

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 047**

51 Int. Cl.:

A23L 33/00 (2006.01)

A61J 15/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/US2013/026063**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123139**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13749880 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.06.2018 EP 2814470**

54 Título: **Métodos, composiciones y dispositivos para satisfacer las necesidades dietéticas de ácidos grasos**

30 Prioridad:

17.02.2012 US 201261600207 P

26.10.2012 US 201261719173 P

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

27.06.2018

73 Titular/es:

**ALCRESTA THERAPEUTICS, INC. (100.0%)
9700 One Newton Executive Park, Suite 202
Newton, MA 02462, US**

72 Inventor/es:

**MARGOLIN, ALEXEY, L.;
SHENOY, BHAMI y
GALLOTTO, ROBERT**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 674 047 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

Métodos, composiciones y dispositivos para satisfacer las necesidades dietéticas de ácidos grasos

5 Los ácidos grasos de cadena larga son críticos para la salud y el desarrollo humanos. Los ácidos grasos de cadena larga que se consumen en la dieta se presentan principalmente en forma de triglicéridos (TG), en los que tres ácidos grasos de cadena larga se unen a una molécula de glicerol a través de enlaces éster. La absorción de triglicéridos de cadena larga primero requiere la acción enzimática de las lipasas (por ejemplo, lipasa pancreática), que digieren los triglicéridos a través de la hidrólisis, descomponiéndolos en monoglicéridos y además en ácidos grasos libres. 10 Una vez que están disponibles, estos monoglicéridos y ácidos grasos libres son absorbidos por las células endoteliales en el intestino delgado, donde se someten a una reesterificación, seguida del transporte al hígado y finalmente a los tejidos en el cuerpo con diversos propósitos fisiológicos. D. Kasper et al., Harrison's Principles of Internal Medicine 16ª Ed. (2004). Mientras que los triglicéridos de cadena media pueden absorberse a través de la luz intestinal, los triglicéridos de cadena larga no pueden, por lo tanto, la lipasa pancreática es esencial para una adecuada hidrólisis y absorción de ácidos grasos de cadena larga. C. Jensen et al., Am. J. Clin. Nutr. 43:745-751 (1986). Sin embargo, algunas personas no pueden descomponer adecuadamente los triglicéridos de cadena larga, por ejemplo, pacientes que sufren un compromiso pancreático comprometido, malabsorción o insuficiencia pancreática y, como resultado, pueden sufrir una absorción de ácidos grasos que es inadecuada para mantener la salud.

20 Los suplementos de lipasa comercialmente disponibles se pueden agregar a la dieta para mejorar la hidrólisis de los triglicéridos de cadena larga. Sin embargo, por una serie de razones, los suplementos de lipasa no necesariamente resolverán el problema de la absorción deficiente de ácidos grasos en todas las personas que sufren de una capacidad reducida para descomponer los triglicéridos de cadena larga o que, de otro modo, necesitan recibir ácidos grasos elementales. Por ejemplo, la mayoría de los suplementos de lipasa comerciales se fabrican a partir de lipasa pancreática animal, que se sabe que tiene una estabilidad significativamente reducida por debajo de pH 7. Véase, por ejemplo, el documento US2010/0239559, D. Kasper et al., Harrison's Principles of Internal Medicine 16ª ed. (2004). En el momento en que tales lipasas pasan por el estómago, es probable que se hayan inactivado cantidades significativas. Además, no todas las lipasas funcionan en el mismo grado para la hidrólisis de un ácido graso de cadena larga dado, lo que indica que la especificidad de la lipasa es una consideración importante. R. Jensen et al., Lipids 18 (3): 239 - 252 (1983). Y, en algunas poblaciones con insuficiencia pancreática, las fórmulas nutricionales están estrictamente reguladas, tales como en los bebés prematuros o en pacientes en unidades de cuidados intensivos. Para estas poblaciones controladas, puede no ser deseable o factible complementar fórmulas ya aprobadas con ingredientes adicionales. Además, aunque muchas fórmulas suplementadas con ácidos grasos 35 pueden contener triglicéridos de cadena media, existe un beneficio médico distintivo para la ingesta dietética de ácidos grasos de cadena larga. Por lo tanto, existe la necesidad de métodos mejorados para mejorar la hidrólisis de triglicéridos de cadena larga.

40 La hidrólisis adecuada de los triglicéridos poliinsaturados de cadena larga (TG-LCPUFA) es particularmente importante por varias razones. Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) son críticos para el desarrollo neural y retinal. Además, algunos se consideran "ácidos grasos esenciales", lo que significa que los humanos no pueden sintetizarlos y deben obtenerlos de fuentes dietéticas. La fuente principal de la dieta para los ácidos n-3 LC-PUFAs docosahexaenoico (DHA) y el ácido eicosapentaenoico (EPA) es su precursor, el ácido alfa-linolénico (ALA), que es un ácido graso esencial. Las enzimas endógenas, sin embargo, son altamente ineficientes para convertir ALA en DHA y EPA. De acuerdo con una declaración oficial de la Sociedad Internacional para el Estudio de Ácidos Grasos y Lípidos (ISSFAL), la conversión de ALA a DHA es de aproximadamente 1% en bebés y considerablemente menor en adultos. Brenna et al., Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 80 (2-3): 85-91 (2009). Por lo tanto, aunque el DHA y el EPA no son ácidos grasos esenciales per se, las fuentes dietéticas de DHA y EPA son importantes. La fuente principal de la dieta para el ácido araquidónico n-6 LC-PUFA (ARA o AA) es el ácido linoleico (LA), que es un ácido graso esencial.

50 El documento JP-2004-645387 describe un método para purificar un isómero de ácido linoleico conjugado, que implica la reacción selectiva de una mezcla de ácidos grasos que tiene una mezcla racémica de ácido linoleico conjugado en presencia de lipasa en un sistema de reacción que no contiene ningún disolvente orgánico. El documento US 2011/0150944 describe estructuras de triglicéridos y emulsiones que comprenden las mismas adecuadas para nutrición parenteral. El documento WO 2011/092299 describe composiciones aceitosas o grasas ricas en ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga y un proceso para producir dicha composición.

60 La invención se define por las reivindicaciones. Se describen en este documento (i) lipasas que son sorprendentemente más eficientes que otras para hidrolizar ciertos triglicéridos y ésteres de cadena larga, tales como, por ejemplo, triglicéridos y ésteres poliinsaturados de cadena larga (ii) una fórmula nutricional, tal como, por ejemplo, una fórmula nutricional médica o una fórmula infantil, que comprende componentes prehidrolizados (es decir, monoglicéridos y/o ácidos grasos libres) de triglicéridos LC-PUFA, ésteres de ácidos grasos LC-PUFA y/u otros triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos de cadena larga. La invención se refiere a (i) 65 proporcionar métodos para producir dicha fórmula nutricional, incluidos los métodos en los que una fórmula contiene triglicéridos LC-PUFA, ésteres de ácidos grasos LC-PUFA y/u otros triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos

grasos de cadena larga que están expuestos temporalmente a la lipasa y (ii) proporcionan dispositivos diseñados para proporcionar fórmulas nutricionales que comprenden monoglicéridos y/o ácidos grasos libres, por ejemplo, triglicéridos de LC-PUFA y/o ésteres de ácido graso LC-PUFA.

5 La fórmula se expone temporalmente a la lipasa y la lipasa se elimina o separa de la fórmula antes de la ingestión para proporcionar la ventaja de asegurar la descomposición de los triglicéridos LC-PUFA, ésteres de ácidos grasos LC-PUFA y/u otros triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos de cadena larga sin requerir la ingestión de lipasa exógena.

10 Por consiguiente, se describe en este documento una fórmula nutricional. La fórmula nutricional puede comprender LC-PUFAs. En algunas fórmulas nutricionales, más del 2% de los LC-PUFA totales están en forma de monoglicéridos y ácidos grasos libres, es decir, menos del 98% de los LC-PUFA totales están en forma de triglicéridos o ésteres. En algunas fórmulas nutricionales, los monoglicéridos de LC-PUFA y los ácidos grasos libres comprenden más de 2,5%, más de 3%, más de 4%, más de 5%, más de 6%, más de 7%, más de 8%, más de 10%,
15 más de 12%, más de 15%, más de 20%, más de 25%, más de 30%, más de 40%, más de 50% o más del 75% del total de LC-PUFAs en una fórmula nutricional. En ciertas fórmulas nutricionales, la relación de monoglicéridos de LC-PUFA y ácidos grasos libres a triglicéridos y ésteres es al menos 0,08:1, al menos 0,09:1, al menos 0,1:1, al menos 0,25:1, al menos 0,5:1, al menos 1:1, al menos 2:1, al menos 3:1, al menos 4:1, al menos 5:1, al menos 8:1, al menos 10:1 o al menos 20:1.

20 La fórmula nutricional se puede formular para la administración a bebés prematuros. Otras fórmulas nutricionales abarcadas por la invención se formulan para bebés, niños pequeños, niños o adultos que tienen una capacidad reducida para hidrolizar triglicéridos LC-PUFA, ésteres de ácidos grasos LC-PUFA y/u otros triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos de cadena larga, o que simplemente necesitan LC-PUFAs dietéticos adicionales y/u
25 otros ácidos grasos de cadena larga. Una fórmula nutricional, como se describe en este documento, puede ser para un sujeto que tiene menos de 1 año. El sujeto puede tener entre 1 y 4 años. El sujeto puede tener entre 1 y 6 años de edad.

30 La fórmula nutricional descrita en este documento puede ser una fórmula nutricional médica, es decir, una fórmula que se formula para ser consumida o administrada oral o enteralmente bajo supervisión médica, tal como las distribuidas a través de hospitales o farmacias bajo una receta médica. Por lo general, una fórmula nutricional médica se formula para el tratamiento dietético de un trastorno médico específico, enfermedad o condición anormal, para la cual existen requisitos nutricionales distintivos. Una fórmula nutricional médica debe tener el estado "Generalmente reconocido como seguro" y cumplir con las regulaciones de la FDA que se relacionan con el
35 etiquetado, los reclamos del producto y la fabricación.

Algunas fórmulas nutricionales no contienen lipasa añadida. Otras fórmulas nutricionales contienen una lipasa. La lipasa se puede seleccionar de lipasas de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, y *Rhizopus oryzae*.

40 La fórmula nutricional puede comprender EPA, DHA, ARA, LA y/o ALA.

Debido a que los ácidos grasos poliinsaturados libres son inestables y se degradan rápidamente, la invención proporciona métodos convenientes y eficaces para preparar las fórmulas nutricionales descritas en este documento
45 poco antes de la ingestión por un sujeto. En ciertas realizaciones, el método comprende exponer una composición nutricional líquida que comprende triglicéridos LC-PUFA, ésteres de ácidos grasos LC-PUFA y/u otros triglicéridos de cadena larga y/o ésteres de ácidos grasos de cadena larga a una lipasa antes de la ingestión por una persona que necesita LC-PUFAs dietéticos adicionales y/u otros ácidos grasos de cadena larga. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante al menos un minuto, al menos 2 minutos, al menos 3 minutos, al menos 5 minutos, al menos 8 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15 minutos, al menos 30 minutos, al menos 45 minutos o al menos 60 minutos antes de la ingestión. En algunas realizaciones, la composición
50 nutricional líquida está expuesta a lipasa durante no más de un minuto, no más de 2 minutos, no más de 3 minutos, no más de 5 minutos, no más de 8 minutos, no más de 10 minutos, no más de 15 minutos, no más de 30 minutos, no más de 45 minutos o no más de 60 minutos antes de la ingestión. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 24 horas. En ciertas realizaciones, la lipasa se selecciona de las lipasas de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia*, y *Rhizopus oryzae*. En los métodos de la invención, la lipasa se elimina de la fórmula nutricional antes de la ingestión. En el dispositivo, la composición nutricional líquida, que comprende triglicéridos de LC-PUFA, ésteres de ácidos grasos de LC-PUFA y/u otros triglicéridos de cadena larga y/o ésteres, se expone a la lipasa inmovilizada en un soporte sólido antes de
55 la ingestión. La lipasa se inmoviliza en el soporte sólido por unión covalente.

Otro aspecto de la invención es un método para proporcionar nutrición a un sujeto que necesita LC-PUFA dietéticos y/u otros ácidos grasos de cadena larga, tales como personas que sufren una capacidad reducida para descomponer los triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos de cadena larga en el intestino, personas
65 que padecen insuficiencia pancreática, personas que padecen desnutrición y personas que han estado recibiendo nutrición parenteral total, mediante la administración de una fórmula de la invención. El sujeto puede ser un bebé

prematureo. El sujeto puede ser un bebé a término o niño pequeño. El sujeto puede tener más de 50 años, más de 60 años o más de 70. El sujeto puede sufrir de insuficiencia pancreática. La fórmula se puede administrar a través de una sonda de alimentación. La fórmula nutricional, como se describe en este documento, se puede administrar para mejorar la capacidad cognitiva en una persona de cualquier edad, para prevenir la enfermedad pulmonar crónica en un recién nacido prematuro, para mejorar el desarrollo neurológico de un bebé prematuro, o para tratar o prevenir una serie de otras condiciones asociadas con la mejora de la mayor ingesta de ácidos grasos de cadena larga, tales como, por ejemplo, EPA, DHA, ARA, LA y ALA. Tales condiciones incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Alzheimer, trastorno bipolar, depresión, sepsis, estrés respiratorio agudo, curación de heridas, cáncer, enfermedad cardiovascular, apoplejía, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, diabetes, esclerosis múltiple, desnutrición, deterioro de la función gastrointestinal y enfermedades crónicas inflamatorias tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal.

También se describe en este documento un método para reducir el tiempo que un paciente necesita nutrición parenteral total administrando una fórmula nutricional como la descrita en este documento. Como resultado, dichos pacientes están expuestos a un riesgo reducido de atrofia intestinal y otras complicaciones asociadas con la nutrición parenteral total prolongada (más de 24 horas). Dichos métodos se pueden utilizar para acortar el tiempo de recuperación de pacientes con deterioro de la función GI, tales como, por ejemplo, malabsorción, síndrome del intestino corto, EII, insuficiencia pancreática, desnutrición antes o después de cirugía, quimioterapia o radioterapia u otras causas de desnutrición, cáncer, heridas y úlceras por presión. Dichos pacientes pueden recibir la fórmula nutricional por sonda nasogástrica. Este método de alimentación puede ser ventajoso en situaciones en las que el paciente sufre alteración de la motilidad intestinal, alteración de la secreción de enzimas pancreáticas debido al síndrome de respuesta inflamatoria sistémica u otras afecciones que provocan una alteración de la escisión y absorción de triglicéridos LC-PUFA, ésteres de ácidos grasos LC-PUFA, y/u otros triglicéridos o ésteres de cadena larga de ácidos grasos de cadena larga.

Alternativamente, cuando es ventajoso evitar el estómago, la fórmula nutricional se puede administrar mediante una sonda nasoyeyunal. Se pueden usar también otros tipos de aparatos de alimentación para administrar las fórmulas descritas en este documento.

Los sujetos sanos también pueden beneficiarse de una mayor absorción de LC-PUFA, por ejemplo, al reducir el riesgo de enfermedad cardiovascular. Por consiguiente, se describen en este documento métodos para mejorar la absorción de grasas en un sujeto sano, que comprende alimentar al sujeto con una fórmula nutricional como se describe en este documento.

La invención proporciona además dispositivos para preparar las fórmulas como se describe en este documento. El dispositivo comprende una cámara que contiene al menos una lipasa, en donde la cámara es capaz de contener una composición nutricional líquida de manera que se exponga a la lipasa. La lipasa se inmoviliza por unión covalente a una estructura en comunicación fluida con el interior del recipiente. En algunas realizaciones, el dispositivo comprende una cámara que consiste en una membrana permeable y que comprende lipasa inmovilizada dentro de la cámara, de modo que la composición nutricional líquida puede fluir a través de la membrana permeable y entrar en contacto con la lipasa, pero la lipasa no puede pasar a través de la membrana permeable. En algunas realizaciones, la lipasa contenida dentro de la cámara de un dispositivo de la invención es una lipasa microbiana. En algunas realizaciones, la lipasa se selecciona de lipasas bacterianas. En algunas realizaciones, la lipasa se selecciona de una lipasa de *Chromobacterium viscosum*, una lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, una lipasa de *Burkholderia cepacia* y una lipasa de *Rhizopus oryzae*. En algunas realizaciones, la lipasa se selecciona de una lipasa de *Chromobacterium viscosum*, una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* y una lipasa de *Rhizopus oryzae*. En algunas realizaciones, la lipasa es una lipasa de *Rhizopus oryzae*.

Breve descripción de los dibujos

La FIGURA 1 ilustra un dispositivo y un método para proporcionar nutrición a un bebé, de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIGURA 2A ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIGURA 2B ilustra un dispositivo para tratar la fórmula.

La FIGURA 2C ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIGURA 3A ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIGURA 3B ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIGURA 3C ilustra un dispositivo para tratar la fórmula.

La FIGURA 4A ilustra una estructura 250, de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIGURA 4B ilustra una estructura 250.

La FIGURA 5A ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIGURA 5B ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.

La FIGURA 6A es una fotografía de un vial de lipasa de *Rhizopus oryzae* inmovilizada en perlas de polímero.

- La FIGURA 6B ilustra un dispositivo para tratar y administrar una fórmula nutricional de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 6C ilustra un dispositivo para tratar y administrar una fórmula nutricional de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 5 La FIGURA 6D ilustra un primer plano del dispositivo representado en la FIGURA 6C.
- La FIGURA 7 representa la hidrólisis del triglicérido de DHA por la lipasa de *Rhizopus oryzae* (RO).
- La FIGURA 8 representa la hidrólisis del triglicérido ARA por la lipasa de *Rhizopus oryzae*.
- La FIGURA 9A ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 10 La FIGURA 9B ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 9C ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 15 La FIGURA 10A ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 10B ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 10C ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 20 La FIGURA 11A ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 11B ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 11C ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 25 La FIGURA 12 ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 13A ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 30 La FIGURA 13B ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 14 ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 35 La FIGURA 15 ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 16 ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 17A ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 40 La FIGURA 17B ilustra una vista parcial en corte de un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 18 ilustra un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 45 La FIGURA 19 ilustra una vista parcial en corte de un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 20 ilustra una vista parcial en corte de un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- La FIGURA 21 ilustra una vista parcial en corte de un dispositivo para tratar la fórmula, algunas opciones de las cuales están de acuerdo con ciertas realizaciones.
- 50 La FIGURA 22A muestra el peso de las heces en cerdos EPI durante la semana de control ("semana Cont", durante la cual los cerdos fueron alimentados con fórmula infantil fortificada TG-LCPUFA) vs. la semana de tratamiento ("semana de tratamiento", durante la cual los cerdos fueron alimentados con la misma fórmula fortificada no hidrolizada ("CONT"), hidrolizada previamente con lipasa de *Chromobacterium viscosum* ("CV"), o prehidrolizada con lipasa de *Rhizopus oryzae* ("RO")). FIGURA 22B muestra el contenido total de grasa fecal durante los últimos 3 días de la semana de tratamiento en los mismos 3 grupos de cerdos, y la FIGURA 22C muestra el coeficiente de absorción de grasa (% CFA).
- 55 La FIGURA 23 muestra los niveles de ARA (A), EPA (B) y DHA (C) en las heces de cerdos EPI alimentados con fórmula no hidrolizada ("CONT"), fórmula pre-hidrolizada con lipasa CV ("CV") o fórmula prehidrolizada con lipasa RO ("RO"). Los asteriscos indican $p < 0,001$.
- 60 La FIGURA 24 muestra los niveles de ARA (A) y DHA (B) en el plasma de cerdos EPI después de 7 días de alimentación con fórmula no hidrolizada ("CONT"), fórmula pre-hidrolizada con lipasa de CV ("CV") o fórmula prehidrolizada con lipasa RO ("RO"). Los asteriscos indican $p < 0,05$.
- La FIGURA 25 muestra los niveles de ARA y DHA en la retina (A) y tejido adiposo (B) de cerdos EPI después de 7 días de alimentación con fórmula no hidrolizada ("CONT"), fórmula prehidrolizada con lipasa CV ("CV") o fórmula prehidrolizada con lipasa RO ("RO"). Los asteriscos indican $p < 0,05$.
- 65

La FIGURA 26 muestra los niveles de ARA y DHA en el corazón (A) y tejido renal (B) de cerdos EPI después de 7 días de alimentación con fórmula no hidrolizada ("CONT"), fórmula prehidrolizada con CV lipasa ("CV") o fórmula prehidrolizada con lipasa RO ("RO"). Los asteriscos indican $p < 0,05$.

La FIGURA 27 muestra el porcentaje de hidrólisis de DHA y ARA en la fórmula de Enfalac con 100 mg (A), 500 mg (B), 1000 mg (C) o 2000 mg (D) de lipasa de RO inmovilizada.

La FIGURA 28 muestra el porcentaje de hidrólisis de DHA (A) y ARA (B) con lipasa RO o pancreatina.

La FIGURA 29 representa el diseño de estudio para el estudio de cerdos de 6 semanas descrito en el Ejemplo 10.

La FIGURA 30 muestra los niveles de ARA y DHA en eritrocitos recogidos de cerdos sanos alimentados con fórmula infantil fortificada con TG-LC-PUFA ("Saludable"), cerdos con insuficiencia pancreática exocrina inducida quirúrgicamente alimentados con fórmula infantil fortificada con TG-LC-PUFA ("EPI"), y cerdos con insuficiencia pancreática exocrina inducida quirúrgicamente, alimentados con fórmula infantil enriquecida con TG-LC-PUFA que había sido pre-hidrolizada por la lipasa de RO inmovilizada ("EPI + iRO").

15 Ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga

Los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) son cadenas de hidrocarburo que contienen dos o más dobles enlaces. Dependiendo de la posición del primer doble enlace en relación con el extremo metilo, un LC-PUFA puede clasificarse como un ácido graso omega-3 (n-3) u omega-6 (n-6). ALA y LA son ácidos grasos parentales de las familias de PUFA n-3 y n-6, respectivamente. Se consideran "ácidos grasos esenciales", lo que significa que los humanos no pueden sintetizarlos, sino que deben obtenerlos a través de la dieta. Esto se debe a que los mamíferos carecen de la capacidad de introducir dobles enlaces en ácidos grasos más allá del carbono 9 y 10. Bloover et al. Cell Biology: A Short Course, John Wiley & Sons, Inc. en 39 (2011). Sin embargo, los humanos pueden hacer PUFAs de cadena larga adicionales comenzando con ALA y AL.

25 Tanto ALA como LA se metabolizan para generar otros PUFA de cadena larga mediante una serie de pasos de desaturación y elución. Por ejemplo, el ALA se metaboliza a EPA y finalmente a DHA. LA se metaboliza a ARA, un ácido graso n-6. Sin embargo, la conversión de ALA a DHA y EPA y LA a ARA es relativamente ineficiente. L. Arterburn et al., Am. J. Clin. Nutr. 83 (supl): 1467S-1476S (2006). Los estudios han estimado que la conversión de ALA a DHA en humanos es inferior al 5%. B. Anderson y D. Ma, Lipids Health Dis. 8:33 (2009). El hígado contiene el tejido más activo para convertir ALA en DHA y LA en ARA y, por lo tanto, desempeña un papel clave en el suministro de DHA y ARA a tejidos u órganos menos activos, tales como el cerebro. M. Martínez et al., J. Pediatr. 120:S129 - S138 (1992). Alternativamente, estos LC-PUFA se pueden consumir directamente de la dieta. El DHA y el EPA se encuentran en el pescado, las nueces y el aceite de linaza, mientras que el ARA está disponible a partir de fuentes de grasa animal, aceite de maíz, aceite de soja y aceite de semilla de girasol.

35 Ácidos grasos n-3

El ácido graso n-3 DHA es crítico para el desarrollo y la función de los nervios y la retina. Es el PUFA de cadena larga principal en la membrana neural y es esencial para la función cerebral, la construcción de circuitos cerebrales y la transmisión de impulsos nerviosos. Como componente integral de la membrana, el DHA contribuye a la fluidez de la membrana, que es importante para mantener las estructuras sinápticas, la neurotransmisión y la plasticidad sináptica. G. Jicha et al., Clin. Interv. Aging 5: 45-61 (2010). El DHA también influye en los eventos de señalización esenciales para la diferenciación y supervivencia de las neuronas, y tiene efectos sobre los niveles y el metabolismo de los neurotransmisores y los eicosanoides. La mayoría de la acumulación de DHA en el cerebro ocurre al comienzo del tercer trimestre a lo largo del segundo año de vida. Se ha demostrado que, en roedores y primates, un suministro inadecuado de PUFA n-3 durante este período da como resultado una capacidad de aprendizaje y una neurotransmisión deterioradas. M. Martínez et al., J. Pediatr. 120:S129 - S138 (1992). La suplementación de DHA en ratas que anteriormente estaban restringida a una dieta deficiente en DHA rescata el rendimiento en tareas de memoria y aprendizaje. W. Chung et al., J. Nutr. 138(6):1165-1171 (2008). Y en un estudio de adolescentes sanos, 8 semanas de suplementos de DHA aumentaron significativamente la activación funcional en la corteza prefrontal dorsolateral durante la realización de una tarea de activación en comparación con el placebo. R. McNamara et al., Am. J. Nutr. 91:1060-7 (2010). Por lo tanto, el DHA se considera importante no solo en el desarrollo, sino en el mantenimiento de la función neuronal.

El DHA también está muy concentrado en la retina y tiene efectos importantes sobre la diferenciación de los fotorreceptores y la activación del pigmento visual rodopsina. H. Lauritzen et al., Prog. Lipid Res. 40:1-94 (2001); M. Clandinin et al., J. Pediatr. 125:S25-32 (1994). Un suministro inadecuado de DHA temprano en el desarrollo de primates y roedores da como resultado una fisiología retiniana anormal y una agudeza visual reducida. M. Reibick et al., Dev. Psychol. 33:387-395 (1997); J. McCann et al., Am. J. Clin. Nutr. 82:281-295 (2005). De manera similar, en seres humanos, se ha demostrado que los bebés alimentados con fórmula sin DHA durante los primeros doce meses de vida tienen una agudeza visual menor que los bebés alimentados con fórmula con DHA. E. Birch et al., Am. J. Clin. Nutr. 91(4):848-859 (2010). Las deficiencias de DHA también se han asociado con el síndrome del alcoholismo fetal, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad, la fibrosis quística, la fenilcetonuria, la depresión unipolar, la hostilidad agresiva y la adrenoleucodistrofia. A. Horrocks et al., Pharmacological Res. 40(3):211-225 (1999).

Los beneficios de una mayor ingesta de DHA y otros ácidos grasos n-3 se han descrito para diversas enfermedades, incluidas, por ejemplo, la enfermedad de Alzheimer (EA), trastorno bipolar (PA), depresión, incluyendo trastorno depresivo mayor (TDM) y depresión postparto, sepsis, estrés respiratorio agudo, curación de heridas, cáncer, enfermedad cardiovascular, apoplejía, enfermedad de Parkinson, esquizofrenia, diabetes, esclerosis múltiple y enfermedades inflamatorias crónicas tales como artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico y enfermedad inflamatoria intestinal.

