/día de ácido siálico.
- 30 12. El método de acuerdo con la reivindicación 2, en el que la fórmula infantil comprende un contenido total de proteína de entre 12 y 16 gramos/litro, de los cuales no más de 40% en peso es suministrado por glicomacropéptido de caseína.

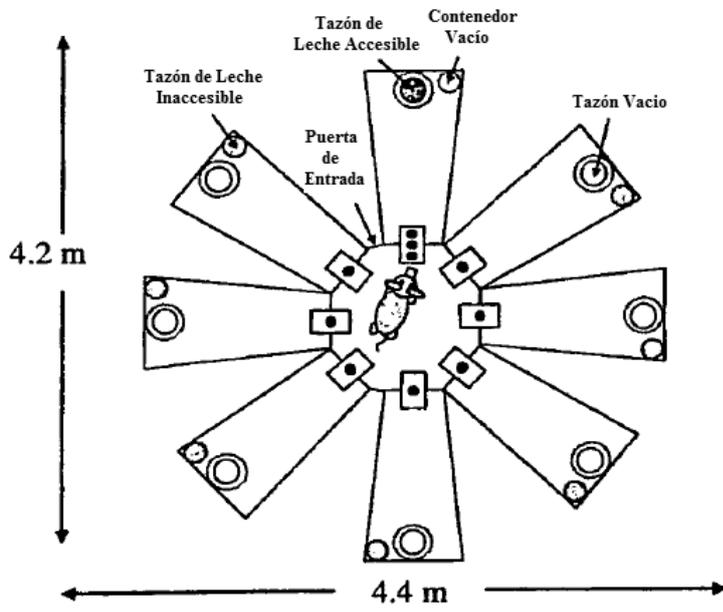


FIG. 1.

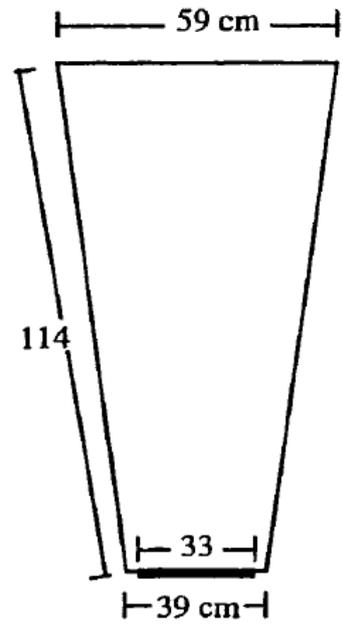


FIG. 2.

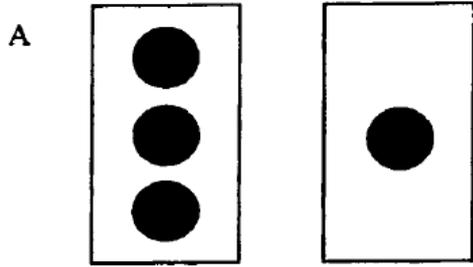


FIG. 3(A).

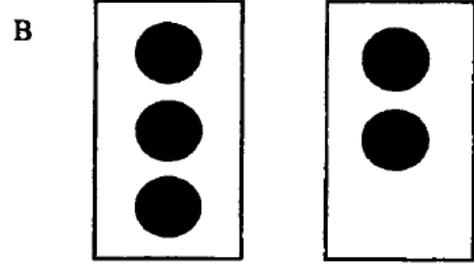


FIG. 3(B)

