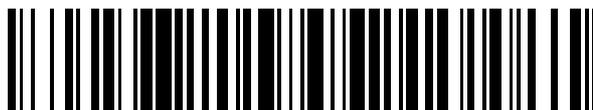


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 586 833**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.04.2013 E 13164605 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2653040**

54 Título: **Alimento basado en leche de burra enriquecida para bebés prematuros y/o bebés a término con alergia o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca y método de preparación del mismo**

30 Prioridad:

**19.04.2012 IT RM20120170**

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

**19.10.2016**

73 Titular/es:

**DICOFARM SPA (100.0%)  
Via Casale della Marcigliana, 29  
00138 Roma, IT**

72 Inventor/es:

**ACRI, MAURIZIO**

74 Agente/Representante:

**TEMIÑO CENICEROS, Ignacio**

**ES 2 586 833 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

Alimento basado en leche de burra enriquecida para bebés prematuros y/o bebés a término con alergia o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca y método de preparación del mismo.

5

### Campo de aplicación

En su aspecto más general, la presente invención se refiere a alimentos infantiles, alimentos de continuación, alimentos para fines médicos específicos, nutracéuticos, complementos dietéticos y dispositivos médicos hechos de  
10 leche de burra enriquecida para bebés prematuros, bebés a término de bajo peso y completos con o en riesgo de intolerancia o alergia a la proteína de la leche de vaca u otra fuente, excepto la leche de burra.

Técnica anterior

15 La alergia a la proteína de leche de vaca (CMA) es ciertamente la alergia alimentaria más común y conocida que se produce principalmente en la niñez. La inmadurez funcional del sistema gastrointestinal y el sistema inmunológico en los primeros años de vida, y el aumento en el porcentaje de niños que no pueden ser amamantados y son alimentados por fórmulas a base de leche de vaca, determinan que aparezca la alergia a la leche en niños en porcentajes que varían entre el 2 y el 7 % (Sampson y col. 2004). Además, hasta el 7 % de los niños padecen la  
20 denominada intolerancia a la proteína de la leche de vaca (CMI), que es la forma más común de intolerancia alimentaria inmunológica en la niñez.

Entre los principales eventos de la CMI y la CMA, hay síntomas de gravedad variable, que pueden implicar la piel (dermatitis atópica, urticaria/angioedema, erupciones), el tracto gastrointestinal (retraso en el crecimiento, reflujo  
25 gastro-esofágico grave, diarrea crónica, estreñimiento persistente, síndromes de malabsorción, vómitos recurrentes, enterocolitis, anoproctitis) o reacciones anafilácticas potencialmente mortales (edema de glotis, hipotensión hasta choque, asma de opresión, síntomas cutáneos y gastrointestinales agudos). En la mayoría de los casos se encuentran lesiones histopatológicas de la mucosa intestinal muy similares a las típicas de la enfermedad celíaca (atrofia vellosa intestinal de diversos grados), índice anatomopatológico de la afección de malabsorción. La  
30 intensidad y el número de los síntomas es variable con el tiempo, no sólo de sujeto a sujeto, sino también en el paciente individual.

Las proteínas de la leche se clasifican en caseínas y proteínas del suero, constituyendo respectivamente el 80 y el 20 %, de las proteínas totales de la leche de las vacas. Dado que la beta-lactoglobulina está ausente en la leche de  
35 mujer, en el pasado se creía que esta proteína representaba el alérgeno principal de la leche de vaca. Por el momento se ha demostrado, en cambio, que las caseínas son los alérgenos principales y a menudo se producen fenómenos de cosensibilización. En la práctica, muchos sujetos alérgicos a la leche de vaca son sensibles a más de una proteína.

40 Una dieta de exclusión de alimentos alérgicos y la sustitución por otros alimentos hipoalérgicos representa el tratamiento de elección de las alergias alimentarias. Lo razonable de la terapia es la eliminación completa de la proteína de la leche de vaca de la dieta de los niños.

En los dos primeros años de vida, cuando la lactancia materna no está disponible, la leche de vaca, pasteurizada o  
45 en formulación adaptada, y sus derivados, son los alimentos que satisfacen todas o al menos la mitad de las necesidades de energía y nutrición del niño, y también son la principal fuente de calcio dietético, cuya demanda es muy alta a esta edad. Por lo tanto, es evidente que no es posible prescribir una dieta de eliminación de la leche de vaca y sus derivados sin tener un alimento alternativo.

50 En la actualidad, los sustitutos de la leche de vaca usados más frecuentemente en niños que padecen alergia o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca son formulaciones basadas en proteínas aisladas de soja, hidrolizados de proteínas, formulaciones basadas en arroz y leche de especies animales diferentes de bovinos (Host y col., 2004).

55 Idealmente, el sustituto alimentario debe ser hipoalérgico o antialérgico, sin reacción cruzada con la proteína de la leche de vaca, nutricionalmente adecuado y apetecible. Sin embargo, los tratamientos actualmente en uso no siempre consiguen los resultados deseados debido a "efectos secundarios": cumplimiento deficiente por el sabor desagradable, altos costes operativos, riesgo persistente de reacciones alérgicas graves hacia alimentos aparentemente considerados "seguros".

Las formulaciones hidrolizadas (HF) se usan para el tratamiento y la prevención de la alergia a las proteínas de la leche de vaca. Las formulaciones hidrolizadas difieren entre sí en al menos 5 características:

- 5 1) nivel de hidrólisis: hidrolizados parciales (pHF) y mejorados (eHF);
- 2) tipo de hidrólisis usada: enzimática, térmica, ultrafiltración;
- 3) fuente de proteína: caseína, proteína de suero, soja, arroz;
- 4) presencia/ausencia de lactosa: posible relevancia para la absorción de calcio, formación de galactocerebrósidos, desarrollo de la flora intestinal).

10

El nivel de hidrólisis, por lo tanto, el peso molecular de los residuos peptídicos, se considera fundamental para la respuesta terapéutica a la CMA. Los péptidos de peso molecular (PM) inferior a 1500 dalton rara vez son inmunógenos, los péptidos con PM inferior a 3500 dalton apenas permiten la unión entre dos moléculas de IgE en los mastocitos y la posterior reacción inmediata, mientras que los péptidos con PM de más de 6000 dalton se

15

consideran potencialmente alergénicos (Cantani y col. 2000).  
En pHF o fórmulas hipoalergénicas (HA = hipoalergénico), los presentes péptidos son intermedios en tamaño entre el de las fórmulas adaptadas y el de los hidrolizados denominados mejorados. Están presentes en todos los péptidos que tienen un PM mayor de 6000 dalton. El contenido del alérgeno principal de la leche, la beta-lactoglobulina, es

20

aproximadamente 300 veces más bajo que el de la leche de vaca y las fórmulas adaptadas, aunque de media, 10.000 veces mayor que el contenido de los hidrolizados mejorados. El poder antigénico del residuo, concretamente, la capacidad de causar una reacción alérgica en sujetos con CMA, es intermedio con respecto a las fórmulas adaptadas y con respecto a los hidrolizados mejorados.

25

El uso de dichas fórmulas es adecuado sólo proporcionar un posible beneficio en la prevención de la atopia en individuos de alto riesgo.