Por ejemplo, los ensayos clínicos con pacientes con EA han demostrado que el DHA proporciona un beneficio terapéutico. Para una revisión de los estudios que evalúan el efecto del DHA en la EA, ver G. Jicha y W. Markesbery, *Clin. Interv. Aging* 5: 45-61 (2010). Los datos de los ensayos in vitro, sistemas de cultivo celular y modelos murinos de la EA apoyan un papel directo de los PUFA n-3 en el procesamiento de amiloides en el cerebro. Y en los modelos transgénicos productores de amiloide de la EA, la suplementación con DHA da como resultado niveles más bajos de $\alpha\beta$. M. Oksman et al., *Neurobiol. Dis.* 23(3):563-572 (2006). Además de los datos positivos de ensayos clínicos en pacientes con EA, un gran estudio en ancianos sanos con quejas leves de memoria mostró que los sujetos a los que se les administró DHA obtuvieron mejores resultados en las pruebas de aprendizaje y memoria después de seis meses en comparación con los que recibieron placebo. (Comunicado de prensa de Martek, 4 de mayo de 2010). Por lo tanto, DHA también puede desempeñar un papel beneficioso en la prevención de la EA.

El uso terapéutico de DHA también se ha investigado en pacientes con BP y MDD. Para una revisión sobre DHA en BP, ver V. Balencia-Martinez et al., *Expert. Rev. Neurother.* 11 (7):1029-1047 (2011). Debido a las dificultades para evaluar los niveles de DHA en el tejido cerebral de pacientes humanos, se ha evaluado la composición de ácidos grasos en membranas de eritrocitos de muestras de sangre y se encontró que contenía significativamente menos DHA en pacientes con BP y MDD que en controles sanos. R. McNamara et al., *J. Affect. Disord.* 126(1-2):303-311 (2010). En un estudio post-mortem, la composición de ácidos grasos de la corteza orbitofrontal tuvo niveles significativamente más bajos de DHA en pacientes con BP en comparación con los controles normales. R. McNamara et al., *Psychiatry Res.* 160(3):285-299 (2008). Y en un estudio de 4 meses, doble ciego, controlado con placebo, los pacientes con BP que recibían ácidos grasos n-3 tuvieron un período de remisión significativamente más prolongado que el grupo placebo. A. Stoll et al., *Arch. Gen. Psychiatry* 56 (5): 407 - 412 (1999). Estos estudios implican al DHA como terapéuticamente beneficioso en BD y MDD, particularmente debido a sus efectos estabilizadores del estado de ánimo.

También se ha demostrado que DHA beneficia a pacientes que sufren de otras formas de depresión. Para una revisión, ver A. Logan et al., *Lipids Health Dis.* 3:25-32 (2004). Varios estudios han encontrado niveles reducidos de n-3 en la sangre de pacientes con depresión. De manera similar, un aumento en el DHA en plasma se asoció con una reducción en las mujeres que informaron de síntomas de depresión posparto. Algunos estudios controlados con placebo han encontrado que el tratamiento con n-3 mejora los sistemas depresivos. Para una revisión sobre la relación entre los niveles de n-3 y la depresión, ver A. Logan et al., *Lipids Health Dis.* 3:25-32 (2004).

En la sepsis, una dieta enteral enriquecida con EPA, ácido γ -linolénico y antioxidantes mejoró los resultados hospitalarios y redujo la mortalidad en pacientes con sepsis grave o choque séptico que requieren ventilación mecánica. A. Pontes-Arruda et al., *Crit. Care Med.* 34(9):2325-2333 (2006). Se han notificado beneficios similares en días sin ventilación, días sin UCI, nuevas disfunciones orgánicas reducidas y una menor tasa de mortalidad en pacientes con estrés respiratorio agudo alimentados con PUFA de cadena larga enriquecidos con dieta y antioxidantes. J. Gadek et al. *Crit. Care Med.* 27(8):1409-1420 (1999).

También se ha publicado que los ácidos grasos n-3 tienen efectos beneficiosos en la curación de las heridas. Al alterar el microambiente lipídico, los ácidos grasos n-3 mejoran la reconstitución de las células epiteliales y también pueden ayudar a reducir la inflamación. D. Ruthig y K. Meckling-Gill, *J. Nutr.* 129:1791-1798 (1999); J. McDaniel et al. *Wound Repair Regen.* 19(2):189-200 (2011).

EPA y DHA han demostrado efectos protectores en cánceres, tales como cáncer de próstata y mama. Los efectos beneficiosos pueden deberse a propiedades antiinflamatorias, así como a mecanismos que disminuyen la proliferación y promueven la apoptosis, tal como a través de la regulación negativa de NF- κ B. Para una discusión sobre los ácidos grasos n-3 en el cáncer, ver B. Anderson y D. Ma, *Lipids Health Dis.* 8:33 (2009).

Los ácidos grasos n-3 se han asociado con efectos beneficiosos en pacientes con enfermedad cardiovascular y en la reducción del riesgo de enfermedad cardiovascular en personas sanas. Se han reportado efectos positivos similares en los accidentes cerebrovasculares. En consecuencia, la American Heart Association, así como otras agencias de salud, han emitido recomendaciones para una mayor ingesta de ácidos grasos n-3 en la dieta. P. Kris-Etherton et al. *Circulation* 106: 2747 - 2757 (2002). Los posibles mecanismos para los efectos observados de los ácidos grasos n-3 en la salud cardiovascular incluyen efectos hipotriglicéridémicos, efectos hipotensores, reducción en la agregación plaquetaria y efectos estabilizadores sobre el miocardio en sí.

El beneficio de los ácidos grasos n-3 en algunas condiciones se puede atribuir a amplios efectos antiinflamatorios. La EPA y el DHA dan lugar a resolvinas, que son mediadores antiinflamatorios con funciones inmunomoduladoras y de resolución de la inflamación. Por ejemplo, EPA y DHA exhiben efectos inhibidores sobre la quimiotaxis de

leucocitos y alteran la producción de citocinas inflamatorias a través de la reducción de la activación de NF- κ B en células inmunes. P. Calder, *Int. Rev. Immunol.* 28:506-534 (2009). En general, los PUFA n-3 se asocian con respuestas de células T proinflamatorias reducidas. Cuando los ácidos grasos n-3 se incrementan en las dietas de los animales, la composición del microdominio de la membrana de las células T en las balsas lipídicas se altera, dando como resultado una activación disminuida de NF- κ B, la producción de IL-2 y la proliferación celular. Específicamente, los PUFA n-3 afectan a la distribución y la partición de los primeros mediadores de señalización de la activación de las células T, tales como la proteína quinasa C. Y. Fan et al., *J. Immunol.* 173:6151-6160 (2004). También se ha demostrado que los ácidos grasos n-3 reducen la expresión de MHC de clase II en células dendríticas, disminuyendo de manera efectiva la presentación de antígenos a las células T, mientras que los ácidos grasos n-6 están asociados con una mayor actividad de presentación de antígenos.

Sanderson et al., *J. Leukoc. Biol.* 62:771-777 (1997). En una línea celular de monocitos y en macrófagos intraperitoneales, DHA y EPA tienen propiedades antiinflamatorias mediadas a través de un receptor 120 acoplado a proteína G (GPR120). Como resultado, estos ácidos grasos muestran efectos anti diabéticos in vivo a través de la supresión de la inflamación tisular inducida por macrófagos. D. Oh et al., *Cell* 142 (5): 687 - 698 (2010). Las diversas funciones inmunomoduladoras de los PUFA n-3 indican que pueden ser influyentes en muchas enfermedades humanas.

Ácidos grasos n-6

Al igual que los ácidos grasos n-3, los ácidos grasos n-6, tales como el ARA, desempeñan un papel crucial en el desarrollo neuronal y la función cerebral, y la acumulación de ARA se produce en el cerebro durante el desarrollo prenatal y postnatal. B. Koletzko et al., *J. Perinat Med.* 36(1):5-14 (2008). Los ácidos grasos n-6 son generalmente importantes para el desarrollo e inmunidad normales, y también estimulan el crecimiento de la piel y el cabello, mantienen la salud ósea, regulan el metabolismo y mantienen el sistema reproductivo.

Suplementos de PUFA de cadena larga

Durante más de una década, las agencias de salud han recomendado el consumo de ácidos grasos n-3 en la dieta debido a sus beneficios para la salud. El DHA y el EPA están disponibles comercialmente como triglicéridos o en forma esterificada en suplementos nutricionales o productos recetados (por ejemplo, LOVAZA®, OMACOR® y Vascepa™). Los suplementos de DHA pueden derivarse del aceite de pescado o de fuentes vegetarianas como el aceite de linaza o las algas. Los suplementos pueden ser en fórmulas en polvo, bebidas líquidas o de alimentación por sonda.

La fórmula infantil está sujeta a la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos, que define la fórmula para lactantes como "un alimento que pretende ser o está representado para un uso dietético especial únicamente como alimento para lactantes por su imitación a la leche humana o su idoneidad como un sustituto parcial o completo de la leche humana." La FDA define a los bebés como personas que no tienen más de 12 meses de edad. 21 CFR 105.3 (e). El principal ácido graso n-3 en la leche humana es el DHA, con un promedio de 7-8 mg/dL (que varía de 0,17% a 1,0% del total de ácidos grasos). R. Yuhas et al., *Lipids* 41 (9): 851 - 858 (2006). La cantidad de DHA en la leche humana es principalmente un reflejo de la ingesta materna de DHA.

Las fórmulas infantiles suplementadas con TG-LCPUFA disponibles en el mercado incluyen las fórmulas Enfamil, tales como Enfamil LIPIL® y Enfamil PREMIUM®, Baboo, Earth's Best Organic, fórmulas de Nestlé, tales como Nestlé Gerber GOOD START® y Nestlé NAN®, fórmulas de Nutricia, tales como NEOCATE® y APTAMIL®, Parent's Choice Organic, SMA GOLD® de Pfizer, fórmulas de Similac, tales como Similac ADVANCE®, Similac EARLY SHIELD® e ISOMIL®, y Ultra Bright Beginnings. Otros preparados para lactantes también pueden complementarse con TG-LCPUFA. Las fórmulas suplementadas con TG-LCPUFA pueden estar basadas en leche o ser a base de soja, y pueden ser orgánicas. En EE. UU., la fórmula infantil suplementada con TG-LCPUFA representa aproximadamente el 90% de las ventas de productos (Mead Johnson Nutrition).

TG-LCPUFA también se puede agregar a las fórmulas de continuación y bebidas para niños pequeños, ancianos y otras personas que necesitan apoyo nutricional o suplementos dietéticos con ácidos grasos de cadena larga. Los ejemplos de dicho producto incluyen ENSURE®, PEDIASURE®, CARNATION®, BOOST®, CERELAC® y SOUVENAIID®. Además, se pueden usar fórmulas especializadas que se complementan con TG-LCPUFA o ésteres de LC-PUFA en conexión con los métodos y dispositivos de la invención en pacientes que requieren alimentación por sonda. Por ejemplo, las fórmulas enterales se usan comúnmente en bebés prematuros, pacientes con insuficiencia renal, enfermedades gastrointestinales o condiciones que causan deterioro de la función gastrointestinal, resección intestinal, malabsorción de grasas, desnutrición, pancreatitis, hiperglucemia/diabetes, insuficiencia hepática, enfermedad pulmonar aguda y crónica, o un estado inmunocomprometido. Para una revisión de fórmulas enterales disponibles comercialmente, ver A. Malone, *Prat. Gastr.* 29(6):44-74 (2005). Las fórmulas nutricionales pueden ser estándar, elementales o especializadas en la función de la enfermedad o condición del paciente. Las fórmulas estándar comúnmente utilizadas incluyen, por ejemplo, ISOCAL®, NUTREN 1.0®, NUTREN 1.5®, NUTREN 2.0®, OSOMLITE 1.0®, OSMOLITE 1.2®, FIBERSOURCE 1.2®, JEVITY 1.2®, JEVITY 1.5®, PROBALANCE®, ISOSOURCE 1.5®, DELIVER 2.0®, NOVOSOURCE 2.0® y TWOCAL HN®. Las fórmulas elementales pueden contener fuentes de macronutrientes que incluyen fórmulas poliméricas e hidrolizadas y pueden

ser mejoradas con fibra. Las fórmulas específicas de la enfermedad incluyen, por ejemplo, fórmulas renales tales como MAGNACAL RENAL®, NEPRO®, NOVASOURCE RENAL®, SUPLENA® y NUTRI-RENAL®.

Las fórmulas gastrointestinales (GI) pueden usarse para el manejo nutricional de pacientes con deterioro de la función GI, incluyendo pacientes con malabsorción grave de proteínas o grasas, resección intestinal extensa, fibrosis quística, parálisis cerebral, síndrome del intestino corto, EII, pancreatitis, enfermedad de Crohn, diarrea, fístula gastrointestinal, enfermedad celíaca, síndromes de malabsorción, traumatismo/cirugía, enteritis por radiación, fallo intestinal, quilotórax. Estas fórmulas también se usan para la alimentación postoperatoria temprana, alimentación trófica, nutrición parenteral total (NPT) alternativa y alimentación dual con NPT. Las fórmulas GI incluyen, por ejemplo, PEPTAMEN®, que se compone de 70% de triglicéridos de cadena media para disminuir el potencial de la malabsorción de las grasas y 30% de triglicéridos de cadena larga, VIVONEX PLUS® y VIVONEX PEDIATRIC®.

Desafortunadamente, para personas que padecen una capacidad alterada para hidrolizar triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos de cadena larga, tales como, por ejemplo, aquellos con producción pancreática comprometida o aquellos con insuficiencia pancreática, incluso complementando tales fórmulas con DHA, EPA y otros ácidos grasos n-3, puede no ser suficiente darse cuenta de los beneficios asociados con estos compuestos. Los triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos deben metabolizarse a monoglicéridos y/o ácidos grasos libres para ser absorbidos adecuadamente en el intestino. La invención proporciona métodos de utilización de suplementos de PUFA de cadena larga disponibles comercialmente existentes o fórmulas de nuevo diseño suplementadas con PUFA de cadena larga para proporcionar fórmulas listas para usar que contienen concentraciones significativamente más altas de monoglicéridos de cadena larga y/o ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, los métodos serán particularmente efectivos para proporcionar monoglicéridos de cadena larga y/o ácidos grasos libres producidos a partir de triglicéridos de DHA, EPA y ARA o DHA esterificado, EPA y ARA para que la fórmula proporcione el máximo beneficio asociado con estos ácidos grasos críticos para personas que, de otro modo, no podrían hidrolizarlos ni absorberlos.

Capacidad reducida para hidrolizar triglicéridos de cadena larga y ésteres de ácidos grasos

La insuficiencia pancreática es una de las condiciones que conduce a una capacidad reducida para hidrolizar los triglicéridos de cadena larga. La insuficiencia pancreática se caracteriza por una producción insuficiente de enzimas pancreáticas exocrinas, incluida la lipasa pancreática. La insuficiencia pancreática puede ocurrir naturalmente durante varias etapas de la vida humana. Por ejemplo, la secreción de lipasa pancreática comienza en niveles bajos alrededor de las 30 semanas de gestación y permanece baja durante el primer año de vida. Por lo tanto, los bebés, y especialmente los bebés prematuros, pueden experimentar insuficiencia pancreática. Como resultado, si no se están amamantando, estos bebés son susceptibles a una hidrólisis y absorción deficiente de ácidos grasos, y están privados de los beneficios asociados con la ingestión de DHA, EPA y otros LC-PUFA.

En el otro extremo del espectro, los ancianos sanos también pueden experimentar insuficiencia pancreática u otra capacidad reducida para hidrolizar triglicéridos LC-PUFA o LC-PUFA esterificados debido a cambios en el páncreas que ocurren como parte del proceso de envejecimiento natural. Estos cambios pueden incluir atrofia, fibrosis, esclerosis o lipomatosis del páncreas. Como resultado, los ancianos pueden experimentar síntomas de mala digestión que incluyen desnutrición, esteatorrea, diarrea, dolor abdominal y pérdida de peso debido a la reducción de la secreción de enzimas pancreáticas exocrinas. K. Herzig et al., BMC Geriatrics 11: 4-8 (2011).

La insuficiencia pancreática u otra capacidad reducida para hidrolizar los triglicéridos LC-PUFA o LC-PUFA esterificados también pueden ser el resultado de una enfermedad o trauma. Por ejemplo, la pancreatitis es una condición de la inflamación en el páncreas que produce insuficiencia pancreática. La pancreatitis puede ser aguda o crónica e incluye la pancreatitis causada por el alcoholismo, pancreatitis crónica idiopática, pancreatitis hereditaria, pancreatitis traumática, pancreatitis necrosante aguda y pancreatitis autoinmune. La fibrosis quística es también una causa de insuficiencia pancreática, particularmente en niños y adolescentes. Los trastornos que provocan una disminución del pH intraduodenal, tal como el gastrinoma (síndrome de Zollinger-Ellison), pueden inactivar la lipasa y causar insuficiencia pancreática. Las insuficiencias pancreáticas también pueden ser causadas por cirugías del tracto gastrointestinal en las que se extirpan porciones del estómago o del páncreas, cáncer de páncreas, enfermedades gastrointestinales tales como úlceras estomacales, enfermedad celíaca o enfermedad de Crohn, o en trastornos autoinmunes tales como el lupus eritematoso sistémico (SLE) o la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).

Otras causas de una capacidad reducida para digerir TG-LC-PUFAs, LC-PUFA esterificados y/u otros triglicéridos de cadena larga y ésteres de ácidos grasos incluyen, por ejemplo, el síndrome del intestino irritable, hipertrigliceridemia, desnutrición, incluyendo desnutrición proteico-calórica severa, neoplasias pancreáticas y duodenales, radioterapia abdominal, hemocromatosis, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, síndrome de Shwachman, deficiencia de tripsinógeno, deficiencia de enterocinasa o una deficiencia aislada de lipasa. D. Kasper et al., Harrison's Principles of Internal Medicine 16ª Ed. (2004) La capacidad reducida para digerir triglicéridos de cadena larga o PUFA esterificados de cadena larga también puede ser consecuencia de una resección intestinal, fibrosis quística, parálisis cerebral, síndrome del intestino corto, EII, pancreatitis, enfermedad de Crohn, diarrea, fístula gastrointestinal, enfermedad celíaca, síndromes de malabsorción, traumatismo/cirugía, particularmente traumatismo gastrointestinal o cirugía, enteritis por radiación, insuficiencia intestinal, quilotórax, cáncer, particularmente cáncer

pancreático o gastrointestinal, y/o cicatrización de heridas. Aunque se desconoce la causa exacta, los niños con trastorno por déficit de atención e hiperactividad (TDAH) también han reducido los niveles de LC-PUFA. Burgess et al., *Am. J. Clin. Nutri.* 71 (supl): 327S-30S (2000).

5 Los pacientes con fibrosis quística (FQ), por ejemplo, han demostrado tener niveles reducidos de LC-PUFAs. Peretti et al., *Nutrition & Metabolism* 2: 11-28 (2005). Los pacientes FQ que reciben terapia de reemplazo de enzimas pancreáticas con frecuencia continúan sufriendo una malabsorción de grasas. Kalivianakis, *American Journal of Clinical Nutrition* 69: 127 - 134 (1999). Se describen en este documento fórmulas y métodos para mejorar la absorción de grasas, tales como, por ejemplo, LC-PUFA en pacientes con FQ. En algunas realizaciones, la invención proporciona fórmulas y métodos para inducir el aumento de peso en pacientes con FQ.

15 Mientras que la caquexia y la pérdida de peso son comunes en las etapas avanzadas de muchos cánceres debido al estado catabólico de los tejidos, desviación de nutrientes y malabsorción en etapas avanzadas, el cáncer de páncreas (PC) es inusual, ya que la pérdida de peso y la malabsorción están presentes en 80% -90% de pacientes en el momento del diagnóstico. La malabsorción por deficiencia exocrina explica en gran medida la pérdida de peso y se debe a la pérdida de parénquima pancreático, el bloqueo del conducto pancreático que impide que las enzimas lleguen al intestino y a los procedimientos quirúrgicos. El resultado final común de todos estos mecanismos es la esteatorrea y la pérdida de peso. Damerla et al., *J of Support Oncology* 6: 393-396 (2008). La estabilización del peso en PC se asocia con una mejor supervivencia y calidad de vida. Davidson et al., *Clinical Nutrition* 23, 239 - 247 (2004). Se describen en este documento fórmulas y métodos para mejorar la absorción de grasas, tales como, por ejemplo, LC-PUFA en pacientes con PC. Se describen en este documento fórmulas y métodos para inducir la ganancia de peso en pacientes con PC.

25 Algunos aspectos que se describen en este documento mejoran las opciones de tratamiento actuales para la insuficiencia pancreática y otras afecciones que reducen la capacidad para hidrolizar TG-LCPUFA, LC-PUFA esterificados y/u otros triglicéridos de cadena larga y ésteres de ácidos grasos. En un paciente con capacidad reducida para hidrolizar TG-LCPUFA, LC-PUFA esterificados y/u otros triglicéridos de cadena larga y ésteres de ácidos grasos, simplemente aumentar el consumo de estos nutrientes sin mejorar la hidrólisis puede causar esteatorrea, dolor abdominal, calambres, diarrea, y otras complicaciones gastrointestinales. La terapia de reemplazo de enzimas pancreáticas también puede conducir a complicaciones. Se ha observado que grandes cantidades de enzimas digestivas pancreáticas pueden dañar el intestino grueso y causar colonopatía fibrosante. D. Bansi et al., *Gut* 46: 283 - 285 (2000); D. Borowitz et al. *J. Pediatr.* 127:681-684 (1995). Otro peligro importante planteado por los suplementos de lipasa es la reacción alérgica, ya que muchos suplementos comerciales de lipasa se derivan de fuentes animales. Por lo tanto, los aspectos descritos en este documento que proporcionan triglicéridos de cadena larga prehidrolizados o ésteres de PUFA de cadena larga, con o sin lipasa añadida, proporcionarán métodos mejores y más seguros para tratar la insuficiencia pancreática u otra capacidad reducida para digerir los triglicéridos de cadena larga o PUFAs esterificados de cadena larga.

40 Si bien los ácidos grasos n-3 y n-6 son importantes durante el desarrollo, se cree que los ácidos grasos n-3 son más críticos que los ácidos grasos n-6 más adelante en la vida. En algunos sujetos, especialmente en algunos adultos, puede ser deseable aumentar la proporción de (DHA y EPA):ARA. En particular, los pacientes con fibrosis quística pueden beneficiarse del aumento de la proporción de (DHA y EPA):ARA en su plasma. Desafortunadamente, las fórmulas adultas actualmente disponibles generalmente tienen una baja proporción de ácidos grasos n-3:n-6. Además, en sujetos con hidrólisis alterada de TG-LCPUFAs, simplemente aumentar el consumo de n-3 TG-LCPUFA es poco probable que mejore significativamente la relación (DHA y EPA):ARA en el sujeto, y el aumento resultante en TG-LCPUFAs no digeridos podría causar problemas gastrointestinales.

50 En consecuencia, se describen en este documento fórmulas y métodos para aumentar la relación de (DHA y EPA):ARA en un sujeto, particularmente en un sujeto adulto. Por ejemplo, algunas realizaciones proporcionan métodos para preparar una fórmula para adultos en los que una fórmula que comprende n-3 triglicéridos y/o ésteres se expone a una lipasa que hidroliza n-3 triglicéridos y/o ésteres. En algunas realizaciones, la fórmula preparada comprende una proporción mayor de monoglicéridos n-3:n-6 y/o ácidos grasos libres, por ejemplo, una relación más alta de DHA libre y EPA a ARA libre, que en la fórmula correspondiente sin tratamiento con lipasa. En algunas realizaciones, la fórmula comprende más monoglicéridos n-3 y/o ácidos grasos libres que monoglicéridos n-6 y/o ácidos grasos libres, por ejemplo, más DHA libre y EPA que ARA libre. En algunas realizaciones, la fórmula se prepara exponiéndola a una lipasa que tiene una mayor actividad hacia triglicéridos n-3 y/o ésteres que triglicéridos n-6 y/o ésteres. En algunas realizaciones, la enzima es la enzima RO. También se describe una fórmula en la que la proporción de ácidos grasos libres y/o monoglicéridos n-3:n-6 es mayor que la relación de ácidos grasos n-3:n-6 encontrados en el plasma del sujeto, por ejemplo, una fórmula en la que la relación de DHA y EPA libre a ARA libre es mayor que en el plasma del sujeto. También se describen métodos en los que dicha fórmula se administra a un sujeto adulto. El sujeto puede tener fibrosis quística.

Capacidad reducida para hidrolizar ácidos grasos de cadena larga en bebés prematuros

65 Los PUFA de cadena larga son críticos en los bebés para el desarrollo normal del sistema nervioso y la retina y se acumulan en las membranas celulares del cerebro y la retina a partir de las 30 semanas de gestación. C. Martin et al., *J. Pediatr.* 159(5): 743-749 (2011); A. Lapillone et al., *Leukotrienes Ess. Fatty Acids* 81: 143 - 150 (2009); J.

McCann et al., Am. J. Clin. Nutr. 82:281-295 (2005); M. Martinez et al., J. Pediatr. 120:S129 - S138 (1992). Normalmente, los ácidos grasos, incluidos DHA, EPA y ARA, así como las lipasas necesarias para descomponer estos ácidos grasos en monoglicéridos y ácidos grasos libres, se administran al feto a través de la placenta y luego a los lactantes a través de la leche materna. Los bebés prematuros corren un riesgo significativamente mayor de un suministro inadecuado de ácidos grasos debido al tiempo de gestación acortado seguido de su dependencia de fuentes externas de ácidos grasos después de la vida. C. Martin et al., J. Pediatr. 159(5):743-749 (2011). Además, debido a que los bebés prematuros no producen niveles suficientes de lipasa pancreática, en consecuencia, tienen dificultades para hidrolizar los ácidos grasos de cadena larga que se proporcionan en su fórmula.

Se ha demostrado que los bebés prematuros tienen menos DHA y una relación DHA/ARA más baja en el cerebro y la retina en comparación con un bebé a término. M. Martinez et al., J. Pediatr. 120:S129 - S138 (1992). Además, en un estudio retrospectivo del perfil de ácidos grasos de los bebés prematuros, los niveles inadecuados de PUFA de cadena larga se asociaron con un aumento de la enfermedad pulmonar crónica y la sepsis, posiblemente debido a la respuesta inmune desregulada. C. Martin et al., J. Pediatr. 159(5):743-749 (2011). Estos estudios y otros sugieren que, incluso con fórmulas suplementadas con DHA y otros triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos de cadena larga, asegurar niveles adecuados de PUFA de cadena larga en neonatos prematuros es una necesidad significativa y potencialmente insatisfecha. Las fórmulas descritas en este documento, los métodos y los dispositivos de la invención permitirán que los bebés prematuros reciban cantidades suficientes de ácidos grasos de cadena larga para reconocer los beneficios médicos asociados.