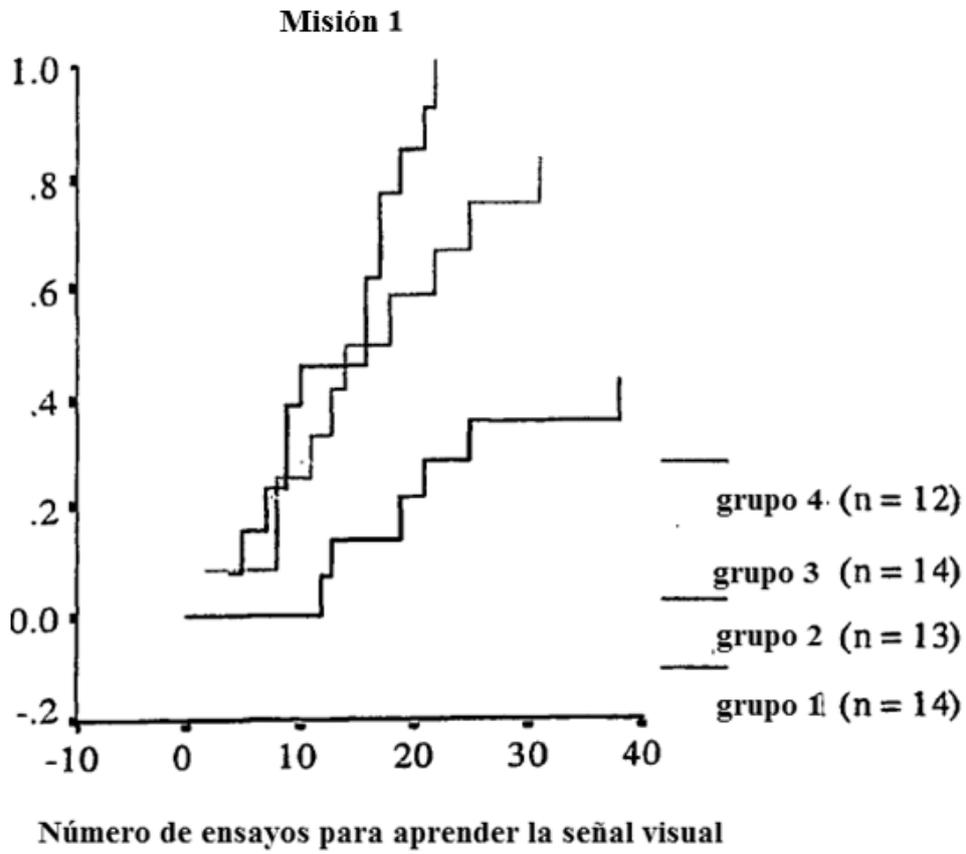


FIG. 4

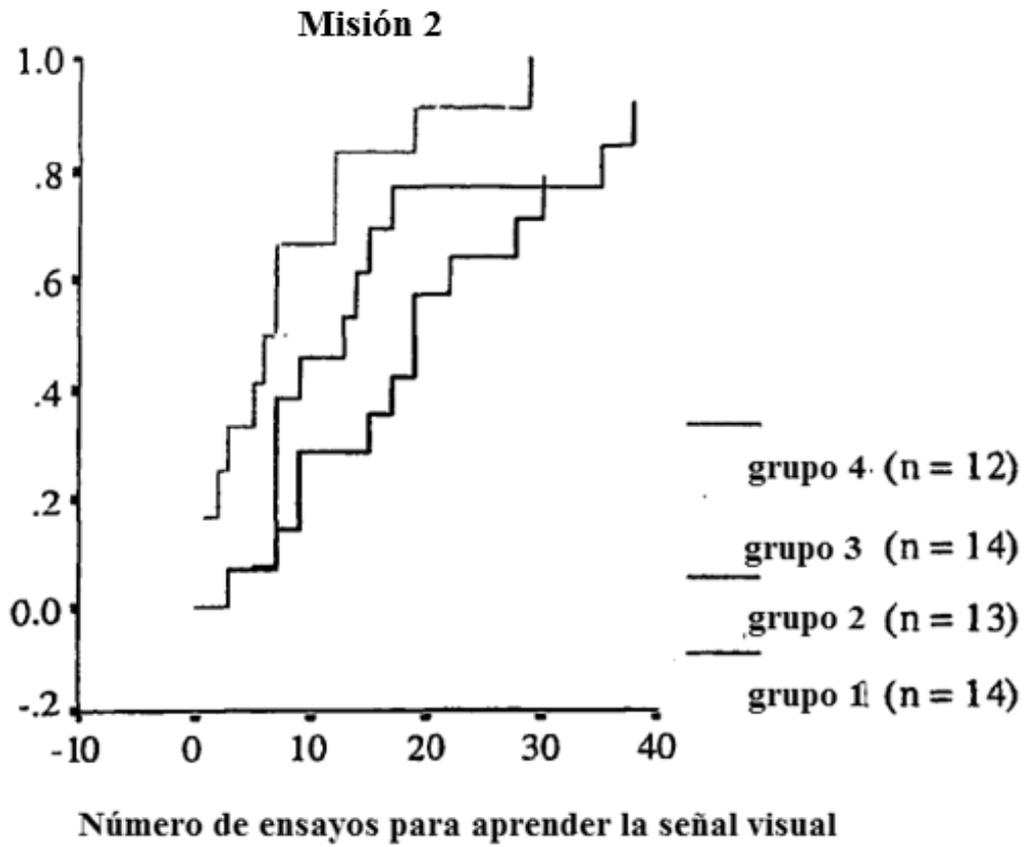