30

Los hidrolizados mejorados o de extensión (eHF), caracterizados por la presencia de péptidos en su mayor parte de menos de 1500 daltons, son las únicas fórmulas realmente hipoalergénicas (es decir, toleradas por el 90 % de los

35

bebés con CMA mediada por IgE, con un 95 % de intervalo de confianza) recomendadas como la primera elección para el tratamiento de la CMA por la European Society for Paediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPACI), la European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) (Høst y col.1999) y la American Academy of Pediatrics (AAP) (AAP 2000), aunque no se excluye la posibilidad de reacciones alérgicas, incluso graves, aunque en un porcentaje muy pequeño; sin embargo, los hidrolizados mejorados son poco

45

apetecibles.  
Las fórmulas de aminoácidos libres (AAF) se consideran las únicas fórmulas, por definiciones, no alergénicas. De hecho, las mezclas de aminoácidos que las constituyen no son capaces de desencadenar ningún tipo de reacción alérgica, ya sea de tipo inmediato o tardía. Estas mezclas contienen adicionalmente jarabe de glucosa o

40

maltodextrinas, aceites vegetales de grasas, minerales y vitaminas; están desprovistas de proteínas de la leche de vaca, como lactosa, de sacarosa y soja, pero su uso se ve dificultado, sobre todo, por su sabor desagradable y su alto coste. Los estudios nutricionales realizados en eHF y AAF han producido resultados contradictorios. De hecho, existen pocos datos con respecto a la tolerabilidad de la "bioquímica" de estas fórmulas, en particular los índices del

45

y el metabolismo de la proteína y el balance de nitrógeno.  
Otras terapias incluyen el uso de fórmulas basadas en proteínas de soja aislada (SF), materia objeto de interminables debates y discusiones a lo largo de los años, especialmente por el riesgo de sensibilización a su proteína. Dicho fenómeno de sensibilización se produce en una tasa que varía del 8 % al 14 % de los niños con CMA mediada por IgE. Generalmente, las fórmulas a base de proteínas de soja no se recomiendan para el

50

tratamiento inicial de bebés con CMA, en los que se ha notificado alergia a proteínas de soja con una frecuencia entre el 17 % y el 47 %. Además, la SF no se recomienda en prematuros o para el uso en el tratamiento de bebés con CMA no mediada por IgE, con síntomas predominante gastrointestinales. Su poder alergénico se debe a la presencia de beta conglucina y glicina y P34. Sin embargo, si se tolera, representan una alternativa eficaz a la leche de vaca, ya que son válidos desde el punto de vista nutricional y pueden utilizarse en las formas mediadas por

55

IgE especialmente en bebés de más de 6 meses con manifestaciones cutáneas.  
Las fórmulas para bebés basadas en proteínas hidrolizadas de arroz están libres de lactosa, contienen jarabe de glucosa, maltodextrina, almidón de maíz, MCT, aceites vegetales, ácido linoleico y ácido linoléico (relación 10:1), nucleótidos, selenio, lisina, treonina, taurina, colina y carnitina. Su uso es muy reciente, por lo tanto, por el momento

no están disponibles datos para un uso a largo plazo.

En los últimos años, en alternativa a la SF y el eHF, ha surgido un fuerte interés en la leche de otras especies de mamíferos para lactantes y niños con CMA. Sin embargo, algunos de ellos, en particular la leche de cabra y oveja, han mostrado una alta reactividad cruzada con proteínas de la leche de vaca, tanto *in vivo* como *in vitro*. Algunos estudios, en sujetos muy sensible a las caseínas bovinas, han revelado la presencia de IgE circulante capaces de reconocer las proteínas de la leche de búfala, cabra y oveja, mientras que la sensibilidad a la proteína de la leche de burra y yegua parece ser muy inferior (Businco y col. 2000). Además, desde un punto de vista nutricional, la leche de cabra es deficiente en algunos factores claves tales como ácido fólico, vitaminas B6 y B12 y hierro, y finalmente, su alto contenido de proteínas y minerales, especialmente calcio, fósforo, sodio y potasio, implica una carga excesiva de solutos para el riñón de los bebés.

La leche de burra parece ser más prometedora, siendo más similar en composición a la leche humana que la leche de vaca, dado que se tolera en algunos niños con CMA mediada por IgE grave. Sin embargo, su disponibilidad es limitada y la recuperación es difícil. De todos modos, se ha ensayado únicamente en un estudio individual.

Los estudios clínicos han demostrado la excelente eficacia nutricional de la administración de leche de burra (LB) en bebés que padecen alergia inmunológica o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca (Carroccio y col., 2000; Iacono y col., 1992, Monti y col., 2007, Vita y col., 2007). Dichos estudios también han destacado la excelente palatabilidad de la leche de burra en comparación con productos a base de hidrolizados de soja y/o proteínas. La composición de la leche de burra puede variar significativamente entre diferentes razas, sin embargo, es probable que sea más similar a la leche humana que la leche de vaca y de cabra (Medhammar y col., 2011; Salimei y col., 2004). En particular, en relación con las principales características químicas de la leche de burra, el contenido de proteínas promedio ha resultado ser ligeramente mayor que el contenido de proteínas de la leche humana, pero de un nivel significativamente menor que el de la leche de vaca. Las mismas observaciones se aplican a la relación caseína/proteína que parece estar cerca de la encontrada en la leche humana. El componente de proteína de la leche de burra (aproximadamente 1,63 g/100 g) es muy similar al de la leche humana (aproximadamente 1,50 g/100 g), en particular por el bajo contenido de caseína y lactoglobulina y por la alta concentración de lisozima. Contrariamente a la leche de algunos rumiantes, la leche de burra contiene niveles de lisozima similares a la leche humana, así como una alta concentración de aminoácidos esenciales (Salimei y col., 2004). En relación con el componente proteico del suero, la leche de burra se caracteriza por un contenido de  $\beta$ -lactoglobulina, que se caracteriza notablemente por un alto poder alergénico, equivalente al 30 % de la fracción de proteínas de suero de leche. En consecuencia, el contenido de  $\beta$ -lactoglobulina de la leche de burra es mucho menor que el encontrado en la leche bovina y equina (Bertino y col. 2010).

La concentración de lisozima es muy alta en la leche de burra, la enzima es responsable de la hidrólisis del enlace  $\alpha$  1-4 entre el ácido N-acetil murámico y la N-acetil glucosamina del peptidoglicano, formando la pared celular bacteriana, con posteriores actividades bacteriolíticas presentes sólo en pequeñas cantidades en la leche de vaca. La presencia de lisozima es importante ya que desempeña una acción selectiva contra la microflora potencialmente patógena en el tracto gastro-intestinal del bebé.

Entre los compuestos bioactivos, en la leche de burra está presente la lactoferrina en una cantidad del 4,5 % de proteína de suero total, una concentración superior a la que se encuentra en la leche humana y de vaca. La lactoferrina tiene una importante función en la inmunidad innata del huésped, tiene una alta actividad inmunomoduladora, antivírica y antimicrobiana. Además, la leche de burra tiene un alto contenido de lactosa (aproximadamente 6,73 g/100 g), comparable a la de la leche humana (6,50 g/100 g), lo que la hace extremadamente apetecible. La lactosa tiene un papel importante en el metabolismo del calcio; estimula la absorción de calcio en la proximidad de la mucosa intestinal e influye positivamente en la mineralización ósea. Por otra parte, un alto contenido de lactosa hace hincapié en la función prebiótica de la leche de burra como un sustrato adecuado para el correcto desarrollo de la flora láctica intestinal de los bebés.

Las solicitudes de patente europeas EP 2248908 y EP 2427566 describen cepas de bacterias probióticas pertenecientes al género de lactibacillus aisladas de las composiciones de la leche de burra y su uso en alimentos y bebidas a base de leche fermentada.

La principal diferencia entre la leche de burra y la leche humana es con respecto al componente lipídico. Aunque la composición de la fracción lipídica de la leche de burra es comparable a la de la leche humana en porcentaje, el contenido total de lípidos en la leche de burra es en promedio igual a 0,30 g/100 g, en comparación con la de la leche humana que es igual a 3,5 g/100 g.

