

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 416**

51 Int. Cl.:

A23L 33/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2008 PCT/IL2008/001437**

87 Fecha y número de publicación internacional: **07.05.2009 WO09057121**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2008 E 08844965 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.01.2018 EP 2230942**

54 Título: **Mezcla de lípidos para la nutrición de bebés**

30 Prioridad:

01.11.2007 US 996109 P

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

22.03.2018

73 Titular/es:

**ENZYMOTEC LTD. (100.0%)
P.O. Box 6, 5 Hatasiya Street
23106 Migdal Haemek, IL**

72 Inventor/es:

**BAR YOSEF, FABIANA;
PELLED, DORI y
KATZ, ARIEL**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 660 416 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

Mezcla de lípidos para la nutrición de bebés

Campo de la invención

Esta invención se refiere al campo de la nutrición de bebés.

5 Antecedentes de la invención

La cantidad y calidad del suministro de nutrientes durante la infancia tiene consecuencias inmediatas sobre el crecimiento, la composición corporal, la salud y el bienestar y tiene importantes consecuencias a largo plazo sobre el desarrollo y la función de los órganos, los riesgos de enfermedad, así como la capacidad cognitiva en la madurez.

10 En la leche materna humana (HBM), aproximadamente el 50% de las calorías de la dieta se suministran como grasa de leche. La grasa de leche humana (HMF) está compuesta de aproximadamente 30-40 g/L de lípidos. De ellos, aproximadamente el 98% son triglicéridos, 0.3-1% de fosfolípidos y 0.4% de colesterol [WO05/051091, WO 06/114791].

15 Los lípidos (dietéticos), tales como los encontrados en HBM, son indispensables para, por ejemplo, crecimiento y desarrollo normales como componentes principales de las membranas celulares y los tejidos, y, por ejemplo, son importantes en los procedimientos de transducción de señales y en una variedad de vías bioquímicas y biosintéticas. Muchos lípidos, y especialmente triglicéridos, son parte de la nutrición humana a diario.

20 Las grasas de triglicéridos, o triglicéridos, son la principal fuente de energía de los recién nacidos (Hamosh et al., Pediatrics 1985, 75 (suppl):146-150). Además de proporcionar 40% a 50% de las calorías totales en la leche humana o fórmula, los triglicéridos son esenciales para el desarrollo normal ya que proporcionan ácidos grasos necesarios para el desarrollo cerebral, son una parte integral de las membranas celulares y son un vehículo para las vitaminas y hormonas solubles en grasa en la leche. Adicionalmente, estos triglicéridos ricos en energía se pueden almacenar en el cuerpo en cantidades casi ilimitadas en contraste con la capacidad de almacenamiento limitada de carbohidratos y proteínas.

25 La composición de triglicéridos de HMF es única en su composición y distribución de ácidos grasos. La HMF se caracteriza por un contenido total de ácido palmítico (C16:0) de aproximadamente el 17-25%, del cual aproximadamente el 70% están situados en la posición sn-2 de los triglicéridos [WO 05/051091]. Además, las posiciones sn-1 y sn-3 son ricas en ácidos grasos insaturados, especialmente ácidos grasos monoinsaturados, tal como el ácido oleico (C18:1), que es de gran importancia para la nutrición y el desarrollo del bebé.

Las posiciones sn-1 y sn-3 de las grasas vegetales son ricas en ácidos grasos saturados y, de este modo, no son apropiadas para la nutrición de bebés. Por consiguiente, las fórmulas infantiles avanzadas incluyen grasas estructuradas producidas para imitar la estructura única y las características de HMF.

30 Los fosfolípidos son un componente nutricional esencial de HBM. Aunque la composición de fosfolípidos permanece constante y no está influenciada por la dieta de la madre, el nivel de fosfolípidos en la HBM cambia con la edad del bebé.

35 Los fosfolípidos están compuestos de cinco unidades estructurales principales: esfingomielina (SM), fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilserina (PS) y fosfatidilinositol (PI). [Thompson DK. et al. Comprehensive Reviews In Food Science And Food Safety 6: 79-102 (2007)].

40 Algunos fosfolípidos, y especialmente los extraídos de la soja, se usan como suplementos dietéticos y una variedad de beneficios para la salud están asociados con su ingesta. Estos beneficios incluyen la mejora de las funciones cognitivas, la mejora de la memoria y la concentración, el mantenimiento de la composición de la membrana celular y la contribución al bienestar general. Los fosfolípidos y las lecitinas son una fuente de colina y mejoran la biodisponibilidad de otros nutrientes y productos terapéuticos.

45 Los niveles de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en HBM varían ampliamente dependiendo del tipo de grasa consumida por una madre. Aun así, en comparación con la grasa de leche de vaca, un amplio espectro de ácidos grasos y un alto contenido de ácidos grasos insaturados, particularmente ácido linoleico, están presentes en la HBM. En las fórmulas basadas en leche de vaca, por otro lado, se adicionan mezclas de aceite vegetal para proporcionar una cantidad adecuada de PUFA, incluido el ácido linoleico y otros.

También los glicerofosfolípidos, la esfingomielina, el colesterol y sus derivados, aunque se encuentran en cantidades relativamente pequeñas en HBM, juegan un papel importante en la nutrición de bebés en desarrollo, y juegan papeles esenciales en todos los sistemas fisiológicos y ciclos del cuerpo humano.

50 Los bebés que no pueden ser amamantados o que no deben recibir HBM, o para quienes la HBM no está disponible, requieren sustitutos de la leche materna. Las alternativas más apropiadas a la leche humana son las fórmulas infantiles.

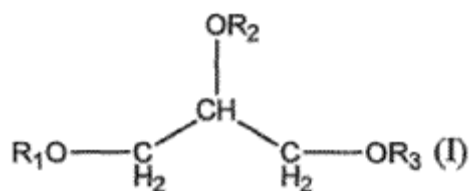
Tales fórmulas preparadas industrialmente se basan en leche bovina o se derivan de una fuente vegetariana, tal como la soja, y tratan de simular la composición y las propiedades biológicas de HBM. Estos sustitutos conocidos intentan imitar el contenido de triglicéridos de HBM.

- 5 Es un objeto de la presente invención proporcionar una composición mejorada de la leche humana sustituta que comprenda los componentes esenciales encontrados en HMF que comprende triglicéridos, fosfolípidos y ácidos grasos, teniendo beneficios asociados con el desarrollo mental y físico de un bebé junto con los beneficios asociados con el desarrollo intestinal y función de un bebé.

Resumen de la invención

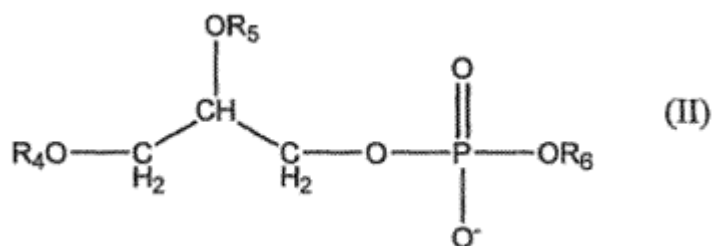
La presente invención proporciona de este modo una composición, que no es leche materna humana, que comprende

- 10 (i) al menos dos triglicéridos de fórmula I:



en la que R₁, R₂ y R₃ pueden ser idénticos o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente de residuos de ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA); y en la que un LC-PUFA está conjugado con los triglicéridos (R₁ y/o R₂ y/o R₃)

- 15 (ii) al menos dos fosfolípidos de fórmula II:



en la que R₄ y R₅ son cada uno un sustituyente que tiene independientemente los significados de R₁, R₂, R₃; y en el que un LC-PUFA se conjuga con los fosfolípidos (R₄ y/o R₅), y en el que R₆ se selecciona de colina, inositol, etanolamina y serina;

- 20 (iii) LC-PUFA libres;

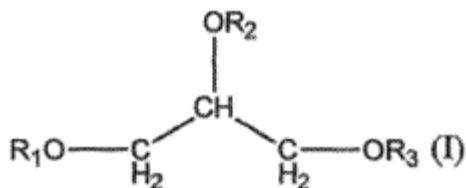
y en el que al menos aproximadamente 1% del LC-PUFA en la composición está conjugado con dichos al menos dos fosfolípidos, y los LC-PUFA presentes en la composición como LC-PUFA libre, conjugados con los triglicéridos y con los fosfolípidos comprenden ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA).

Se describen adicionalmente usos de las composiciones de la invención.

- 25 Descripción detallada de la invención

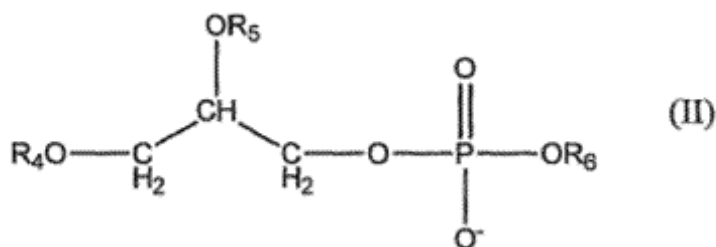
En un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición, que no es leche materna humana, que comprende

- (i) al menos dos triglicéridos de fórmula I:



en la que R_1 , R_2 y R_3 pueden ser idénticos o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente de residuos de ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA); y en la que un LC-PUFA está conjugado con los triglicéridos (R_1 y/o R_2 y/o R_3)

- 5 (ii) al menos dos fosfolípidos de fórmula II:



en la que R_4 y R_5 son cada uno un sustituyente que tiene independientemente los significados de R_1 , R_2 , R_3 ; y en el que un LC-PUFA se conjuga con los fosfolípidos (R_4 y/o R_5), y en el que R_6 se selecciona de colina, inositol, etanolamina y serina;

- 10 (iii) LC-PUFA libres; y en la que al menos aproximadamente 1% del LC-PUFA en la composición está conjugado con dichos al menos dos fosfolípidos, y los LC-PUFA presentes en la composición como LC-PUFA libre, conjugados con los triglicéridos y con los fosfolípidos comprenden ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA).