Capacidad reducida para hidrolizar ácidos grasos de cadena larga en bebés alimentados con fórmula

Los bebés alimentados con fórmula que no ha sido suplementada con ácidos grasos también pueden experimentar déficits en los PUFA de cadena larga. Se encontró que los niveles de PUFA de cadena larga disminuyen en los lactantes alimentados con fórmula no suplementada en comparación con los lactantes alimentados con leche materna. B. Koletzko et al., J. Perinat. Med. 36(1):5-14 (2008). Incluso los bebés alimentados con leche materna pueden experimentar déficits en los ácidos grasos n-3 ya que la cantidad de DHA en la leche materna varía y se correlaciona con la ingesta dietética materna. Se ha descrito una correlación positiva entre la cantidad de DHA en la leche materna y el desarrollo visual y del lenguaje en bebés amamantados. S. Innis, J. Pediatr. 143:S1-S8 (2003). Por lo tanto, se recomienda una dieta que contenga DHA para las mujeres que están amamantando. Para los bebés alimentados con fórmula, todos los principales fabricantes de fórmulas han introducido fórmulas infantiles premium con grasas que contienen DHA y ARA. Sin embargo, los informes sobre los beneficios de esas fórmulas enriquecidas con DHA y ARA han sido mixtos. Algunos estudios han demostrado ventajas significativas en el desarrollo cognitivo cuando los bebés recibieron fórmulas que contienen PUFA de cadena larga, mientras que otros no. B. Koletzko et al., J. Perinat. Med. 36(1): 5-14 (2008); E. Sarkadi-Nagy et al., J. Lipid Res. 45:71-80 (2004). Recientemente, los bebés alimentados con Enfamil LIPIL® que contienen DHA y ARA durante el primer año de vida experimentaron mejores resultados inmunitarios, incluida una mejor salud respiratoria, en comparación con los bebés alimentados con la misma fórmula sin lípidos. E. Birch et al., J. Pediatr. 156(6):902-906 (2010). En general, sin embargo, los datos preclínicos hasta la fecha no han mostrado beneficios consistentes de las fórmulas actuales suplementadas con ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga para el desarrollo infantil.

Una explicación de los resultados inconsistentes en estos estudios es que algunos bebés no pueden absorber la cantidad necesaria de ácidos grasos esenciales a través del intestino, incluso cuando ingieren una fórmula complementada con triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos de cadena larga. Esta incapacidad para absorber ácidos grasos puede deberse a los bajos niveles de lipasa pancreática endógena de los bebés. Debido a que las lipasas normalmente se transfieren a un bebé a través de la leche materna, es posible que los bebés alimentados con fórmula no tengan niveles suficientes de lipasa para descomponer los PUFA de cadena larga o los ésteres de PUFA en monoglicéridos y/o ácidos grasos libres, para su absorción por el intestino. Como resultado, los bebés alimentados con fórmula suplementada con LC-PUFA aún tienen una menor absorción de PUFA-CL en comparación con los lactantes alimentados con leche materna. Una vez más, existe una clara necesidad no solo de proporcionar suplementos de ácidos grasos, sino de permitir la hidrólisis y la absorción de estos ácidos grasos.

La adición de lipasa a fórmulas infantiles reguladas por el gobierno (o, por ejemplo, fórmulas médicas nutricionales) podría requerir un trabajo de desarrollo significativo para seleccionar, estabilizar y formular un suplemento de lipasa adecuado. En fórmulas no reguladas, sin pruebas suficientes, problemas relacionados con la estabilidad de la lipasa, falta de especificidad, pureza y/o interferencia con otros materiales pueden dar como resultado el uso de niveles de enzima excesivos o potencialmente dañinos. Agregar grandes cantidades de una nueva sustancia, además de los obstáculos regulatorios, también introduce otra variable que podría afectar a la capacidad de una persona con capacidad reducida para hidrolizar los triglicéridos de cadena larga, especialmente los bebés, de tolerar una fórmula. Este problema persiste en las fórmulas descritas, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N° 5.902.617 (Pabst) y la patente de EE. UU. No. 4.944.944 (Tang).

Las realizaciones de la invención resuelven estos diversos problemas proporcionando una fórmula nutricional que, alimentada, proporciona mayores cantidades de monoglicéridos esenciales y ácidos grasos libres que pueden absorberse fácilmente a través del intestino del bebé. Como resultado, los sujetos alimentados con fórmula pueden recibir los beneficios de DHA, EPA y ARA. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional no introduce ingredientes nuevos, excepto las grasas prehidrolizadas que están presentes en las fórmulas existentes. A los bebés alimentados

con fórmula se les proporcionan los beneficios de los ácidos grasos obtenidos por lactantes amamantados, sin la exposición a los suplementos de lipasa. La fórmula nutricional, como se describe en este documento, puede contener una lipasa altamente específica que permite el uso de una cantidad mínima de lipasa añadida a la fórmula infantil para proporcionar mayores cantidades de monoglicéridos de cadena larga y ácidos grasos libres, particularmente DHA, EPA y ARA.

En algunas realizaciones, la fórmula nutricional conduce a una absorción mejorada de ácidos grasos. Un sujeto puede ingerir la fórmula nutricional durante 3 días, 5 días, 7 días, 10 días, 14 días, 30 días, 60 días o más. Tal ingestión de una fórmula nutricional como se describe en este documento puede reducir la grasa total en las heces, y, específicamente, puede reducir los niveles de DHA, ARA, y/o EPA en las heces. Esta reducción puede medirse con relación a la composición de materia fecal del sujeto antes de comenzar a ingerir la fórmula nutricional. Esta reducción se puede medir con relación a la composición de materia fecal de un sujeto alimentado con una fórmula nutricional que no se ha expuesto a la lipasa antes de la ingestión, tal como una fórmula nutricional disponible actualmente. Los niveles de grasa total, DHA, ARA y/o EPA en las heces pueden reducirse en al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o más. En ciertas realizaciones, los niveles de grasa total, DHA, ARA y/o EPA en las heces se reducen entre 50 y 80%. El nivel de grasa total en las heces se puede reducir en al menos 50%. El nivel de al menos un LC-PUFA (tal como DHA, ARA o EPA) en las heces se puede reducir en al menos 50%. El nivel de al menos un LC-PUFA (tal como DHA, ARA o EPA) en las heces se puede reducir en al menos un 60%. Los niveles de DHA, ARA y EPA en las heces se pueden reducir cada uno en al menos un 50%. Los niveles de DHA, ARA y EPA en las heces se pueden reducir cada uno en al menos un 60%. La ingestión de la fórmula nutricional puede mejorar la acumulación de los niveles de grasa en plasma, eritrocitos y tejido, incluyendo los niveles de DHA y ARA. Los tejidos pueden incluir retina, corazón, tejido adiposo y tejido renal. La ingestión de la fórmula nutricional puede aumentar el nivel de DHA, ARA, o ambos en el plasma, eritrocitos o ambos. La ingestión de la fórmula nutricional puede aumentar el nivel de DHA, ARA o ambos en la retina. La ingestión de la fórmula nutricional puede aumentar el nivel de DHA, ARA, o ambos en el corazón. La ingestión de la fórmula nutricional puede aumentar el nivel en plasma de triglicéridos, colesterol, HDL y/o LDL. La ingestión de la fórmula nutricional puede aumentar la relación de HDL a LDL en el plasma del sujeto.

La ingestión de la fórmula nutricional aumenta el nivel plasmático de vitamina A y/o vitamina E. Sin pretender imponer ninguna teoría, se cree que este aumento se debe al hecho de que las vitaminas A y E se proporcionan típicamente como ésteres, que deben ser hidrolizados. Se cree que la exposición a la lipasa en diversos métodos y composiciones como se describe en este documento mejora la hidrólisis de estos ésteres de vitaminas, lo que conduce a una mayor acumulación de vitaminas A y E en el plasma.

La ingestión de la fórmula nutricional puede tener efectos beneficiosos sin una acumulación significativamente aumentada de grasas en el hígado. La enfermedad del hígado graso (FLD, por sus siglas en inglés) se caracteriza por una mayor acumulación de grasa, especialmente triglicéridos, en las células hepáticas. La condición también se asocia con otras enfermedades que influyen en el metabolismo de las grasas. Es normal que el hígado contenga algo de grasa y, por sí mismo, esto no causa síntomas. En algunos pacientes, el hígado graso puede estar acompañado de inflamación hepática y muerte de células hepáticas (esteatohepatitis). También hay una asociación con el cáncer de hígado (carcinoma hepatocelular). La resistencia a la insulina, así como un mayor consumo de carbohidratos y ácidos grasos saturados, y una baja ingesta de fibra y ácidos grasos omega-3, están todos asociados positivamente con la patogénesis de la FLD.

Las causas de FLD incluyen la dieta, los medicamentos, las enfermedades y las condiciones médicas. El consumo de exceso de calorías puede causar FLD; el exceso de ingesta calórica supera la capacidad del hígado para metabolizar la grasa de manera normal, lo que resulta en la acumulación de grasa en el hígado. Una cantidad de medicamentos, incluidos el tamoxifeno, la inyección de amiodarona, la amiodarona oral y el metotrexato, están asociados con la FLD. El hígado graso también se asocia con la diabetes tipo II, la obesidad y los niveles elevados de triglicéridos en la sangre, la enfermedad celíaca y la enfermedad de Wilson (anormalidad del metabolismo del cobre), la pérdida de peso rápida y la desnutrición.

Lipasa

La insuficiencia pancreática y otras afecciones asociadas con una capacidad reducida para hidrolizar triglicéridos de cadena larga o ésteres de ácidos grasos de cadena larga actualmente se tratan con enzimas digestivas suplementarias, incluida la lipasa pancreática. Sin embargo, las enzimas pancreáticas, y particularmente la lipasa pancreática presente en estos suplementos, a menudo son sensibles a la degradación por ácido gástrico y pepsina, de modo que solo una pequeña fracción de las enzimas ingeridas alcanzan el duodeno en forma activa. E. Ville et al., *Digestivity* 65: 73 - 81 (2001). Desafortunadamente, muchos de los revestimientos protectores del ácido tienen problemas potenciales de seguridad para las poblaciones infantiles o pacientes inmunodeprimidos, ya que una parte importante del peso administrado es el recubrimiento de plástico. Además, aunque los recubrimientos protectores de ácido han ayudado, persiste cierto grado de malabsorción, lo que hace que los pacientes con insuficiencia pancreática necesiten dosis crecientes de suplementos enzimáticos. Esta persistencia de malabsorción de ácidos grasos de las enzimas recubiertas enteralmente puede deberse a que el duodeno y el yeyuno superior en pacientes con insuficiencia pancreática a menudo tienen ambientes ácidos, por lo que no se logra el aumento esperado en el

pH y la capa protectora no se disuelve adecuadamente. para liberar la enzima. D. Graham, New England J. Med. 296(23):1314-1317 (1977). Ambos problemas se han abordado aumentando la dosis de lipasa administrada. Desafortunadamente, como se indicó anteriormente, se ha encontrado que altas dosis de suplemento de enzimas pancreáticas están asociadas con la colonopatía fibrosante. Por lo tanto, se describen en este documento fórmulas nutricionales que comprenden mayores porcentajes de monoglicéridos de cadena larga y/o ácidos grasos libres sin contener lipasa añadida. Algunas realizaciones proporcionan fórmulas nutricionales que comprenden una dosis optimizada de lipasa, como se describe en este documento.

Las lipasas pueden obtenerse de animales, plantas y muchos microorganismos naturales o genéticamente modificados. Muchos, si no la mayoría, de los suplementos de lipasa dietética comercialmente disponibles se derivan de animales y son particularmente susceptibles a la degradación por enzimas digestivas. Una alternativa utilizada menos frecuentemente es la lipasa microbiana, es decir, la lipasa producida en bacterias u hongos, tal como, por ejemplo, la levadura. Las lipasas microbianas retienen la actividad en un rango de pH más amplio que las lipasas animales o vegetales, eliminando así la necesidad de tabletas con recubrimiento entérico. Sin embargo, las enzimas microbianas tienden a ser degradadas por la tripsina en el intestino delgado, lo que reduce su disponibilidad para descomponer los triglicéridos y ésteres en el intestino. En ciertas realizaciones, la lipasa usada en los métodos o dispositivos de la invención son lipasas bacterianas, lipasas fúngicas o ambas.

La especificidad y la cinética de las lipasas individuales pueden variar significativamente. La especificidad de las lipasas está controlada por las propiedades moleculares de la enzima, la estructura del sustrato y los factores que afectan la unión de la enzima al sustrato. Los tipos de especificidad incluyen la especificidad del sustrato, es decir, una lipasa dada puede ser más activa en la descomposición de un tipo de ácido graso que otra lipasa y la especificidad posicional, que implica la hidrólisis preferencial de enlaces éster en las posiciones 1 y/o 3 del esqueleto de glicerol de un triglicérido.

Ahora se ha determinado que la lipasa producida por *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y *Rhizopus oryzae* tiene una mayor especificidad para DHA, EPA y ARA que otras lipasas, tales como la lipasa producida por *Candida rugosa*, *Rhizomucor miehei*, *Penicillium camemberti*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus oryzae*. Como resultado, los suplementos de lipasa o los productos nutricionales complementados con lipasa que comprenden *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y/o *Rhizopus oryzae* proporcionarán una hidrólisis aumentada de TG-DHA, TG-EPA y/o TG-ARA. Por consiguiente, un aspecto como se describe en este documento se refiere a suplementos de lipasa o productos nutricionales complementados con lipasa que comprenden lipasa de *Chromobacterium viscosum*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa de *Burkholderia cepacia* y/o lipasa de *Rhizopus oryzae*. En algunas realizaciones, la lipasa es la lipasa de *Chromobacterium viscosum*, la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* o la lipasa de *Rhizopus oryzae*. En ciertas realizaciones, la lipasa es la lipasa de *Rhizopus oryzae*.

La referencia a la lipasa de ciertas especies, tales como la lipasa de *Chromobacterium viscosum*, la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, la lipasa de *Burkholderia cepacia* y la lipasa de *Rhizopus oryzae*, no significa necesariamente que la lipasa se prepare directamente a partir de la especie hospedante nativa. Por ejemplo, la misma lipasa podría producirse de manera recombinante en otra célula huésped.

Otro aspecto descrito en este documento es un método para aumentar la absorción de DHA, EPA y/o ARA mediante la administración de una o más lipasas de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y *Rhizopus oryzae*, como un suplemento dietético, o hidrolizando previamente una fórmula que contiene DHA, EPA y/o ARA con una o más de estas enzimas. En algunas realizaciones, la lipasa es la lipasa de *Chromobacterium viscosum*, la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* o la lipasa de *Rhizopus oryzae*. Un aspecto adicional descrito en este documento se refiere a lipasas con actividades específicas para DHA, EPA y/o ARA que son comparables a las actividades específicas de una o más de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y *Rhizopus oryzae* según lo determinado por cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) y descrita en el Ejemplo 1. En algunas realizaciones, la lipasa tiene actividades específicas para DHA, EPA y/o ARA que son comparables a las actividades específicas de una o más de la lipasa de *Chromobacterium viscosum*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens* o lipasa de *Rhizopus oryzae*. Se describe en este documento una fórmula nutricional que contiene menos de 5.000 unidades de lipasa (con unidades evaluadas en un ensayo estándar de aceite de oliva, tal como se describe en *Pharmaceutical Enzymes: Properties and Assay Methods*, R. Ruysen y A. Lauwers (Eds). Scientific Publishing Company, Ghent, Bélgica (1978)). En otras realizaciones, la fórmula nutricional contiene menos de 3.000 unidades de lipasa. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene menos de 1.000 unidades. En ciertas realizaciones, la fórmula que contiene menos de 5.000, menos de 3.000 o menos de 1.000 unidades de lipasa es una fórmula infantil o una fórmula nutricional médica.

Lipasa inmovilizada

Los procesos para inmovilizar enzimas y otras proteínas en soportes insolubles son bien conocidos y están descritos en la bibliografía. La inmovilización de la lipasa puede mejorar la estabilidad de la enzima, hacerla reutilizable y permitir que los productos se separen fácilmente de la enzima sin contaminación por la lipasa. La lipasa se une covalentemente a un soporte sólido. Otros métodos de inmovilización de lipasa incluyen, por ejemplo, adsorción,

unión iónica, unión covalente, reticulación, encapsulación y atrapamiento sobre matrices poliméricas e inorgánicas hidrófobas o hidrófilas. Ver Y. Ren et al., *BMC Biotechnol.* 11:63 (2011); V. R. Murty et al., *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7:57-66 (2002). La lipasa puede inmovilizarse uniéndose directamente a un material de soporte o a través de un enlazador. Ver, por ejemplo, Stark y Holmberg, *Biotechnol. and Bioeng.* 34(7):942-950 (1989).

5 La inmovilización por adsorción es reversible y típicamente implica fuerzas hidrofóbicas. Es simple y de bajo costo, pero tiene la desventaja de la inmovilización incompleta o la filtración de enzimas del soporte insoluble. Los ejemplos de lipasa inmovilizada usando este método se pueden encontrar en E. Lie et al., *Chem. Technol. and Biotechnol.* 50:549-553 (1991) (lipasa de *Candida cylindracea*, soporte de zeolita); M. Basri et al., *J. Chem. Technol. and Biotechnol.* 59:37-44 (1994) (lipasa de *Candida rugosa*, soporte de polímero); H. Gunnlaughsdottir et al., *Enzyme and Microbiol. Tech.* 22:360-367 (1998) (lipasa de *Humicola lanuginosa*, soporte de perlas de vidrio). Los soportes adecuados para la inmovilización por adsorción incluyen, por ejemplo, perlas de cerámica tales como Toyonite (Toyo Denka Kogyo Co., Ltd.).

15 La unión iónica se basa en interacciones electrostáticas entre la lipasa y grupos iónicos cargados de forma diferente en matrices tales como, por ejemplo, DEAE-celulosa o DEAE-Sephadex en un soporte sólido. La unión iónica provoca un cambio mínimo en la conformación de la lipasa y produce una lipasa inmovilizada con alta actividad en la mayoría de los casos. Sin embargo, se debe tener en cuenta que, aunque la fuerza de unión entre la enzima y el soporte es más fuerte que cuando se usa la adsorción, no es tan fuerte como la unión covalente y, por lo tanto, puede producirse una fuga de lipasa desde el soporte.

25 La unión covalente se basa en enlaces covalentes entre un material de soporte y un grupo funcional en un aminoácido en la superficie de la lipasa. Los grupos funcionales que pueden tener lugar en esta unión de la enzima al soporte pueden ser grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo, hidroxilo, imidazol o fenólicos que no son esenciales para la actividad catalítica de la lipasa. Para proteger el sitio activo, la inmovilización puede llevarse a cabo en presencia de sustrato o un inhibidor competitivo. Una ventaja significativa del uso de la unión covalente de lipasa a un material de soporte es la resistencia del enlace, es decir, la estabilidad de la inmovilización. Para un ejemplo de lipasa inmovilizada por unión covalente, véase S. Emi et al., *European Polymer Journal* 30 (5): 589-595 (1994). Los soportes adecuados para la unión covalente incluyen, por ejemplo, Immobead™ (ChiralVision).

30 La reticulación implica unir la lipasa a sí misma para formar una estructura tridimensional o unir la lipasa a una estructura sólida usando un agente de entrecruzamiento. Por ejemplo, la lipasa puede estar reticulada a cuentas de quitosano. Ver S. H. Chiou et al., *Prep. Biochem. Biotechnol.* 37(3):265-275 (2007). La inmovilización de la lipasa por encapsulación generalmente implica la formación de un recubrimiento poroso o membrana semipermeable alrededor de la lipasa, de modo que la lipasa esté contenida dentro del material poroso, pero los triglicéridos y ésteres puedan pasar libremente a través de ella. La inmovilización de la lipasa por atrapamiento implica restringir el movimiento de la enzima atrapándola en una estructura reticular. Las cuentas de alginato se pueden usar para este tipo de inmovilización. I. Bushan et al., *J. Bioactive and Compatible Polymers* 23 (6): 552 - 562 (2008). Polímeros sintéticos y naturales también pueden ser utilizados. Ver también, G. Fernandez-Lorente et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.* (publicado en línea el 14 de diciembre de 2010) y G. Fernández-Lorente et al., *J. Am. Oil Chem. Soc.* 88:1173-1178 (2011).

45 En ciertas realizaciones, los métodos y dispositivos de la invención utilizarán lipasa que se ha cristalizado y reticulado para aumentar la estabilidad como se describe en la patente de EE. UU. Nº 6.541.606 (Margolin), con o sin otra forma de inmovilización, tal como la encapsulación.

50 En algunas realizaciones, la lipasa se inmoviliza en nanopartículas magnéticas (MNP). Estas MNP pueden estar recubiertas por ligadores o polímeros que contienen grupos funcionales amino o epoxi a los que se hacen reaccionar las lipasas. Un revestimiento adecuado para MNP es, por ejemplo, la polidopamina. Véase, por ejemplo, Y. Ren et al., *BMC Biotechnology* 11:63 (2011). El uso de MNP para la inmovilización de lipasa tiene ventajas tales como la biocompatibilidad, el supermagnetismo, el tamaño pequeño y la baja toxicidad. Las propiedades magnéticas de las nanopartículas facilitan la eliminación de la lipasa de la solución y también proporciona otro medio para unir la MNP-lipasa a un soporte sólido.

55 En algunas realizaciones, la lipasa inmovilizada es una lipasa microbiana. En algunas realizaciones, la lipasa inmovilizada se selecciona de lipasas bacterianas. En algunas realizaciones, la lipasa inmovilizada es una o más lipasas seleccionadas de *Chromobacterium viscosum*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y *Rhizopus oryzae*.

60 En ciertas realizaciones, la lipasa se agrega a la fórmula durante 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30 minutos o más. La hidrólisis de los triglicéridos y ésteres de LC-PUFA se mide mediante RP-HPLC. En ciertas realizaciones, el porcentaje de hidrólisis de triglicéridos y ésteres de LC-PUFA es del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en 30 minutos. En realizaciones, el porcentaje de hidrólisis de triglicéridos y ésteres de LC-PUFA es del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en 20 minutos. En realizaciones, el porcentaje de hidrólisis de triglicéridos y ésteres de LC-PUFA es del 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 100% en 10 minutos. En ciertas realizaciones, la lipasa es la lipasa de *Rhizopus oryzae*.

Dispositivos que comprenden lipasa inmovilizada

De acuerdo con diversas realizaciones, la presente descripción proporciona dispositivos y métodos para preparar productos nutricionales, como se define en las reivindicaciones. Los dispositivos y métodos se pueden usar para exponer la fórmula infantil u otros productos nutricionales a las lipasas antes del consumo. Las lipasas descomponen en consecuencia las grasas y los aceites con la posterior liberación de ácidos grasos libres y monoglicéridos. Los dispositivos y métodos permitirán medios convenientes para preparar la fórmula u otros productos nutricionales. En algunas realizaciones, los dispositivos y métodos permiten a los bebés u otras personas que consumen los productos evitar el consumo de lipasa exógena. En algunas realizaciones, los dispositivos y métodos permiten la producción de fórmulas que contienen monoglicéridos y/o ácidos grasos libres, pero que no contienen ninguna cantidad significativa de lipasa (como se determina por ELISA).

Las Figuras 1, 2A-2C, 3A-3C, 4A-4B, 5A-5B, 9A-9C, 10A-10C, 11A-11C, 12, 13A-13B, 14, 15, 16, 17A-17B, 18, 19, 20 y 21 ilustran dispositivos de acuerdo con diversas realizaciones de la presente descripción. Como se muestra en la FIGURA 1, los dispositivos 100 de la presente descripción pueden incluir un recipiente 110 configurado para contener la fórmula infantil 120 u otros productos nutricionales líquidos. Como se describe en detalle a continuación, el recipiente 110 puede incluir lipasas que están inmovilizadas de manera que la fórmula 120 que se alimenta al niño a través de una sonda nasogástrica 114 u otro mecanismo de alimentación (por ejemplo, un biberón) no contenga lipasas en cualquier cantidad apreciable. Por ejemplo, las lipasas se pueden inmovilizar sobre o en las estructuras 150 que se encuentran a lo largo de la pared o de otro modo dentro del recipiente de manera que las lipasas están en contacto fluido con la fórmula 120 dentro del recipiente. Además, como se discute con referencia a diversas realizaciones a continuación, la fórmula puede añadirse al recipiente 110, de diversas maneras para permitir el tratamiento enzimático de las lipasas dentro del recipiente 110. Por ejemplo, el fluido puede alimentarse a través de una sonda 112 o verterse en el recipiente, y puede pasarse posteriormente a través de una sonda nasogástrica u otro dispositivo para alimentarlo.

A lo largo de esta descripción, se hará referencia a dispositivos y métodos para su uso en el tratamiento o la preparación de una fórmula nutricional, tal como, por ejemplo, una fórmula infantil y una fórmula nutricional médica. Se apreciará que los dispositivos y métodos pueden usarse para tratar o preparar cualquier tipo de fórmula nutricional para la cual puede ser beneficioso proporcionar un tratamiento con lipasa antes del consumo. Dichos productos pueden incluir cualquier fórmula nutricional para ser consumida por alguien con insuficiencia pancreática u otra capacidad reducida para hidrolizar triglicéridos de cadena larga o PUFA esterificados de cadena larga.

Las Figuras 2A-2C y 3A-3C ilustran dispositivos más detallados, de acuerdo con diversas realizaciones. Como se muestra, los dispositivos 200-202, 300-302 pueden incluir un recipiente 210, 310 para contener la fórmula líquida. El recipiente 210, 310 puede incluir una variedad de diferentes tipos y configuraciones. Por ejemplo, el recipiente 210, 310 puede incluir un frasco o vial de vidrio o plástico, una bolsa (por ejemplo, de silicona u otro material flexible como una bolsa de solución salina IV), un recipiente cilíndrico tal como un barril de jeringa u otro recipiente de tamaño y conformado para contener una cantidad deseada de fórmula u otro producto.

Como se indicó, los dispositivos de la presente descripción pueden permitir que la fórmula se exponga a las lipasas para obtener los efectos enzimáticos deseados, mientras que permite que la fórmula se consuma convenientemente sin consumir lipasas. Por consiguiente, en diversas realizaciones, las lipasas se inmovilizan dentro del recipiente 210, 310 de modo que, cuando se elimina la fórmula (por ejemplo, a través de una sonda nasogástrica, una tetina para un biberón o transfiriendo la fórmula a otro recipiente), las lipasas permanecen en el recipiente 210, 310 o se pueden eliminar de la fórmula antes del consumo. En otras realizaciones, las lipasas se inmovilizan dentro del recipiente 210, 310, por ejemplo, en soportes sólidos removibles, de manera que las lipasas pueden retirarse fácilmente del recipiente, mientras se deja la fórmula en el recipiente para su posterior consumo.

Las Figuras 2A-2C muestran una configuración para el recipiente 210, junto con ciertas realizaciones para inmovilizar las lipasas dentro del recipiente 210. Como se observa, el recipiente 210 puede incluir una variedad de diferentes materiales, tamaños y formas. Además, el recipiente 210 puede incluir uno o más puertos de acceso 220, 230 para controlar el flujo de la fórmula 260 dentro y fuera del recipiente.

Las lipasas se pueden inmovilizar dentro del recipiente 210 en una variedad de formas. Por ejemplo, de acuerdo con la presente invención, las lipasas se pueden inmovilizar o contener dentro de las estructuras 250, 252 localizadas dentro del recipiente 210 (Figuras 2A y 20). Adicionalmente, o alternativamente, las lipasas 251 se pueden inmovilizar o contener dentro de la pared del recipiente 210 (figura 2B). Por consiguiente, como la fórmula 260 se coloca dentro del recipiente, la fórmula 260 entra en contacto con las lipasas para producir los efectos enzimáticos deseados.

Como se indicó, las lipasas se pueden inmovilizar dentro del recipiente uniendo las lipasas a las estructuras 250, 252 dentro del recipiente y/o a las paredes 251 del recipiente. Las estructuras dentro del recipiente pueden tener una variedad de configuraciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, las estructuras pueden incluir perlas, bolas o cualquier otra estructura que puedan ser ellas mismas móviles dentro del recipiente de modo que las estructuras fluyan dentro de la fórmula. Por ejemplo, como se muestra en la FIGURA 4A, las estructuras 250 pueden incluir

perlas o bolas que tienen una pared superficial 256 a la que se pueden unir las lipasas 257. Además, se entenderá que las estructuras 250, 252 pueden tener una variedad de diferentes formas o configuraciones (por ejemplo, similar a un cuboide, un ovoide o una barra).