La concentración de minerales promedio en la leche de burra está cercana a las necesidades nutricionales y metabólicas del recién nacido. La leche de burra y la leche materna son similares en cuanto a la baja carga renal de solutos (proteínas y sustancias inorgánicas).

5

La leche de burra es un producto natural, el más cercano a la leche materna, por sus propiedades organolépticas y el valor hipoalergénico y, por lo tanto, representa un sustituto válido en casos en los que la nutrición con leche materna no es posible o suficiente, y en casos de bebés con o en riesgo de intolerancia o alergia a la proteína de la leche de vaca u otra fuente.

10

Sin embargo, el bajo contenido de grasa de la leche de burra determina su valor energético inferior (~44 kcal/100 ml) a la leche humana (~65 kcal/100 ml) y la leche de otros mamíferos, y esto no permite el uso de leche de burra, según se encuentra en la naturaleza, como la única fuente de alimento alternativa a la leche de vaca (D'Auria y col., 2011).

15

En cuanto a la leche de burra, se describe el procesamiento, almacenamiento y distribución, en el estado de la técnica no se aplicó ningún tratamiento térmico en el cultivo, que pueda garantizar una seguridad de salud e higiene duradera. Generalmente, la leche de burra recién ordeñada se filtra y se almacena en refrigeración y, después del envasado, se almacena en un refrigerador a una temperatura entre 0 °C y 4 °C hasta que se entrega al consumidor final en forma de leche cruda no pasteurizada. Antes de su uso, se recomienda calentar a fuego lento la leche, hasta alcanzar la temperatura de 70 °C durante al menos 2 minutos. Este procedimiento se realiza por el consumidor sin estructuras equipadas o procedimientos estandarizados, que pueden eliminar, a altas temperaturas, ciertos nutrientes de la leche, tales como vitaminas, y alterar estructuralmente las proteínas, con la formación de pequeños gránulos de precipitado, inofensivos pero que disminuyen las propiedades nutricionales y organolépticas de la leche.

20

Además, pueden producirse riesgos sanitarios si el tratamiento térmico no se realiza a la temperatura requerida y durante el tiempo necesario.

25

La solicitud de patente internacional WO95/01100 describe un método de conservación de la leche de una burra que comprende las etapas de enfriamiento de la leche a una temperatura entre 4 y 10 °C, filtración, distribución de la leche refrigerada en recipientes de tubo que tienen un volumen menor de 20 ml, y una posterior congelación lenta y sin agitación de dichos recipientes que contienen la leche a una temperatura entre -18 y -40 °C. Después, el producto obtenido se usa en la industria cosmética como agente tensor de la piel para eliminar las arrugas y como un medicamento, como agente antiinflamatorio externo.

30

En vista de lo anterior, es evidente que leche de burra puede ser una alternativa viable en el tratamiento de la intolerancia/alergia a la proteína de la leche de vaca, en comparación con las terapias actualmente disponibles.

35

Desafortunadamente, los componentes lípidos reducidos la hacen no apta para satisfacer las necesidades nutricionales reales del recién nacido, y los procedimientos actuales para envasado, procesamiento y distribución no incluyen el tratamiento térmico para garantizar la seguridad de salud e higiene del producto final.

40

La fórmula de la leche se desarrolló con el objetivo de crear una alternativa nutricionalmente viable a la leche materna o, en algunos casos, para satisfacer necesidades nutricionales específicas del lactante/niño, o para hacer frente a trastornos específicos, tales como la alergia a la proteína de la leche de vaca. Se debe considerar que las necesidades nutricionales de los recién nacidos también pueden variar dependiendo de la edad gestacional, el peso al nacer, y/o ciertas situaciones patológicas.

45

En ausencia de leche materna y en la falta de disponibilidad de un "banco" de leche humana, usa fórmulas especiales para bebés prematuros, que están recomendadas para todo el período en el que dichos niños no han alcanzado aún la madurez de la principal función gastrointestinal. Las recomendaciones más recientes de la International Society of Nutrition (ESPGHAN) proponen las características de composición específicas de estas fórmulas, tanto para el perfil proteico como el perfil lipídico. En particular, los lípidos deben obtenerse tanto de fuentes animales como vegetales y deben estar predominantemente en forma no saturada, con una relación ácido linoleico/ácido  $\alpha$ -linolénico entre 6 y 7. La adición de ácidos de grasos poliinsaturados preformados de cadena larga (LC-PUFA) permite llegar a cantidades similares a las de la leche humana.

50

Debe considerarse que la digestión de lípidos en el bebé prematuro no se considera tan bien documentada como en el bebé a término.

55

En el bebé, el modelo de referencia para los requisitos es todavía la leche materna, que en los primeros meses de vida es la única fuente de grasa perfectamente adecuada a los requisitos energéticos, estructurales y metabólicos del organismo.

5 Los nutrientes que se añaden a las fórmulas funcionales están diseñados para imitar la composición de la leche materna y hacen la fórmula adecuada a las necesidades nutricionales del recién nacido. Entre los principales nutrientes funcionales, las grasas tienen una importante función en el crecimiento y desarrollo del recién nacido.

Los ácidos grasos de la leche materna son en su mayoría insaturados. Por otra parte, el 70 % del ácido palmítico se esterifica en la posición  $\beta$  y se absorbe como monoglicérido. Esto asegura la absorción óptima de calcio y un aumento de la facilidad de evacuación.

Por lo tanto, la adición de ácido palmítico esterificado en la posición  $\beta$  en la fórmula para lactantes permite una mayor absorción de calcio, una mejor mineralización ósea, un tránsito intestinal más rápido.

15 Swar M O. Donkey milk-based formula: A substitute for patients with cow's milk protein allergy. Sudan J Paediatr 2011; 11(2): 21-24 describe una fórmula a base de leche de burra que comprende leche de burra con la adición de 1,6 g de aceite de girasol a 100 ml de leche de burra.

## 20 **Resumen de la invención**

En vista de lo anterior, la invención tiene el objetivo de aprovechar las propiedades nutricionales e hipoalergénicas de la leche de burra y compensar la falta de porción lipídica y calórica, lo que la hará inadecuada para la alimentación del recién nacido, complementándola con la adición de una mezcla de triglicéridos obtenidos a partir de aceites vegetales en la que del 35 al 55 % del contenido total de ácido palmítico (C16:0) se esterifica en la posición  $\beta$  (sn-2) en la molécula de glicerol, aceites vegetales ricos en ácidos grasos esenciales (omega-3 y omega-6) y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), para alcanzar una composición más cercana a la de la leche materna. De esta manera, la leche de burra es adecuada para cumplir todas las necesidades nutricionales y metabólicas de los bebés, desde recién nacidos prematuros, ayudando a mejorar el desarrollo neuroconductual, para disminuir la probabilidad de desarrollar obesidad y sobrepeso con los años, a favor de la prevalencia del intestino de una flora bifidógena, para mejorar la absorción de grasa, para disminuir la probabilidad de aparición de estreñimiento y trastornos digestivos pequeños en general, además de ser hipoalergénica.

La invención también pretende aprovechar las propiedades nutricionales y hipoalergénicas de la leche de burra que compensa la falta de cantidades de lípidos y calorías como se explica y que incluye adicionalmente posiblemente la adición de espesantes naturales tales como harina de algarrobo o almidón de maíz, lo que hará de la leche de burra resultante adecuada para satisfacer todas las necesidades nutricionales y metabólicas de los niños recién nacidos, desde recién nacidos prematuros, en los casos de alergias y reflujo gastroesofágico (leche de fórmula anti-reflujo, AR).