Una composición (mezcla) comprende una mezcla de dichos triglicéridos de fórmula I, dichos fosfolípidos de fórmula II y LC-PUFA (en forma libre y en forma conjugada). Una mezcla de la invención comprende dos o más triglicéridos de fórmula I, dos o más fosfolípidos de fórmula II y LC-PUFA, en el que la mezcla por lo general comprende (i) LC-PUFA libres, (ii) LC-PUFA conjugados con los triglicéridos (R_1 y/o R_2 y/o R_3) y (iii) LC-PUFA conjugados con los fosfolípidos (R_4 y/o R_5).

Dichos LC-PUFA comprenden ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA).

- 20 En una realización, el contenido de peso de AA es mayor que el de DHA. En una realización adicional, la proporción de contenido en peso entre AA y DHA es al menos aproximadamente 1.1. En una realización adicional, la proporción de contenido en peso entre AA y DHA es al menos aproximadamente 1.3. En otra realización más, la proporción de contenido en peso entre AA y DHA es al menos aproximadamente 1.5. En una realización adicional, la proporción de contenido en peso entre AA y DHA es al menos aproximadamente 2. En otra realización más, la proporción de contenido en peso entre AA y DHA es al menos aproximadamente 3. En otra realización, la proporción de contenido en peso entre AA y DHA es al menos aproximadamente 10.

En una realización adicional, R_5 es DHA o AA.

En otra realización más, R_4 es DHA o AA.

- 30 En una realización específica, al menos aproximadamente el 2% (p/p) del contenido de LC-PUFA de la formulación se conjuga con al menos un fosfolípido. En otra realización más, al menos aproximadamente 5% (p/p) del contenido de LC-PUFA de la formulación se conjuga con al menos un fosfolípido. En otra realización más, al menos aproximadamente 10% (p/p) del contenido de LC-PUFA de la formulación se conjuga con al menos un fosfolípido. En otra realización, al menos aproximadamente 20% (p/p) del contenido de LC-PUFA de la formulación se conjuga con al menos un fosfolípido. En otra realización más, al menos aproximadamente el 50% (p/p) del contenido de LC-PUFA de la formulación se conjuga con al menos un fosfolípido.

- 35 En una realización, al menos el 1% del LC-PUFA conjugado está conjugado en la posición sn-2 de dicho al menos un fosfolípido. En una realización adicional, al menos aproximadamente el 2% del LC-PUFA conjugado está conjugado en la posición sn-2 de dicho al menos un fosfolípido. En otra realización, al menos aproximadamente 33% del LC-PUFA conjugado está conjugado en la posición sn-2 de dicho al menos un fosfolípido. En una realización adicional, al menos

- aproximadamente 40% del LC-PUFA conjugado se conjuga en la posición sn-2 de dicho al menos un fosfolípido. En otra realización más, al menos aproximadamente el 45% del LC-PUFA conjugado está conjugado en la posición sn-2 de dicho al menos un fosfolípido. En otra realización, al menos aproximadamente el 50% del LC-PUFA conjugado está conjugado en la posición sn-2 de dicho al menos un fosfolípido. En otra realización más, al menos aproximadamente el 60% del LC-PUFA conjugado está conjugado en la posición sn-2 de dicho al menos un fosfolípido. En otra realización, al menos aproximadamente 70% del LC-PUFA conjugado está conjugado en la posición sn-2 de dicho al menos un fosfolípido.
- En otra realización, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 0.1%. En otra realización, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 0.5%. En una realización adicional, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 1%. En otra realización, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 2%. En otra realización, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 5%. En una realización adicional, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 7%. En una realización adicional, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 10%. En una realización adicional, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 15%. En una realización adicional, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 20%. En una realización adicional, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 35%. En una realización adicional, la cantidad total de fosfolípidos en la composición es al menos aproximadamente 50%.
- En una realización adicional, dicho triglicérido y/o dicho fosfolípido se derivan de al menos un material de lecitina en bruto seleccionado del grupo que consiste en un organismo vegetal, marino y acuícola.
- En un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición farmacéutica que comprende una composición de la presente invención.
- Las vías de administración apropiadas para las composiciones de la presente invención son la administración por vía oral, bucal, sublingual, mediante sonda de alimentación, tópica, transdérmica o parenteral (que incluye la administración subcutánea, intramuscular, intravenosa e intradérmica). En una realización específica, los compuestos se pueden administrar por vía oral.
- La dosis exacta y el régimen de administración de la composición dependerán necesariamente del efecto terapéutico o nutricional que se desee alcanzar y pueden variar con la fórmula particular, la vía de administración, y la edad y el estado del sujeto individual a quien la composición se debe administrar.
- La presente invención también proporciona de este modo composiciones farmacéuticas de la invención en mezcla con auxiliares farmacéuticamente aceptables, y opcionalmente otros agentes terapéuticos. Los auxiliares deben ser "aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros ingredientes de la composición y no perjudiciales para los destinatarios de los mismos.
- En una realización, la composición farmacéutica comprende además al menos un agente farmacéuticamente activo.
- Las composiciones de la invención se pueden preparar mediante cualquier procedimiento bien conocido en el arte de la farmacia. Tales métodos incluyen la etapa de asociar los ingredientes con cualquier agente auxiliar. El (los) agente(s) auxiliar(es), también denominados ingrediente(s) accesorio(s), incluyen los convencionales en la técnica, tales como portadores, rellenos, aglutinantes, diluyentes, disgregantes, lubricantes, colorantes, agentes aromatizantes, antioxidantes y agentes humectantes.
- Las composiciones farmacéuticas apropiadas para administración oral se pueden presentar como unidades de dosificación discretas tales como píldoras, comprimidos, grageas o cápsulas, o como un polvo o gránulos, o como una solución o suspensión.
- Para administración parenteral, las composiciones apropiadas incluyen inyección estéril acuosa y no acuosa. Las composiciones se pueden presentar en recipientes de dosis unitaria o multidosis, por ejemplo, viales y ampollas sellados, y se pueden almacenar en una condición de deshidrato por congelación (liofilizado) que requiere solamente la adición de un portador líquido estéril, por ejemplo, agua, antes de utilizar. Para la administración transdérmica, se pueden contemplar, por ejemplo, geles, parches o pulverizador.
- La invención describe además un paquete comercial para preparar una fórmula que comprende: (a) una composición según la invención que, tras la administración a un sujeto, por ejemplo, mejora, mantiene o trata afecciones asociadas con el desarrollo mental y físico de un bebé, (b) opcionalmente al menos uno de proteína, carbohidrato, vitamina, mineral, aminoácido, nucleótido y aditivo activo o no activo fisiológicamente aceptable; (c) opcionalmente al menos un portador o diluyente fisiológicamente aceptable para transportar el (los) constituyente(s) definido(s) en (a) y (b); (d) medios y receptáculos para mezclar los constituyentes definidos en (a), (b) y/o (c); y (e) instrucciones de uso tales como, pero sin limitarse a, términos de almacenamiento, instrucciones para la preparación de la fórmula para administración, diluciones requeridas, dosificaciones, frecuencia de administración y similares.

Un paquete comercial también puede contener una composición de la invención en una forma lista para usar, junto con instrucciones de uso. Las dosis generalmente se determinan según la edad, el peso, el sexo y el estado del sujeto, según la buena práctica médica conocida por el médico tratante y otro personal médico.

- 5 Para obtener una fórmula deseada de la invención, una composición de la invención se puede mezclar con otros componentes tales como, pero sin limitación, una fuente de proteína, una fuente de carbohidratos, minerales, vitaminas, nucleótidos, aminoácidos y opcionalmente al menos uno de un portador, diluyente, aditivo o excipiente, todos los cuales son apropiados para el consumo y/o la administración de mamíferos y son farmacéuticamente aceptables.

En un aspecto de la presente invención, se proporciona una composición nutricional que comprende una composición de la invención.

- 10 Una composición nutricional como se usa en este documento puede ser cualquier composición nutricional que incluye, pero no se limita a, sustituto de la grasa de la leche humana, fórmula infantil, producto lácteo, helado, galleta, producto de soja, de panadería, repostería y pan, salsa, sopa, alimentos preparados, alimentos congelados, condimentos, productos de confitería, aceites y grasas, margarinas, productos para untar, cereales, productos instantáneos, alimentos para bebés, alimentos para niños, bar, refrigerios, dulces y productos de chocolate.

- 15 En otro aspecto de la invención, se proporciona una composición nutracéutica que comprende una composición de la invención.

- 20 Una composición nutracéutica como se usa en este documento puede ser cualquier nutracéutico, que puede ser cualquier sustancia que se puede considerar un alimento o parte de un alimento y proporciona beneficios médicos o de salud, incluida la prevención y el tratamiento de enfermedades. Tales composiciones nutracéuticas incluyen, pero no se limitan a, un aditivo alimentario, un complemento alimenticio, un suplemento dietético, alimentos genéticamente modificados, tales como, por ejemplo, vegetales, productos a base de hierbas y alimentos procesados, tales como cereales, sopas y bebidas, y alimentos funcionales estimulantes y comida farmacéutica.

En otro aspecto más de la invención, se proporciona un alimento funcional que comprende una composición según la invención.

- 25 Un alimento funcional como se usa en este documento puede ser cualquier alimento funcional, que incluye, pero no se limita a, productos lácteos, helado, galletas, producto de soja, panadería, repostería y pan, salsa, sopa, comida preparada, comida congelada, condimento, productos de confitería, aceites y grasas, margarina, comida para untar, relleno, cereales, productos instantáneos, bebidas y batidos, alimentos para bebés, alimentos para niños, bar, refrigerios, golosinas y productos de chocolate.

- 30 En un aspecto adicional de la invención, se proporciona una fórmula infantil que comprende una composición de la invención.

- 35 Un bebé, como se usa en este documento, pretende abarcar un bebé humano o cualquier bebé de mamífero no humano. Un bebé, como se usa en este documento, abarca a cualquier bebé, tal como, pero no se limita a, un recién nacido, un bebé prematuro y a término, bebés pequeños prematuros, bebés con muy bajo peso al nacer (VLBW) o bajo peso al nacer extremo (ELBW) particularmente aquellos con inmadurez general, por ejemplo, de la vía gastrointestinal o cualquier otro riesgo para la salud conocido para una persona experta en el arte.