5 Las estructuras 250, 252 y/o la configuración de la pared del recipiente 210 pueden configurarse para proporcionar un área superficial deseada de manera que la fórmula pueda entrar en contacto con una cantidad suficiente de lipasa durante un período de tiempo aceptable. Por ejemplo, las estructuras 250, 252 pueden incluir numerosas cuentas 250 (figura 2A) o estructuras en forma de barra 252 (figura 2C) para proporcionar un área superficial alta para unir una cantidad suficiente de lipasa. Alternativamente, si se dispone de períodos más largos para incubar la fórmula con las lipasas antes del consumo y/o se usan lipasas con alta actividad enzimática, pueden ser adecuadas cantidades más pequeñas de lipasa.

15 En diversas realizaciones, las estructuras 250, 252 y/o el recipiente se construyen de manera que, como la fórmula 260 se retira del recipiente para su consumo o almacenamiento, la lipasa no se mantiene dentro de la fórmula 260. Por ejemplo, las cuentas 250 o las estructuras similares a varillas se pueden dimensionar de manera que no pasen a través de un puerto de acceso 230 relativamente pequeño. Alternativamente, o adicionalmente, las estructuras se pueden unir a la pared del recipiente y/o el recipiente puede incluir una pantalla o filtro que esté dimensionado para evitar el movimiento de las estructuras con la fórmula 260. Además, las estructuras 250, 252 pueden tener otras propiedades que faciliten su separación de la fórmula. Por ejemplo, las estructuras 250 pueden formarse de perlas magnéticas que pueden eliminarse uniéndose a un filtro magnético.

25 También se describen dispositivos en los que, en lugar de inmovilizar las lipasas por su unión a estructuras dentro del recipiente 210 y/o la pared del recipiente, las lipasas 257' están contenidas dentro de las estructuras 250, 252 y/o la pared del recipiente 251. La FIGURA 4B ilustra una de tales formas de realización. Como se muestra, las estructuras 250' pueden incluir cuentas u otras formas que tienen una pared 256'. La pared puede estar formada por materiales semipermeables que permiten la entrada y salida de la fórmula 260 pero no las lipasas 257'. Tal encapsulación se puede usar de manera similar para otras estructuras (por ejemplo, 252) y/o para la pared del recipiente de manera que la superficie de la pared tenga un material semipermeable, dentro del cual pueden estar contenidas las lipasas.

30 El recipiente puede tener de manes similar configuraciones de superficie que proporcionen cantidades aumentadas de lipasa y/o un mayor contacto de lipasas con la fórmula 260. Por ejemplo, la pared del recipiente puede tener crestas u otras modificaciones superficiales para aumentar el área superficial. Además, en lugar de incluir un único espacio abierto, el recipiente puede incluir variaciones en la trayectoria del flujo, por ejemplo, una trayectoria de enrollamiento larga para permitir una exposición prolongada o prolongada a lipasas y/o una colección de canales o tubos a los que se inmovilizan lipasas y cuya fórmula puede fluir. Ver, por ejemplo, la FIGURA 1, elemento 150 y FIGURA 21, elemento 2101.

40 En ciertas realizaciones, el recipiente puede fabricarse y preempaquetarse con lipasas en cualquiera de las realizaciones descritas en este documento. Durante el uso, el recipiente puede abrirse y la fórmula puede colocarse en el recipiente para contactar las lipasas durante un tiempo suficiente para producir los efectos enzimáticos deseados. En otras realizaciones, estructuras tales como perlas 250 o estructuras similares a varillas tienen lipasas inmovilizadas en sus superficies o están contenidas/encapsuladas dentro de las que pueden empaquetarse y distribuirse, y esas estructuras pueden colocarse en un recipiente separado que contiene la fórmula. En algunas realizaciones, puede ser beneficioso agitar o sacudir el recipiente que comprende la lipasa inmovilizada y la fórmula durante un período de tiempo.

50 Como se observa, la fórmula 260 se puede colocar en el recipiente 210 a través de varios puertos de acceso. Por ejemplo, el recipiente puede incluir un puerto de acceso superior 220 y/o un puerto de acceso inferior 230. Los puertos 220, 230 se pueden usar para la entrada y salida de la fórmula respectivamente. Además, se puede usar un solo puerto o se pueden usar múltiples puertos. Los puertos pueden comprender una estructura configurada para acoplarse a otros dispositivos que pueden usarse para alimentar o transferir fluidos. Por ejemplo, los puertos pueden incluir un conector, tal como una conexión Luer-Lock, roscas y/o un conducto o tubo que puede acoplarse a una sonda nasogástrica. Además, los puertos se pueden configurar para enganchar un biberón, una tetina de biberón o cualquier otra estructura para facilitar la transferencia de un fluido a otro recipiente o para ayudar a alimentar. Además, uno o ambos puertos 220, 230 pueden incluir una válvula 140 (figura 1), 240 (figura 2A) u otro mecanismo de control de flujo de fluido.

60 Las Figuras 3A-3C ilustran dispositivos de la presente descripción. Como se muestra, los dispositivos 300-302 incluyen un recipiente 310 para recibir la fórmula 260. Además, el recipiente 310 puede incluir una tapa 322 u otro dispositivo de cierre, tal como una parte superior roscada para un frasco o botella. Similar a las realizaciones mostradas en las Figuras 2A-2C, los dispositivos pueden incluir estructuras 350, 351, 351' y 353 que incluyen lipasas inmovilizadas en sus superficies y/o encapsuladas en ellas.

65 Las realizaciones de las Figuras 3A-3C pueden proporcionar una separación más rápida de la fórmula de las estructuras que contienen lipasas. Por ejemplo, como se muestra en la FIGURA 3A, las estructuras de tipo varilla

350 pueden contener lipasas, y después del tratamiento enzimático de la fórmula, la tapa 322 se puede retirar para eliminar simultáneamente las estructuras 350 y lipasas. Además, la tapa 322 se puede reemplazar con otra tapa, boquilla de botella u otra conexión de fluido. De forma similar, las estructuras que tienen otras configuraciones, como las bolas o cuentas 351, 351' (figura 3B), se pueden dimensionar para una fácil eliminación de la fórmula 260. Por ejemplo, como se muestra, las cuentas 351, 351' tienen un tamaño tal que pueden eliminarse fácilmente manualmente o por filtración. Además, el recipiente 310 puede proporcionar lipasas que están inmovilizadas o contenidas dentro de su superficie interior 553, y después del tratamiento enzimático, la fórmula 260 puede transferirse a otro recipiente, o consumirse reemplazando la tapa 322 con una boquilla de botella u otra conexión a un sistema de alimentación.

Alternativamente, o adicionalmente, las estructuras 350, 351, 351' pueden tener una pared exterior permeable con componentes adicionales que proporcionan lipasas inmovilizadas contenidas en ella. Por ejemplo, la estructura 351' (figura 3B) ilustra una realización en la que la estructura 351' tiene una pared exterior permeable que encierra numerosas perlas 250. La pared exterior puede incluir una malla u otra configuración que permita un fácil movimiento de la fórmula hacia y desde la estructura 351' para proporcionar contacto con las perlas 250. Además, las perlas pueden proporcionar lipasas, que pueden inmovilizarse en sus superficies o encapsularse en ellas, como se describe en diversas realizaciones anteriores.

Como se indicó anteriormente, las estructuras que contienen lipasas pueden fabricarse y distribuirse como componentes preenvasados junto con el recipiente 310. Alternativamente, o adicionalmente, las estructuras se pueden empaquetar y distribuir por separado desde el recipiente. Por ejemplo, se puede fabricar y distribuir un tapón 322 que contiene estructuras de tipo varilla 350 o perlas 351, 351', o que de otro modo tienen lipasa contenida o inmovilizada en él. La tapa se puede configurar para conectarse con biberones estándar, botellas de agua u otro recipiente o dispositivo que pueda contener fórmulas.

En otras realizaciones, las lipasas pueden proporcionarse de modo que las lipasas entren en contacto con la fórmula cuando la fórmula se coloca en un recipiente y/o durante la alimentación o la eliminación de un recipiente. Por ejemplo, la FIGURA 5A ilustra un dispositivo 500, de acuerdo con realizaciones ejemplares. El dispositivo 500 puede incluir una tetina de botella estándar, y las lipasas pueden inmovilizarse en una superficie interna 510 del borde de la tetina o boquilla. Como tal, la fórmula entrará en contacto con las lipasas durante el uso normal. De manera similar, las lipasas pueden estar contenidas en o sobre otras estructuras que pueden usarse para alimentar, tal como un tubo de fluido de un dispositivo de alimentación nasogástrica.

Alternativamente, las lipasas se pueden proporcionar en un elemento separado configurado para permitir el contacto de la fórmula con las lipasas durante el flujo de fluido normal. Por ejemplo, en una realización, las lipasas pueden estar contenidas dentro de un alojamiento 520 configurado para el acoplamiento con un cierre de botella tal como una boquilla (Figura 5A) o una tapa/cierre de botella (Figura 5B). El alojamiento 520 puede incluir paredes permeables que permiten que la fórmula fluya a través de su volumen y entren en contacto con las lipasas proporcionadas en el mismo.

Las lipasas contenidas dentro del alojamiento 520 pueden proporcionarse en diversas formas. Por ejemplo, en algunas realizaciones, las lipasas se inmovilizan sobre las perlas 550 dentro del alojamiento 520 por unión o encapsulación, como se describió previamente. Además, la carcasa 520 puede incluir una malla abierta u otra configuración que permita que la fórmula fluya a través de ella. Por ejemplo, con la configuración de botella que se muestra en la FIGURA 5A, una malla abierta o trayectoria de flujo a través de la carcasa 520 permitirá que la fórmula entre en contacto con las lipasas cuando la fórmula salga de una botella durante la alimentación. Alternativamente, como se muestra en la FIGURA 5B, la fórmula puede verse dentro o fuera de la parte superior 530 de la carcasa para permitir el contacto de la fórmula con las lipasas durante el llenado o el vaciado del recipiente 310. La parte superior 530 y/o cualquier otra parte de la carcasa 520 se puede formar de una variedad de materiales. Por ejemplo, la carcasa 520 puede formarse de una membrana que permita un flujo de fluido controlado. Además, la parte superior 530 puede estar formada por una membrana semipermeable que permita el flujo de líquido (fórmula) a través de la misma, pero que no permita el paso de las lipasas. Por consiguiente, la membrana que forma la parte superior 530 puede servir para inmovilizar las lipasas dentro del recipiente 310 sin unir o inmovilizar las lipasas dentro del recipiente 310.

En diversas realizaciones, los dispositivos descritos anteriormente pueden incluir modificaciones para mejorar o controlar la actividad de la lipasa. Por ejemplo, los recipientes 110, 210, 310 pueden incluir sistemas de agitación para permitir el movimiento continuo de la fórmula durante un periodo de incubación, permitiendo así que las lipasas entren en contacto con los ácidos grasos que se encuentran en todo el volumen de fluido. Además, los dispositivos pueden incluir sistemas para controlar la temperatura para mejorar o controlar la actividad de la lipasa.

Ciertas realizaciones de la invención se refieren a un recipiente que contiene una fórmula nutricional y una lipasa. En algunas realizaciones, la lipasa está en contacto con la fórmula nutricional en el recipiente. En otras realizaciones, la lipasa y la fórmula nutricional no están en contacto en el recipiente. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional y la lipasa están contenidas en compartimentos separados dentro del recipiente. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional está en forma seca. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional está en forma líquida. En algunas

realizaciones, la lipasa se pone en contacto con la fórmula nutricional liberando la lipasa en el compartimiento que contiene la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la lipasa se pone en contacto con la fórmula nutricional transfiriendo la lipasa y la fórmula nutricional a otro recipiente (por ejemplo, vaciando el compartimiento de lipasa y el compartimiento de fórmula nutricional en el otro recipiente). En algunas realizaciones, se añade líquido al otro recipiente antes o después de transferir la lipasa y la fórmula nutricional al otro recipiente.

Los dispositivos de acuerdo con la presente descripción pueden tener varias formas y/o configuraciones diferentes. Por ejemplo, las Figuras 9A-9C, 10A-10C, 11A-11C, 12, 13A-13B, 14, 15, 16, 17A-17B, 18, 19, 20, 21 ilustran diversas formas y configuraciones adicionales. En cada una de las configuraciones descritas con respecto a esas figuras, las lipasas pueden inmovilizarse usando cualquiera de los métodos descritos anteriormente (por ejemplo, inmovilizando lipasas en estructuras tales como perlas dentro de un dispositivo, y/o inmovilizando lipasas dentro o sobre una pared u otra superficie de un dispositivo). Además, la configuración específica se puede seleccionar para proporcionar una variedad de características diferentes, tales como el área de la superficie, el volumen, la cantidad de lipasas y/o el tiempo de exposición de los materiales a las enzimas.

Los dispositivos ilustrados en las FIGURAS 9A-9C, 10A-10C, 11A-11C, 12, 13A-13B, 14, 15, 16, 17A-17B, 18, 19, 20, 21 se pueden configurar para permitir el contacto de las lipasas de varias maneras. Por ejemplo, en diversas realizaciones, una parte o la totalidad del dispositivo pueden insertarse dentro de un recipiente que incluya la fórmula para permitir el contacto entre la fórmula y las lipasas. En otras realizaciones, el dispositivo está configurado para el tratamiento en línea de la fórmula.

Las Figuras 9A-9C ilustran varias configuraciones para dispositivos que pueden colocarse dentro de un recipiente para tratar la fórmula. Como se muestra, el dispositivo 900, 920 (Figuras 9A y 9C) puede tener una variedad de formas diferentes formadas por una pared exterior 901, 901" que encierra a las lipasas. Como se indicó anteriormente, las lipasas 902 se pueden inmovilizar en una variedad de formas diferentes, que incluyen la fijación a perlas. Además, los dispositivos 910 (figura 9B) pueden incluir más de una bolsa o abertura 903 formadas en una o más paredes 901'. La configuración específica, el número de bolsas o aberturas, así como la cantidad de lipasa y/o volumen del dispositivo pueden variar según el uso previsto y/o para controlar la tasa de actividad de la lipasa.

En ciertas realizaciones, el dispositivo puede configurarse para permitir un cambio en su tamaño o forma. Por ejemplo, las Figuras 10A-10C ilustran un dispositivo 1000, que puede comprimirse, por ejemplo, para almacenarlo en un recipiente 1001 antes de su uso. Cuando se desee, el recipiente 1001 se puede abrir, y la pared 1003 del dispositivo se puede expandir para producir una relación deseada de volumen de lipasa 1002 al volumen del recipiente. En algunas realizaciones, el dispositivo 1000 incluye una bobina o muelle 1004 para proporcionar soporte estructural y/o para ayudar al dispositivo a mantener una forma y/o volumen deseados.

En algunas realizaciones, el dispositivo puede incluir una extensión similar a una barra para facilitar la colocación y eliminación de la lipasa dentro de un volumen de fórmula. Por ejemplo, las Figuras 11A-11C, 12, 13A-13B, 14 y 15 ilustran varias configuraciones a modo de ejemplo para dispositivos con una extensión similar a una barra. Como se muestra, el dispositivo 1100, 1100', 1100", 1200, 1300, 1400, 1500 puede incluir una o múltiples bolsas o aberturas 1101, 1201, 1301, 1401, 1501 colocadas en diversas configuraciones cerca de una región distal de la extensión tipo barra 1102, 1202, 1302, 1402, 1502. En algunas realizaciones, como se muestra, por ejemplo, en las Figuras 13A-13B, la orientación de las bolsas o aberturas 1301 puede ser ajustable, por ejemplo, para permitir la inserción dentro de una abertura estrecha durante el uso y/o para minimizar el espacio de almacenamiento.

En diversas realizaciones, la lipasa puede unirse a una porción de una tapa o cierre para una botella o jarra, de manera que cuando la tapa o cierre se coloca en la botella o jarra, la lipasa puede entrar en contacto con fluidos contenidos dentro de la botella o jarra. Por ejemplo, cualquiera de los dispositivos que se muestran en este documento se puede unir a una superficie de una tapa o cierre para permitir el contacto con el recipiente de fórmula en una botella o recipiente. Varias configuraciones de dispositivos 1600, 1700, 1800, 1900, 2000 que incluyen lipasa unida a un tapón o cierre 1602, 1702, 1802, 1902, 2002 se ilustran en las Figuras 16, 17A-17B, 18, 19 y 20. Como se muestra, las lipasas pueden estar contenidas dentro de las bolsas o aberturas 1601, 1705, 1805, 1901, 2001 que tienen una variedad de formas o configuraciones. Además, en algunas realizaciones, la tapa o cierre 1902, 2002 puede incluir una abertura 1910, 2010 para insertar o extraer fluido de un recipiente, y tales aberturas 1910, 2010 pueden incluir un conector para un tubo de fluido, por ejemplo, un conector tipo leer.

En algunas realizaciones, puede ser deseable tratar la fórmula cuando la fórmula fluya a través de un tubo (por ejemplo, durante la alimentación, como se muestra en la figura 1, o durante la transferencia de un recipiente a otro). La FIGURA 21 ilustra otro dispositivo 2100 para el tratamiento en línea de las lipasas. El dispositivo 2100 puede incluir una bolsa o abertura 2101 que contiene lipasas, que pueden inmovilizarse, como se discutió anteriormente. Además, la bolsa o abertura 2101 puede tener una trayectoria tortuosa o curva para permitir tiempos de contacto más largos entre las lipasas y la fórmula. Además, el dispositivo 2100 puede incluir aberturas 2110 en ambos extremos para permitir la conexión a tubos o conductos para la entrada y salida de la fórmula.

En diversas realizaciones, los dispositivos pueden incluir un material que actúa como una pantalla o malla para evitar que las lipasas entren en la fórmula para ser ingeridas por un paciente. Por ejemplo, los dispositivos

mostrados en las Figuras 19 y 21 pueden incluir una o más mallas o pantallas 1906, 2106 para evitar que las lipasas inmovilizadas en perlas u otras estructuras se muevan a la fórmula para ser ingeridas.

En algunas realizaciones, las lipasas se pueden inmovilizar dentro o sobre un componente de un recipiente de manera que las lipasas no estén en contacto con la fórmula hasta que se tomen pasos adicionales. Por ejemplo, en una realización, las lipasas pueden estar contenidas dentro o sobre una parte de un capuchón o cierre, y el capuchón o cierre puede incluir un mecanismo para liberar las lipasas inmovilizadas en el recipiente. Por ejemplo, las lipasas pueden estar contenidas en o dentro de cuentas u otras estructuras (véase, por ejemplo, el elemento 1805 en la figura 18), que están además unidas o contenidas dentro de la tapa; y, cuando se desee, las lipasas pueden caerse en el recipiente (por ejemplo, retorciendo la tapa o retirando una barrera/mecanismo de fijación). De manera similar, las lipasas se pueden unir o contener con una pared del recipiente u otra estructura e inmovilizarse sobre perlas u otros materiales, y se puede permitir que las lipasas entren en contacto con la fórmula solo cuando se desee (por ejemplo, liberando lipasas en el recipiente o eliminando una barrera sobre las lipasas).

La FIGURA 6A es una fotografía de un vial que contiene lipasa de *Rhizopus oryzae* inmovilizada en perlas de polímero. La lipasa inmovilizada está en forma granular seca que se puede añadir al recipiente o cámara de un dispositivo de acuerdo con la invención, tal como el dispositivo representado en las Figuras 6B-D. La lipasa inmovilizada puede quedar atrapada en la cámara del dispositivo, mientras se permite el flujo de fórmula a través y fuera de la cámara simplemente proporcionando un filtro en el extremo de salida de la cámara que contiene poros suficientemente grandes para permitir que la fórmula pase, pero retenga la lipasa inmovilizada dentro de la cámara. Alternativamente, la lipasa se puede inmovilizar, por ejemplo, recubriendo los canales internos o la cámara del dispositivo de modo que la fórmula se exponga a la lipasa cuando pasa a través de la cámara. La lipasa inmovilizada en un dispositivo de este tipo se puede usar para la alimentación continua durante períodos prolongados debido a la mayor estabilidad y reutilización de la lipasa.

Fórmulas nutricionales

Se describen en este documento fórmulas nutricionales. La invención proporciona dispositivos para proporcionar una fórmula nutricional y métodos para preparar una fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional es una fórmula infantil. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional es una fórmula nutricional médica. En la presente invención, una fórmula nutricional se expone a la lipasa antes de la ingestión. En algunas realizaciones, esta exposición permite la prehidrólisis de al menos algunos lípidos en la fórmula nutricional. Por lo tanto, en algunas realizaciones, una fórmula nutricional es una fórmula "como se alimenta", es decir, la fórmula líquida tal como se compone justo antes de la ingestión por el sujeto, que difiere en composición de la fórmula vendida por el fabricante. La expresión "fórmula nutricional" no abarca las composiciones existentes dentro del cuerpo de un sujeto después de la ingestión.

En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende ácidos grasos de cadena larga. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende uno o más LC-PUFA, tales como DHA, ARA y EPA. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende DHA. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende ARA. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende DHA y ARA. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende DHA, ARA y EPA.

En algunas realizaciones, más del 5% de los ácidos grasos totales de cadena larga en la fórmula nutricional están en forma de monoglicéridos y/o ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, más del 5% del PUFA-CL total en la fórmula nutricional está en forma de monoglicéridos y/o ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, más del 5% del DHA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, más del 5% del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, más del 5% del EPA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

En algunas realizaciones, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95% o el 100% del total de los ácidos grasos de cadena larga en la fórmula nutricional están en forma de monoglicéridos y/o ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95% o 100% del total de PUFA-CL en la fórmula nutricional está en forma de monoglicéridos y/o ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95% o el 100% del DHA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95% o 100% del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95% o 100% de la EPA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, más del 10%, más del 15%, más del 20%, más del 30%, más del 40%, más del 50%, más del 60%, más del 70%, más del 80%, más del 85%, más del 90%, más del 95% o el 100% tanto del DHA como del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En una realización particular, más del 90% tanto del

DHA como del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En una realización particular, más del 95% tanto del DHA como del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

En algunas realizaciones, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o el 100% del total de los ácidos grasos de cadena larga en la fórmula nutricional están en forma de monoglicéridos y/o ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o el 100% del LC-PUFA total en la fórmula nutricional está en forma de monoglicéridos y/o ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o el 100% del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o el 100% del EPA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o el 100% tanto del DHA como del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En una realización particular, al menos el 90% tanto del DHA como del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En una realización particular, al menos el 95% tanto del DHA como del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

En algunas realizaciones de la invención, el tamaño de porción aproximado de una fórmula nutricional como se describe en este documento es aproximadamente 100-110 ml para fórmula infantil prematura, 90-150 ml (por ejemplo, 148 ml) para fórmula infantil a término, 230-500 ml (por ejemplo, 235-250 ml) para alimentación enteral, y 230-250 ml para fórmulas infantiles y fórmulas para adultos. En algunas realizaciones, cada porción contiene aproximadamente 10-35 mg de ácidos grasos libres de ARA y monoglicéridos (como se obtendría de la hidrólisis completa de TG-ARA en fórmulas para lactantes prematuros y a término disponibles actualmente) o aproximadamente 40-50 mg de ácidos grasos libres de ARA y monoglicéridos (como se obtendría de la hidrólisis completa de TG-ARA en una fórmula adulta actualmente disponible). En algunas realizaciones, cada porción contiene aproximadamente 7-20 mg de ácidos grasos libres de DHA y monoglicéridos (como se obtendría de la hidrólisis completa de TG-DHA en fórmulas para bebés prematuros y a término disponibles actualmente) o aproximadamente 10-40 mg de ácidos grasos libres de DHA y monoglicéridos (como se obtendría de la hidrólisis completa de TG-DHA en fórmulas infantiles y adultas actualmente disponibles). En algunas realizaciones, una porción de adultos de 230-250 ml contiene aproximadamente 1.100 mg de ácidos grasos libres de EPA y monoglicéridos y aproximadamente 240 mg de ácidos grasos libres de DHA y monoglicéridos (como se obtendría de la hidrólisis completa de TG-EPA y TG-DHA en alguna fórmula para adultos disponible actualmente, tal como ProSure®. En algunas realizaciones de la invención, sin embargo, la capacidad de prehidrolizar TG-LCPUFA antes de la ingestión permite que la fórmula se prepare con niveles más altos de LC-PUFA que en las fórmulas disponibles actualmente. Por consiguiente, en algunas realizaciones, la cantidad de ácidos grasos libres y/o monoglicéridos de ARA y/o DHA excede las cantidades que podrían obtenerse a partir de la hidrólisis completa de TG-LCPUFA en fórmulas actualmente disponibles. En algunas realizaciones, una porción de una fórmula nutricional como se describe en este documento contiene 50-100 mg de ácidos grasos libres de LC-PUFA y/o monoglicéridos. En algunas realizaciones, una porción de una fórmula nutricional como se describe en este documento contiene 100-200 mg de ácidos grasos libres de LC-PUFA y/o monoglicéridos. En algunas realizaciones, una porción de una fórmula nutricional como se describe en este documento contiene 200-300 mg de ácidos grasos libres de LC-PUFA y/o monoglicéridos. En algunas realizaciones, una porción de una fórmula nutricional como se describe en este documento contiene 250-500 mg de ácidos grasos libres de LC-PUFA y/o monoglicéridos. En algunas realizaciones, una porción de una fórmula nutricional como se describe en este documento contiene 500-1000 mg de ácidos grasos libres de LC-PUFA y/o monoglicéridos. En algunas realizaciones, una porción de una fórmula nutricional como se describe en este documento contiene 1-2 gramos de ácidos grasos libres de LC-PUFA y/o monoglicéridos. En algunas realizaciones, una porción de una fórmula nutricional como se describe en este documento contiene 2-3 gramos de ácidos grasos libres de LC-PUFA y/o monoglicéridos.

En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende grasas, carbohidratos y proteínas (o aminoácidos). En algunas realizaciones, una fórmula infantil como se describe en este documento comprende uno, más de uno o todos de los siguientes: leche sin grasa, lactosa, aceite vegetal (por ejemplo, uno o más de oleína de palma, coco, soja y aceites de girasol con alto contenido de ácido oleico), concentrado de proteína de suero, azúcares, LC-PUFA, vitaminas y minerales. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende grasas compuestas de ácidos grasos de cadena media y grasas compuestas de ácidos grasos de cadena larga. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende grasas compuestas por ácidos grasos n-6 y grasas compuestas por ácidos grasos n-3. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende LA y ALA.

En algunas realizaciones, una fórmula nutricional como se describe en este documento no comprende lipasa añadida. En algunas realizaciones, se usa un dispositivo y/o un método de la presente invención para exponer una

fórmula nutricional a una lipasa, pero la fórmula nutricional se separa de la lipasa antes de la alimentación, de manera que la fórmula nutricional como alimentada no comprende agregado de lipasa. Una fórmula nutricional que no comprende lipasa añadida se refiere a una fórmula en la que la lipasa no es detectable o está presente solo a niveles muy bajos, debido, por ejemplo, a la lixiviación de la lipasa inmovilizada de un soporte sólido en la fórmula.