FIG. 5.

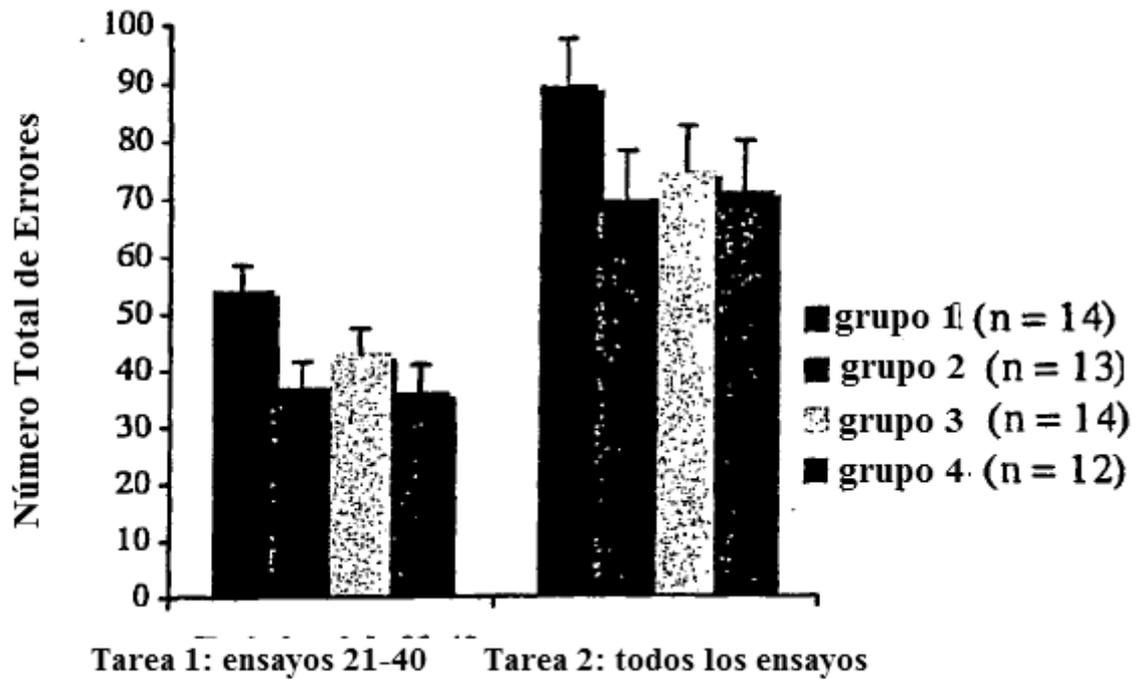


FIG. 6.