También se describe un procedimiento para mejorar, promover o mantener el desarrollo de funciones cognitivas en un bebé que comprende administrar a dicho bebé una composición de la invención.

- 40 La frase "mejorar, promover o mantener", como se usa en este documento, pretende abarcar potenciar, avanzar, soportar, progresar, retener, mantener, preservar o soportar cualquier función de desarrollo deseada en un bebé mamífero. Tales funciones de desarrollo incluyen el desarrollo de funciones cognitivas en un bebé, desarrollo de cerebro y retina en un bebé, desarrollo de agudezas visuales en un bebé, reducción de la peroxidación lipídica en un bebé, calidad de crecimiento de un bebé, desarrollo del sistema nervioso central (CNS) en un bebé y así sucesivamente.

- 45 El término "desarrollo de funciones cognitivas en un bebé" como se usa en este documento pretende abarcar el desarrollo de una gama de funciones y habilidades tales como, pero no se limitan a, la inteligencia, la creatividad (generar y abrirse a nuevas ideas, percibir nuevas relaciones), memoria (codificación, almacenamiento, recuperación), funciones ejecutivas (manejo de novedad, planificación e implementación, monitoreo del desempeño, vigilancia, inhibición de la tarea de información irrelevante), recursos cognitivos (velocidad de procesamiento de la información, capacidad de memoria de trabajo, capacidad atencional), atención, aprendizaje, percepción, acción, planificación, resolución de problemas e imágenes mentales.

- 50 Un procedimiento bien conocido para evaluar el desarrollo cognitivo en un bebé es una evaluación del índice de desarrollo mental (MDI) del bebé según las escalas de desarrollo neurológico de Bayley (Bayley, N. The Bayley Scales of Infant Development II. New York: New York Psychological Corp., 1993).

En un aspecto adicional, se describe un procedimiento para mejorar, promover o mantener el desarrollo de cerebro y retina en un bebé que comprende administrar a dicho bebé una composición de la invención.

5 El término "desarrollo de cerebro y retina en un bebé" como se usa en este documento pretende abarcar procedimientos tales como, pero no limitados a, aquellos que dan como resultado la progresión del cerebro y la retina a lo largo del tiempo, desde su formación hasta la estructura madura. El resultado del desarrollo del cerebro es responsable de la coordinación y el control de las actividades corporales y la interpretación de la información de los sentidos (tal como, por ejemplo, la vista, el oído, el olfato, etc.).

En otro aspecto, se describe un procedimiento para mejorar, promover o mantener el desarrollo de agudezas visuales en un bebé que comprende administrar a dicho bebé una composición de la invención.

10 El término "desarrollo de agudezas visuales en un bebé" como se usa en este documento pretende abarcar la capacidad del ojo para resolver detalles finos o distancias pequeñas, tal como se mide por cualquier medio apropiado en la técnica, incluida la electrorretinografía. La "agudeza visual mejorada" se refiere a cualquier mejora en la capacidad del ojo para resolver detalles finos o distancias pequeñas, como se mide por cualquier medio apropiado en la técnica.

15 Se describe un procedimiento de reducción de la peroxidación de lípidos en un bebé que comprende administrar a dicho bebé una composición de la invención.

El término "peroxidación de lípidos reductores en un bebé" como se usa en este documento pretende abarcar la mejora, prevención, ralentización del deterioro oxidativo de lípidos que contienen cualquier número de dobles enlaces carbono-carbono y prevención de la inflamación.

20 Se describe adicionalmente un procedimiento para mejorar, promover o mantener la calidad de crecimiento de un bebé administrando a dicho bebé una composición de la invención.

El término "calidad de crecimiento de un bebé" como se usa en este documento pretende abarcar la ganancia de peso, cambios en la longitud y circunferencia de la cabeza, y otro desarrollo fisiológico adicional como se da en los datos de referencias de crecimiento y procedimientos de examen físico conocidos para una persona experta en el arte.

25 Todavía se describe adicionalmente un procedimiento para mejorar, promover o mantener el desarrollo del CNS en un bebé que comprende administrar a dicho bebé una composición de la invención.

El término "desarrollo del CNS en un bebé" como se usa en este documento pretende abarcar cualquier procedimiento tal como, pero no se limita a, aquellos que resultan en la progresión del sistema nervioso central a lo largo del tiempo, desde su formación hasta la estructura madura y función.

30 Otra divulgación más se refiere a un procedimiento para mejorar la absorción intestinal de ácidos grasos omega-3 y/u omega-6 en neonatos prematuros sanos, no sanos y que comprende administrar a dicho bebé la composición de la invención.

El término "mejora de la absorción intestinal de ácidos grasos omega-3 y/u omega-6" como se usa en este documento pretende abarcar la mejora y el aumento de procedimientos tales como, pero no se limita a, aquellos por los cuales los nutrientes ácidos grasos omega-3 y/u omega-6 se absorben del contenido del intestino.

35 Otra divulgación se refiere a un procedimiento para mejorar, promover o mantener la madurez intestinal en bebés que comprende administrar a dicho bebé la composición de la invención.

40 El término "mejorar, promover o mantener la madurez intestinal en bebés" como se usa en este documento pretende abarcar, por ejemplo, promover el crecimiento y la maduración normal del tracto gastrointestinal, restaurar o mantener la función gastrointestinal, promover el crecimiento veloso, promover la proliferación del intestino delgado y grueso en un mamífero sano, por ejemplo, para permitir una mayor absorción de nutrientes.

Una divulgación adicional abarca el uso de una composición de la invención, para la preparación de una composición farmacéutica o nutracéutica para el tratamiento de bebés.

45 En una realización, una composición de la invención se prepara a partir de una fuente natural, sintética o semisintética. En una realización específica adicional, dicha fuente natural es una fuente de plantas, animales o microorganismos. En otra realización más, la producción de dicha composición lipídica implica una catálisis enzimática.

En otra realización, una composición de la invención se puede sintetizar por extracción polar de una fuente marina, vegetal, animal o de microorganismos. Las rutas de síntesis apropiadas para sintetizar una composición de la invención se describen en "Lecithins: Sources Manufacture and uses" Bernard F. Szuhaj Ed. (1989) que se incorpora en este documento como referencia.

En una realización de la invención, las composiciones farmacéuticas o nutracéuticas están en una forma de administración de dosis.

En una realización, una composición de la presente invención comprende además al menos un triglicérido de fórmula I, que tiene al menos 30% (p/p) de ácido palmítico total conjugado en la posición sn-2.

5 En otra realización, una composición de la presente invención comprende además (se mezcla con) al menos un triglicérido de fórmula I que tiene el siguiente perfil de ácido graso conjugado:

0-10% de ácidos grasos C8:0 de los ácidos grasos totales;

0-10% de ácidos grasos C10:0 de los ácidos grasos totales;

0-22% de ácidos grasos C12:0 de los ácidos grasos totales;

10 0-15% de ácidos grasos C14:0 de los ácidos grasos totales;

15-55% de ácidos grasos C16:0 de los ácidos grasos totales de los cuales al menos 30% están conjugados en la posición sn-2 del triglicérido;

1-7% de ácidos grasos C18:0 de los ácidos grasos totales;

20-75% de ácidos grasos C18:1 de los ácidos grasos totales;

15 2-40% de ácidos grasos C18:2 de los ácidos grasos totales;

0-8% de ácidos grasos C18:3 de los ácidos grasos totales; y

otros ácidos grasos presentes en niveles de menos del 8% de los ácidos grasos totales.

Como se usa en este documento, el término "grupo acilo" se refiere a un radical orgánico denominado -C(=O)R, en el que R se selecciona de un residuo de ácido graso saturado, monoinsaturado y poliinsaturado.

20 Como se usa en este documento, el término "ácido graso" pretende abarcar un ácido carboxílico con una cola (cadena) alifática no ramificada que tiene por lo general entre 4 y 28 átomos de carbono, que es ya sea saturada o insaturada que tiene un enlace insaturado (ácidos grasos monoinsaturados) o dos o más enlaces insaturados (ácidos grasos poliinsaturados). Se debe observar que cuando al menos un enlace insaturado de un ácido graso insaturado es al menos un doble enlace, dicho al menos un doble enlace puede estar ya sea en la configuración cis o en la configuración trans.

25 Los ejemplos no limitantes de ácidos grasos saturados que se pueden usar en esta invención incluyen: ácido butírico (ácido butanoico, C4:0), ácido caproico (ácido hexanoico, C6:0), ácido caprílico (ácido octanoico, C8:0), ácido cáprico (ácido decanoico, C10:0), ácido láurico (ácido dodecanoico, C12:0), ácido mirístico (ácido tetradecanoico, C14:0), ácido palmítico (ácido hexadecanoico, C16:0), ácido esteárico (ácido octadecanoico, C18:0), ácido araquídico (ácido eicosanoico, C20:0), ácido behénico (ácido docosanoico C22:0).

Los ejemplos no limitantes de ácidos grasos monoinsaturados que se pueden usar en esta invención incluyen: ácido miristoleico (ω -5, C14:1), ácido palmitoleico (ω -7, C16:1), ácido oleico (ω -9, C18:1) y ácido erúxico (ω -9, C22:1).

35 El término "ácido graso poliinsaturado de cadena larga (LC-PUFA)" como se usa en este documento pretende abarcar ácidos grasos con cadena alifática no ramificada que tiene al menos 18 átomos de carbono y al menos dos enlaces insaturados.

Ejemplos no limitantes del LC-PUFA son ácido alfa-linolénico (ALA, ω -3, C18:3), ácido eicosapentaenoico (EPA, ω -3, C20:5), ácido docosahexaenoico (DHA, ω -3, C22:6), ácido docosapentaenoico (DPA, ω -3, 22:5), ácido linoleico (LA, ω -6, C18:2), ácido araquidónico (AA, ω -6, C20:4).