5 En algunas realizaciones, una fórmula nutricional comprende no más de 0,02% (p/p) de lipasa, no más de 0,01% (p/p) de lipasa, no más de 0,005% (p/p) de lipasa, no más de 0,002% (p/p) de lipasa, no más de 0,001% (p/p) de lipasa, no más de 0,0005% (p/p) de lipasa, no más de 0,0002% (p/p) de lipasa, o no más de 0,0001% (p/p) de lipasa. En algunas realizaciones, una fórmula nutricional comprende menos de 0,02% (p/p) de lipasa, menos de 0,01% (p/p) de lipasa, menos de 0,005% (p/p) de lipasa, menos de 0,002% (p/p) de lipasa, menos de 0,001% (p/p) de lipasa, menos de 0,0005% (p/p) de lipasa, menos de 0,0002% (p/p) de lipasa, o menos de 0,0001% (p/p) de lipasa.

15 En algunas realizaciones, la fórmula nutricional comprende una lipasa. En algunas realizaciones, la lipasa se selecciona de lipasa de *Chromobacterium viscosum*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa de *Burkholderia cepacia*, y lipasa de *Rhizopus oryzae*. En algunas realizaciones, la lipasa se selecciona de lipasa de *Chromobacterium viscosum*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens* y lipasa de *Rhizopus oryzae*. En algunas realizaciones, la lipasa es lipasa de *Chromobacterium viscosum*. En algunas realizaciones, la lipasa es lipasa de *Pseudomonas fluorescens*. En algunas realizaciones, la lipasa es lipasa de *Rhizopus oryzae*.

20 En algunas realizaciones, una porción de la fórmula nutricional contiene menos de 5.000 unidades de lipasa (con unidades evaluadas en un ensayo de oliva estándar, tal como se describe en *Pharmaceutical enzymes: Properties and Assay Methods*, R. Ruysen y A. Lauwers (Eds) Scientific Publishing Company, Ghent, Bélgica (1978)). En otras realizaciones, una porción de la fórmula nutricional contiene menos de 3.000 unidades de lipasa. En algunas realizaciones, una porción de la fórmula nutricional contiene menos de 1.000 unidades. En ciertas realizaciones, la fórmula que contiene menos de 5.000, menos de 3.000 o menos de 1.000 unidades de lipasa por porción es una fórmula infantil o una fórmula nutricional médica.

30 En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,01 mg a 1 gramo de lipasa por gramo de grasa total (ya sea en forma de ácido graso libre, monoglicérido, éster o triglicérido) en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,1 a 500 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,1 a 250 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,1 a 200 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,1 a 150 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,1 a 100 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,1 a 50 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 1 a 50 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 25 a 75 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 1 a 100 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene no más de 50 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional.

45 En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 10 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total (ya sea en forma de ácido graso libre, monoglicérido, éster o triglicérido) en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 5 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 3 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 1 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,5 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,05 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,01 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,02 a 0,08 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,04 a 0,06 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene no más de 0,1 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional.

60 En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 10 mg de lipasa por miligramo de DHA total (ya sea en forma de ácido graso libre, monoglicérido, éster o triglicérido) en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 5 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 3 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 1 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,5 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,05 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la

fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,01 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,02 a 0,08 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,04 a 0,06 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional.

5 En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 10 mg de lipasa por miligramo de ARA total (ya sea en forma de ácido graso libre, monoglicérido, éster o triglicérido) en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 5 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 3 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 1 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,5 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,05 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,01 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,02 a 0,08 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,04 a 0,06 mg de lipasa por miligramo de ARA total en la fórmula nutricional.

20 En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 10 mg de lipasa por miligramo de EPA total (ya sea en forma de ácido graso libre, monoglicérido, éster o triglicérido) en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 5 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 3 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 1 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,5 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,001 a 0,05 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,01 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,02 a 0,08 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional contiene de 0,04 a 0,06 mg de lipasa por miligramo de EPA total en la fórmula nutricional.

35 En algunas realizaciones, se prepara una fórmula nutricional mediante un método descrito en este documento. En algunas realizaciones, se prepara una fórmula nutricional usando un dispositivo descrito en este documento.

Métodos de preparación de una fórmula nutricional

40 De acuerdo con diversas realizaciones, la presente descripción también proporciona métodos para preparar fórmulas nutricionales. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional es una fórmula infantil. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional es una fórmula nutricional médica. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional es una bebida nutricional para adultos (tal como una bebida nutricional completa, por ejemplo, ENSURE, PEDIASURE).

45 En algunas realizaciones, un método para preparar una fórmula nutricional comprende exponer una composición nutricional líquida a una lipasa. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida comprende triglicéridos de LC-PUFA o ésteres de LC-PUFA. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida comprende triglicéridos o ésteres de uno o más LC-PUFA seleccionados del grupo que consiste en DHA, ARA y EPA.

50 En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a una lipasa seleccionada entre lipasa de *Chromobacterium viscosum*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, lipasa de *Burkholderia cepacia* y lipasa de *Rhizopus oryzae*. En algunas realizaciones, la lipasa se selecciona de lipasa de *Chromobacterium viscosum*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens* y lipasa de *Rhizopus oryzae*. En algunas realizaciones, la lipasa es lipasa de *Chromobacterium viscosum*. En algunas realizaciones, la lipasa es lipasa de *Pseudomonas fluorescens*. En algunas realizaciones, la lipasa es lipasa de *Rhizopus oryzae*.

55 Los componentes involucrados en estos métodos pueden mezclarse en varios órdenes. En algunas realizaciones, la lipasa se agrega a una composición nutricional líquida, exponiendo de ese modo los lípidos en la composición nutricional líquida a la lipasa. En algunas realizaciones, se prepara una composición nutricional líquida añadiendo un líquido potable a una forma sólida o en polvo de la composición nutricional. En algunas realizaciones, la lipasa está presente en la forma sólida o en polvo de la composición nutritiva antes de la adición de líquido potable. En otras realizaciones, se agrega lipasa después de que se prepara la composición nutricional líquida. En algunas realizaciones, la lipasa y la forma sólida o en polvo de la composición nutritiva se añaden a un líquido potable al mismo tiempo.

65 En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante al menos un minuto, al menos 2 minutos, al menos 3 minutos, al menos 5 minutos, al menos 8 minutos, al menos 10 minutos, al menos 15

minutos, al menos 30 minutos, al menos 45 minutos o al menos 60 minutos antes de la ingestión. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida está expuesta a la lipasa durante no más de 30 segundos, no más de 1 minuto, no más de 2 minutos, no más de 3 minutos, no más de 5 minutos, no más de 8 minutos, no más de 10 minutos, no más de 15 minutos, no más de 30 minutos, no más de 45 minutos, no más de 60 minutos, no más de 2 horas, no más de 4 horas, no más de 6 horas, no más de 12 horas, o no más de 24 horas.

En algunas realizaciones, el método da como resultado una fórmula nutricional en la que al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o 100% del LC-PUFA total en la fórmula nutricional está en forma de monoglicéridos y/o ácidos grasos libres. En algunas realizaciones, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o el 100% del DHA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o el 100% del ARA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, al menos 10%, al menos 15%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95% o el 100% del EPA está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

A los efectos de esta aplicación, la exposición de una composición o fórmula nutricional a una lipasa se refiere al período de tiempo en el que una composición nutricional líquida o una fórmula líquida está en contacto con una lipasa, que puede estar en solución o inmovilizada. Para los fines de esta aplicación, la exposición a una lipasa termina cuando la fórmula es ingerida por un sujeto o cuando la lipasa se elimina al separar la fórmula líquida de un soporte sólido al que está inmovilizada la lipasa. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 20% del DHA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a la lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 20% del ARA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos 20% del LC-PUFA total en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 40% del DHA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos 40% del ARA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos 40% del PUFA-CL total en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 50% del DHA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos 50% del ARA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 50% del LC-PUFA total en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos 60% del DHA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a la lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 60% del ARA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos 60% del LC-PUFA total en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a la lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 70% del DHA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a la lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 70% del ARA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 10 minutos, y al menos el 70% del LC-PUFA total en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 20 minutos, y al menos el 20% del DHA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 20 minutos, y al menos el 20% del ARA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso

y al menos el 70% del LC-PUFA total en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

5 En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 30 minutos, y al menos el 80% del DHA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 30 minutos, y al menos el 80% del ARA en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a lipasa durante no más de 30 minutos, y al menos el 80% del LC-PUFA total en la fórmula nutricional resultante está en forma de un monoglicérido y/o un ácido graso libre.

15 En los métodos de la invención, la lipasa se elimina de la composición nutricional líquida antes de alimentar al sujeto. La lipasa se elimina exponiendo la composición nutricional líquida que comprende la lipasa a un soporte sólido inmovilizado en una molécula que se une a la lipasa, uniendo así la lipasa al soporte sólido, y separando la composición nutricional líquida del soporte sólido. Dado que la lipasa se inmoviliza en el soporte sólido, la separación de la composición nutricional líquida del soporte sólido tiene el efecto de eliminar la lipasa de la composición nutricional líquida. En algunas realizaciones, la lipasa se inmoviliza en un soporte sólido antes de que se exponga a la composición nutricional líquida, y la lipasa se elimina separando la composición nutricional líquida del soporte sólido. En algunas realizaciones, la lipasa se inmoviliza en al menos una parte de una cara interior de una cámara o en un soporte sólido contenido dentro de la cámara, y la composición nutricional líquida se expone temporalmente a la lipasa al pasar a través de la cámara. En algunas realizaciones, la cámara es una columna. En algunas realizaciones, la composición nutricional líquida se expone a un recipiente que contiene lipasa inmovilizada en un soporte sólido, y al menos una parte de la superficie interna del recipiente consiste en un material que es permeable a los triglicéridos y ésteres, pero que no es permeable al soporte sólido.

25 En algunas realizaciones, el método produce una fórmula nutricional que no comprende lipasa añadida. En algunas realizaciones, se expone una fórmula nutricional a una lipasa, pero la fórmula nutricional se separa de la lipasa antes de la alimentación, de manera que la fórmula nutricional de alimentación no comprende lipasa añadida. Una fórmula nutricional que no comprende (o contiene) lipasa añadida se refiere a una fórmula en la que la lipasa no es detectable o está presente solo en niveles muy bajos, debido, por ejemplo, a la lixiviación de la lipasa inmovilizada de un soporte sólido a la fórmula. En algunas realizaciones, una fórmula nutricional comprende no más de 0,02% (p/p) de lipasa, no más de 0,01% (p/p) de lipasa, no más de 0,005% (p/p) de lipasa, no más de 0,002% (p/p) de lipasa, no más de 0,001% (p/p) de lipasa, no más de 0,0005% (p/p) de lipasa, no más de 0,0002% (p/p) de lipasa, o no más de 0,0001% (p/p) de lipasa. En algunas realizaciones, una fórmula nutricional comprende menos de 0,02% (p/p) de lipasa, menos de 0,01% (p/p) de lipasa, menos de 0,005% (p/p) de lipasa, menos de 0,002% (p/p) de lipasa, menos de 0,001% (p/p) de lipasa, menos de 0,0005% (p/p) de lipasa, menos de 0,0002% (p/p) de lipasa, o menos de 0,0001% (p/p) de lipasa.

40 En algunas realizaciones, el método comprende exponer la fórmula nutricional a menos de 5.000 unidades de lipasa por porción (con unidades evaluadas en un ensayo de oliva estándar, tal como se describe en *Pharmaceutical Enzymes: Properties and Assay Methods*, R. Ruysen y A. Lauwers (Eds) Scientific Publishing Company, Ghent, Bélgica (1978)). En otras realizaciones, la fórmula nutricional se expone a menos de 3.000 unidades de lipasa por porción. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a menos de 1.000 unidades de lipasa por porción. En ciertas realizaciones, la fórmula expuesta a menos de 5.000, menos de 3.000 o menos de 1.000 unidades de lipasa por porción es una fórmula infantil o una fórmula nutricional médica.

50 En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 0,01 mg a 1 gramo de lipasa por gramo de grasa total (ya sea en forma de ácido graso libre, monoglicérido, éster o triglicérido) en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 0,1 a 500 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 0,1 a 250 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 0,1 a 200 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 0,1 a 150 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 0,1 a 100 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 0,1 a 50 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 1 a 50 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 25 a 75 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a de 1 a 100 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, un método de la invención expone la fórmula nutricional a no más de 50 mg de lipasa por gramo de grasa total en la fórmula nutricional.

65 En algunas realizaciones, el método expone la fórmula nutricional a de 0,001 a 10 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total (ya sea en forma de ácido graso libre, monoglicérido, éster o triglicérido) en la fórmula nutricional. En

algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 5 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 3 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 1 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 0,5 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 0,05 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,01 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,02 a 0,08 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,04 a 0,06 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a no más de 0,1 mg de lipasa por miligramo de LC-PUFA total en la fórmula nutricional.

En algunas realizaciones, el método expone la fórmula nutricional a 0,001 a 10 mg de lipasa por miligramo de DHA total (ya sea en forma de ácido graso libre, monoglicérido, éster o triglicérido) en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 5 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 3 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 1 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 0,5 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,001 a 0,05 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,01 a 0,1 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,02 a 0,08 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional. En algunas realizaciones, la fórmula nutricional se expone a de 0,04 a 0,06 mg de lipasa por miligramo de DHA total en la fórmula nutricional.

En la presente invención, un método para preparar una fórmula nutricional comprende exponer una composición nutricional líquida a un dispositivo como se describe en este documento.

EJEMPLO 1: Actividades específicas de lipasas para DHA y ARA

Para evaluar la actividad enzimática de diversas lipasas sobre triglicéridos de DHA y/o ARA, se realizaron experimentos en un vial de vidrio de dos ml (con barra de agitación magnética) que contenía tampón Tris 0,1 M, pH 7,7 y el sustrato DHA o triglicéridos de ARA. La reacción se inició añadiendo soluciones de lipasa. Las lipasas se obtuvieron a partir de fuentes comerciales de la siguiente manera: *Rhizopus oryzae* (Amano DF-15, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japón), *Chromobacterium viscosum* (EMD CalBiochem, EMD Biosciences, Billerica, MA) y *Pseudomonas fluorescens* (Amano AK, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japón). También están disponibles otras lipasas de fuentes comerciales, tales como *Candida rugosa* (Amano AY 30 o Amano 30, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japón), *Aspergillus niger* (Amano DS, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japón), *Penicillium camembertii* (Amano 50, Amano Enzymes Inc., Nagoya, Japón), *Rhizomucor miehei* (L4277, Sigma-Aldrich), *Aspergillus oryzae* (62285, Sigma-Aldrich) y *Burkholderia cepacia* (534641, Sigma-Aldrich). Se prepararon soluciones de lipasa a partir de estas lipasas disponibles comercialmente sin purificación adicional, excepto que la lipasa de *B. cepacia* se purificó hasta la homogeneidad.

Los viales se transfirieron a un baño maría a 37°C colocado en un agitador magnético. Se tomaron 50 µl de muestras a diferentes intervalos de tiempo 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 minutos y se añadieron a un vial de HPLC que contenía 950 µl de tampón de operación (tampón de fosfato amónico al 30% 10 mM, pH 3,0 y 70% de acetonitrilo). Las muestras se analizaron luego para determinar el ácido libre de DHA o el ácido libre de ARA mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) usando una serie Agilent HPLC1100 y una columna RP C8 y controlando a 215 y 220 nm. Los picos de ácido libre se identificaron de acuerdo con los tiempos de retención usando estándares comercialmente disponibles: triglicérido DHA (Nu-check Prep, Inc. Lote No. T-310-D7-V), triglicérido ARA (Nu-check Prep, Inc. Lote No. T-295-JY14-V), forma de ácido libre de DHA (Nu-check Prep, Inc. Lote No. U-84A-AU20-U), y forma de ácido libre de ARA (Nu-check Prep, Inc. Lote No. U-71A-N11-U). Las actividades específicas de un panel de lipasas en este ensayo para DHA y ARA se resumen en la Tabla 1. En las manos de los inventores, *Chromobacterium viscosum* (CV), *Burkholderia cepacia* (BC), *Pseudomonas fluorescens* (PF) y *Rhizopus oryzae* (RO) tenían una actividad específica sustancialmente mayor hacia DHA y/o ARA en comparación con las otras lipasas analizadas, incluida *Candida rugosa* (CR).

Tabla 1. Actividades específicas de lipasas para DHA y ARA

Enzima	DHA producido, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	ARA producido, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$
CV	27,73	23,207
PF	4,66	2,599
RO	9,83	6,297
CR	0,01	0,205
AN	0,00	0,000
PC	0,00	0,000
BC	55,11	13,920
AO	0,33	0,263
RM	0,14	0,03

5 EJEMPLO 2: Actividad enzimática de lipasas de *Chromobacterium viscosum* y *Rhizopus oryzae* para DHA, ARA y EPA en fórmula infantil

10 Para evaluar la actividad enzimática de la lipasa de CV y RO en DHA, ARA y EPA cuando se suplementó con fórmula infantil, se preparó fórmula infantil a base de leche disolviendo 10 g de polvo de ENFAMIL® en 35 ml de agua. Fórmula infantil que contiene sustrato EPA, tampón Tris 0,1M, pH 7,7, y sustratos 2,7 mg DHA (Nu-check Prep, Inc. Lote No. T-310-D7-V) y 5,4 mg de ARA (Nu-check Prep, Inc. Lote No. T-295) a un vial de vidrio de 1 mL (con barra de agitación magnética). La reacción se inició añadiendo enzima (es decir, lipasa); cuatro concentraciones de cada enzima fueron probadas. Los viales se transfirieron a un baño maría a 37°C colocado en un agitador magnético. Se tomaron 50 μl de cada muestra en diferentes puntos de tiempo 0, 10, 20, 30, 45 y 60 minutos y se añadieron a un vial de HPLC que contenía 950 μl de tampón de operación HPLC (30% tampón de fosfato de amonio 10 mM, pH 3,0 y 70% de acetonitrilo). A continuación, las muestras se analizaron para determinar el ácido DHA, el ácido ARA o el ácido EPA mediante RP-HPLC como anteriormente.

20 El porcentaje de triglicéridos totales disminuyó con el tiempo a medida que aumentaba la cantidad de ácido libre y monoglicérido. Por ejemplo, cuando se hidroliza con RO, la cantidad de ácido libre de DHA aumenta con el tiempo (Figura 7). De manera similar, cuando se hidrolizó con RO, la cantidad de ácido libre de ARA aumentó con el tiempo (Figura 8).

25 Las actividades específicas de cada una de las lipasas en este ensayo se calcularon en base a la cantidad de ácido DHA libre, ácido ARA o ácido EPA liberado en la fórmula infantil y se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Actividades específicas de lipasas en TG-DHA, TG-ARA y TG-EPA en fórmula infantil

Enzima	DHA producido, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	ARA producido, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$	EPA producido, $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$
CV	39,461	36,587	19,866
RO	13,062	10,940	14,156

30 EJEMPLO 3: Hidrólisis del triglicérido de DHA y triglicéridos de ARA a gran escala

35 Las lipasas se evaluaron por su capacidad de hidrolizar TG-DHA y TG-ARA cuando se las aumenta hasta una cantidad que puede usarse para complementar la fórmula infantil. La fórmula infantil (leche) se preparó disolviendo 162 g de polvo de Enfamil en 648 ml de agua del grifo (agua caliente, la temperatura era 37°C). El triglicérido DHA (442 mg, concentración final de DHA fue 0,54 g, 1,2% de grasa total) y el triglicérido ARA (885 mg, concentración final ARA 1,08 g, 2,4% de grasa total) se pesaron con precisión de la misma fuente que en el Ejemplo 2 y se mezclaron con el polvo de fórmula infantil antes de agregar el agua. La reacción se llevó a cabo en un baño maría con agitación constante. La hidrólisis de grasa se inició añadiendo CV o lipasa RO. Las muestras de fórmula se retiraron a 0, 15 y 30 minutos y se analizaron para determinar la hidrólisis de DHA y ARA mediante RP-HPLC, tal como se describió anteriormente. Los resultados se muestran en la Tabla 3 a continuación.

40

Tabla 3. Hidrólisis de TG-DHA y TG-ARA en fórmula infantil

	Lipasa, mg	% Hidrólisis DHA		% Hidrólisis ARA	
		15 min	30 min	15 min	30 min
CV	9	75,17	71,32	58,97	74,38
	18	84,51	87,25	65,83	63,31
RO	29	62,35	71,19	104,81	124,67
	58	73	67,77	124,22	113,08

EJEMPLO 4: Actividad enzimática de lipasa de *Rhizopus oryzae* inmovilizada en TG-DHA o TG-ARA en fórmula infantil y tampón

Para evaluar la actividad enzimática de la lipasa de RO inmovilizada en TG-DHA o TG-ARA cuando se suplementaba con fórmula infantil, se preparó una fórmula infantil a base de leche disolviendo 10 g de polvo de ENFAMIL® en 35 ml de agua. La reacción se llevó a cabo de la siguiente manera. Se añadieron fórmula infantil, tampón Tris 0,1 M, pH 7,7 y sustrato (TG-DHA o TG-ARA) a un vial de vidrio de 1 ml (con barra de agitación magnética). La reacción se inició añadiendo lipasa. Los viales se transfirieron a un baño maría a 37°C colocado en un agitador magnético. Se tomaron 50 µl de cada muestra en diferentes puntos de tiempo 0, 10, 20 y 30 minutos y se añadieron a un vial de HPLC que contenía 900 µl de tampón de operación HPLC (30% de tampón de fosfato de amonio 10 mM, pH 3,0 y acetonitrilo al 70%). Las muestras se analizaron luego para determinar el ácido DHA o el ácido ARA mediante RP-HPLC como se describió anteriormente.

Las actividades específicas de la lipasa para la hidrólisis de TG-DHA y TG-ARA se calcularon en base a la cantidad de ácido DHA libre o ácido ARA liberado en la fórmula infantil y se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Actividades específicas de la lipasa de RO inmovilizada sobre TG-DHA o TG-ARA en fórmula infantil y tampón

Enzima	DHA producido, µmol/min/mg	ARA producido, µmol/min/mg
Lipasa (RO) inmovilizada de <i>Rhizopus oryzae</i>	0,017 (0,004)	0,020 (0,008)

Los valores entre paréntesis son solo para el búfer.

EJEMPLO 5: Animales y procedimiento quirúrgico

5.1 Animales

Los experimentos se realizaron en 12 cerdos (9 + 3) del rebaño de la Universidad en Odarslöv, Universidad Agrícola Sueca, Departamento de Biosistemas y Tecnología Agrícola, que pesaban aproximadamente 10 ± 2 kg cada uno. Los animales se mantuvieron en un ciclo de día y noche de 12 horas, con luz de 06:00 a 18:00 (de 6 a.m. a 6 p.m.) y oscuridad de 18:00 a 06:00 (de 6 p.m. a 6 a.m.) horas. Los cerdos se alojaron individualmente en jaulas metabólicas o corrales individuales equipados con un comedero seco, una tetina para beber y una lámpara de calentamiento constante (150 W). Se les permitió moverse libremente dentro de su corral y tener contacto visual entre ellos.

5.2 Alimentación

Después de la cirugía y durante el período previo al tratamiento, los cerdos fueron alimentados con una dieta estándar de cerdo ("53908 Växtill 320 P BK", Lantmännen, Suecia) que contenía 17,5% de proteína cruda, 3,9% de fibra cruda, 3,5% de grasa cruda y 5,2% de ceniza junto con 5000IE/kg de vitamina A, 500 IE/kg de vitamina D y 85 mg/kg de vitamina E. Los cerdos fueron alimentados dos veces al día (2,0% de masa corporal por comida) a las 09:00-10:00 h (de 9 a.m. a 10 a.m.) y de 17:00 a 18:00 h (de 5 a.m. a 6 a.m.). Durante unos días antes del inicio del experimento, es decir, antes del período de adaptación, los cerdos fueron entrenados para consumir fórmula infantil (NAN Pro 1 Gold Infant Formula, Nestlé). La fórmula se preparó como una dilución 1:4 en agua del grifo en lugar de 1:7 según lo recomendado por el fabricante para permitir un consumo adecuado, ya que a los cerdos no les gusta beber grandes volúmenes de líquido. Los requerimientos diarios de nutrientes son 400 kJ/kg de peso corporal, correspondientes a 40 g de fórmula en polvo/kg de peso corporal. La alimentación diaria se dividió en 4 porciones, comenzando con la primera comida a las 9 a.m. y más tarde, cada 3 h después con la última comida del día a las 6 p.m. 100 g de fórmula NAN contiene aproximadamente 27,7% de grasa, 9,6% de proteína y 57,8% de carbohidratos.

5.3 Leche de fórmula infantil enriquecida con triglicéridos DHA y ARA

De acuerdo con el fabricante, NAN Pro 1 Gold (Nestlé) es una fórmula para lactantes de primera calidad, predominantemente de suero de leche, nutricionalmente completa y especialmente formulada para bebés sanos desde el nacimiento. También contiene aceite de pescado para ayudar al desarrollo cerebral y visual.

(http://www.nestlebaby.com/au/baby_nutrition/products/infant_formula/)

Ingredientes de NAN Pro 1 Gold:

Sólidos lácteos, aceites vegetales (contiene soja), minerales (citrato de calcio, citrato de potasio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, cloruro de sodio, sulfato de sodio, sulfato ferroso, sulfato de zinc, fosfato de calcio, sulfato de cobre, sulfato de manganeso, yoduro de potasio, selenato de sodio), LCPUFA omega (DHA de aceite de pescado, AA), emulsionante (lecitina de soja), vitaminas [ascorbato de sodio (vit C), acetato de alfa tocoferol d-l (vit E), niacinamida (niacina), pantotenato de calcio, acetato de retinilo (vit A), mononitrato de tiamina (vit B1), clorhidrato de piridoxina (vit B6), riboflavina (vit B2), ácido fólico, filoquinona (vit K1), biotina, colecalciferol (vit D3)], cianocobalamina (B 12), L-histidina, taurina, inositol, nucleótidos (citidina 5'-monofosfato, uridina 5'-monofosfato, adenosina 5'-monofosfato, guanosina 5'-monofosfato), L-carnitina, cultivo (bífido).

La Tabla 5 a continuación resume la composición lipídica de la leche humana y la leche de fórmula infantil*, junto con la fórmula infantil y la leche de fórmula para cerdos para su uso en estos experimentos.

Tabla 5: Leche de fórmula fortificada con LCPUFA

	Leche humana*	Fórmula de bebé a término	Fórmula de bebé prematuro	Fórmula de cerdo para el estudio en cerdos
TG g/L	25-29	33-36	25	50
Colesterol mg/dL	9-15	0-4		10
En % de FA total	Leche humana*	Fórmula de bebé a término	Fórmula de bebé prematuro	Fórmula de cerdo para el estudio en cerdos
Palmitato C16:0	20-25	8-24	NA*	NA*
Estearato C18:0	7-12	2-6 NA*	NA*	
LA C18:2n-6	10-15,5	10-29,9	4,5	NA*
LNA C18:3n-3	0,58-1,44	0,08-2	0,086	NA*
DHA C22:6n-3 (ω 3)	0,19-0,42	0-0,15	0,083	Hasta 1,6%**
ARA C20:4n-6 (ω 6)*	0,4-0,54	0-0,4	0,167*	Hasta 3,15%**

5 *Datos de varias cohortes de mujeres en Australia, Europa, Estados Unidos y Canadá entre 1990 y 2005. Datos de varias fórmulas de término infantil incluyendo Nutrilom (Nutricia, Holanda), Enfamil (Mead Johnson, Canadá), Similac (Abbott Ross, EE. UU.), SMA (Wyeth, EE. UU.). (JPGN 2010; 51: 380-401) //
 **Huang MC, 2007, ^{\$\$}MCT 9.6 * La concentración final se medirá una vez finalizado el experimento.