## 40 Descripción detallada de la invención

Un objeto de la presente invención es una formulación a base de leche de burra cruda enriquecida con una mezcla lipídica y posteriormente sometida a la inactivación de la flora microbiana patógena o liofilizada, para los sujetos que padecen alergia o intolerancia a las proteínas de la leche de vaca.

Dicha mezcla lipídica comprende:

- 50 - una mezcla de triglicéridos obtenidos a partir de aceites vegetales en la que del 40 al 50 % del contenido total de ácido palmítico (C16:0) se esterifica en la posición  $\beta$  (sn-2) en la molécula de glicerol,
- aceites vegetales con alto contenido de ácidos grasos esenciales,
- ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga.

En la actualidad, las fórmulas con un alto contenido de ácido palmítico en la posición  $\beta$  se obtienen por esterificación del aceite de palma rico en tripalmitina con otros aceites vegetales, usando una alfa-gamma lipasa específica, obtenida a partir de *Rhizomucor miehei* o *Aspergillus oryzae*, a través de técnicas de biotecnología. De esta manera, se obtiene un reposicionamiento de los ácidos grasos en los triglicéridos dando lugar a una estructura más cercana a la de la leche materna. Una diferencia sustancial entre la composición de lípidos de la leche materna y la leche formulada estándar se encuentra en la posición de los ácidos grasos en los triglicéridos. En la leche materna, el 70%

del ácido palmítico se esterifica "internamente" (posición beta), donde es inaccesible a la acción de la lipasa pancreática, que en su lugar interrumpe los ácidos grasos periférico (posiciones alfa y gamma). Por lo tanto, el ácido palmítico puede absorberse en el intestino como un monoglicérido. En muchas fórmulas infantiles disponibles en la actualidad, sin embargo, el ácido palmítico, situado el 90% "externamente" en la posición alfa, se hidroliza fácilmente por la lipasa y complejos con los iones de calcio, generando palmitato de calcio. Este compuesto impide la absorción intestinal tanto del ácido de calcio como palmítico, lo que acaba dando a las heces una consistencia dura, característica de los bebés artificialmente alimentados.

La mezcla específica de triglicéridos usados en el objeto de la formulación de la invención tiene un porcentaje de ácidos grasos C16 esterificados en la posición  $\beta$  de al menos un 43 % en comparación con los ácidos grasos totales C16, hasta un máximo del 2 % de ácidos grasos trans, hasta un máximo del 0,1 % de ácido graso libre como ácido oleico, un valor máximo de peróxido igual a 1 equiv. mol./kg, un contenido de agua máximo del 0,3 %. La composición de ácidos grasos es:

C8:0	0,6 - 1,5 %
C10:0	0,7 - 1,5 %
C12:0	9,5 - 14 %
C14:0	3 - 5 %
C16:0	21 - 24 %
C18:0	2,5 - 5 %
C18:1	38 - 44 %
C18:2	12 - 15 %
C18:3	1,3 - 1,9 %

La introducción innovadora en la leche de burra de tal mezcla de triglicéridos en la que se estructura el ácido palmítico en la posición beta, es un correlato funcional con la leche materna, y una etapa importante en el camino que se acerca a la regla de oro, proporcionando, además, ventajas nutricionales indudables, tales como:

- Aumento de la captación de ácido palmítico;
- Aumento de la absorción de calcio;
- Aumento de la mineralización ósea;
- Reducción de la formación de jabones;
- Menor incidencia de estreñimiento.

En particular, en el grupo de ácidos grasos esenciales presentes en los aceites vegetales de la presente invención, se incluyen ácido linoleico (LA), el progenitor de la serie omega-6 y ácido alfa-linolénico (ALA), el progenitor de la serie omega-3, es decir, los ácidos grasos poliinsaturados que, para la intervención de algunas enzimas, dan lugar a los compuestos de cadena larga (LC-PUFA). Dichos ácidos grasos se denominan "esenciales" (EFA), ya que se deben tomar necesariamente con la dieta puesto que el cuerpo humano es incapaz de sintetizarlos.

Los ácidos grasos esenciales en el cuerpo realizan tres importantes funciones estrechamente relacionadas entre sí:

- función estructural,
- función metabólica,
- función de transporte de otros lípidos, principalmente colesterol.

Los ácidos grasos esenciales y sus derivados son componentes importantes de los lípidos estructurales, los lípidos involucrados en la constitución de las membranas celulares en todo el cuerpo, pero en particular de las neuronas, nervios, vainas de mielina, retina y los vasos del corazón.

El cerebro se desarrolla máximamente durante la vida fetal e inmediatamente después del parto, en su crecimiento se concentra más del 50% del coste de energía total en esa fase de la vida, de manera que el organismo humano tiene una alta demanda de grasa cuantitativa, pero también necesita la calidad de los ácidos grasos esenciales y sus derivados.

Los ácidos grasos poliinsaturados de la serie omega-6 y la serie omega-3 constituyen el 20 % de la materia sólida del cerebro. El ácido docosahexaenoico (DHA) (22:6) es un ácido graso esencial de la serie omega-3 que es el componente principal del cerebro, estructuras visuales y membranas excitables y se cree que ejercen una influencia importante en la estabilidad de la membrana y en las propiedades funcionales de las proteínas de la membrana de todas las células parenquimales.

Incluso el ácido araquidónico (ARA), principal responsable del crecimiento del feto, es un componente de las membranas excitables, pero también desempeña una función como segundo mensajero y precursor de muchas hormonas. Los LC-PUFA omega-6 y omega-3 son también precursores de numerosos mediadores de procesos inflamatorios.

Por lo tanto, los LC-PUFA influyen en el desarrollo físico y neuropsicológico de los niños y tienen efectos biológicos estructurales, actuando sobre la permeabilidad, la fluidez y la función de las membranas celulares, particularmente las sinápticas y retinianas, para las que una deficiencia puede dañar su progresión en la placenta, el sistema vascular, el cerebro y el sistema nervioso fetal general, con posibles consecuencias a largo plazo.

También se ha descubierto que tienen un impacto en el curso de infecciones, la agregación plaquetaria, la actividad cardiovascular, la piel, la inflamación, inmunidad, el resultado de los trasplantes y algunos tipos de cáncer.

15 En vista de lo anterior, es evidente la importancia de los lípidos de la dieta en todas las fases de la vida, pero especialmente en las fases con alta tasa de crecimiento y el metabolismo de tipo anabólico. Una nutrición adecuada desde un punto de vista cualitativo es esencial para establecer y mantener un estado de salud óptima tanto a nivel estrictamente físico como mental y cognitivo.

20 Dada la alta variabilidad de la leche de burra como materia prima del objeto de la invención presente, es posible enriquecer aún más la leche de burra, en forma líquida o liofilizada, con vitaminas, minerales, prebióticos, proteínas, carbohidratos, con el fin de ajustar las formulaciones a las normas y recomendaciones actuales vigentes o para satisfacer necesidades nutricionales, metabólicas y/o patológicas del recién nacido.