40 El término "ácido graso omega-3" como se usa en este documento pretende abarcar un ácido carboxílico con una cadena alifática no ramificada larga que es poliinsaturada, en la que el primer doble enlace carbono-carbono está ubicado en la posición ω -3 (esto es, en el tercer carbono del final de la cadena alifática). Ejemplos no limitantes de ácidos grasos omega-3 que se pueden usar en la composición de la invención incluyen: ácido alfa-linolénico (ALA, ω -3, C18:3), ácido eicosapentaenoico (EPA, ω -3, C20:5), ácido docosahexaenoico (DHA, ω -3, C22:6) y ácido docosapentaenoico (DPA, ω -3, 22: 5).

45 El término "ácido graso omega-6" como se usa en este documento pretende abarcar un ácido carboxílico con una cadena alifática no ramificada larga que es poliinsaturada, en la que el primer doble enlace carbono-carbono está

ubicado en la posición ω -6 (esto es, en el sexto carbono desde el final de la cadena alifática). Ejemplos no limitantes de ácidos grasos omega-6 que se pueden usar en la composición de la invención incluyen: ácido linoleico (LA, ω -6, C18:2) y ácido araquidónico (AA, ω -6, C20:4).

5 La invención se describe adicionalmente en los siguientes ejemplos, que de ningún modo pretenden limitar el alcance de la invención como se reivindica.

Ejemplos

Ejemplo 1: preparación de fracciones de lípidos usadas para la preparación de composiciones (mezclas) de la invención.

Fracción de lípidos 1: extracción de biomasa enriquecida con ácido araquidónico

10 Se cultivó la cepa ATCC32222 *Mortierella Alpina*, en 1 litro y medio en un matraz de agitación de 2 litros. Los medios de crecimiento se basaron en glucosa (30 g/l) como fuente de carbono y extracto de levadura (15 g/l) como fuente de nitrógeno. Además, se adicionaron los siguientes componentes: dihidrogenofosfato de potasio KH_2PO_4 (7 g/l), hidrogenofosfato de disodio Na_2HPO_4 (2 g/l), sulfato de magnesio $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5 g/l), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.1 g/l), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (8 mg/l), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1 mg), $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg/l), $\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg/l), $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 mg/l).
15 Después de 8 días de fermentación a 28 °C, la biomasa se filtró, se lavó con agua DI y se secó en un horno de vacío a 25 °C, para obtener 18 g de biomasa seca.

Fracción de lípidos 2: enriquecimiento de la fracción de lípidos 1

20 La biomasa seca de la fracción de lípidos 1 se sometió a un procedimiento de extracción mezclándola con una mezcla de 100 ml de hexano y etanol (80:20 v/v) durante 2 horas a 40 °C en una incubadora agitadora a 200 RPM. La biomasa se filtró y se lavó. El filtrado se evaporó a presión reducida para obtener 5.1 g de fracción de lípidos.

Fracción de lípidos 3: purificación de fosfolípidos enriquecidos con ARA

25 El aceite esencialmente como se produce en la fracción de lípidos 2, se usó como material de partida para obtener una fracción de fosfolípidos puros. Se disolvieron 10 g del aceite en 30 ml de etanol absoluto y se cargaron en una columna de vidrio cargada con 200 g de sílice (Merck 60). Se pasó aproximadamente 1 litro de etanol absoluto a través de la columna y la salida se analizó continuamente mediante TLC hasta que una fracción de fosfolípidos pura comenzó a eluir. Se realizó un lavado adicional de la columna con aproximadamente 3 litros de etanol al 96% (4% de agua) aumentando la temperatura hasta 60°C con el fin de eliminar más de la fracción de fosfolípidos. Esta fracción se recogió por separado, se evaporó a presión reducida para obtener aproximadamente 0.3 g de fosfolípidos puros.

Fracción de lípidos 4: extracción de la fracción de lípidos de la biomasa de *Schizochytrium sp*

30 Se sometieron 50 gramos de biomasa de la microalga *Schizochytrium sp* a un procedimiento de extracción mezclando con 250 ml de etanol al 96% (contenido de agua del 4%) durante 2 horas a 40°C en una incubadora vibratoria a 200 RPM. La biomasa se filtró y se lavó. El filtrado se evaporó a presión reducida para obtener 8.7 g de aceite.

Fracción de lípidos 5: extracción selectiva de fracción de lípidos con alto contenido de triglicéridos

35 Se sometieron 20 gr de biomasa de la microalga *Schizochytrium sp* a un procedimiento de extracción mezclando con 100 ml de acetona durante 2 horas a temperatura ambiente con un agitador magnético. La biomasa se filtró y se lavó. El filtrado se evaporó a presión reducida para obtener 7.7 g de aceite.

Fracción de lípidos 6: extracción selectiva de fracción de lípidos con alto contenido de fosfolípidos

40 La biomasa obtenida después de la producción de la fracción de lípidos 5 mediante extracción con acetona se sometió a una extracción adicional usando 100 ml de mezcla de solventes de hexano:etanol (80:20 v/v) a temperatura de 40°C durante 2 horas en una incubadora vibratoria a 200 RPM. Después de la filtración y la evaporación del filtrado, se obtuvieron 0.6 g de material similar a una pasta.

Fracción de lípidos 7: purificación de fosfolípidos enriquecidos con DHA

45 Se usaron 10 g de material similar a pasta esencialmente como el producido en la fracción de lípidos 6, como material de partida para el procedimiento de purificación de fosfolípidos como se describe para producir la fracción de lípidos 3. A partir de 10 g de suministro, se obtuvieron 0.6 g de fracción de fosfolípidos puros.

Fracción de lípidos 8: producción industrial de fracción de lípidos enriquecida con fosfolípidos

ES 2 660 416 T3

5 Se extrajeron 1,000 kg de harina de pescado de la fuente Herring usando una mezcla de 4,000 litros de etanol:agua (80:20 v/v), durante 2 horas a 40 °C en un reactor de 5,000 litros equipado con un agitador de tipo ancla. La biomasa se filtró en una centrífuga de cesta de 1.5 m de diámetro y se lavó. El filtrado se evaporó al vacío usando agua caliente en la camisa, en un evaporador por lotes de 3,000 equipado con un agitador de tipo de hélice. El material similar a la pasta obtenido se volvió a disolver en hexano, se filtró de nuevo a través de un filtro de bolsa y se evaporó en el mismo evaporador en las mismas condiciones para obtener 46 kg de una fracción de lípidos altamente viscosa.

Procedimientos de determinación del contenido de las fracciones lipídicas:

1. Determinación y cuantificación de la composición de ácidos grasos:

10 Los ésteres metílicos de ácidos grasos se prepararon mediante metilación básica en presencia de metóxido de sodio disuelto en metanol y se extrajeron con hexano. La composición de ácidos grasos se analizó mediante la inyección de los ésteres metílicos en un instrumento cromatógrafo de gases equipado con una columna capilar y un detector de ionización de llama.

El instrumento GC (HP) se programó bajo las siguientes condiciones:

- Horno- temperatura Inicial- 110 °C, temperatura final- 250 °C, tiempo de análisis- 41.50 min.

15 - Entrada delantera- temperatura Inicial- 350 °C, presión- 13.83 psi, relación de división- 24.988: 1, flujo de división- 39.8 ml/min, flujo total- 43.4 ml/min, tipo de gas- nitrógeno

- Detector delantero- temperatura- 250 °C, flujo de hidrógeno- 40.0 ml/min,

- Flujo de aire- 400.0 ml/min

La cuantificación de los ésteres metílicos se realizó contra el estándar interno de C23:0.

20 2. Determinación y cuantificación del contenido de fosfolípidos

El contenido de fosfolípidos se midió por ³¹P-RMN o por HPTLC.

El ³¹P-RMN es un procedimiento aceptado y ampliamente utilizado para medir el contenido de fosfolípidos (Analytical Biochemistry Volume 232, Issue 1, November 1995, Pages 1-6; Journal of Lipid Research Volume 27, 1986, 386).

25 El procedimiento HPTLC consiste en aplicar una muestra que contiene fosfolípidos sobre placa de sílice, desarrollar la placa en la mezcla de solventes (cloroformo: acetona: metanol: ácido acético y agua = 11:6.4: 5:2.4: 1 (v/v)). Después del desarrollo, la placa se seca y se tiñe con una mezcla de CuSO₄ ácido. La cuantificación se realiza escaneando la placa a 274 nm frente a la mezcla del contenido de fosfolípidos conocido.

3. Determinación y cuantificación del contenido de triglicéridos

30 La cuantificación del contenido de triglicéridos se realizó mediante la inyección de la muestra en el instrumento de GC equipado con una columna capilar y un detector de ionización de llama. El GC está equipado con la columna Agilent modelo J & W DB-1HT y se programó bajo las siguientes condiciones:

- Horno- temperatura inicial-160 °C, temperatura final- 350 °C, tiempo de análisis- 29.50min

- Entrada delantera- temperatura inicial- 350 °C, presión- 13.83 psi, relación de división- 24.988: 1, flujo de división- 39.8 ml/min, flujo total- 43.4 ml/min, tipo de gas- Nitrógeno

35 - Detector delantero- temperatura- 350 c, flujo de hidrógeno- 40.0 ml/min,

- Flujo de aire- 400.0ml/min

4. Análisis de la composición de ácidos grasos fosfolípidos

40 La composición de ácido graso esterificada a los fosfolípidos se analizó mediante un procedimiento de dos etapas. Los fosfolípidos analizados se purificaron en una placa de cromatografía de capa fina (TLC) (con la misma mezcla de solventes del procedimiento 2), se depuran de la sílice con tolueno y se transformaron en ésteres metílicos siguiendo el procedimiento número 1.

5. Análisis posicional de ácidos grasos

ES 2 660 416 T3

El análisis de la distribución posicional de los ácidos grasos de los fosfolípidos se llevó a cabo mediante un procedimiento de múltiples etapas que comienza con una hidrólisis selectiva del ácido graso sn-2 por la fosfolipasa A2 (PLA2). La fracción 2-liso-fosfolípido resultante se purificó en una placa de sílice, se transformó en ésteres metílicos y se analizó mediante GC como se describió previamente.

- 5 La tabla 1 detalla la composición de varias preparaciones de lípidos, que comprenden triglicéridos y fosfolípidos para uso en la preparación de composiciones de la presente invención.