10 La concentración total de TG-DHA y TG-AA en la fórmula NAN es 0,22%, que está por debajo de los niveles recomendados de 1%. Por lo tanto, la fórmula NAN se fortificó con TG-DHA y TG-AA del aceite de pescado (NuCheck (<http://www.nu-checkprep.com>), ~40% TG-DHA y TG-ARA) hasta alcanzar una concentración final del 1% TG-DHA y 2% de TG-ARA, respectivamente.

15 5.4 Cirugía de ligadura del conducto pancreático para la inducción de insuficiencia pancreática exocrina (EPI)
 La cirugía EPI se realizó en 12 + 2 cerdos jóvenes de 6-8 semanas de edad. EPI generalmente se desarrolla completamente de tres a cuatro semanas después de la cirugía. El desarrollo de la insuficiencia pancreática total fue confirmado por el crecimiento detenido (aumento mínimo o nulo en el peso corporal) y/o el desarrollo de esteatorrea.

20 EJEMPLO 6: Diseño experimental, procedimientos

6.1 Diseño del estudio

25 El estudio contenía tres períodos: adaptación, control y prueba. Durante el período de adaptación de 7 días, los cerdos fueron entrenados para beber fórmula infantil fortificada con TG-DHA y TG-ARA. Durante el período de control de 7 días, los cerdos continuaron siendo alimentados con fórmula infantil fortificada con TG-DHA y TG-ARA. Durante el período de prueba de 7 días, los cerdos fueron alimentados con fórmula infantil fortificada con TG-DHA y TG-ARA, ya sea (a) no hidrolizados, (b) prehidrolizados con lipasa CV; o (c) prehidrolizados con RO lipasa. El consumo de fórmula se midió a diario, las muestras de heces se recogieron los últimos 3 días de cada período de estudio (recolección de 72 horas) y las muestras de sangre se recogieron el día 7 de los períodos de control y prueba.

30 6.2 Dosificación de lipasa

La dosis de lipasa y el tiempo de prehidrólisis se determinaron en base a los resultados in vitro (Ejemplo 3) y los requerimientos nutricionales diarios de los cerdos. La fórmula NAN mezclada con lipasa RO o CV (~1300 U/g de grasa total) se incubó con agitación durante 15 minutos a 37°C.

35 Preparación propuesta de fórmula y mezcla de lipasas:

- El peso corporal de los cerdos varió de 11 a 14 kg.
- Requisito de alimentación: 40 g de fórmula en polvo/kg de peso corporal;
- Necesidad diaria 500 g polvo/cerdo
- 40 - 4 comidas por día
- 125 g polvo/cerdo/comida

Preparación de la comida: 500 g de polvo + 1,5 l de agua (dilución 1:4)

- Agregue primero el polvo seco
- Agregue los aceites TG-PUFA (7,5 ml de DHA y 15 ml de ARA), mezcle bien y agregue agua del grifo del baño - maría a 37°C, mezcle bien.
- Para la fórmula tratada con lipasa, mezcle en CV o lipasa RO
- Agregue agua a volumen final
- Mezcle todos los 15 minutos en baño maría a 37°C
- Divida en 4 cubos y alimente a cada cerdo ~600 mL de fórmula

6.2.1 Período de adaptación (7-10 días)

Aproximadamente 7-10 días antes del período de adaptación, 12 cerdos fueron colocados en jaulas metabólicas y entrenados para beber fórmula enriquecida con TG-PUFA. En la primera mañana del período de adaptación, se registró el peso corporal antes de la comida de la mañana.

6.2.2 Período de control (7 días)

A todos los cerdos seleccionados se les dio fórmula infantil como única fuente de alimento, 4 veces por día. El consumo total de fórmula diaria se midió durante todo el experimento. En la mañana del primer día del período de control, se registró el peso corporal antes de la comida de la mañana. Se recogieron muestras de heces 3 x 24 horas desde el día 5 hasta el día 7. Se tomaron muestras de sangre el último día de este período, 1 hora antes de una comida y 1, 2 y 3 horas más tarde.

6.2.3 Período de prueba (7 días)

A todos los cerdos seleccionados se les dio fórmula infantil enriquecida con TG-PUFA como la única fuente de alimento, 4 veces por día. El consumo total diario de leche se midió durante todo el experimento. En la mañana del primer día del período de prueba, se registró el peso corporal antes de la comida de la mañana. Se recogieron muestras de heces de 3 x 24 h desde el día 5 hasta el día 7. Se tomaron muestras de sangre el último día de este período, 1 h antes de una comida y 1, 2 y 3 h más tarde.

Antes del comienzo de este período, los cerdos se distribuyeron aleatoriamente en tres grupos, en función del peso corporal y la disposición a beber fórmula:

- 1) Un tercio de los cerdos EPI (n = 4) fueron alimentados con fórmula prehidrolizada con lipasa RO;
- 2) Un tercio de los cerdos de EPI (n = 4) fueron alimentados con fórmula prehidrolizada con lipasa CV; y
- 3) Un tercio de los cerdos EPI (n = 4) fueron alimentados solo con fórmula.

La preparación de la fórmula y la mezcla de lipasa se muestra anteriormente en el párrafo.

6.3 Criterios para una respuesta positiva

Reducción significativa en LCPUFA fecales, aumento en el coeficiente de absorción de grasa (% CFA) y aumento en la concentración de LCPUFA en plasma en comparación con cerdos EPI alimentados solo con fórmula suplementada con TG-ARA al 2% y TG-AA al 1%.

6.4 Análisis de los datos

Los datos individuales se registraron en el momento en que se generaron. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando la prueba t de Student. Las diferencias se consideraron significativas si $p < 0,05$.

EJEMPLO 7: Las lipasas RO y CV mejoran la absorción de ácidos grasos en cerdos EPI

Los cerdos con insuficiencia pancreática exocrina (EPI), un modelo quirúrgico bien establecido, se utilizaron como modelo para imitar a los bebés humanos prematuros o a término, donde la función pancreática exocrina está comprometida. El modelo de cerdo quirúrgico EPI se usó esencialmente como se describe en los Ejemplos 5 y 6 para evaluar el efecto sobre la absorción de ácidos grasos de la fórmula infantil prehidrolizada con lipasa CV o lipasa RO en comparación con la fórmula infantil no hidrolizada. Los cerdos EPI tenían 10 semanas de edad (+/- 2 semanas), lo que corresponde a aproximadamente 6 meses de edad para un bebé humano. Los cerdos fueron alimentados con la fórmula infantil Nestlé (NAN Pro 1 Gold) enriquecida con 2% de triglicéridos ARA (TG-ARA) y 1% de triglicéridos DHA (TG-DHA) a partir del aceite de pescado (NuCheck) (<http://www.nu-chekprep.com>, ~40% de TG-DHA y TG-ARA). La alimentación se produjo cada 3 horas, 4 veces por día. En el grupo de cerdos que recibieron fórmula prehidrolizada, la fórmula se hidrolizó previamente 15 minutos antes de la alimentación mediante mezcla con lipasa CV o lipasa RO a 37°C. La duración del experimento fue de 1 semana, seguido del análisis de la concentración de LC-PUFA en heces, absorción de PUFA-LC en plasma y acrecentamiento de PUFA-CL en tejidos (retina, corazón, hígado, riñón, eritrocitos, cerebro y grasa).

Como se muestra en la FIGURA 22A, los cerdos EPI que recibieron una fórmula prehidrolizada con lipasa CV o lipasa RO tuvieron un peso de heces significativamente reducido (CV:> 60% de reducción, $p < 0,001$, RO: reducción de ~30%, $p < 0,05$). La prehidrólisis de grasa con lipasa CV o lipasa RO también redujo significativamente el contenido total de grasa en las heces en comparación con los cerdos EPI de control (Figura 22B) y aumentó

significativamente el coeficiente de absorción de grasa (% CFA) en comparación con los controles (Figura 22C), donde el % de CFA = (ingesta de grasa (g/24 h) - grasa en heces (g/24 h))/(ingesta de grasa (g/24 h)), n = 3/brazo, p = 0,002 para CV vs. control, y p = 0,003 para RO vs. control. En comparación con el control, la prehidrólisis con lipasa CV o lipasa RO causó reducciones significativas en ARA fecal (reducciones del 36% y 65%, respectivamente), EPA (78% de reducción con cualquiera de las enzimas) y DHA (68% y 60% de reducciones, respectivamente) (Figura 23). Estos datos muestran que la prehidrólisis de fórmula con lipasa de CV o RO reduce los niveles fecales de grasa total, ARA, DHA y EPA, lo que indica una mejora en la absorción de omega-3, omega-6 y ácidos grasos totales.

Además, los cerdos alimentados con fórmula prehidrolizada tuvieron aumentos significativos en los niveles plasmáticos y tisulares de ARA y DHA después de 7 días de alimentación en comparación con los cerdos de control. Para estos estudios, hubo 4 cerdos en los grupos control y lipasa CV y 3 cerdos en el grupo lipasa RO. Se tomaron muestras de plasma preprandiales después del ayuno durante la noche después de 7 días de tratamiento. Los niveles plasmáticos de ARA y DHA fueron significativamente mayores (60% y 30%, respectivamente, p <0,05) en cerdos alimentados con fórmula prehidrolizada con lipasa de RO en comparación con cerdos alimentados con fórmula no hidrolizada (Figuras 24A y 24B). Los niveles plasmáticos de ARA también fueron significativamente mayores (40%, p <0,05) en los cerdos alimentados con fórmula prehidrolizada con lipasa CV en comparación con los cerdos alimentados con fórmula no hidrolizada (Figura 24). Los niveles de ARA y DHA también aumentaron significativamente (p <0,05) en la retina (Figura 25A) y el tejido adiposo (Figura 25B) de cerdos alimentados con fórmula prehidrolizada con lipasa RO en comparación con cerdos alimentados con fórmula no hidrolizada. Los niveles de retina de ARA también fueron significativamente mayores (p <0,05) en cerdos alimentados con fórmula prehidrolizada con lipasa CV en comparación con cerdos alimentados con fórmula no hidrolizada (Figura 25A). En cerdos alimentados con fórmula prehidrolizada con CV o RO lipasa, los niveles de ARA también aumentaron significativamente (p <0,05) en el corazón (Figura 26A: 60% y 20% de aumento, respectivamente) y riñón (Figura 26B) de cerdos en comparación a cerdos alimentados con fórmula no hidrolizada. Los niveles de DHA aumentaron significativamente (60%, p <0,05) en el corazón de los cerdos alimentados con fórmula prehidrolizada con lipasa CV en comparación con los cerdos alimentados con fórmula no hidrolizada (Figura 26A). Hubo cambios mínimos o nulos en el hígado, los eritrocitos y el cerebro, lo que puede explicarse por la duración relativamente corta del tratamiento (7 días) en este estudio.

EJEMPLO 8: Hidrólisis de TG-DHA y TG-ARA en fórmula infantil por lipasa inmovilizada en una "bolsa de té"

La lipasa de *Rhizopus oryzae* (RO) se unió covalentemente a perlas acrílicas y se contuvo en un dispositivo que se asemeja a una bolsita de té. La fórmula infantil Enfalac (25 g) se combinó con agua del grifo (88 ml) a 37°C. Las reacciones se llevaron a cabo en un frasco de vidrio con 100 ml de fórmula infantil y una bolsa de té que contenía 100, 500, 1000 ó 2000 mg de lipasa de RO inmovilizada. Cada reacción se incubó a 37°C durante 30 minutos con inversión. Las muestras se tomaron en los siguientes puntos de tiempo: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20 y 30 minutos. Las muestras se analizaron para DHA y ARA mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC).

A cada concentración de lipasa de RO inmovilizada, el porcentaje de hidrólisis de DHA y ARA aumentó a medida que aumentaba la cantidad de lipasa de RO inmovilizada (Figura 27). Estos datos demuestran la viabilidad del dispositivo de bolsa de té para prehidrolizar la fórmula con lipasa.

EJEMPLO 9: Hidrólisis de TG-DHA y TG-ARA en fórmula infantil por lipasa inmovilizada en un cartucho

La lipasa de *Rhizopus oryzae* (RO) y la lipasa de *Chromobacterium viscosum* (CV) se inmovilizaron en perlas de polímero acrílico macroporoso (Immobeeds™ ChiralVision). Se usaron aproximadamente 200 mg de lipasa de RO por gramo de perlas. Se irradió una muestra de perlas recubiertas con lipasa CV (CVI) para determinar el efecto de la irradiación sobre la potencia de la lipasa inmovilizada. Aproximadamente 1,7 g de cada preparación de perlas (RO, CV y CVI) se empaquetaron en columnas con volúmenes de lecho de aproximadamente 5 ml. La fórmula infantil que contenía triglicéridos de DHA y ARA se pasó sobre la columna a una velocidad de flujo de 75 ml/hora. El eluato de columna se analizó para determinar la hidrólisis de DHA y ARA por HPLC. El porcentaje de hidrólisis de triglicéridos de DHA y ARA por lipasas de CV, CVI y RO se muestra en la Tabla 6.

Tabla 6: Hidrólisis de TG-DHA y TG-ARA usando un cartucho de lipasa inmovilizado

	Empaquetamiento de columna	% de hidrólisis TG-DHA	% de hidrólisis TG-ARA
CV	5 mL	92,50	41,00
CVI	5 mL	71,90	34,50
RO	5 mL	98,79	94,85

EJEMPLO 10: Lipasa RO versus pancreatina

La lipasa de *Rhizopus oryzae* (RO) mostró una actividad mucho mayor hacia los triglicéridos de DHA y ARA que la pancreatina porcina (Zenpep®), que contiene una mezcla de lipasas, proteasas y amilasas pancreáticas. 1,4 mL de fórmula infantil se mezclaron con 100 uL de lipasa (ya sea pancreatina o lipasa RO) y 100 uL de cada uno de los triglicéridos de DHA y ARA. Las reacciones se incubaron a 37°C durante 15 minutos. Se tomaron muestras en los

puntos de tiempo 0, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 15 minutos y se analizaron mediante RP-HPLC para DHA y ARA. Los triglicéridos DHA (Figura 28A) y ARA (Figura 28B) se hidrolizaron mediante lipasa RO a lo largo del tiempo, pero no se hidrolizaron mediante pancreatina.

5 EJEMPLO 11: Estudio de cerdo de 6 semanas: Alimentación a largo plazo de cerdos con fórmula prehidrolizada por lipasa inmovilizada

10 Seis cerdos sanos y veinte cerdos con insuficiencia pancreática exocrina (EPI) inducida quirúrgicamente (véase el Ejemplo 5) se sometieron a un período de adaptación/control de dos semanas seguido de un período de prueba de seis semanas (Figura 29). Durante el período de adaptación, todos los cerdos fueron alimentados con la fórmula infantil NAN Pro 1 Gold (Nestlé) ("IF"). Durante el período de prueba, los cerdos sanos ("Saludable") y seis de los cerdos con EPI ("EPI") fueron alimentados con fórmula infantil fortificada con TG-LCPUFA (véanse los Ejemplos 5 y 6); siete de los cerdos con EPI fueron alimentados con fórmula infantil fortificada con TG-LCPUFA que había sido hidrolizada previamente con enzima RO inmovilizada usando un dispositivo de "bolsita de té" ("EPI + iRO"). Los cerdos restantes se retiraron del estudio por varias razones, por ejemplo, la falta de inducir quirúrgicamente EPI completo.

20 Para la prehidrólisis, se prepararon 2 litros de fórmula infantil NAN Pro 1 Gold (Nestlé) mezclando 1,5 litros de agua a 37°C con 500 g de fórmula en polvo fortificada con 50 mg/kg de TG-DHA y 100 mg/kg de TG- ARA (ver Ejemplo 5, Sección 5.3). Se añadieron cinco dispositivos tipo bolsita de té que contenían lipasa de RO inmovilizada en perlas (1 gramo de lipasa inmovilizada en cada "bolsita de té") a los 2 litros de fórmula y se mezclaron a temperatura ambiente durante 15 minutos usando un agitador magnético a velocidad de mezcla constante. Esto corresponde a 9.000 unidades (medidas contra el aceite de oliva) de lipasa de RO inmovilizada por 150 gramos de grasa total en la fórmula fortificada (60 U/g de grasa total). Antes de la hidrólisis, la fórmula fortificada contenía 17,4 mmol/litro de ácidos grasos no esterificados. Después de la hidrólisis, la fórmula contenía 107,6 mmol/litro de ácidos grasos no esterificados.

30 El consumo de alimentos se midió a diario. Se recogieron muestras de sangre y heces al final del período de adaptación ("basal") y después de las semanas 1, 4 y 6 del período de tratamiento. Para la muestra basal, las heces se recolectaron durante 48 horas (2 x 24 h). Para las muestras de la semana 1, 4 y 6, se recolectaron las heces durante 72 horas (3 x 24 h). Al finalizar el período de tratamiento, se recogieron órganos y tejidos para estudios de absorción y seguridad.

35 La fórmula pre-hidrolizada fue bien tolerada sin cambios relacionados con el tratamiento en la ingesta de alimentos, el crecimiento, los órganos (por examen de aspecto macroscópico) o el bienestar general. No hubo desarrollo de hígado graso basado en el examen del aspecto macroscópico del hígado cuando los cerdos fueron sacrificados al final del estudio de 6 semanas.

40 Después de seis semanas, hubo un aumento estadísticamente significativo en los niveles de ARA (Figura 30A) y DHA (Figura 30B) en eritrocitos (20% y 36%, respectivamente) en cerdos EPI alimentados con fórmula prehidrolizada (EPI + iRO) , en comparación con los cerdos EPI alimentados con la fórmula enriquecida con TG-LCPUFA sin prehidrólisis (EPI). Los niveles de eritrocitos de ARA y DHA no difirieron significativamente entre cerdos sanos y cerdos EPI alimentados con fórmula prehidrolizada durante seis semanas.

45 Como se muestra en la Tabla 7, hubo un aumento estadísticamente significativo en los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol, HDL y LDL en cerdos EPI alimentados con fórmula prehidrolizada durante seis semanas. Los niveles plasmáticos de triglicéridos, colesterol, HDL y LDL no difirieron significativamente entre los cerdos sanos y los cerdos EPI alimentados con fórmula prehidrolizada durante seis semanas.

Tabla 7

50

Grupo	Triglicéridos	Colesterol	HDL	LDL
Saludable	4,13 ± 0,68	0,51 ± 0,25	2,04 ± 0,31	1,27 ± 0,33
EPI	2,69 ± 0,56	0,22 ± 0,07	1,46 ± 0,41	0,69 ± 0,35
EPI + iRO	4,09 ± 1,47*	0,44 ± 0,19*	1,93 ± 0,46*	1,13 ± 0,54*

(Todos los valores en mmol/L. Los asteriscos indican p <0,05 para la diferencia entre EPI y EPI + iRO.)

55 Como se muestra en la Tabla 8, los cerdos alimentados con fórmula prehidrolizada durante seis semanas tuvieron niveles plasmáticos elevados de vitaminas A y E, pero no hubo diferencias significativas para la vitamina D. Hubo una diferencia estadísticamente significativa (p <0,05) en el nivel plasmático de la vitamina E entre los grupos EPI y EPI + iRO. Para la vitamina A, hubo una diferencia estadísticamente significativa (p <0,05) entre los grupos EPI y sanos, pero no entre los grupos EPI + iRO y los grupos sanos.

Tabla 8

Grupo	Alfa-tocoferol mg/mL Vitamina E	Retinol mg/mL Vitamina A	25-OH-D3 ng/mL Vitamina E
Saludable	6,6 ± 1,4	0,34 ± 0,06	9,4 ± 2,0
EPI	0,8 ± 0,4	0,18 ± 0,06	10,4 ± 3,6
EPI + IRO	1,5 ± 0,9*	0,26 ± 0,17	10,2 ± 4,1

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo para proporcionar una fórmula nutricional que comprende monoglicéridos y ácidos grasos libres al exponer una composición nutricional que comprende triglicéridos de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LC-PUFA) y/o ésteres de LC-PUFA a lipasa antes de la ingestión, comprendiendo el dispositivo:
- 10 un recipiente que comprende una pared del cuerpo que recibe la composición nutricional;
al menos una abertura en el recipiente, en la que la al menos una abertura está configurada para conectarse a un tubo de alimentación;
una estructura en comunicación fluida con el interior del contenedor; y
al menos una lipasa inmovilizada por la unión covalente a la estructura de modo que la composición nutritiva se expone a la, al menos una, lipasa cuando la composición nutritiva se recibe dentro del recipiente.
- 15 2. Dispositivo según la reivindicación 1, que comprende además un tubo de alimentación unido al recipiente.
3. El dispositivo de la reivindicación 1 ó 2, en el que la estructura comprende partículas contenidas dentro del recipiente, y opcionalmente en el que las partículas comprenden bolas o perlas.
- 20 4. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende además una válvula.
5. El dispositivo de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la, al menos una, lipasa se selecciona del grupo que consiste en lipasa de *Chromobacterium viscosum*, lipasa de *Pseudomonas fluorescens*, y lipasa de *Rhizopus oryzae*.
- 25 6. El dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el recipiente está configurado de modo que cuando la fórmula nutritiva sale del recipiente, la, al menos una, lipasa permanece en el recipiente.
- 30 7. El dispositivo según la reivindicación 6, que comprende además una pantalla o filtro para evitar que la, al menos una, lipasa salga del dispositivo con la fórmula nutritiva.
- 35 8. Un método para preparar una fórmula nutritiva que comprende LC-PUFA en forma de monoglicéridos y ácidos grasos libres antes de la ingestión por un sujeto, que comprende exponer a una lipasa una composición nutritiva líquida que comprende triglicéridos LC-PUFA y/o ésteres de LC-PUFA, y eliminar la lipasa de la composición líquida después de exponer los triglicéridos LC-PUFA y/o los ésteres de LC-PUFA a la lipasa, en donde la fórmula nutritiva está lista para ser ingerida por el sujeto una vez que la composición nutritiva líquida se expone a la lipasa y la lipasa se elimina de la composición líquida, en donde dicho método comprende pasar la composición nutritiva a través de un dispositivo de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7.