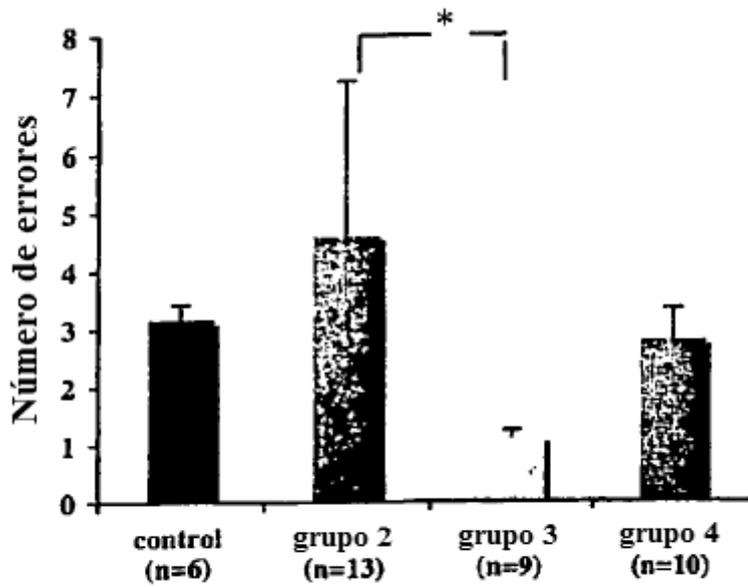


FIG. 7(A).

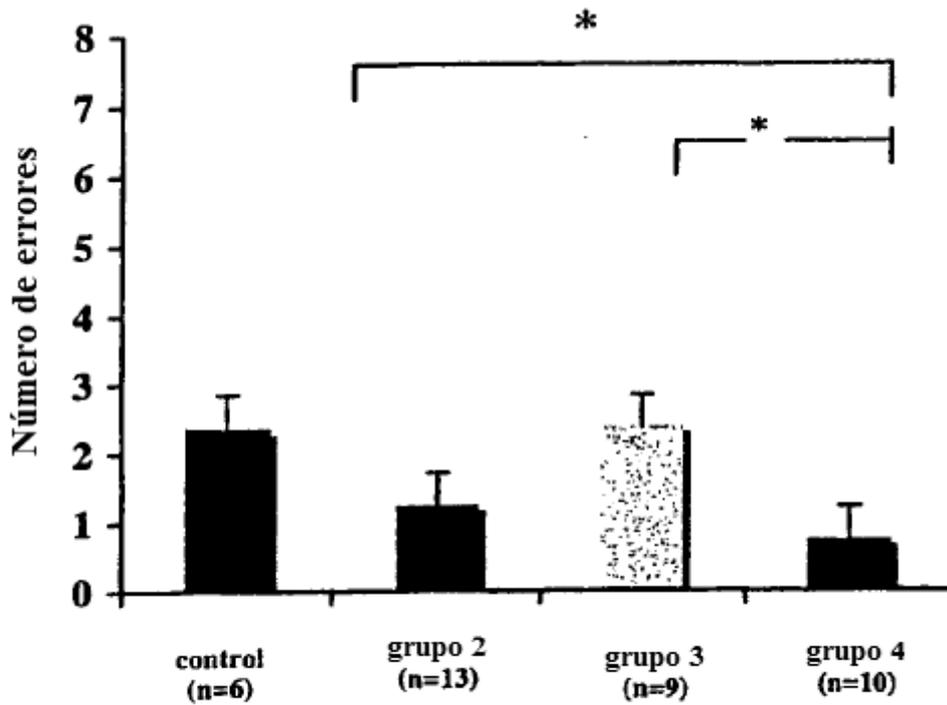


FIG. 7(B).