Tabla 1: fracciones de lípidos

	Fracción de lípidos 2	Fracción de lípidos 3	Fracción de lípidos 4	Fracción de lípidos 5	Fracción de lípidos 6	Fracción de lípidos 7	Fracción de lípidos 8
% de fosfolípidos	5.2	>95	1.8	<5	12.0	>95	45
% de triglicéridos	83.0	<5	NM	96.0	NM	<5	NM
Ácido graso (% p/p) de los ácidos grasos totales							
C14	1.1	0.4	6.6	6.0	2.8	1.3	
C16	13.8	9.6	25.1	25.2	14.9	16.6	
C18	9.1	2.4	0.6	0.6	0.3	0.3	1.3
C18:1n9	12.8	8.9	1.0			0.2	3.9
C18:2 n6	5.6	8.4	1.0			0.4	1.0
C18:3 n3	3.9	6.1	0.4	0.4			0.2
C20:3n6	4.1	2.1	2.5			0.4	
C20:4n6	41.2	21.3	1.3	1.3	0.9	1.2	0.5
C20:5n3			3.4	3.2	2.7	4.9	5.7
C22:5n3			16.3	17.7	10.4	12.3	
C22:6n3			36.4	38.7	22.7	26.4	16.3
Ácido graso (% de ácidos grasos esterificados a fosfolípidos)							
C14	0.5	0.5	1.4		1.8	1.8	2.2
C16	13.7	13.7	21.7		23.7	23.7	29.8
C18	3.4	3.4	0.4		0.4	0.4	2.2
C18:1n9	12.7	12.7	1.2		0.2	0.2	18.0
C18:2 n6	12.1	12.1	3.1		0.6	0.6	
C18:3 n3	8.8	8.8					
C20:3n6	3.1	3.1	0.8		0.6	0.6	
C20:4n6	30.4	30.4	2.1		1.7	1.7	

ES 2 660 416 T3

C20:5n3			6.4		7.0	7.0	12.0
C22:5n3			19.7		17.5	17.5	
C22:6n3			32.2		37.7	37.7	31.0
LC-PUFA							
Ácido graso (% de ácidos grasos esterificados a fosfolípidos)							
LC-PUFA total % p/p	54.8	38.0	61.2	61.3	36.7	45.5	23.8
% LC-PUFA en PL del LC-PUFA total	3.6	>95	1.3		14.9	>95	56.9
% LC-PUFA en sn-2 de PL del LC-PUFA total de PL	>50	>50	>50		>50	>50	82.9

NM = % LC-PUFA total no medido representa la suma de% p/p de ácidos grasos C18:2, C18:3, C20:3, C20:4, C20:5 y C22:6.

% LC-PUFA en PL del LC-PUFA total se calcula mediante (LC-PUFA en PL como % p/p)/(LC-PUFA total como % p/p)*100.

% LC-PUFA en el sn-2 de fosfolípidos del LC-PUFA totales en fosfolípidos se calcula mediante (% LC-PUFA en sn-2 de ácidos grasos totales posicionados sn-2)/(LC-PUFA total en fosfolípidos) * 100.

% LC-PUFA en el sn-2 de fosfolípidos del LC-PUFA totales en fosfolípidos > 50 no se basa en un valor medido sino en un valor estimado.

Las composiciones (mezclas) de la invención que comprenden aceites enriquecidos con LC-PUFA (Tabla 2) se prepararon mezclando fracciones de lípidos 2-8 (Tabla 1) entre sí.

5 Las mezclas de la invención además se pueden mezclar opcionalmente con una mezcla de grasa tal como, pero no se limita a, una mezcla de grasa enriquecida con ácido palmítico sn-2 como se describe en PCT/IL2008/001311 (Tabla 5).

Opcionalmente, los componentes de las fracciones de lípidos 4 y 6 se pasan a través de una secuencia de etapas de refinado que incluyen, desgomado, decoloración y desodorización antes del uso en el procedimiento de mezcla.

Tabla 2: composiciones enriquecidas en LC-PUFA (mezclas)

	mezcla 1	mezcla 2	mezcla 3	mezcla 4	mezcla 5	mezcla 6	mezcla 7	mezcla 8	mezcla 9
fracción de lípidos mixta (%)									
fracción de lípidos 2	50.0	43.5	54.5	73.2	28.6	90.1	50.0	47.6	40.0
fracción de lípidos 3		13.0	5.5	7.3	28.6			47.6	
fracción de lípidos 4							50.0		
fracción de lípidos 5			36.4	7.3	28.6	9.0		4.8	
fracción de lípidos 6		43.5	0.0	7.3		0.9			
fracción de lípidos 7	50.0		3.6	4.9					60.0

ES 2 660 416 T3

fracción de lípidos 8					14.3				
% de fosfolípidos	52.6	20.5	11.9	16.9	36.5	4.8	3.5	50.1	62.1
% de triglicéridos	41.5	NC	80.2	NC	NC	NC	NC	44.1	33.2
Ácido graso (% p/p) de los ácidos grasos totales									
C14	1.2	1.7	2.8	1.5	2.1	1.5	3.9	1.0	1.2
C16	15.2	13.7	17.8	14.5	13.9	14.8	19.4	12.3	15.4
C18	4.7	4.4	5.3	6.9	3.7	8.3	4.9	5.5	3.8
C18:1 n9	6.5	6.7	7.5	10.0	6.8	11.6	6.9	10.3	5.2
C18:2 n6	3.0	3.5	3.5	4.7	4.2	5.0	3.3	6.7	2.5
C18:3 n3	1.9	2.5	2.6	3.3	3.0	3.5	2.1	4.8	1.5
C20:3 n6	2.3	2.1	2.4	3.2	1.8	3.7	3.3	3.0	1.9
C20:4 n6	21.2	21.1	24.1	31.9	18.3	37.2	21.2	29.8	17.2
C20:5 n3	2.4	1.2	1.3	0.7	1.7	0.3	1.7	0.2	2.9
C22:5 n3	6.1	4.5	6.9	2.7	5.1	1.7	8.2	0.8	7.4
C22:6 n3	13.2	9.9	15.1	5.8	13.4	3.7	18.2	1.8	15.8
Ácido graso (% de ácidos grasos esterificados a fosfolípidos)									
C14	1.2	1.1	0.4	0.6	0.6	0.5	1.0	0.5	1.3
C16	18.7	18.0	9.0	13.9	12.1	12.5	17.7	13.0	19.7
C18	1.9	2.1	2.0	2.8	2.2	3.0	1.9	3.2	1.6
C18:1 n9	6.5	7.3	7.6	10.3	9.8	11.5	7.0	12.1	5.2
C18:2 n6	6.3	7.1	7.3	9.8	6.9	10.9	7.6	11.5	5.2
C18:3 n3	4.4	5.0	5.3	7.1	5.0	7.9	4.4	8.4	3.5
C20:3 n6	1.8	2.0	1.9	2.5	1.7	2.8	1.9	2.9	1.6
C20:4 n6	16.0	17.9	18.3	24.7	17.4	27.4	16.3	29.0	13.2
C20:5 n3	3.5	3.0	0.3	0.9	1.7	0.1	3.2	0.0	4.2
C22:5 n3	8.8	7.6	0.6	2.1	0.0	0.2	9.9	0.0	10.5
C22:6 n3	18.9	16.4	1.4	4.6	4.4	0.3	16.1	0.0	22.6
LC-PUFA									
LC-PUFA Total % p/p	50.2	44.7	55.9	52.3	47.4	55.2	58.0	47.1	49.2

ES 2 660 416 T3

% LC-PUFA en PL del LC-PUFA total	43.8	18.9	5.2	11.7	20.0	3.0	2.5	38.5	53.6
% LC-PUFA en sn-2 de PL del LC-PUFA total de PL	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50	> 50
AA: DHA	1.6	2.1	1.6	5.5	1.4	10.1	1.2	16.2	1.1
<p>NC = % LC-PUFA Total no calculado representa la suma de % p/p de ácidos grasos C18:2, C18:3, C20:3, C20:4, C20:5 y C22:6.</p> <p>% LC-PUFA en PL del LC-PUFA total se calcula mediante (LC-PUFA en PL como % p/p)/(LC-PUFA total como % p/p) * 100.</p> <p>% LC-PUFA en el sn-2 de fosfolípidos del LC-PUFA totales en fosfolípidos se calcula mediante (% LC-PUFA en sn-2 de ácidos grasos totales posicionados sn-2)/(LC-PUFA total en fosfolípidos) * 100.</p>									

La proporción ARA: DHA se calcula como C20:4 (% p/p de ácidos grasos totales)/C22:6 (% p/p de ácidos grasos totales).

Ejemplo 2: fórmula infantil

- 5 La tabla 3 proporciona ejemplos de composiciones grasas conocidas de fórmula infantil (primeras dos columnas de la tabla 3), y un ejemplo de una composición grasa de fórmula infantil según la invención (tercera columna de la tabla 3).

- 10 La tabla 4 proporciona ejemplos de composiciones grasas conocidas de fórmula infantil (primeras dos columnas de la tabla 4), y un ejemplo adicional de una composición grasa de fórmula infantil según la invención (tercera columna de la tabla 4); esta composición de grasa de la invención se prepara, por ejemplo, combinando la mezcla 5 de la tabla 2 con una mezcla de grasa enriquecida con ácido palmítico sn-2 como se describe en PCT/IL2008/001311.

La tabla 5 proporciona el perfil de ácidos grasos de las composiciones (mezclas) de la invención (Tabla 2) mezcladas con una mezcla de grasa enriquecida con ácido palmítico sn-2 como se describe en PCT/IL2008/001311.

La tabla 6 proporciona una fórmula infantil basada en leche según la invención; y la tabla 7 proporciona fórmulas infantiles basadas en soja según la presente invención.

- 15 Estas composiciones de fórmula infantil se han formulado según:

1. Koletzko B. et. al. Global Standard for the Composition of Infant Formula: Recommendations of an ESPGHAN Coordinated International Expert Group. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 41(5):584-599 (2005).

2. Alles M. et. al. Current trends in the composition of infant milk formulas. *Current Paediatrics* 14 (1): 51-63 (2004).

- 20 3. Mathews A. Comparison of Triglycerides and Phospholipids as Supplemental Sources of Dietary Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acids in Piglets. *J. Nutr.* 132:3081-3089 (2002).