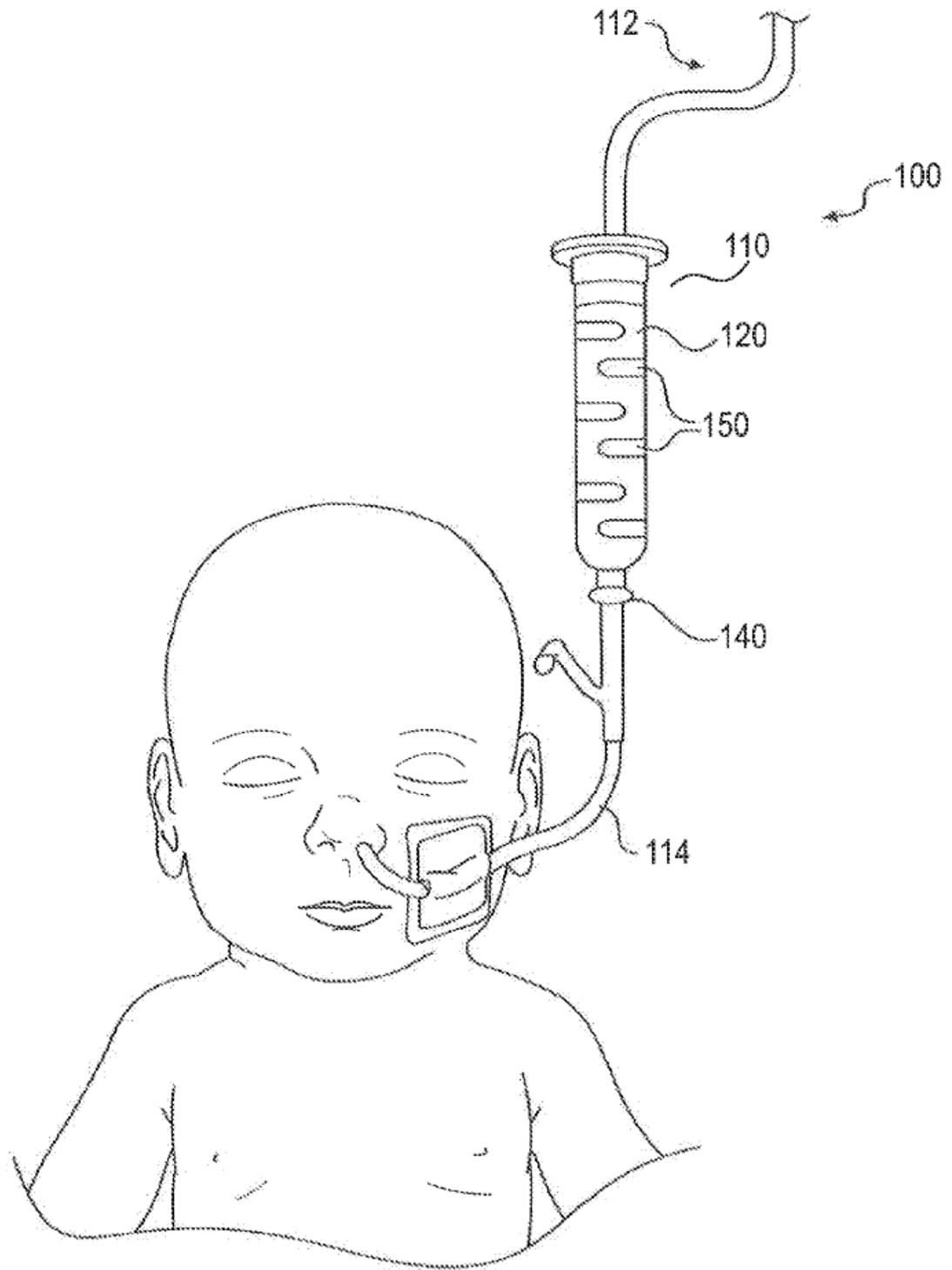


FIG. 1

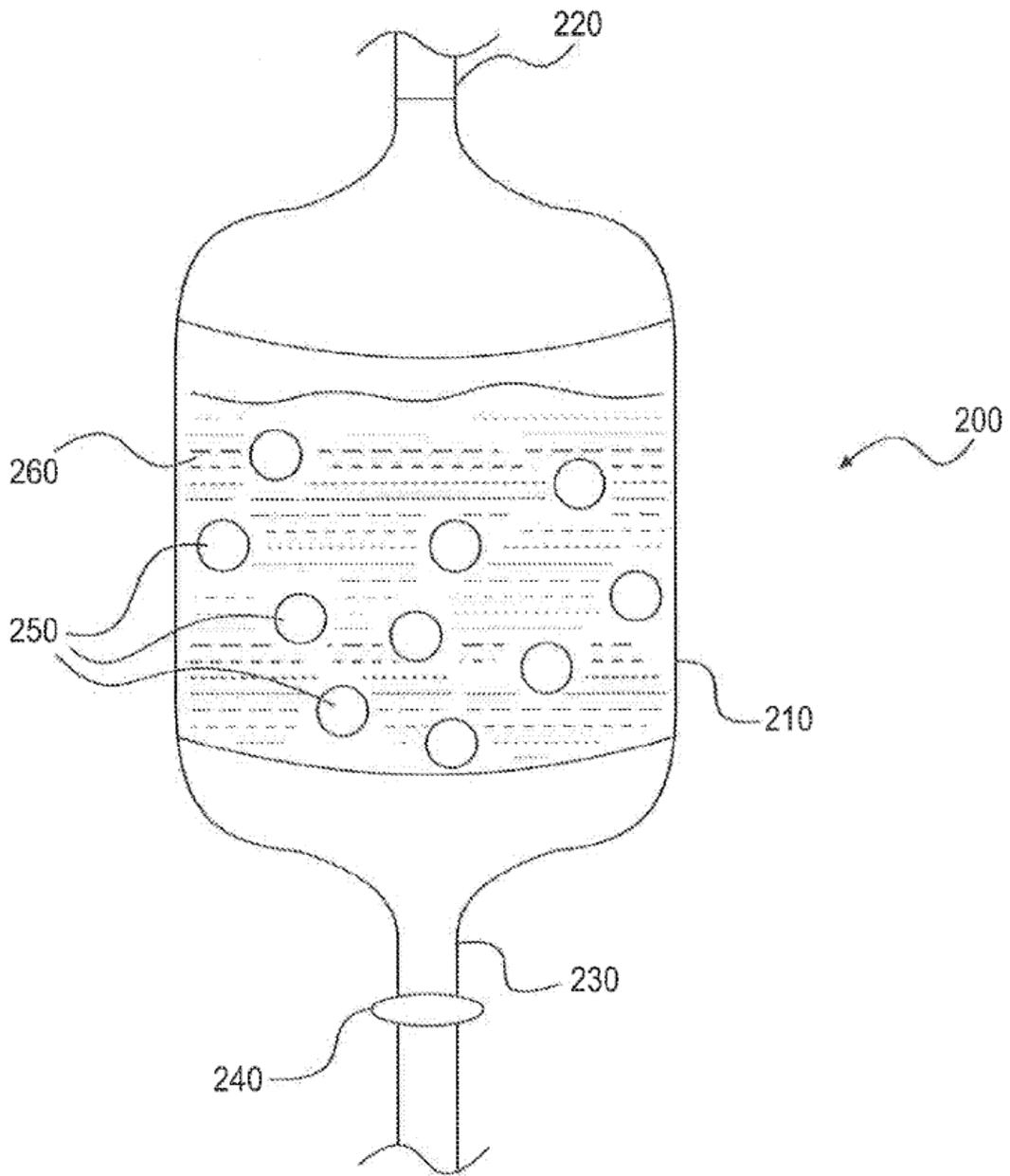


FIG. 2A

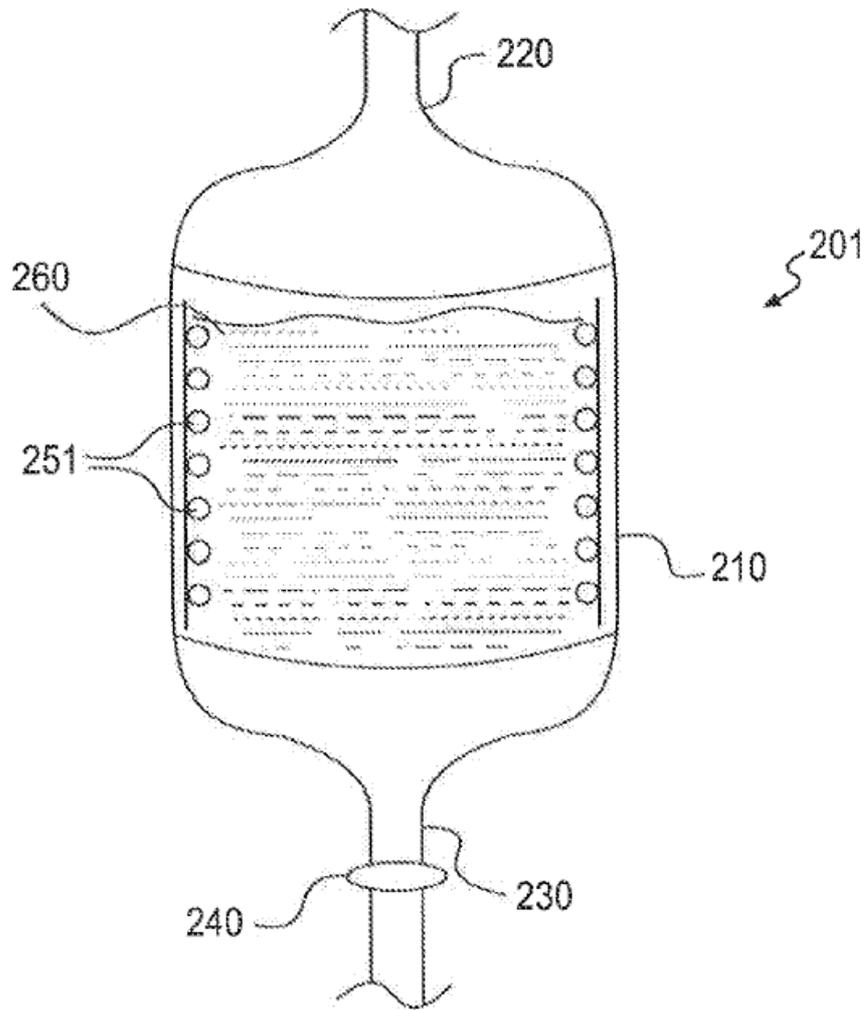


FIG. 2B

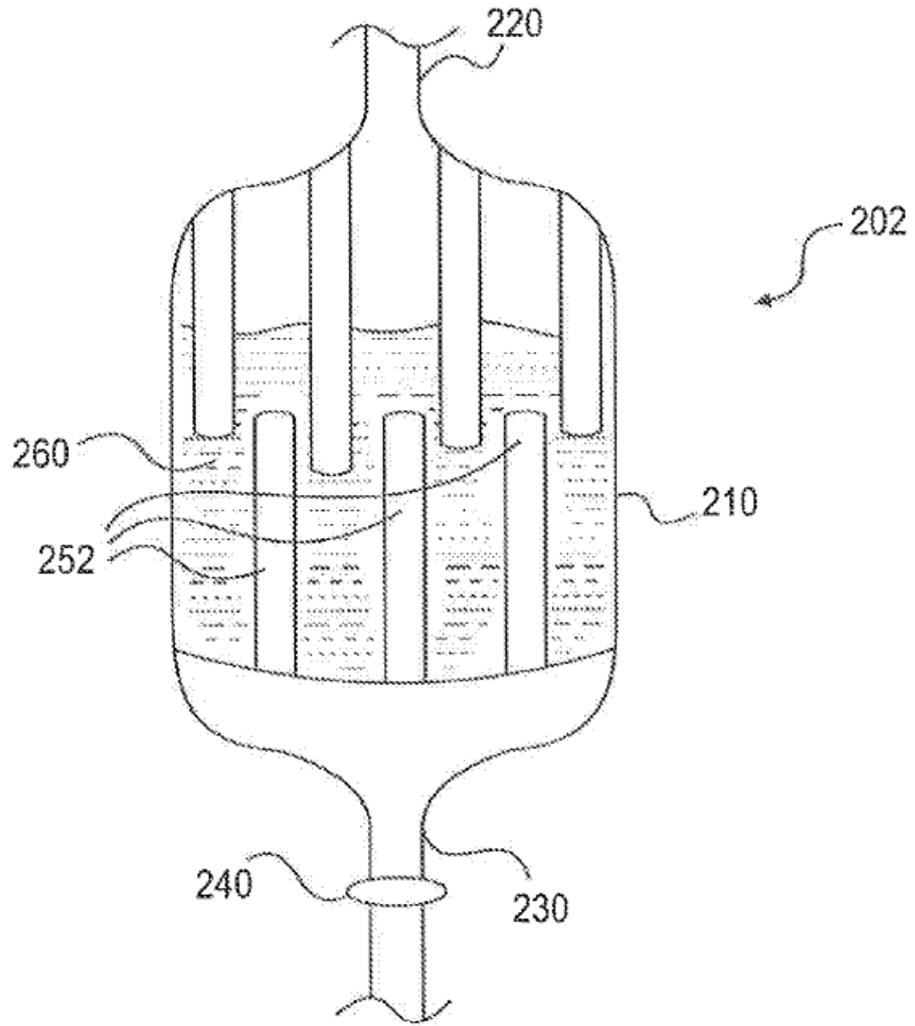


FIG. 2C

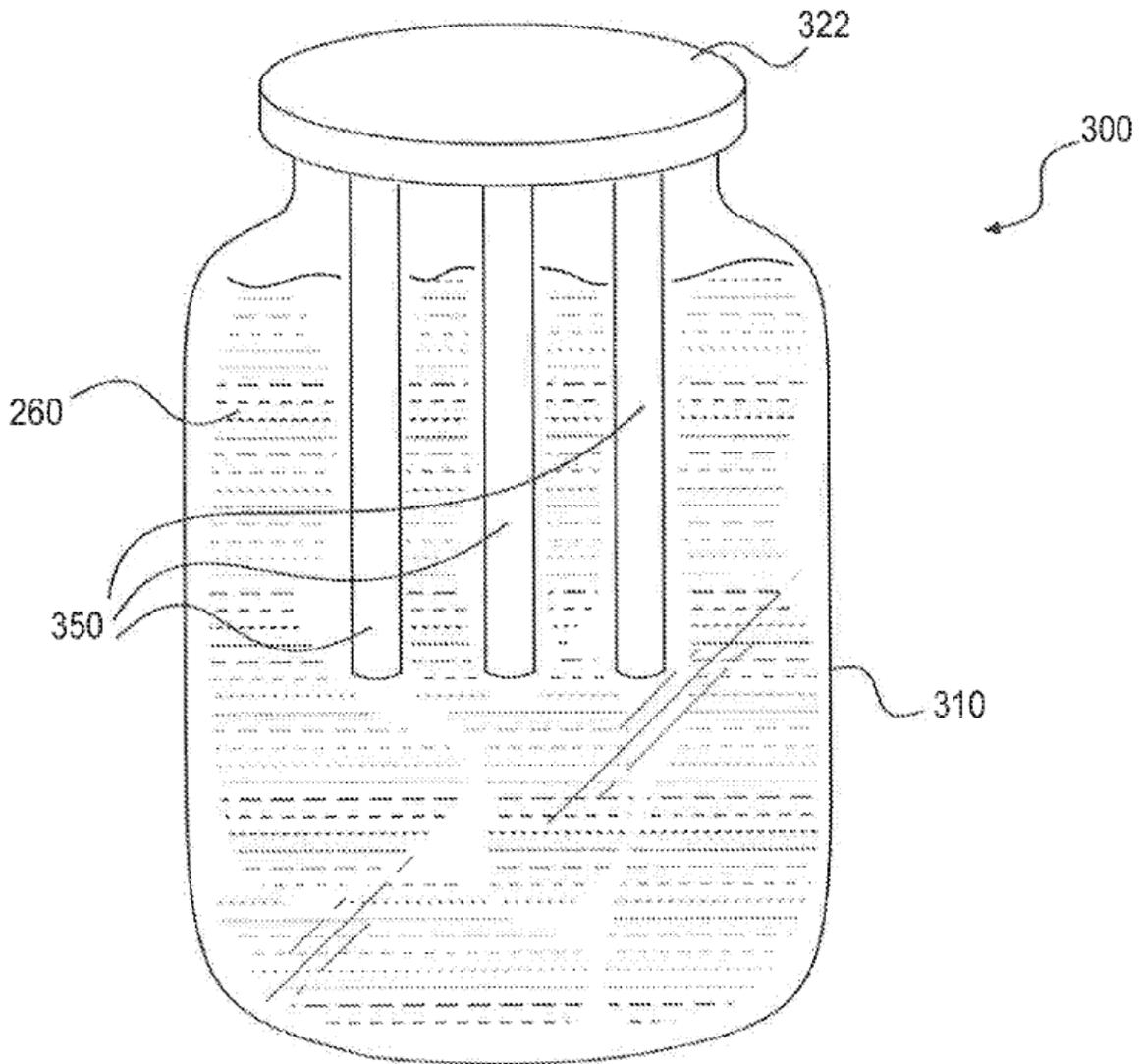


FIG. 3A

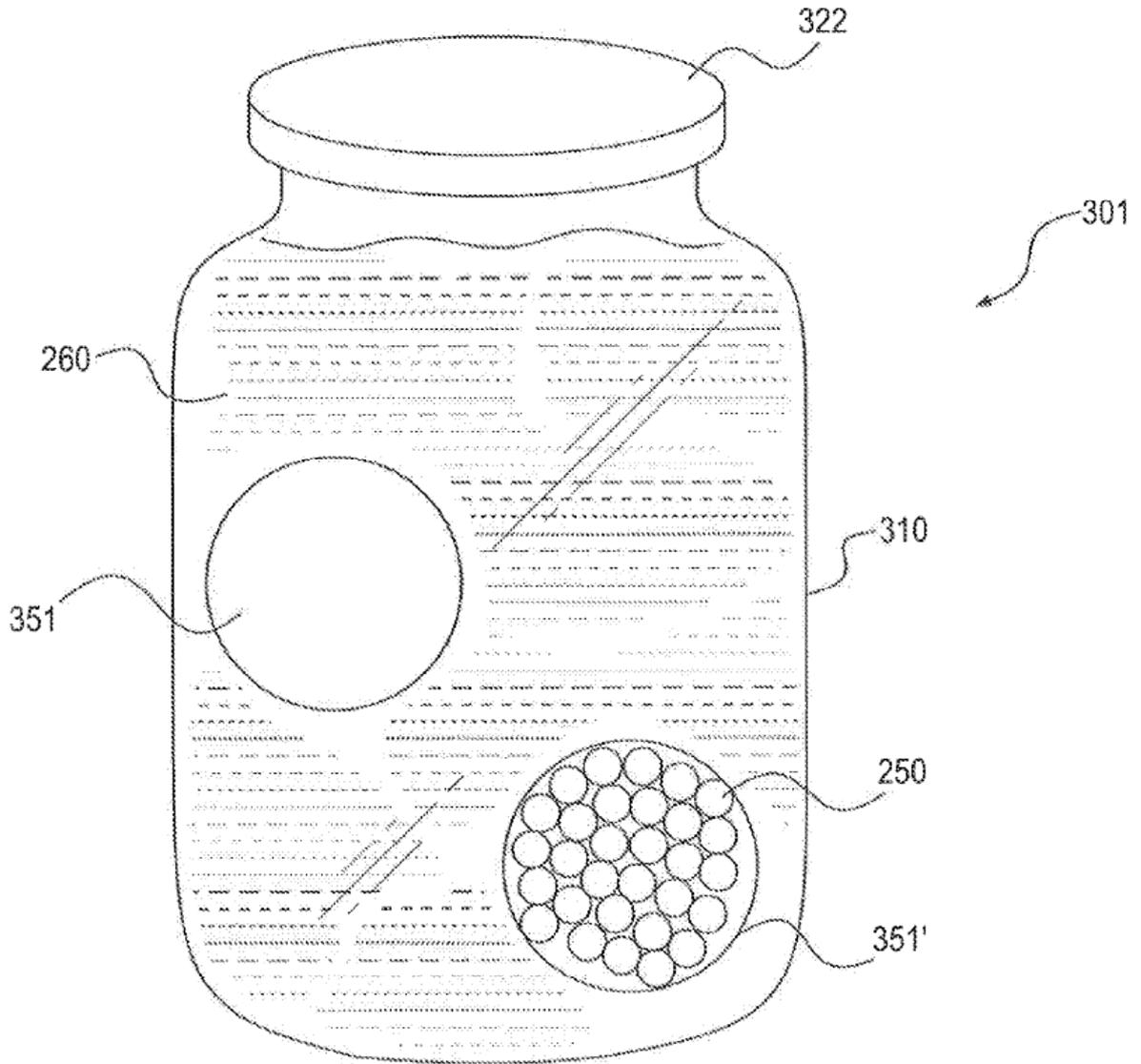


FIG. 3B

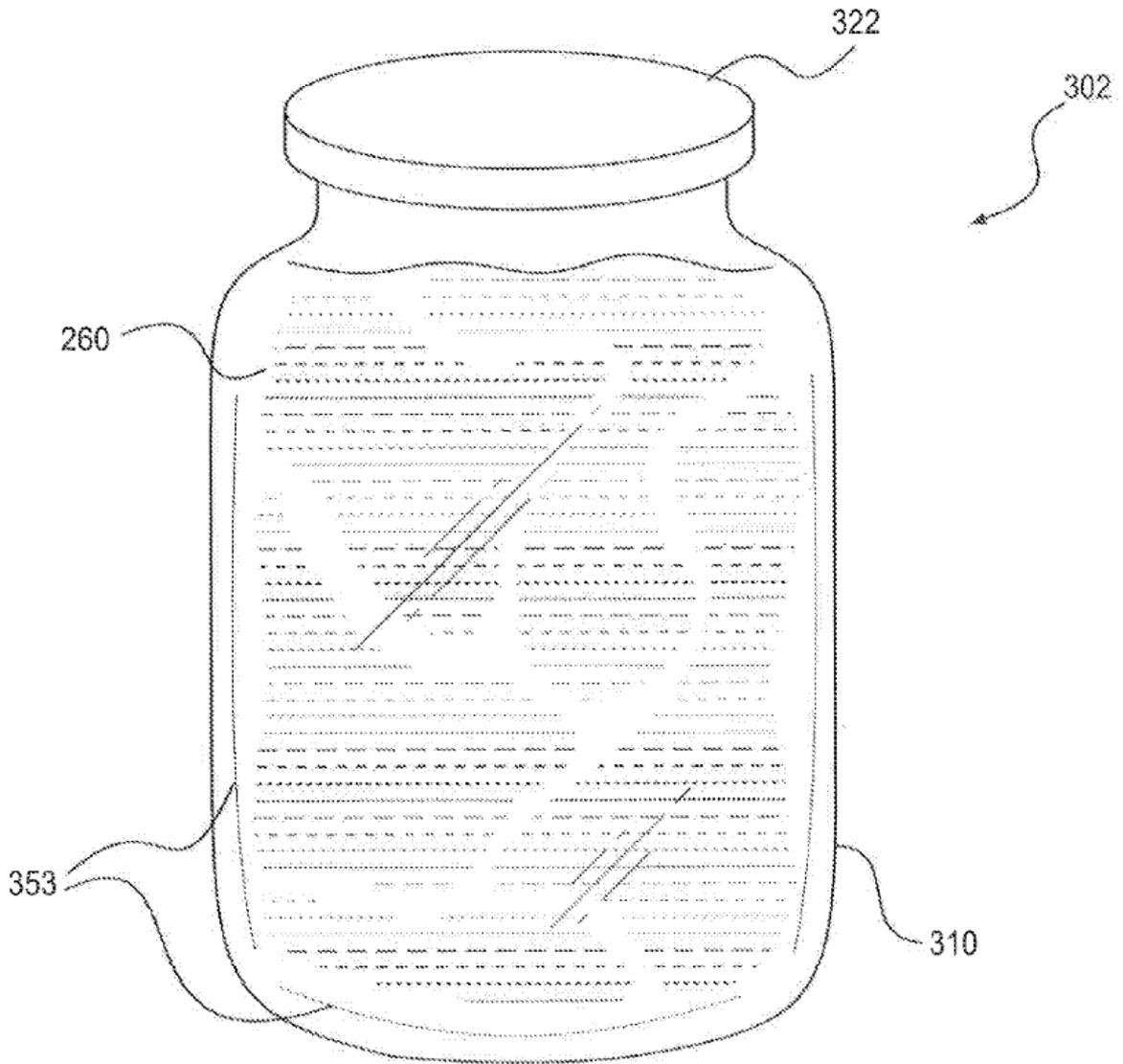


FIG. 3C

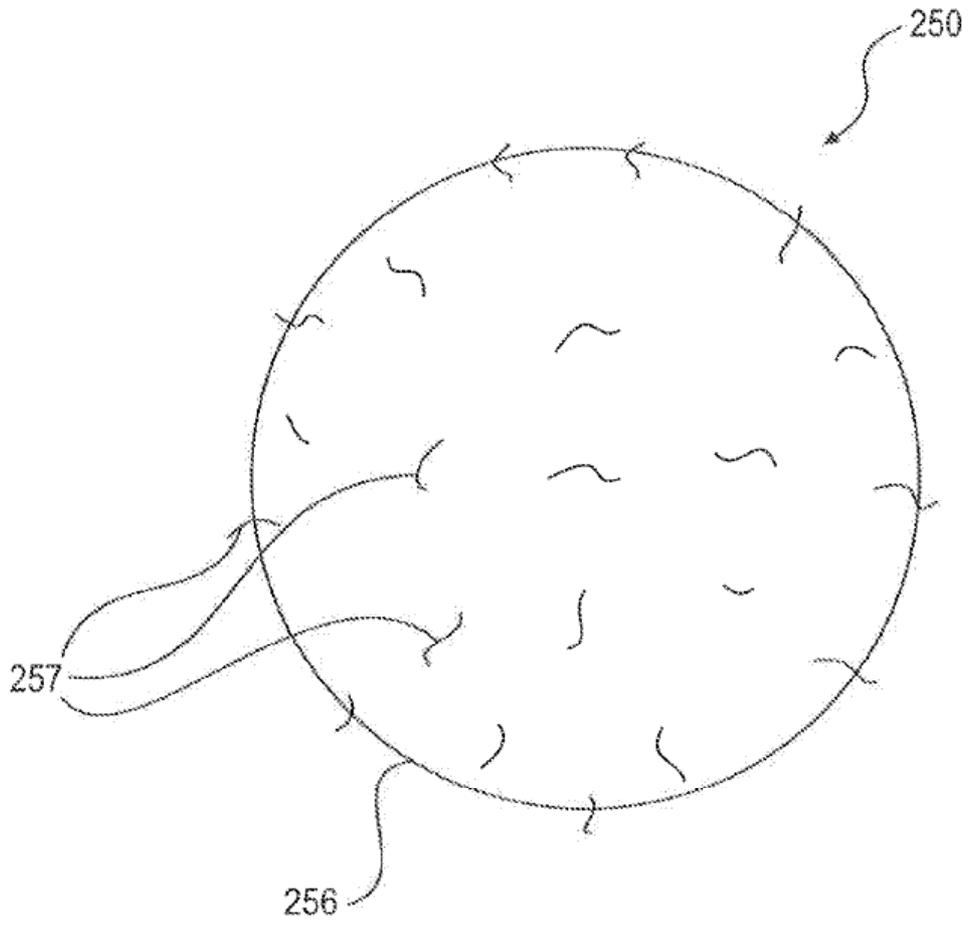


FIG. 4A

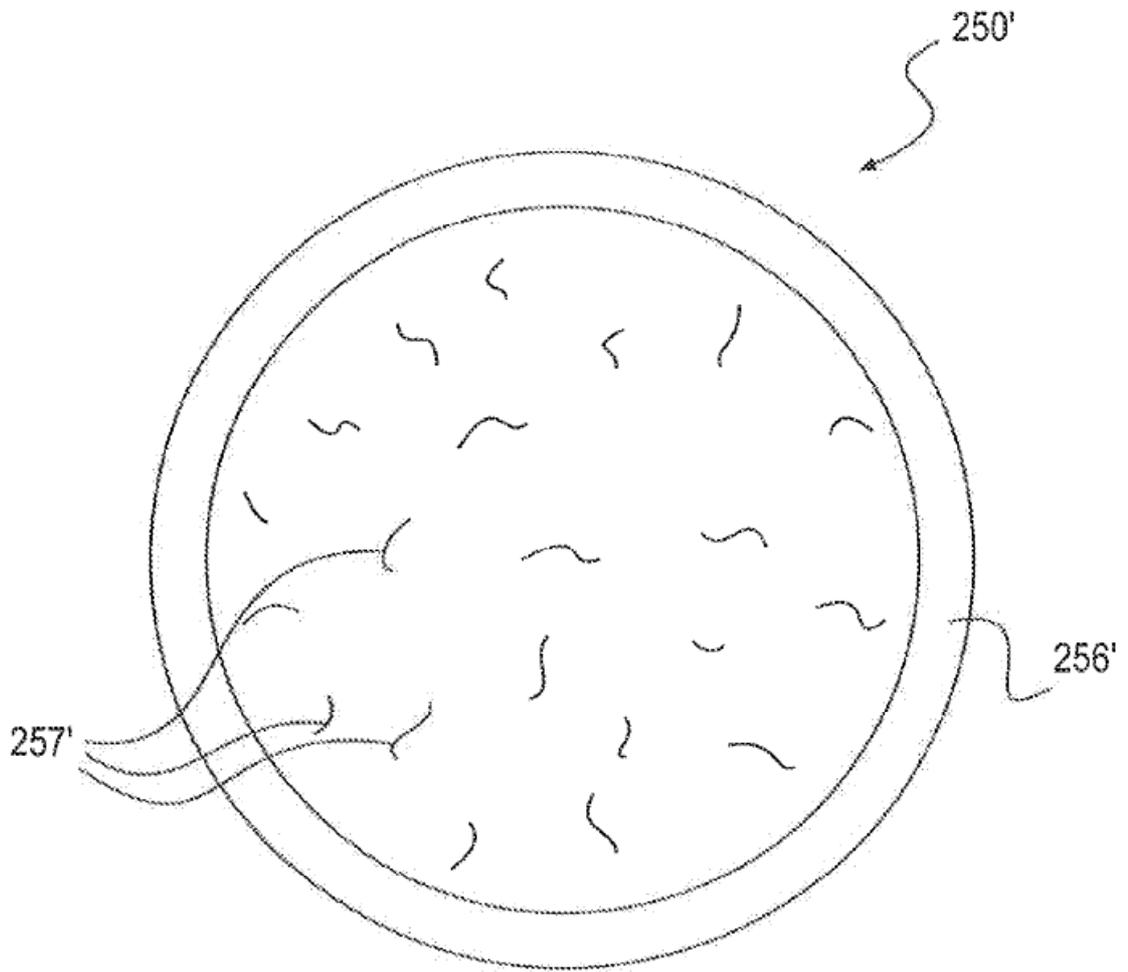


FIG. 4B

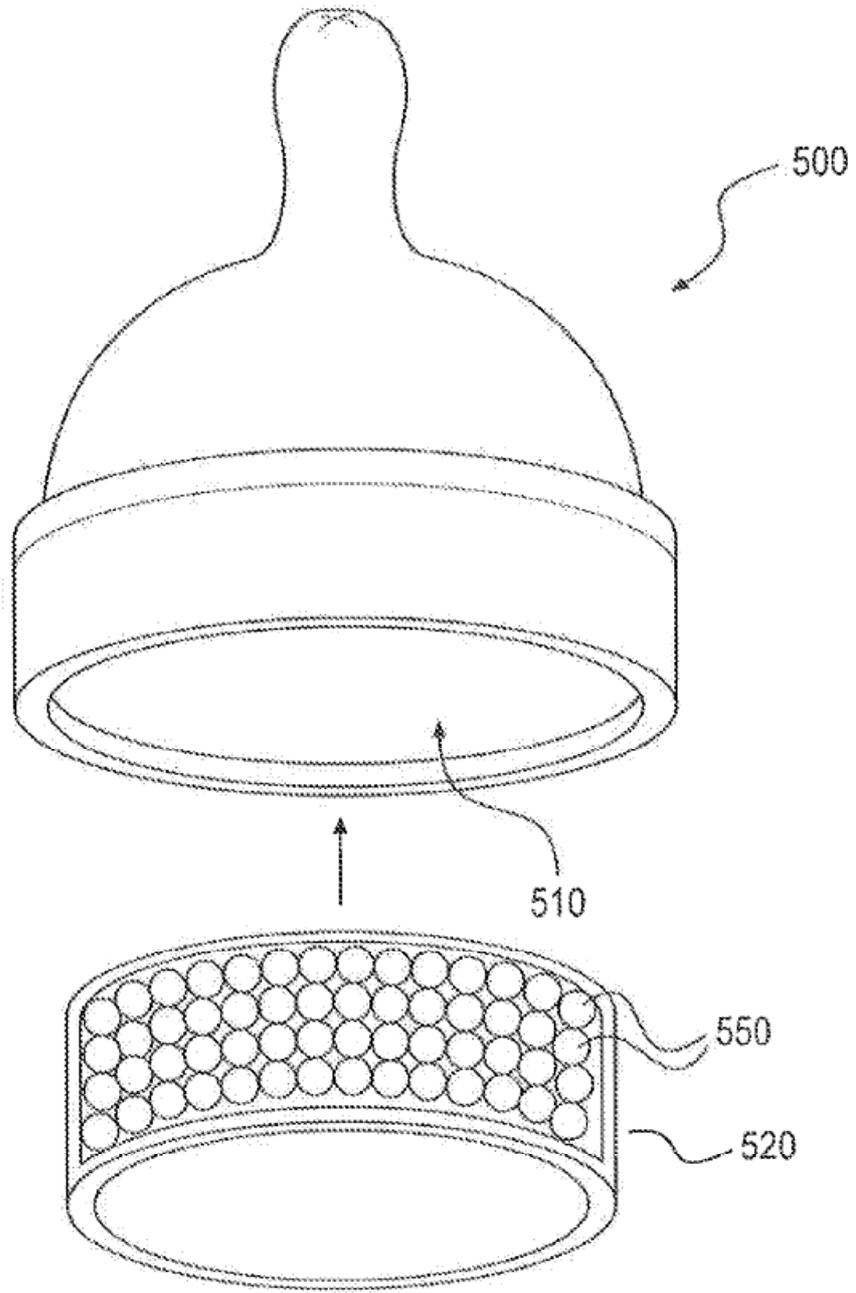


FIG. 5A