25 En una realización preferida de la invención presente, la composición lipídica usada para enriquecer la leche de burra comprende:

- los triglicéridos obtenidos a partir de aceites vegetales en los que el ácido palmítico (C16:0) se esterifica en la posición  $\beta$  (sn-2) en la molécula de glicerol en una cantidad equivalente al 40-55 % del peso total, preferiblemente equivalente al 50 %;
- aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico en una cantidad equivalente al 13-23 % del peso total, preferiblemente equivalente al 18 %;
- aceite de girasol equivalente al 5-15 % del peso total, preferiblemente equivalente al 10 %;
- aceite de colza equivalente al 2-5 % del peso total, preferiblemente al 3,2 %;
- aceite de linaza equivalente al 1-3 % del peso total, preferiblemente equivalente al 2,2 %;
- ácido araquidónico equivalente al 1-3 % del peso total, preferiblemente equivalente al 1,5 %;
- aceite de pescado refinado o aceite de algas con un alto contenido de DHA equivalente al 0,5-1,5 % del peso total, preferiblemente equivalente al 0,9 %;
- mono/diglicéridos de ácidos grasos equivalentes al 0,5-1,5 % del peso total, preferiblemente equivalentes al 1 %.

Por lo tanto, la invención tiene el objetivo de combinar la experiencia de los conocimientos actuales acerca de la importancia de la mezcla lipídica adecuada para el crecimiento del recién nacido y las características peculiares y únicas de antigenicidad de la leche de burra.

45 Dado que en el bebé la leche materna sigue siendo el modelo de referencia para los requisitos, en base a la investigación clínica en el campo, el Solicitante ha desarrollado una mezcla lipídica que hace a las actuales alternativas a la leche materna lo más similares posible al estándar de referencia.

50 Tal mezcla, que consiste en triglicéridos obtenidos a partir de aceites vegetales en los que del 35 al 55 % del contenido total de ácido palmítico (C16:0) se esterifica en la posición  $\beta$  (sn-2) en la molécula de glicerol, aceites vegetales ricos en ácidos grasos esenciales (omega-3 y omega-6) y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA), permite obtener una composición más similar a la de la leche materna, donde los ácidos grasos están principalmente insaturados. Además, el 70 % del ácido palmítico se esterifica en la posición  $\beta$  y se absorbe como monoglicérido. Esto asegura una absorción óptima de calcio y un aumento de la facilidad de evacuación: la adición de ácido palmítico esterificado en la posición  $\beta$  en la fórmula de la leche permite una mayor absorción de calcio, una mejora de la mineralización ósea, un tránsito intestinal más rápido.

Esta mezcla, junto con las cualidades hipoalergénicas ya conocidas y analizadas de la leche de burra, permite crear

una alternativa no disponible hasta el momento a la leche materna, proporcionando una estrategia nutricional para todos los bebés con alergia a las proteínas de la leche de vaca.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar que el producto a base de leche de burra enriquecida con la mezcla lipídica se somete a un tratamiento térmico a corto plazo del método de pasteurización y esterilización u otro método para prolongar la conservación del producto en el tiempo.

De hecho, de acuerdo con la invención, la leche de burra recolectada de diversas granjas, como una materia prima del producto alimenticio, antes de enriquecerse por la adición de la mezcla lipídica de acuerdo con la invención, se controla por el laboratorio interno que realiza un análisis físico-químico para formar su adecuabilidad y después se envía a un tratamiento térmico.

El tratamiento térmico puede conseguirse por un procesamiento de pasteurización relámpago de "alta temperatura a corto plazo" (HTST), UHT de esterilización directa o esterilización de vida útil extendida (ESL), ultrafiltración o cualquier otro tratamiento de inactivación de nueva generación de microorganismos patógenos (por ejemplo, CO<sub>2</sub> supercrítico) que puede extender la vida útil del producto, o, para la misma vida útil, asegurar características nutricionales de mejor calidad. Después, al tratamiento térmico le sigue, si es necesario, el proceso de liofilización o de secado por pulverización, y finalmente el envasado.

Por lo tanto, el método de producción del alimento a base de leche de burra enriquecida en una realización preferida de la presente invención comprende las siguientes etapas:

- recogida de la leche de burra de varias granjas;
- análisis físico-químico de la materia prima;
- adición de la mezcla lipídica que comprende:
  - una mezcla de triglicéridos obtenidos a partir de aceites vegetales, en la que del 40 al 50 % del contenido total del ácido palmítico (C16:0) se esterifica en la posición  $\beta$  (sn-2) en la molécula de glicerol;
  - aceites vegetales ricos en ácidos grasos esenciales;
  - ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga;
- tratamiento de inactivación de microorganismos patógenos;
- liofilización o secado por pulverización (opcional);
- envasado.

A continuación se describen en detalle algunos tratamientos térmicos teniendo en cuenta que también es posible utilizar otros métodos para prolongar la conservación del producto, tal como la ultrafiltración, o nuevas tecnologías, tal como la extracción supercrítica de CO<sub>2</sub>.

#### **Tratamiento térmico por pasteurización relámpago de "alta temperatura a corto plazo"**

La leche, después del calentamiento previo, se lleva rápidamente a una temperatura de al menos 72 °C durante al menos 15 segundos. Dicha pasteurización se consigue reduciendo la leche en una capa fina que se pasa a través de un sistema de tubos forrados y se calienta a una presión tal como para permitir en un tiempo definido alcanzar la temperatura deseada. Esta tecnología aprovecha el fenómeno por el cual las células bacterianas son atraídas hacia la superficie de los tubos de intercambio de calor: esto causa un flujo turbulento del fluido que asegura un intercambio de calor uniforme y eficiente. A una temperatura de 72 °C, se eliminan aproximadamente el 96 % de las bacterias; es de primordial importancia la reducción de bacterias de formas vegetativas de las micobacterias de tuberculosis y las bacterias de brucelosis, además de otros patógenos de importancia tales como, Enterobacterias, estafilococos coagulasa-positivos, Pseudomonas, Salmonella, Listeria y otros microorganismos menores, mientras que un 5 % consistente en esporas se resiste, es decir, formas de resistencia producidas por bacterias capaces de soportar el calor. Para ralentizar el crecimiento de las bacterias restantes, la leche se enfría rápidamente a 4 °C. La leche pasteurizada se puede almacenar a 4 °C durante cuatro a seis días. La leche que ha experimentado este tipo de tratamiento puede definirse como "fresca" y debe ser "fosfatasa negativa" y "peroxidasa positiva", como una demostración objetiva de que el tratamiento térmico se realiza a una temperatura no inferior a 72 °C y no superior a 78 °C durante 15 segundos, es decir, tratada a una temperatura por encima del nivel de destrucción de patógenos pero no recalentada.

**Tratamiento directo UHT (temperatura ultra alta)**

La leche de burra homogeneizada y precalentada a al menos 135 °C se trata después mediante una técnica de esterilización particular a través del uso de valor supercalentado durante no menos de 2-4 segundos.

5

Se denomina como sistema UHT "indirecto" cuando la esterilización de la leche se realiza a través de intercambiadores de calor (placas o tubos), mientras que se dice UHT "directa" (Uperización TM) cuando la esterilización de la leche se produce en contacto directo con el fluido de calentamiento, es decir, vapor de agua, que se evapora de nuevo en la fase de enfriamiento al vacío ultrarrápido posterior.

10

Típicamente, el tratamiento directo (aproximadamente 150 °C durante 2-4") da lugar a un mejor producto en relación con las propiedades organolépticas que las obtenidas por el tratamiento indirecto debido a un menor "efecto térmico". Posteriormente, la leche se enfría a 15-20 °C y avanza a través de sistemas cerrados estériles, mediante flujo continuo, hasta el envasado aséptico en recipientes estériles en línea (brik, botellas de PET o HDPE) que se cierran herméticamente. La condición de hermeticidad del envase es una condición esencial para el almacenamiento a largo plazo. Sin embargo, el tratamiento UHT no asegura la destrucción de las esporas más resistentes: la esterilidad comercial se define como "ausencia de microorganismos capaces de reproducirse y dañar el producto en condiciones normales de almacenamiento a temperatura ambiente" (estabilidad microbiológica). La leche UHT se considera de "larga duración" y se puede conservar durante aproximadamente 9-12 meses a temperatura ambiente.