- 25 Se prepara de este modo una fórmula infantil, que comprende proteínas, carbohidratos, grasa, minerales, vitaminas, etc. para producir un producto alimenticio que suministra a un bebé los principales nutrientes que también se encuentran en la leche humana. Se adiciona 1 litro de agua de ósmosis inversa (RO) a una mezcladora de alto cizallamiento y se calienta a 70 °C. El mezclador se enciende a alta velocidad y se adicionan gradualmente 480gr de lactosa. La velocidad del mezclador se reduce y se adicionan 250 g de una mezcla de grasa (por ejemplo, una mezcla de grasa esencialmente como se describe en el documento PCT/IL2008/001311. Después de esto, se adicionan 140 g de leche desnatada, 90 g de concentrado de proteína de suero de leche y 20 g de una mezcla de minerales, vitaminas y oligoelementos. A la mezcla obtenida, se le adicionan 20 g de una composición de lípidos enriquecida con LC-PUFA de la invención (Tabla 2). La mezcla resultante se pasa a través de un homogeneizador a presión y luego se seca por pulverización para obtener aproximadamente 1 kg de polvo seco. Dado que la mezcla de grasa de la fórmula infantil se mezcla adicionalmente con una composición de mezcla enriquecida con LC-PUFA de la invención, la composición de ácidos grasos en la fórmula infantil resulta de la combinación de la composición de ácidos grasos tanto de la mezcla de grasa como de la composición de mezcla enriquecida con LC-PUFA de la invención.
- 30

ES 2 660 416 T3

Tabla 3: composición de grasa en fórmula infantil

Ácido graso (% de grasa total)	Fórmula convencional	Fórmula complementada con TG como fuentes de AA y DHA	Fórmula según la invención complementada con TG y PL como fuentes de AA y DHA
C12:0	8±0.8	8±0.8	8±0.8
C14:0	3±0.3	3±0.3	3±0.3
C16:0	21±4	21±4	21±4
C18:0	3±0.3	3±0.3	3±0.3
C18:1n-9	46±6	44±6	44±6
C18:2n-6	16±1.6	15±1.5	15±1.5
C18:3n-3	1.5±0.15	1.2±0.12	1.2±0.12
C20:4n-6		0.6	0.6
C22:6n-3		0.3	0.3
Fosfolípidos (g/100g)			
Total	ND	ND	1.35
PC	ND	ND	0.95
PE	ND	ND	0.25
PI	ND	ND	0.05
PA	ND	ND	0.1
PS	ND	ND	>0.1
TG = triglicérido PL = fosfolípidos ND = no detectado			

Tabla 4: Composición de grasa en fórmula infantil

Ácido graso (% p/p)	Fórmula convencional	Fórmula complementada con TG como fuentes de AA y DHA	Fórmula según la invención complementada con TG y PL como fuentes de AA y DHA
C12	8.7	8.7	8.4
C14	3.5	3.5	3.4
C16	21.0	21.0	20.7
C18	2.7	2.7	2.7
C18:1 n-9	44.4	44.4	42.9
C18:2 n-6	16.4	16.4	15.9
C18:3 n-3	1.5	1.5	1.6

ES 2 660 416 T3

C20:3 n6			0.1
C20:4 n-6		0.7	0.7
C20:5 n3			0.1
C22:5 n3			0.2
C22:6 n-3		0.5	0.5
% de fosfolípidos	ND	ND	1.5
ND = no detectado			

La tabla 5 describe fracciones de grasa que comprenden mezclas de grasa de la tabla 2. Las grasas 1-6 de la tabla 5 se derivan de las mezclas 1, 2, 4, 5, 8 y 9 de la tabla 2 y comprenden además al menos un triglicérido de fórmula I que tiene el siguiente perfil de ácidos grasos conjugados:

- 5 0-10% de ácidos grasos C8:0 de los ácidos grasos totales;
- 0-10% de ácidos grasos C10:0 de los ácidos grasos totales;
- 0-22% de ácidos grasos C12:0 de los ácidos grasos totales;
- 0-15% de ácidos grasos C14:0 de los ácidos grasos totales;
- 10 15-55% de ácidos grasos C16:0 de los ácidos grasos totales de los cuales al menos 30% están conjugados en la posición sn-2 del triglicérido;
- 1-7% de ácidos grasos C18:0 de los ácidos grasos totales;
- 20-75% de ácidos grasos C18:1 de los ácidos grasos totales;
- 2-40% de ácidos grasos C18:2 de los ácidos grasos totales;
- 0-8% de ácidos grasos C18:3 de los ácidos grasos totales; y
- 15 otros ácidos grasos presentes en niveles de menos del 8% de los ácidos grasos totales.

Tabla 5

	grasa 1	grasa 2	grasa 3	grasa 4	grasa 5	grasa 6
mezcla de grasa enriquecida con ácido palmítico sn-2 (%)	95	93.4	96.5	96	97	95
mezcla 1 (%)	5.0					
mezcla 2 (%)		6.6				
mezcla 4 (%)			3.5			
mezcla 5 (%)				4.0		
mezcla 8 (%)					3.0	
mezcla 9 (%)						5
% de fosfolípidos	2.6	1.4	0.6	1.5	1.5	3.1
% de triglicéridos	97.1	NC	NC	NC	98.3	96.7

ES 2 660 416 T3

% p/p de ácido graso de ácidos grasos totales						
C12	8.3	8.1	8.4	8.4	8.4	8.3
C14	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4	3.4
C16	20.7	20.5	20.8	20.7	20.7	20.7
C18	2.8	2.8	2.8	2.7	2.8	2.8
C18:1 n9	42.5	41.9	43.2	42.9	43.4	42.4
C18:2 n6	15.7	15.6	16	15.9	16.1	15.7
C18:3 n3	1.5	1.6	1.6	1.6	1.6	1.5
C20:3 n6	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
C20:4 n6	1.1	1.4	1.1	0.7	0.9	0.9
C20:5 n3	0.1	0.1	<0.1	0.1	<0.1	0.1
C22:5 n3	0.3	0.3	0.1	0.2	<0.1	0.4
C22:6 n3	0.7	0.7	0.2	0.5	0.1	0.8
LC-PUFA						
LC-PUFA total % p/p	19.5	19.7	19.1	19.1	18.8	19.5
% LC-PUFA esterificado a PL del LC-PUFA totales	5.6	2.8	1.1	2	2.9	6.8
AA: DHA	1.6	2.1	5.5	1.4	16.2	1.6
NC = no calculado						

Tabla 6: Composición de fórmula infantil basada en leche:

	Unidad	Polvo (100gr)
General:		
Proteína	gramo	11.1
Grasa	gramo	25.9
Lactosa	gramo	55.5
Agua	gramo	2.5
Ceniza	gramo	2.06
Vitaminas:		
Vitamina A	IU	1500
Vitamina D	IU	300
Vitamina E	mg	6

ES 2 660 416 T3

Vitamina K	µg	15
Vitamina B1	µg	350
Vitamina B2	µg	450
Vitamina B6	µg	222
Vitamina B12	µg	0.66
Niacina	mg	2
Ácido fólico	µg	45
Calcio	mg	4.44
Pantotenato	mg	3
Biotina	µg	11
Vitamina C	mg	45
Minerales		
Calcio	mg	326
Fósforo	mg	219
Magnesio	mg	37
Hierro	mg	7.4
Sodio	mg	120.7
Potasio	mg	373
Proporción Ca/P		1.49
Perfil de aminoácidos		
Alanina	mg	522
Arginina	mg	368
Ácido aspártico	mg	11.1
Cisteína	mg	191
Ácido glutámico	mg	1423
Glicina	mg	244
Histidina	mg	262
Isoleucina	mg	761
Leucina	mg	12.2
Lisina	mg	10

ES 2 660 416 T3

Metionina	mg	270
Fenilalanina	mg	461
Prolina	mg	962
Serina	mg	681
Taurina	mg	37
Treonina	mg	686
Triptófano	mg	180
Tirosina	mg	463
Valina	mg	775

Tabla 7: fórmula infantil a base de soja:

	Unidad	Polvo (100gr)
General:		
Proteína	gr	15
Grasa	gr	27.54
Carbohidratos	gr	51.5
Ácido linoleico	gr	4.5
Vitaminas:		
Vitamina A	IU	1500
Vitamina D	IU	300
Vitamina E	IU	10
Vitamina C	mg	65
Vitamina K	µg	77
Vitamina B1	µg	345
Vitamina B2	µg	445
Vitamina B6	µg	327
Vitamina B12	µg	1.5
Niacina	mg	7
Ácido fólico	µg	76
Ácido pantoténico	µg	4.5

ES 2 660 416 T3

Biotina	µg	25
Colina	mg	58
Minerales		
Calcio	mg	500
Fósforo	mg	300
Magnesio	mg	45
Hierro	mg	9.2
Zinc	mg	4
Manganeso	µg	150
Cobre	µg	400
Yodo	µg	77
Sodio	mg	200
Potasio	mg	546
Cloruro	mg	400
Inositol	mg	25
Carnitina	mg	10
Proporción Ca/P		1.67
Perfil de aminoácidos		
Alanina	mg	640
Arginina	mg	497
Ácido aspártico	mg	1385
Cisteína	mg	242
Ácido glutámico	mg	3065
Glicina	mg	300
Histidina	mg	382
Isoleucina	mg	893
Leucina	mg	1600
Lisina	mg	1360
Metionina	mg	406
Fenilalanina	mg	650

Prolina	mg	1113
Serina	mg	737
Taurina	mg	51
Treonina	mg	460
Tirosina	mg	621
Valina	mg	947

Se pueden preparar fórmulas infantiles diseñadas para imitar los diferentes períodos de lactancia controlando los niveles de mezcla de grasa y de composición de mezcla enriquecida con LC-PUFA de la invención.

5 Ejemplo 3: Efecto de los fosfolípidos conjugados con DHA y AA en fórmula infantil sobre el desarrollo cognitivo y la agudeza visual

El estudio incluye tres grupos de bebés alimentados con tres fórmulas infantiles que difieren solo en su contenido de grasa del LC-PUFA (Tabla 3).