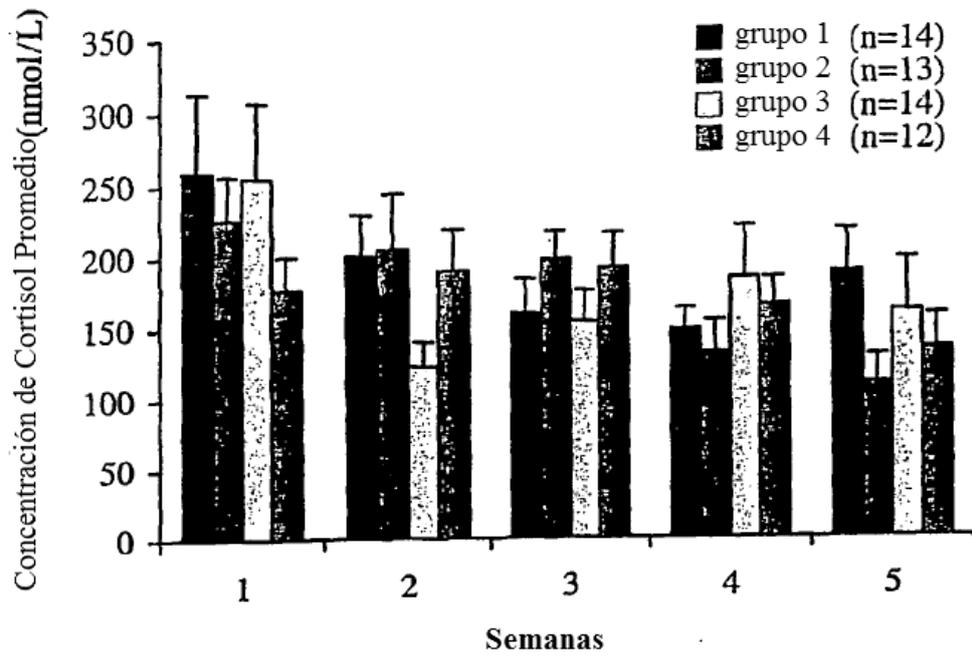


FIG. 8(A).

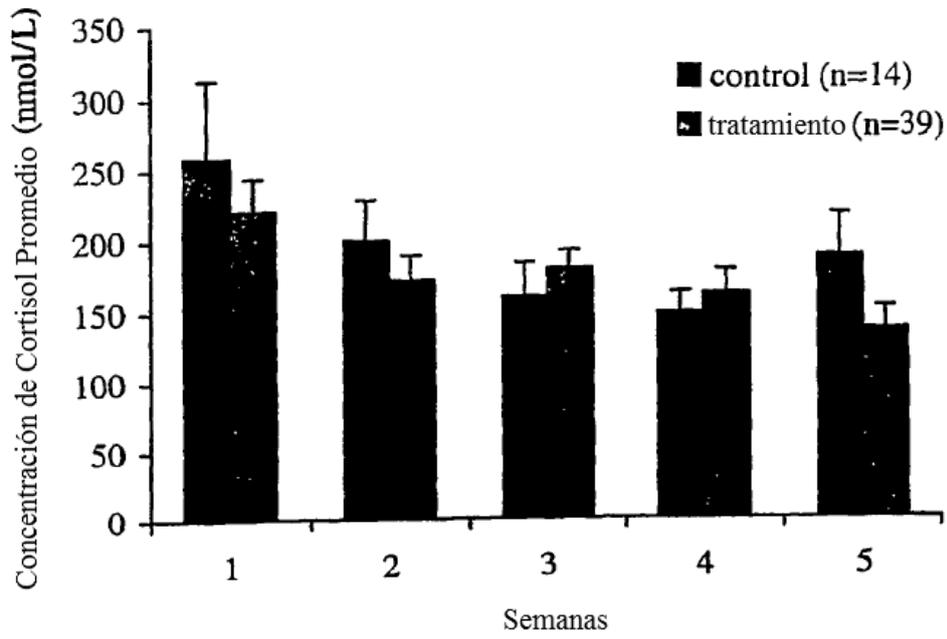


FIG. 8(B).