20

**Tratamiento de calor de "vida útil extendida" (ESL)**

El tratamiento de calor ESL difiere del tratamiento UHT estándar en que proporciona temperaturas más bajas que el proceso UHT estándar. El producto se trata a una temperatura de aproximadamente 125 °C durante un tiempo que varía entre 0,2-5". El producto sometido a un tratamiento ESL se caracteriza por una vida útil de 21-28 días si se almacena en refrigeración (entre 0 y 4 °C), que es una vida útil intermedia entre la del producto en HTST y UHT. El proceso ESL hace que la leche conserve muchas características de la leche fresca.

25

**Liofilización**

30

La invención también proporciona la opción de comenzar a partir de leche de burra liofilizada y enriquecida para satisfacer las necesidades nutricionales específicas, las condiciones metabólicas y/o patológicas del recién nacido.

La liofilización es un proceso tecnológico que permite la eliminación total del agua de los alimentos que se reducen en polvo deshidratado que adecuadamente envasados permiten su almacenamiento durante un período largo a temperatura ambiente. Tales polvos, añadiendo la cantidad correcta de agua, toman el sabor y características nutricionales (o terapéuticas) que los productos líquidos tenían antes del tratamiento.

35

La liofilización puede definirse como un proceso de deshidratación controlada de productos previamente congelados que conducen a productos en polvos liofilizados con características muy similares a las de los productos originales con varias ventajas, tales como:

40

- almacenamiento a largo plazo, más de dos años, incluso a temperatura ambiente, si se envasa correctamente;
- protección contra una contaminación por microorganismos;
- higiene impecable;
- facilidad de transporte y almacenamiento del producto;
- rápida reconstitución del producto en cuanto el liofilizado se pone en presencia de agua;
- conservación de las características del producto original (legado de la proteína, contenido de vitaminas, minerales y lípidos, cuya conservación es asegurar la buena digestibilidad del producto).

45

50

El proceso de liofilización consiste en tres fases principales:

- congelación de muestras
- secado primario o sublimación que se escoge de acuerdo con los valores límite para la temperatura y la presión
- secado secundario o desorción de la muestra a partir de la cual el agua y/o el agua de cristalización se elimina.

55

### Secado por pulverización

Como alternativa a la liofilización, se ofrece la posibilidad de utilizar métodos de alto secado, tal como el secado por pulverización. El secado por pulverización es el proceso tecnológico más ampliamente usado para obtener alimentos en polvo, gránulos o aglomerados de productos líquidos (con al menos un 50 % de sólidos) como soluciones y emulsiones. El líquido se bombea en la cámara de aerosol por un atomizador centrífugo que, girando a alta velocidad, lo atomiza y lo centrifuga hacia las paredes de la cámara. La cámara se calienta internamente por una corriente de aire caliente (normalmente de 180 °C). El contacto entre el aire y el producto atomizado provoca la evaporación de pequeñas gotas de agua, formadas durante la nebulización.

10

La principal ventaja del producto tratado de acuerdo con el método de la presente invención, en comparación con los disponibles actualmente en el mercado, consiste en disponer de una leche de burra fresca sometida a tratamiento térmico por la última tecnología, homogeneizada, que tiene alto contenido calórico, envasada asépticamente y, por lo tanto, más segura, formulada para las necesidades específicas de la primera infancia y que después tiene un mayor contenido de calorías que el de una leche de burra de partida, disponible para el usuario final en condiciones higiénicas y estables controladas.

15

Características y ventajas adicionales de la presente invención aparecerán claramente a partir de los siguientes ejemplos dados de manera no limitante.

20

En la tabla 1 se da un ejemplo de formulación que ilustra la composición de la invención sin ninguna manera de limitar el fin de la misma.

Tabla 1

FÓRMULA ENRIQUECIDA DE LECHE DE BURRA CRUDA		
Composición analítica		por 100 ml
Valor energético	kcal	30-100
Proteínas	g	0,1-5,0
Lactoferrina	mg	0-150
Carbohidratos	g	1,0-10
Lactosa	g	0-10
Maltodextrinas	g	0-10
Fructoligosacáridos	g	0-10
Lípidos	g	0,1-10
Ácido linoleico	mg	60-2000
Ácido $\alpha$ -linolénico	mg	0-200
DHA	mg	0-200
ARA	mg	0-400
Colesterol	mg	0-10
Sodio	mg	0-100
Potasio	mg	0-200
Calcio	mg	0-200
Magnesio	mg	0-20
Fósforo	mg	0-120
Cloruro	mg	0-150
Hierro	mg	0-10
Cinc	mg	0-10
Cobre	mcg	0-200
Yodo	mcg	0-100
Manganeso	mcg	0-80
Selenio	mcg	0-10
Flúor	mcg	0-30
Vitamina A	mcg RE	0-500
Vitamina D <sub>3</sub>	mcg	0-50
Vitamina E	mg	0-30
Vitamina K <sub>1</sub>	mcg	0-60

Vitamina C	mg	0-200
Vitamina B <sub>1</sub>	mcg	0-200
Vitamina B <sub>2</sub>	mcg	0-250
Vitamina B <sub>6</sub>	mcg	0-200
Vitamina B <sub>12</sub>	mcg	0-20
Niacina	mg	0-20
Ácido Pantoténico	mg	0-20
Ácido fólico	mcg	0-200
Biotina	mcg	0-50
Taurina	mg	0-30
Colina	mg	0-30
Inositol	mg	0-50
L-Carnitina	mg	0-20
Nucleótidos	mg	0-30

#### Procedimiento experimental

- Las fases operativas para obtener un alimento a base de leche de burra enriquecido de acuerdo con la invención esterilizada por un tratamiento que inactiva microorganismos patógenos se describen con la presente. A la materia prima, constituida por la leche de burra cruda recogida de diversas granjas en el depósito de la planta, se le añade una mezcla de lípidos y vitaminas, especialmente preparada para integrarse en relación con la energía y la nutrición de la leche de burra y para conseguir la formulación indicada en la tabla 1.
- 10 Por medio de bombas y conductos, la leche de burra enriquecida se envía al sistema donde se realizan las siguientes etapas:
- 15 1. Tratamiento térmico (por medio de pasteurización, esterilización (uperización), "vida útil extendida" (ESL), y cualquier tipo de tratamiento conocido por el experto en el campo usado para asegurar la seguridad alimentaria y la conservación de las propiedades del producto.
  2. Expansión, refrigeración y desodorización en desgasificador: la leche a aproximadamente 150 °C pasa al desgasificador (una cámara de vacío) y se expande con la consecuente separación de los vapores, sustracción de calor y descenso de la temperatura a 80/90 °C con la posterior desodorización para la eliminación de las sustancias volátiles presentes eventualmente.
  - 20 3. Homogeneización: Cuando el producto está a una temperatura de aproximadamente 80 °C, tiene lugar la homogeneización, que tiene el objetivo de aplastar los glóbulos de grasa de tal manera que se reduzca el afloramiento espontáneo. La leche a través de una boquilla a una presión de 160 bar se lleva posteriormente a la presión atmosférica en una cámara de expansión, provocando una depresión que destruye los glóbulos.
  - 25 4. Refrigeración: Después, la leche se enfría gradualmente a temperatura ambiente de 20-30 °C para detener las reacciones químicas que se producen a altas temperaturas.
  5. Envasado: la leche UHT saliente del sistema se transporta en continuo a través de tubos estériles al envasado, realizado en recipientes estériles, preferentemente de tereftalato de polietileno (PET).
- 30 Las plantas de tratamiento están generalmente conectadas a un ordenador personal (PC) que permite controlar y registrar todo el proceso.
- Antes de la operación, la esterilización de la planta se realiza con vapor a 160 °C durante 50 minutos. Un dispositivo de seguridad inicia el temporizador sólo cuando la temperatura de salida es de 130 °C, para asegurar que todas las partes han alcanzado la esterilidad necesaria.
- 35 Al final del procesamiento, la planta se lava con una solución de sosa cáustica a 85 °C y después de un aclarado con ácido nítrico a 80 °C durante un tiempo total definido por características de la planta; incluso el procedimiento de la planta se maneja y se controla a través de un software especial para verificar la corrección del procedimiento.
- 40 El producto esterilizado obtenido se envasa en un ambiente aséptico y se almacena a temperatura ambiente.
- Como alternativa, si la leche ha experimentado el tratamiento HTST, se somete a una congelación rápida: la leche envasada se pone en el congelador ULT a temperaturas por debajo de -80 °C para asegurar el mantenimiento de las