El grupo I recibe fórmula infantil estándar sin suplementación de DHA y AA.

10 El grupo II recibe fórmula infantil complementada con suplementos estándar de DHA y AA (esto es, DHA y AA conjugados solo con triglicéridos).

El grupo III recibe una fórmula infantil complementada según la presente invención, particularmente con DHA y AA conjugados con triglicéridos y fosfolípidos (esto es, una mezcla de DHA y AA conjugada con triglicéridos y con fosfolípidos, mientras que la proporción de triglicéridos conjugados y fosfolípidos es 1: 1).

15 El desarrollo cognitivo de los bebés se mide mediante la prueba de escalas Bayley (esencialmente como se describe en Pinelli J et al. Adv Neonatal Care 3(2):76-87 (2003)). Se mide la agudeza visual de los bebés mediante la prueba de agudeza visual evocada (esencialmente como se describe en Innis SM. J Pediatr. 139(4):532-8 (2001)). Ambas pruebas están adaptadas a la edad de los bebés. Durante los 6 meses de alimentación con fórmula, las pruebas se realizan al inicio y durante el estudio aproximadamente cada uno o dos meses. Los bebés en el tercer grupo (alimentados con fórmula infantil que comprende el DHA y AA conjugados con triglicéridos y fosfolípidos según la invención) demuestran un mejor desarrollo cognitivo y agudeza visual en comparación con los bebés en los otros dos grupos.

20 Ejemplo 4: Efecto de DHA y AA conjugado con fosfolípidos dentro de la dieta sobre el desarrollo de la función cognitiva en un modelo animal.

25 El ácido docosahexaenoico de ácido graso (FA) (DHA, 22: 6n-3) está altamente enriquecido en fosfolípidos de membrana del sistema nervioso central y la retina. Las vías neuronales, tales como las relacionadas con el aprendizaje, la memoria, el aprendizaje espacial, etc., indican el desarrollo de la función cognitiva. En este estudio, se realiza una evaluación sistemática de los hitos del desarrollo neurológico y cognitivo en las crías de animales. Los análisis incluyen mediciones de crecimiento físico y maduración y evaluación de reflejos neurológicos.

Diseño del estudio

30 Los animales se alimentan con diferentes dietas y la apariencia de los reflejos neurales y el rendimiento reflejo se examina después del nacimiento.

El diseño del estudio se lleva a cabo según Kiss et al, Development of Neurological Reflexes and Motor Coordination in Rats Neonatally Treated with Monosodium Glutamate, Neurotoxicity Research, 2005, VOL. 8(3,4). pp. 235-244.

Dietas

Los animales recibieron dietas esencialmente como se describe en la tabla 3 o la tabla 4:

35 Grupo I: dieta de referencia, comida normal.

Grupo II: una dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados solo a triglicéridos (TG).

Grupo III: dieta sintética: la fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados a triglicéridos (TG) y fosfolípidos (PL) (por ejemplo, mezclas de grasas 1-9, Tabla 2).

Crecimiento

5 El peso se registra todos los días hasta las 3 semanas de edad, y luego semanalmente. La longitud corporal (longitud nasoanal) se mide semanalmente.

Signos neurológicos y reflejos

Los exámenes del desarrollo neuroconductual se inician en el primer día después del nacimiento y se llevan a cabo diariamente hasta el día 21 después del nacimiento. Se llevan a cabo inspecciones para la maduración de características físicas tales como apertura de ojos, erupción de incisivos y despliegue de la oreja.

10 Las crías se someten a pruebas para detectar los siguientes signos y reflejos neurológicos:

1. Reflejo de enderezamiento: las ratas se colocan en posición supina y se registra el tiempo en segundos para voltearse y colocar las cuatro patas en contacto con la superficie.

15 2. Geotaxis negativa: los animales se colocan con la cabeza inclinada sobre una tabla inclinada (45 °C) de 30 cm. Las patas traseras de las crías se colocan en el medio del tablero. Se observa el día en que comienzan a darse la vuelta y subir al tablero con sus extremidades anteriores llegando al borde superior. Desde el día de la aparición de la geotaxis negativa, se registra diariamente el tiempo en segundos para alcanzar el extremo superior de la placa.

3. Reflejos sensoriales: la oreja y el párpado se tocan suavemente con un hisopo de algodón y se registra el primer día del reflejo del tic del oído y la contracción del párpado.

20 4. Colocación de extremidades: la parte posterior de la pata delantera y la pata trasera se toca con el borde del banco con el animal suspendido, y se observa el primer día de levantamiento y colocación de las patas sobre la mesa.

5. Agarre del miembro: se tocan las extremidades anterior y posterior con una barra delgada, y se registra el primer día de agarre en la varilla.

25 6. Marcha: los animales se colocan en el centro de un círculo de papel blanco de 13 cm de diámetro, y se registra el día en que comienzan a moverse fuera del círculo con ambas extremidades anteriores. Desde el día de la aparición, el tiempo en segundos para moverse fuera del círculo se registra diariamente.

7. Sobresalto auditivo: se observa el primer día de la respuesta de sobresalto ante un sonido de aplausos.

En conclusión, los resultados muestran que alimentar animales con dieta enriquecida con una composición de la invención mejora el desarrollo del sistema neural.

Ejemplo 5: Efecto de DHA y AA conjugado con fosfolípidos dentro de la dieta en la retina de un modelo animal.

30 El ácido docosahexaenoico de ácido graso (FA) (DHA, 22: 6n-3) está altamente enriquecido en fosfolípidos de membrana del sistema nervioso central y la retina. La transducción de señal del receptor acoplado a proteína G (GPCR) es un motivo de señalización común en las vías neuronales, tales como los implicados en el aprendizaje, la memoria, la discriminación basada en el olfato, el aprendizaje espacial y la agudeza visual.

35 El diseño del estudio es según Niu et al, 2004, Reduced G Protein-coupled Signaling Efficiency in Retinal Rod Outer Segments in Response to n-3 Fatty Acid Deficiency, J. Biol. Chem., Vol. 279, Issue 30, 31098-31104.

Diseño del estudio

40 Los animales se obtienen al destete (3 semanas de edad). Las hembras destetadas se dividen aleatoriamente en grupos dietéticos con la restricción de que ambos grupos tenían el mismo peso corporal medio; los animales se dividen en grupos de modo que el peso medio de los animales en ambos grupos sea similar. Las hembras de ambos grupos dietéticos se aparean, las crías se seleccionan y las madres se mantienen en sus respectivas dietas durante la lactancia. A la edad de 21 días, las crías se adaptan a la oscuridad durante la noche y se sacrifican mediante decapitación bajo una tenue luz roja.

Dietas

Los animales recibieron dietas esencialmente como se describe en la tabla 3 o la tabla 4:

45 Grupo I: dieta de referencia, comida normal.

Grupo II: una dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados solo a triglicéridos (TG).

Grupo III: dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados a triglicéridos (TG) y fosfolípidos (PL) (por ejemplo, véase la tabla 2, mezclas de grasa 1-9).

Retina

- 5 Se estudia la señalización del receptor acoplado a proteína G (GPCR) en membranas del segmento externo de la varilla de la retina (ROS) aisladas de ratas alimentadas con las diferentes dietas. La señalización de GPCR se evalúa en diferentes etapas: activación de rodopsina, acoplamiento de rodopsina-transducina, actividad de fosfodiesterasa cGMP y formación de metarrodopsina II (MII) y el complejo MII-G_t.

Además, se mide la composición de ácidos grasos en la retina.

- 10 La alimentación de los animales con dieta enriquecida con una composición de la invención da como resultado una señalización más alta en el segmento externo de la varilla de la retina y en un contenido del LC-PUFA más alto en la retina.

Ejemplo 6: Efecto de DHA y AA conjugado con fosfolípidos dentro de la dieta sobre la retina y la agudeza visual en un modelo animal.

- 15 La electrorretinografía mide las respuestas eléctricas de diversos tipos de células en la retina, incluidos los fotorreceptores (varillas y conos), las células retinianas internas (células bipolares y amacrinas) y las células ganglionares. Durante una grabación, los ojos están expuestos a estímulos estandarizados y la señal resultante se despliega mostrando el curso temporal de la amplitud (voltaje) de la señal.

- 20 El diseño del estudio es según Kraft et al, 1987, The Rat Electroretinogram in Combined Zinc and Vitamin A Deficiency, Investigative Ophthalmology & Visual Science.

Diseño del estudio

Para evaluar la función de la retina, los animales se crían con poca iluminación con diferentes dietas y se realizan electrorretinogramas escotópicos (ERG).

Dietas

- 25 Los animales recibieron dietas esencialmente como se describe en la tabla 3 o la tabla 4:

Grupo I: dieta de referencia, comida normal.

Grupo II: una dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados solo a triglicéridos (TG).

Grupo III: dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados a triglicéridos (TG) y fosfolípidos (PL) (por ejemplo, véase la tabla 2, mezclas de grasa 1-9).

- 30 Electrorretinografía

Los ERG escotópicos se miden en animales a intervalos regulares durante el transcurso del experimento. Antes de los ERG, los animales se adaptan a la oscuridad por un período mínimo de 12 horas. Se coloca un electrodo de aguja estándar de EEG (Electroencefalograma) en la cámara anterior del ojo y se coloca un electrodo de referencia por vía subcutánea en la piel de la cabeza cerca del párpado superior para registrar el ERG. El ojo está sujeto a destellos de estímulo único de intensidad creciente. El ERG se muestra en un osciloscopio y se registra en cinta magnética.

35

Los animales en el grupo III, que reciben una dieta enriquecida con una composición de la invención, demuestran una mayor sensibilidad retiniana.

Ejemplo 7: Efecto de DHA y AA conjugados con fosfolípidos dentro de la dieta sobre el crecimiento y el desarrollo del cerebro y el CNS en un modelo animal.

- 40 El cerebro de mamífero es particularmente rico en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (PUFA), especialmente ácido docosahexaenoico (DHA) [22:6(n-3)] y ácido araquidónico (AA) [20:4(n-6)]. Se examina el efecto dietario de DHA y AA en la composición de la mielina de cría de rata en un modelo animal. Los lípidos de la dieta juegan un papel importante en la síntesis de mielina, particularmente durante el período de máxima mielinización. Los estudios se llevan a cabo durante el período de máxima mielinización, que coincide con el inicio de la audición en las crías de
- 45 rata.