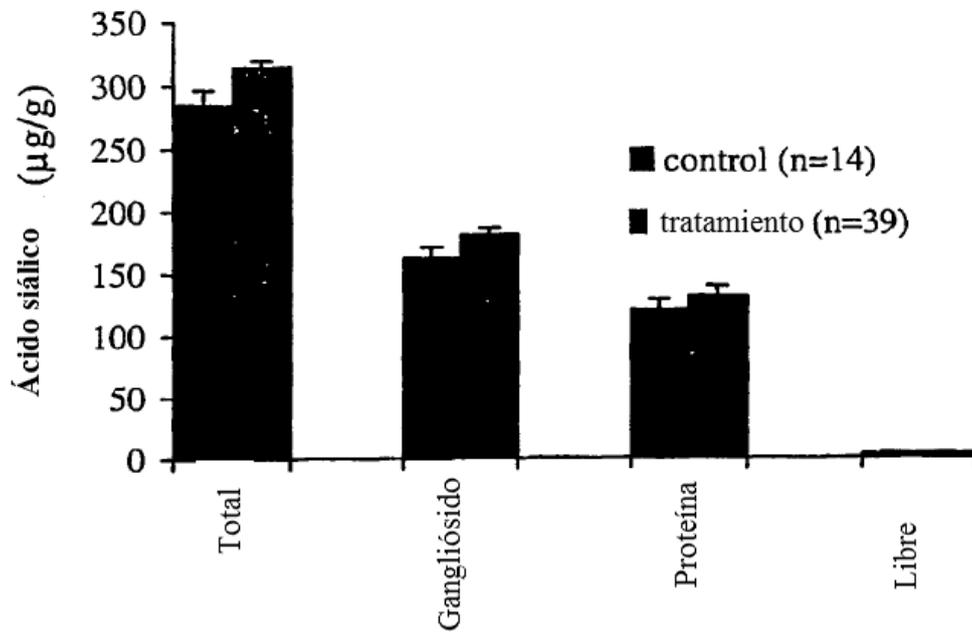
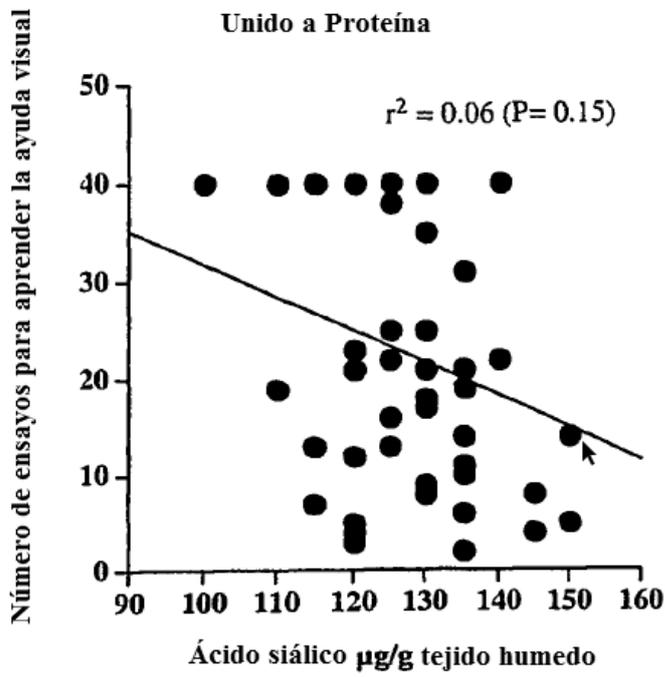
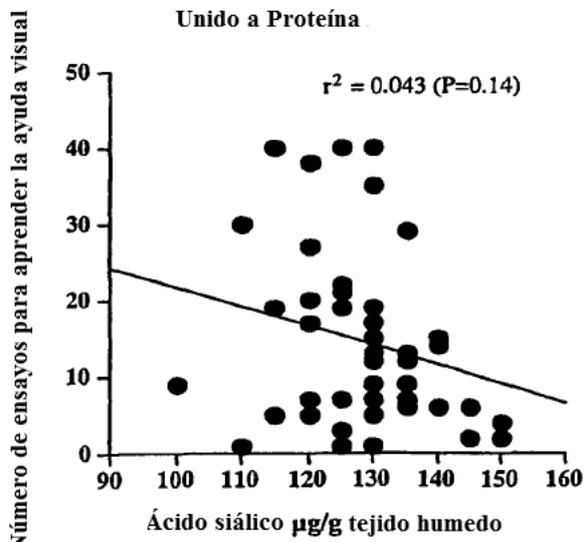


FIG. 9.