características higiénicas y sanitarias durante un largo periodo (duración comercial propuesta de 1 a 2 años después del envasado).

5 Cuando el producto está hecho de leche de burra liofilizada, esta puede enriquecerse para lograr la formulación deseada, indicada en la tabla, tanto cuando está en forma de leche de burra cruda antes de someterse al proceso de liofilización o de pulverización como después del proceso de liofilización o pulverización por la adición de una mezcla en polvo, para conseguir la formulación deseada indicada en la tabla. Después, el producto se envasa en un ambiente aséptico y se almacena a temperatura ambiente.

## 10 Bibliografía

- American Academy of Pediatrics Committee on Nutrition. Hypoallergenic Infant Formulas. *Pediatrics* 2000; 106: 346-9.
- 15 - Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Puntis JW, Rigo J, Shamir R, Szajewska H, Turck D, Vandenplas Y, Weaver LT; ESPGHAN Committee on Nutrition Preparation and handling of powdered infant formula: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2004 Oct; 39(4): 320-2.
- Agostoni C, Domellöf M. Infant formulae: from ESPGAN recommendations towards ESPGHAN-coordinated global standards. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Nov; 41(5): 580-3.
- 20 - Agostoni C, Buonocore G, Carnielli VP, De Curtis M, Darmaun D, Decsi T, Domellof M, Embleton ND, Fusch C, Genzel-Boroviczeny O, Goulet O, Kalhan SC, Kolacek S, Koletzko B, Lapillonne A, Mihatsch W, Moreno L, Neu J, Poindexter B, Puntis J, Putet G, Rigo J, Riskin A, Salle B, Sauer P, Shamir R, Szajewska H, Thureen P, Turck D, van Goudoever JB, Ziegler EE; ESPGHAN Committee on Nutrition. Enteral nutrient supply for preterm infants: commentary from the European Society of Paediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2010 Jan; 50(1): 85-91.
- 25 - Bertino E, Gastaldi D, Monti G, Baro C, Fortunato D, Perono Garoffo L, Coscia A, Fabris C, Mussap M, Conti A. Detailed proteomic analysis on DM: insight into its hypoallergenicity. *Front Biosci (Elite Ed).* 2010; 2: 526-36.
- Braegger C, Chmielewska A, Decsi T, Kolacek S, Mihatsch W, Moreno L, Pieścik M, Puntis J, Shamir R, Szajewska H, Turck D, van Goudoever J; ESPGHAN Committee on Nutrition. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: a systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2011 Feb; 52(2): 238-50. Review
- 30 - Businco L, Giampietro PG, Lucenti P, Lucaroni F, Pini C, Di Felice G, Iacovacci P, Curadi C, Orlandi M. Allergenicity of mare's milk in children with cow's milk allergy. *J Allergy Clin Immunol.* 2000; 105(5): 1031-4.
- 35 - Cantani A, Micera M. Immunogenicity of hydrolysate formulas in children. Analysis of 202 reactions. *J Investig Allergol Clin Immunol* 2000; 10: 261-76.
- Carroccio A, Cavataio F, Montalto G, D'Amico D, Alabrese L, Iacono G. Intolerance to hydrolysed cow's milk proteins in infants: clinical characteristics and dietary treatment. *Clin Exp Allergy.* 2000; 30(11): 1597-603.
- 40 - Civardi E, Tzialla C, Garofoli F, Mazzucchelli I, Bollani L, Stronati M. Nutritional needs of premature infants. *J Matern Fetal Neonatal Med.* 2011 Oct; 24 Suppl 1: 27-9. Epub 2011 Sep 16. Review.
- D'Auria E, Mandelli M, Ballista P, Di Dio F, and Giovannini M. Growth Impairment and Nutritional Deficiencies in a Cow's Milk-Allergic Infant Fed by Unmodified Donkey's Milk. *Hindawi Publishing Corporation. Case Reports in Pediatrics.* 2011, 103825, doi:10.1155/2011/103825
- 45 - ESPGHAN Committee on Nutrition, Agostoni C, Axelsson I, Goulet O, Koletzko B, Michaelsen KF, Puntis J, Rieu D, Rigo J, Shamir R, Szajewska H, Turck D. Soy protein infant formulae and follow-on formulae: a commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006 Apr; 42(4): 352-61.
- Høst A, Koletzko B, Dreborg S, Muraro A, Wahn U, Aggett P, et al. Dietary products used in infants for treatment and prevention of food allergy. Joint Statement of the European Society for Pediatric Allergology and Clinical Immunology (ESPAI) Committee on Hypoallergenic Formulas and the European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition (ESPGHAN) Committee on Nutrition. *Arch Dis Child* 1999; 81: 80-4.
- 50 - Host A, Halken S. Hypoallergenic formulas - when, to, whom and how long; after more than 15 years we know the right indication! *Allergy* 2004; 59: 45-52.
- 55 - Iacono G, Carroccio A, Cavataio F, Montalto G, Soresi M, Balsamo V. Use of ass' milk in multiple food allergy. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1992; 14(2): 177-81.
- Koletzko B, Baker S, Cleghorn G, Neto UF, Gopalan S, Hernell O, Hock QS, Jirapinyo P, Lonnerdal B, Pencharz P, Pzyrembel H, Ramirez-Mayans J, Shamir R, Turck D, Yamashiro Y, Zong-Yi D. Global

standard for the composition of infant formula: recommendations of an ESPGHAN coordinated international expert group. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2005 Nov; 41(5): 584-99.

- Medhammar E, Wijesinha-Bettoni R, Stadlmayr B, Nilsson E, Charrondiere UR, Burlingame B. Composition of milk from minor dairy animals and buffalo breeds: a biodiversity perspective. *J Sci Food Agric.* 2011. doi: 10.1002/jsfa.4690.

5

- Monti G, Bertino E, Muratore MC, Coscia A, Cresi F, Silvestro L, Fabris C, Fortunato D, Giuffrida MG, Conti A. Efficacy of donkey's milk in treating highly problematic cow's milk allergic children: an in vivo and in vitro study. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007; 18(3): 258-64

10

- Salimei E, Fantuz F, Coppola R, Chiofalo B, Polidori P, and Varisco G. "Composition and characteristics of ass's milk" *Animal Research*, vol. 53, no. 1, pp. 67-78, 2004.

- Sampson HA. Update on food allergy. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 113: 805-19.