El diseño del estudio es según Haubner et al, 2007, The Effects of Maternal Dietary Docosahexaenoic Acid Intake on Rat Pup Myelin and the Auditory Startle Response, Dev Neurosci 29:460-467.

Diseño del estudio:

5 Las madres con embarazo programado se reciben el día 2 de gestación. A la llegada, las madres se asignan para alimentarse con diferentes dietas, con acceso libre a dietas y agua. Se proporciona dieta fresca a las madres durante todo el embarazo y la lactancia. El día del nacimiento se designa como día después del nacimiento (PND) 0. Las madres de cada grupo de dieta y sus camadas aleatorizadas se asignan al estudio. Las crías son destetadas en PND 21 y luego se alimentan con la correspondiente dieta materna hasta PND 24 cuando mueren por decapitación. El cerebro y el cerebelo se retiran de las crías por grupo de dieta para el análisis de ácidos grasos.

10 Dietas

Los animales recibieron dietas esencialmente como se describe en la tabla 3 o la tabla 4:

Grupo I: dieta de referencia, comida normal para ratas

Grupo II: una dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados solo a triglicéridos (TG).

15 Grupo III: dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados a triglicéridos (TG) y fosfolípidos (PL) (por ejemplo, véase la tabla 2, mezclas de grasa 1-9).

Análisis bioquímicos

20 La composición de ácidos grasos de los extractos de lípidos totales preparados a partir de las dietas se determina por cromatografía líquida de gases. Se preparan homogeneizados de tejido cerebral obtenidos de todas las crías en PND 24 y se aísla la mielina. La composición de ácidos grasos de la mielina se mide en el extracto lipídico total preparado a partir de los cerebros.

El grupo III, que recibe una dieta enriquecida con una composición de la invención, demuestra niveles más altos de DHA y AA en la mielina de la cría.

Ejemplo 8: Efecto de DHA y AA conjugados con fosfolípidos dentro de la dieta sobre la composición de ácidos grasos en la sangre y el cerebro de un modelo animal

25 Dado que los miembros de las familias (n-3) y (n-6) compiten por las mismas enzimas desaturadas, los efectos de la complementación de PUFA de una familia en la deposición de tejido del PUFA de la otra familia pueden ser un factor importante que considerar al determinar qué la composición de PUFA en la dieta es óptima para el desarrollo neuronal. Por lo tanto, el uso del modelo de crianza artificial para alimentar directamente a las ratas bebés con fórmulas experimentales durante el período de desarrollo cerebral rápido, permite el control preciso de las cantidades relativas y absolutas de PUFA dietéticos específicos. Adicionalmente, este procedimiento permite la administración directa de la dieta a las crías durante un período de desarrollo cerebral que es más o menos similar al del tercer trimestre y al período después del nacimiento temprano en los humanos o la primera infancia en el bebé prematuro.

30 El diseño del estudio es según Ward et al, 1998, Long-Chain Polyunsaturated Fatty Acid Levels in Formulae Influence Deposition of Docosahexaenoic Acid and Arachidonic Acid in Brain and Red Blood Cells of Artificially Reared Neonatal Rats, The Journal of Nutrition Vol. 128 No. 12 December, pp. 2473-2487.

Diseño del estudio

40 Las madres embarazadas se obtienen a los 10-12 días de gestación y se alojan individualmente con acceso libre a la dieta y al agua del grifo. Los descendientes de los animales con embarazo programado se seleccionan, cuando sea necesario, dentro de las 24 horas posteriores al nacimiento, y aproximadamente el mismo número de crías masculinas y femeninas se seleccionan como sujetos. Las crías se asignan aleatoriamente a dietas grupales. Los sustitutos de la leche con o sin DHA y/o AA se alimentan desde los días 5-18 de vida, que es el período de rápido desarrollo cerebral.

Dietas

Los animales recibieron dietas esencialmente como se describe en la tabla 3 o la tabla 4:

Grupo I: dieta de referencia, comida normal para ratas.

45 Grupo II: una dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados solo a triglicéridos (TG).

Grupo III: dieta sintética cuya fuente de grasa está enriquecida con DHA y AA esterificados a triglicéridos (TG) y fosfolípidos (PL) (por ejemplo, véase la tabla 2, mezclas de grasa 1-9).

Procedimiento de crianza artificial

5 El día 27 después de la concepción (aproximadamente el día 5 después del nacimiento), las crías se anestesian y el tubo de gastrostomía se inserta en la boca, se baja por el esófago y sale a través de la pared del estómago. Las crías se alojan individualmente alimentadas con una de las dietas experimentales a través de tubos. Todos los días, todas las crías son pesadas para evaluar el crecimiento. Las crías de control amamantadas no son alimentadas con tubo de gastrostomía, sino que son alimentadas por las madres de lactancia el día de la gastrostomía. El día 40 después de la concepción (aproximadamente el día 18 después del nacimiento), los animales se sacrifican, la sangre se extrae por punción cardíaca y los cerebros se extraen y se dividen en FB y CB.

Análisis bioquímico

15 La composición de ácidos grasos se evalúa tanto en la sangre como en el cerebro para estudiar la relación entre el cerebro y la composición de glóbulos rojos (RBC). El cerebro se subdivide en prosencéfalo (FB) y cerebelo (CB) porque, en las ratas, los eventos de desarrollo que ocurren prenatalmente en el FB ocurren en gran parte después del nacimiento en el CB. Por lo tanto, los efectos de la dieta que tienen efectos específicos sobre el tejido que se desarrolla rápidamente deberían, durante el período después del nacimiento temprano en las ratas, producir mayores efectos sobre el CB que sobre el FB.

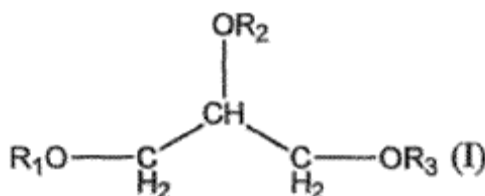
El grupo III, que recibe una dieta enriquecida con una composición de la invención, demuestra niveles más altos de DHA y AA en sangre y cerebro, lo que significa una mejor absorción intestinal.

20

REIVINDICACIONES

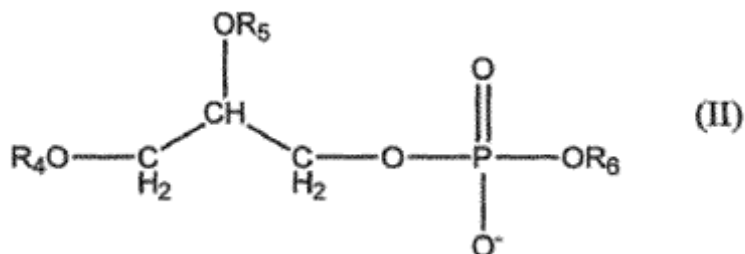
1. Una composición, que no es leche materna humana, que comprende

(i) al menos dos triglicéridos de fórmula I:



5 en la que R₁, R₂ y R₃ pueden ser idénticos o diferentes y se seleccionan cada uno independientemente de residuos de ácidos grasos saturados, ácidos grasos monoinsaturados y ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA); y en la que un LC-PUFA está conjugado con los triglicéridos (R₁ y/o R₂ y/o R₃)

(ii) al menos dos fosfolípidos de fórmula II:



10 en la que R₄ y R₅ son cada uno un sustituyente que tiene independientemente los significados de R₁, R₂, R₃; y en el que un LC-PUFA está conjugado con los fosfolípidos (R₄ y/o R₅), y en la que

R₆ se selecciona de colina, inositol, etanolamina y serina;

(iii) LC-PUFA libres

y en la que

15 al menos aproximadamente 1% del LC-PUFA en la composición está conjugado con dichos al menos dos fosfolípidos, y los LC-PUFA presentes en la composición como LC-PUFA libre, conjugados con los triglicéridos y con los fosfolípidos comprenden ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico (AA).

2. Una composición según la reivindicación 1, en la que al menos aproximadamente el 2% del contenido de LC-PUFA de la composición está conjugado con dichos al menos dos fosfolípidos.

20 3. Una composición según la reivindicación 1 o 2, en la que la proporción de contenido en peso entre AA y DHA es al menos aproximadamente 1.1.

4. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que R₅ es DHA o AA.

5. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que R₄ es DHA o AA.

25 6. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la cantidad total de fosfolípidos es al menos aproximadamente 0.1%, preferiblemente al menos aproximadamente 15%.

7. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dichos triglicéridos y dichos fosfolípidos se derivan de al menos un material de lecitina en bruto seleccionado del grupo que consiste en un organismo vegetal, marino y acuícola.

30 8. Una composición que comprende una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la composición es una composición seleccionada del grupo que consiste en una composición farmacéutica, composición nutracéutica, alimento funcional y fórmula infantil.

9. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende además al menos un triglicérido de fórmula I, que tiene al menos 30% (p/p) de ácido palmítico total conjugado en la posición sn-2.

10. Una composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7 que comprende además al menos un triglicérido de fórmula I que tiene el siguiente perfil de ácido graso conjugado

- 5 0-10% de ácidos grasos C8:0 de los ácidos grasos totales;
- 0-10% de ácidos grasos C10:0 de los ácidos grasos totales;
- 0-22% de ácidos grasos C12:0 de los ácidos grasos totales;
- 0-15% de ácidos grasos C14:0 de los ácidos grasos totales;
- 10 15-55% de ácidos grasos C16:0 de los ácidos grasos totales de los cuales al menos 30% están conjugados en la posición sn-2 del triglicérido;
- 1-7% de ácidos grasos C18:0 de los ácidos grasos totales;
- 20-75% de ácidos grasos C18:1 de los ácidos grasos totales;
- 2-40% de ácidos grasos C18:2 de los ácidos grasos totales;
- 0-8% de ácidos grasos C18:3 de los ácidos grasos totales; y
- 15 otros ácidos grasos presentes en niveles de menos del 8% de los ácidos grasos totales.