Misión 1



Misión 2

FIG. 10 (A) (ARRIBA) Y FIG 10(B) (ABAJO)

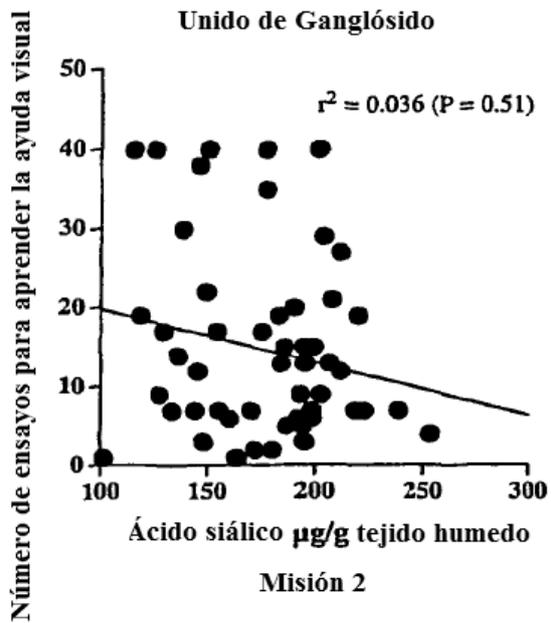
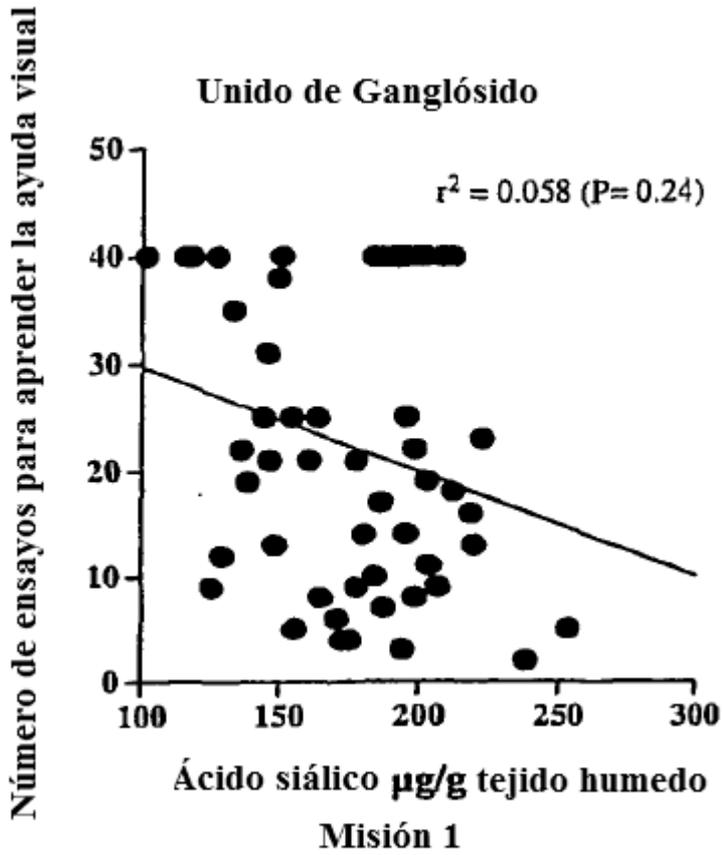


FIG. 11(A) (ARRIBA) Y FIG. 11(B) (ABAJO)