- Vita D, Passalacqua G, Di Pasquale G, Caminiti L, Crisafulli G, Rulli I, Pajno GB. Ass's milk in children with atopic dermatitis and cow's milk allergy: crossover comparison with goat's milk. *Pediatr Allergy Immunol.* 2007; 18(7): 594-8.

15

**REIVINDICACIONES**

1. Alimento para sujetos con alergia o intolerancia a la proteína de la leche de vaca, particularmente para bebés prematuros y/o en un bebé a término, **caracterizado por que** está basado en leche de burra, cruda o liofilizada, complementada con una mezcla lipídica que comprende:

- una mezcla de triglicéridos obtenidos a partir de aceites vegetales, en la que del 40 al 50 % del contenido total del ácido palmítico (C16:0) se esterifica en la posición β (sn-2) en la molécula de glicerol;
- aceites vegetales ricos en ácidos grasos esenciales;
- ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga;

10

y sometido posteriormente a tratamiento de inactivación de microorganismos patógenos.

2. Alimento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** la composición de ácidos grasos de dicha mezcla de triglicéridos es:

15

C8:0	0,6 - 1,5 %
C10:0	0,7 al 1,5 %
C12:0	9,5 al 14 %
C14:0	3 - 5 %
C16:0	21 - 24 %
C18:0	2,5 - 5 %
C18:1	38 - 44 %
C18:2	12 - 15 %
C18:3	1,3 - 1,9 %.

3. Alimento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** en la mezcla lipídica, dicha mezcla de triglicéridos está presente en un porcentaje que varía del 40 al 55 % del peso total, preferiblemente en un porcentaje que varía del 48 al 52 % del peso total, incluso más preferiblemente al 50 % del peso total.

20

4. Alimento de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado por que** la mezcla lipídica comprende adicionalmente:

25

- aceite de girasol con alto contenido en ácido oleico entre el 13 al 23 % del peso total;
- aceite de girasol entre el 5 al 15 % del peso total;
- aceite de colza entre el 2 al 5 % del peso total;
- aceite de linaza entre el 1 al 3 % del peso total;
- ácido araquidónico entre el 1 al 3 % del peso total;
- aceite de pescado refinado entre el 0,5 al 1,5 % del peso total;
- mono/diglicéridos de ácidos grasos entre el 0,5 al 1,5 % del peso total.

30

5. Alimento de acuerdo con la reivindicación 3, **caracterizado por que** la mezcla lipídica comprende adicionalmente:

35

- aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico que asciende al 18 % del peso total;
- aceite de girasol que asciende al 10 % del peso total;
- aceite de colza que asciende al 3,2 % del peso total;
- aceite de linaza que asciende al 2,2 % del peso total;
- ácido araquidónico que asciende al 1,5 % del peso total;
- aceite de pescado refinado que asciende al 0,9 % del peso total;
- mono/diglicéridos de ácidos grasos que ascienden al 1 % del peso total.

40

6. Alimento de acuerdo con la reivindicación 1, **caracterizado por que** su composición analítica es como se indica a continuación:

45

proteínas	0,1-5,0	g
lactoferrina	0-150	mg
carbohidratos	1,0-10	g
lactosa	0-10	g

maltodextrina	0-10	g
fructooligosacáridos	0-10	g
grasa	0,1-10	g
ácido linoleico	60-2000	mg
ácido $\alpha$ -linolénico	0-200	mg
DHA	0-200	mg
ARA	0-400	mg
colesterol	0-10	mg
sodio	0-100	mg
potasio	0-200	mg
calcio	0-200	mg
magnesio	0-20	mg
fósforo	0-120	mg
cloro	0-150	mg
hierro	0-10	mg
cinc	0-10	mg
cobre	0-200	mcg
yodo	0-100	mcg
manganeso	0-80	mcg
selenio	0-10	mcg
flúor	0-30	mcg
vitamina A	0-500 RE	mcg
vitamina D3	0-50	mcg
vitamina E	0-30	mg
vitamina K1	0-60	mcg
vitamina C	0-200	mg
vitamina B1	0-200	mcg
vitamina B2	0-250	mcg
vitamina B6	0-200	mcg
vitamina B12	0-20	mcg
niacina	0-20	mg
ácido pantoténico	0-20	mg
ácido fólico	0-200	mcg
biotina	0-50	mcg
taurina	0-30	mg
colina	0-30	mg
inositol	0-50	mg
L-Carnitina	0-20	mg
Nucleótidos	0-30	mg

7. Método para la producción de un alimento para pacientes con alergia o intolerancia a la proteína de la leche de vaca, particularmente para bebés prematuros y/o en bebés a término, **caracterizado por que** comprende las siguientes etapas:

5

- recogida de la leche de burra de diversas granjas;
- análisis químico-físico de la materia prima;
- adición de una mezcla lipídica que comprende:

10

- una mezcla de triglicéridos obtenidos a partir de aceites vegetales, en la que del 40 al 50 % del contenido total del ácido palmítico (C16:0) se esterifica en la posición  $\beta$  (sn-2) en la molécula de glicerol;
- aceites vegetales ricos en ácidos grasos esenciales;
- ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga;

15

- tratamiento para la inactivación de microorganismos patógenos;
- liofilización o secado por pulverización (opcional);
- envasado.

20 8.

Método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** la composición de ácidos grasos

de dicha mezcla de triglicéridos es:

C8:0	0,6 - 1,5 %
C10:0	0,7 a 1,5 %
C12:0	9,5 al 14 %
C14:0	3 - 5 %
C16:0	21 - 24 %
C18:0	2,5 - 5 %
C18:1	38 - 44 %
C18:2	12 - 15 %
C18:3	1,3 - 1,9 %.

9. Método de acuerdo con la reivindicación 7, **caracterizado por que** en la mezcla lipídica, dicha mezcla de triglicéridos está presente en un porcentaje que varía del 40 al 55 % del peso total, preferiblemente en un porcentaje que varía del 48 al 52 % del peso total, incluso más preferiblemente al 50 % del peso total.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación anterior, **caracterizado por que** la mezcla lipídica comprende adicionalmente:

- aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico entre el 13 y el 23 % del peso total;
- aceite de girasol entre el 5 al 15 % del peso total;
- aceite de colza entre el 2 al 5 % del peso total;
- aceite de linaza entre el 1 al 3 % del peso total;
- ácido araquidónico entre el 1 al 3 % del peso total;
- aceite de pescado refinado entre el 0,5 al 1,5 % del peso total;
- mono/diglicéridos de ácidos grasos entre el 0,5 al 1,5 % 1 % del peso total.

11. Método de acuerdo con la reivindicación 10, **caracterizado por que** la mezcla lipídica comprende adicionalmente:

- aceite de girasol con alto contenido de ácido oleico que asciende al 18 % del peso total;
- aceite de girasol que asciende al 10 % del peso total;
- aceite de colza que asciende al 3,2 % del peso total;
- aceite de linaza que asciende al 2,2 % del peso total;
- ácido araquidónico que asciende al 1,5 % del peso total;
- aceite de pescado refinado que asciende al 0,9 % del peso total;
- mono/diglicéridos de ácidos grasos que ascienden al 1 % del peso total.

12. Método para la producción de un alimento para pacientes con alergia o intolerancia a la proteína de la leche de vaca, particularmente para bebés prematuros y/o en bebés a término, de acuerdo con las reivindicaciones 7 en adelante, **caracterizado porque** el tratamiento para la inactivación de microorganismos patógenos se realiza por pasteurización rápida o tratamiento UHT directo o liofilización o pulverización o cualquier otro método conocidos por el experto en el campo adecuado para prolongar la conservación del producto.