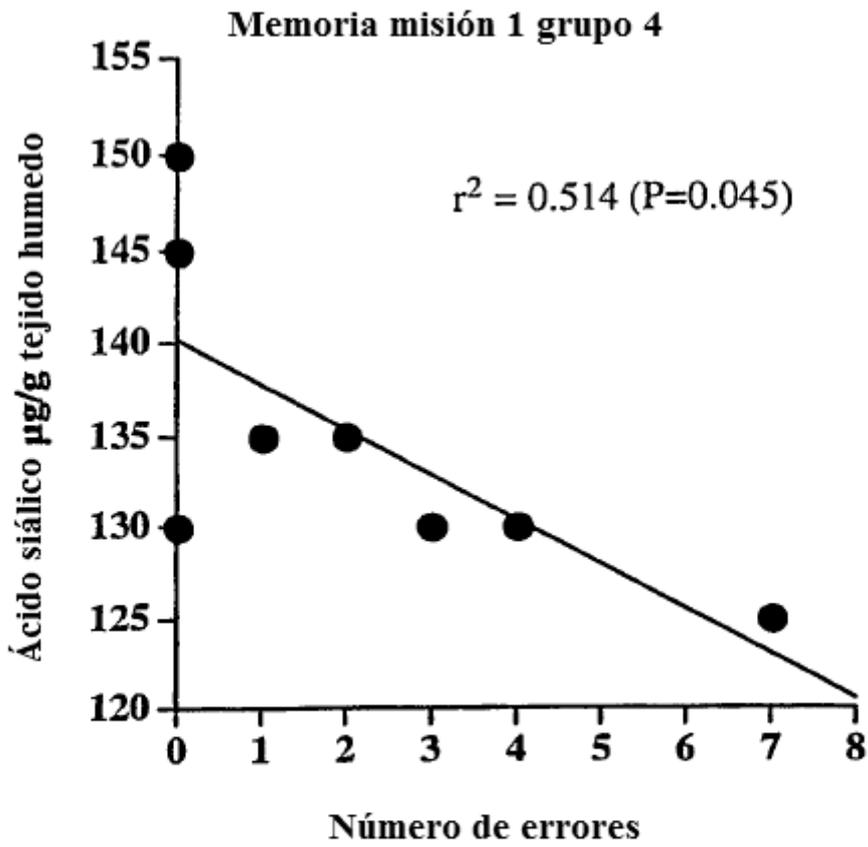


FIG. 12.

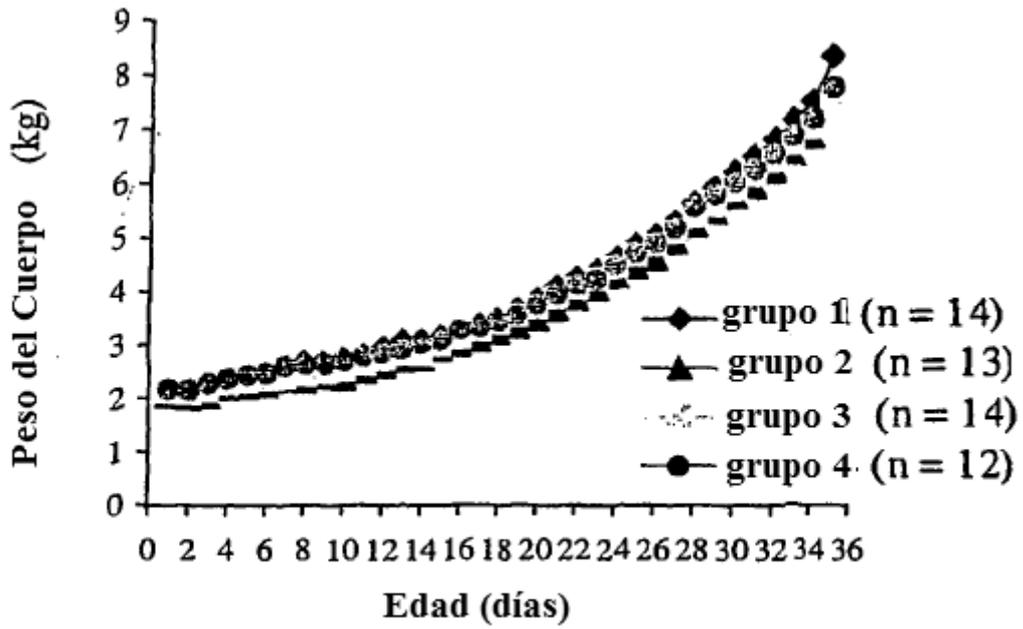


FIG. 13.