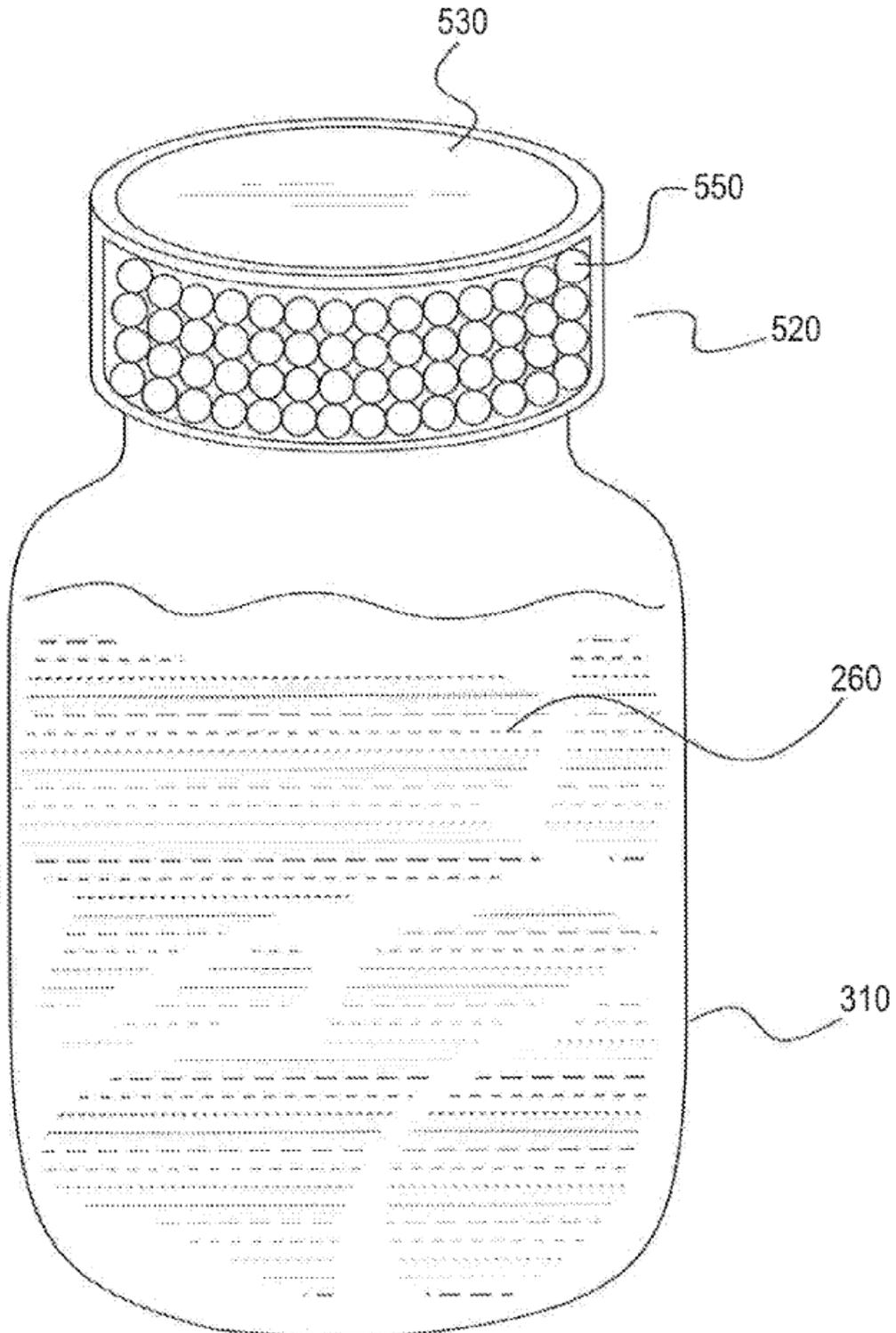


FIG. 5B

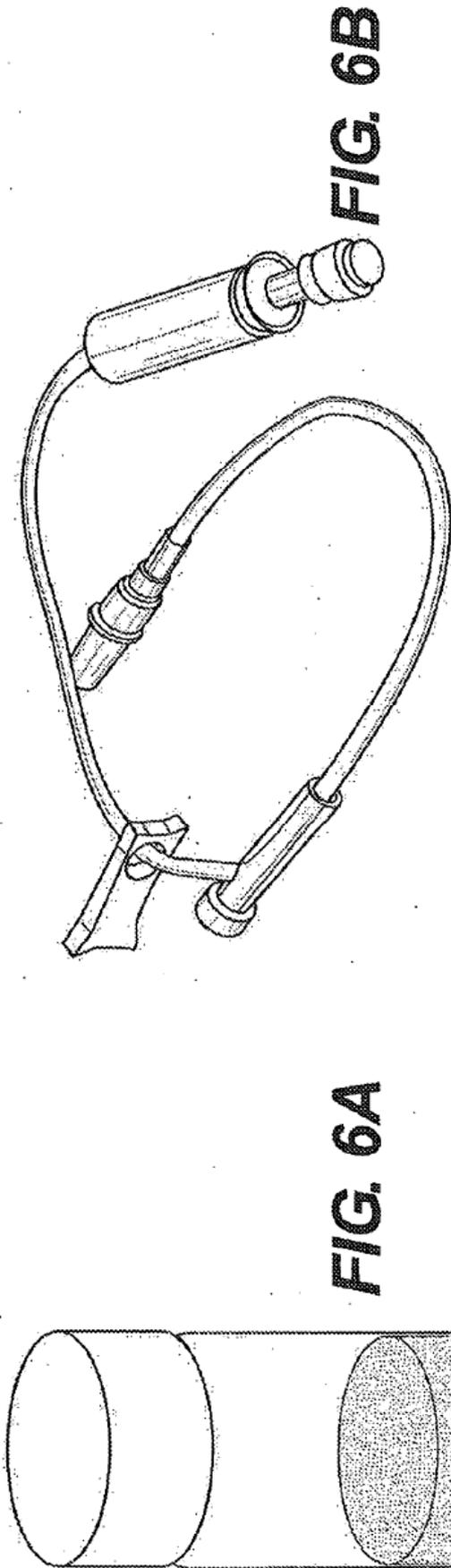


FIG. 6B

FIG. 6A

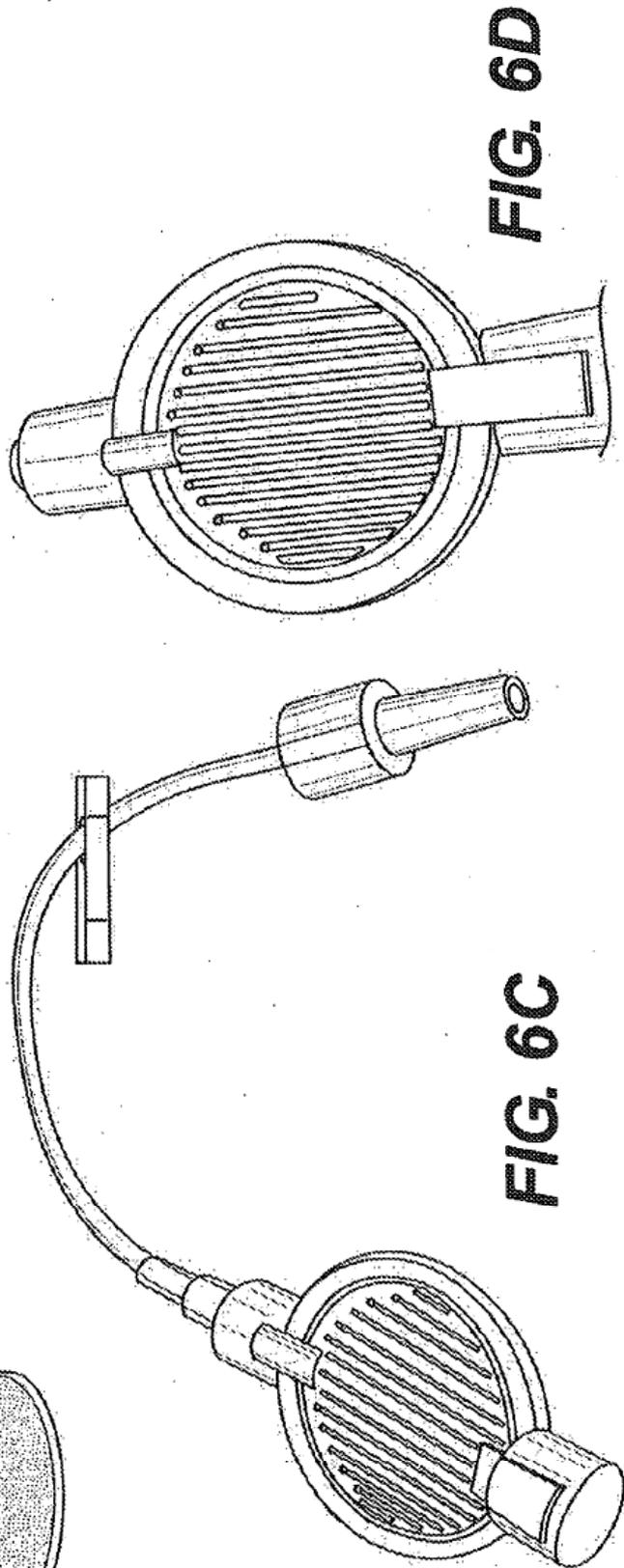


FIG. 6D

FIG. 6C

HIDRÓLISIS DEL TRIGLICÉRIDO DHA POR LIPASA RO

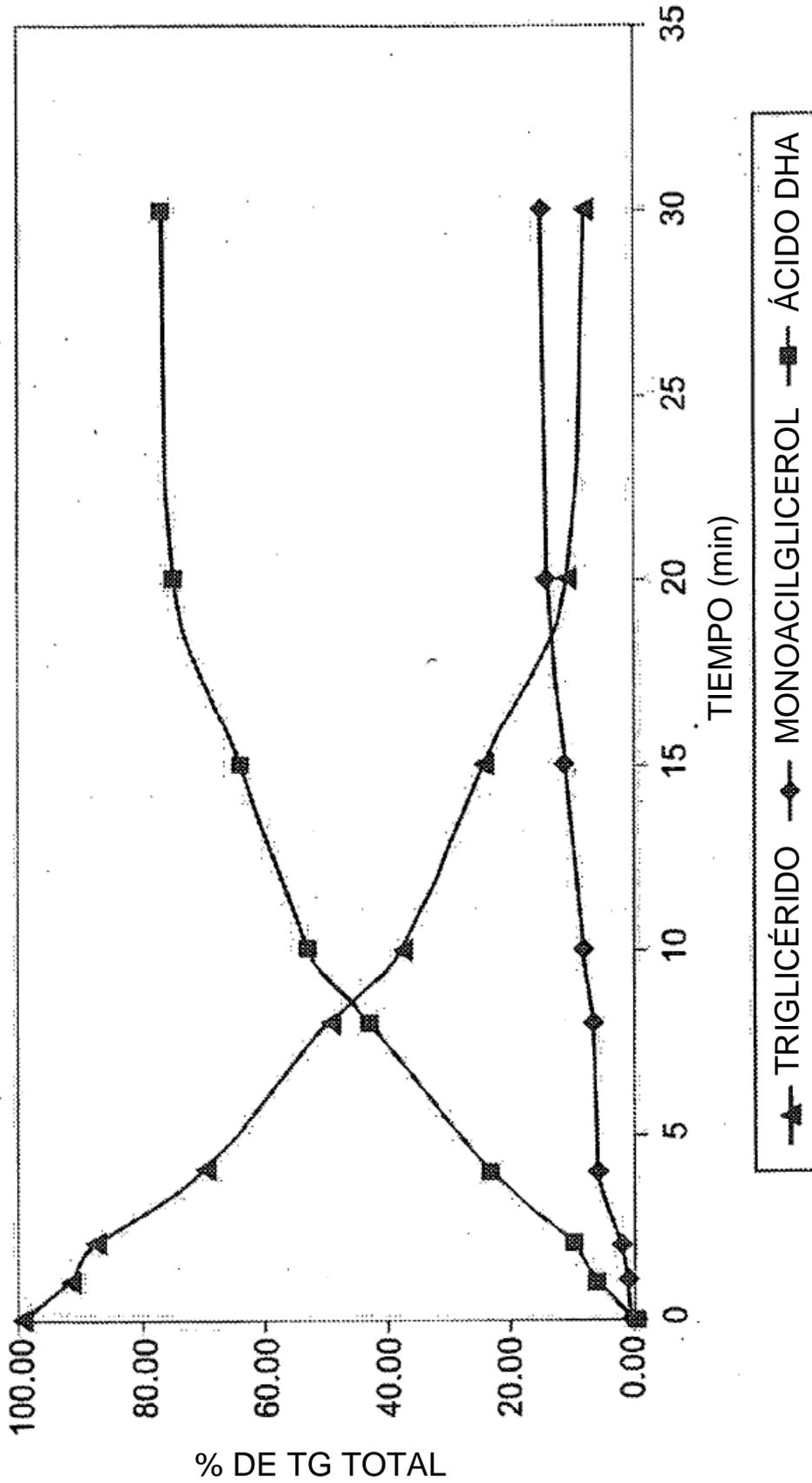


FIG. 7

HIDRÓLISIS DEL TRIGLICÉRIDO ARA POR LIPASA RO

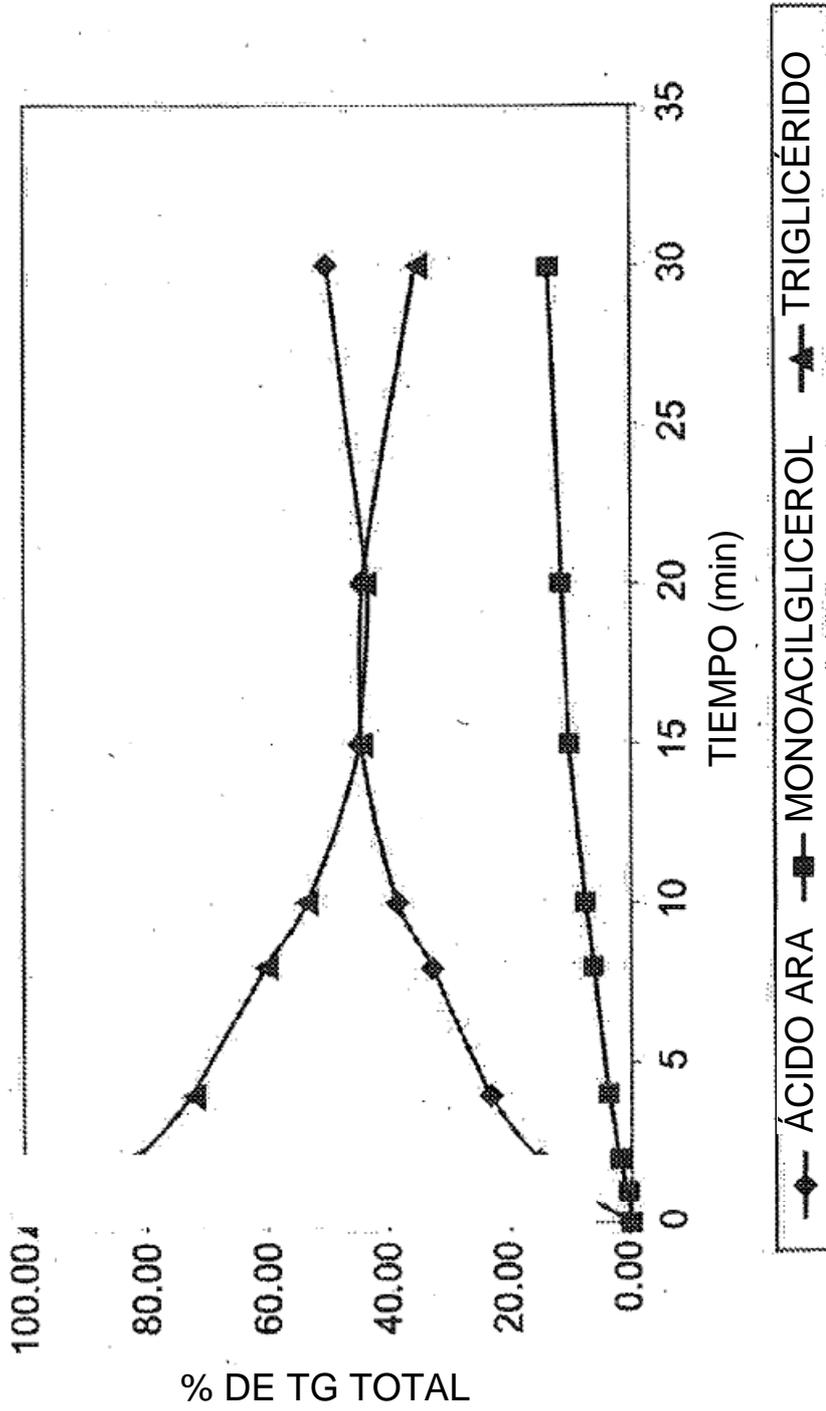


FIG. 8

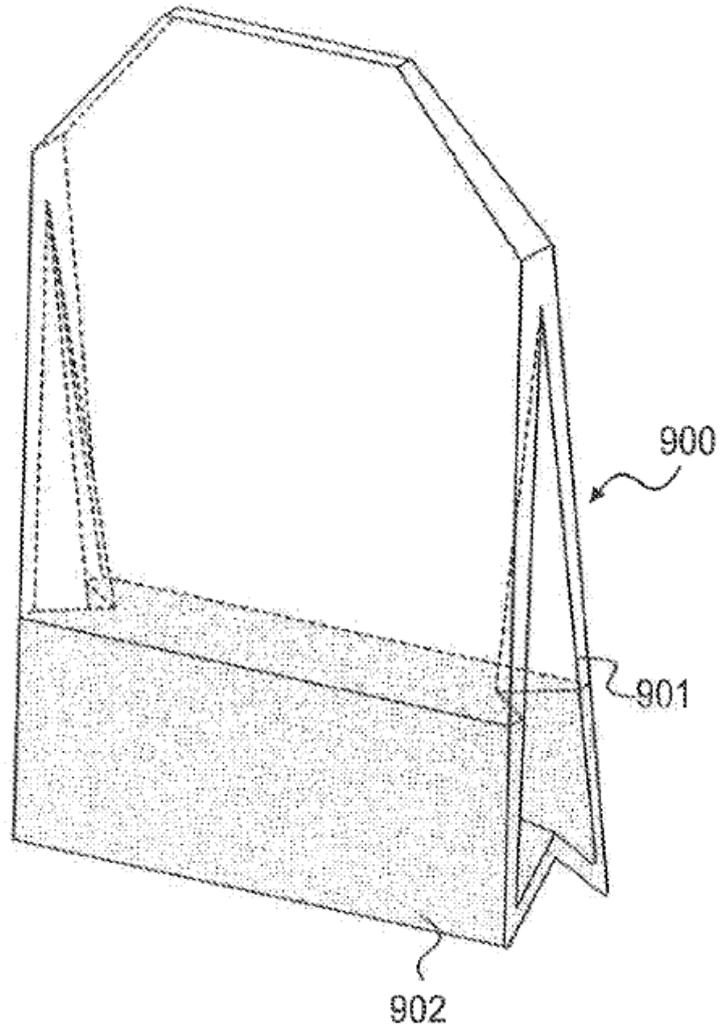


FIG. 9A

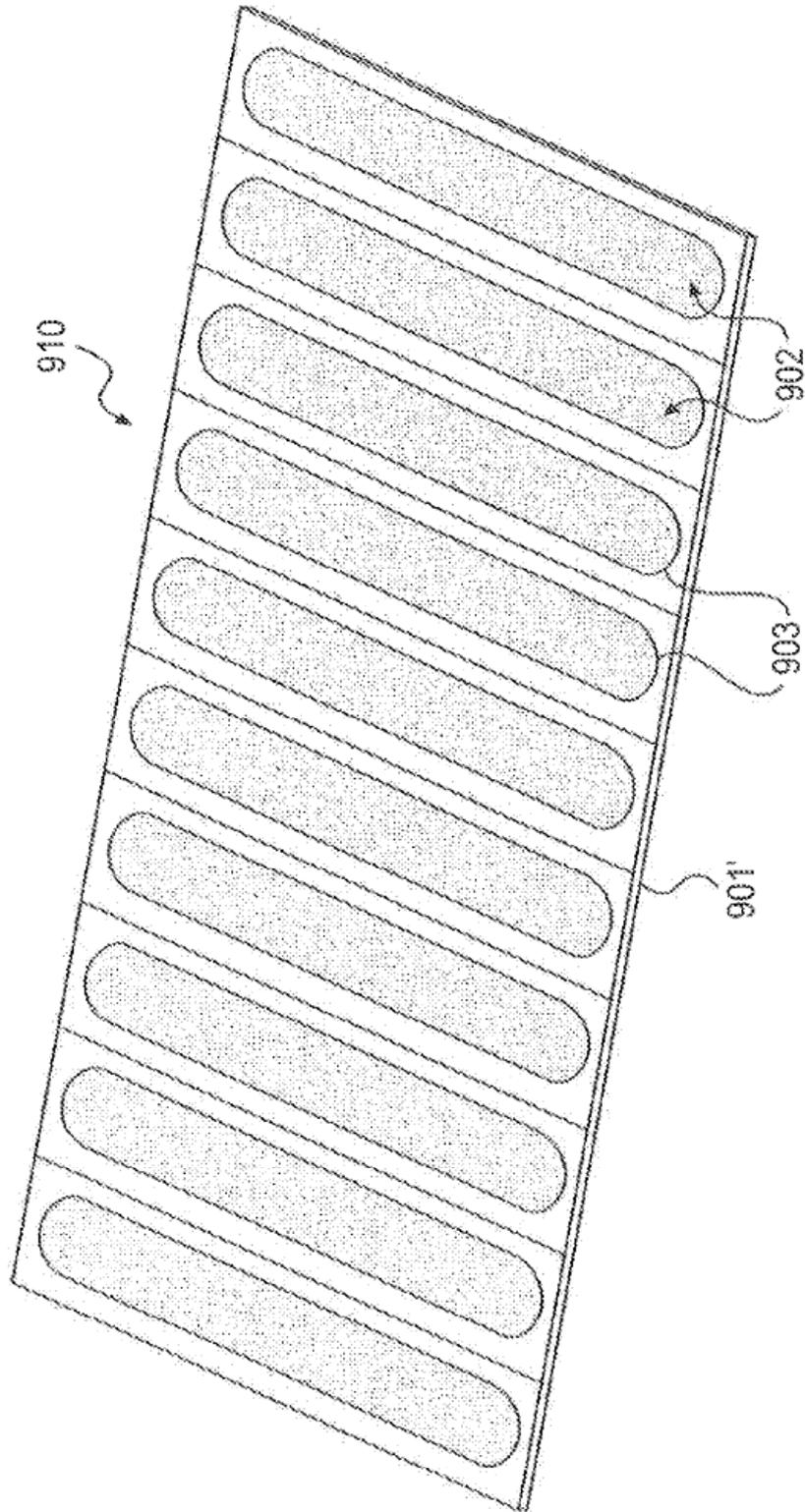


FIG. 9B

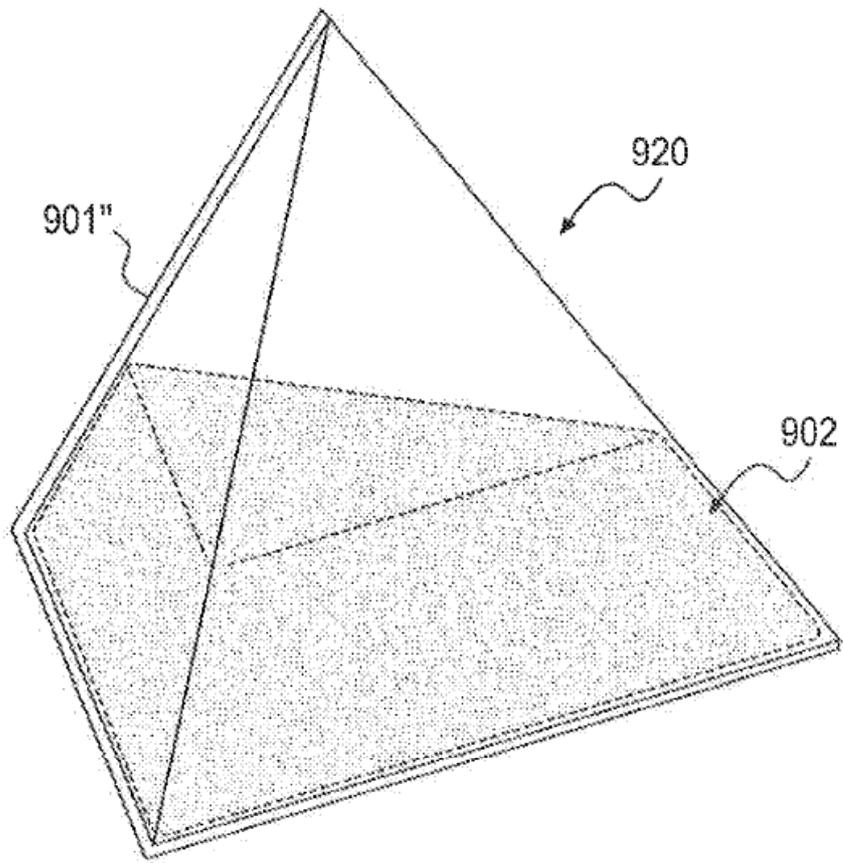


FIG. 9C

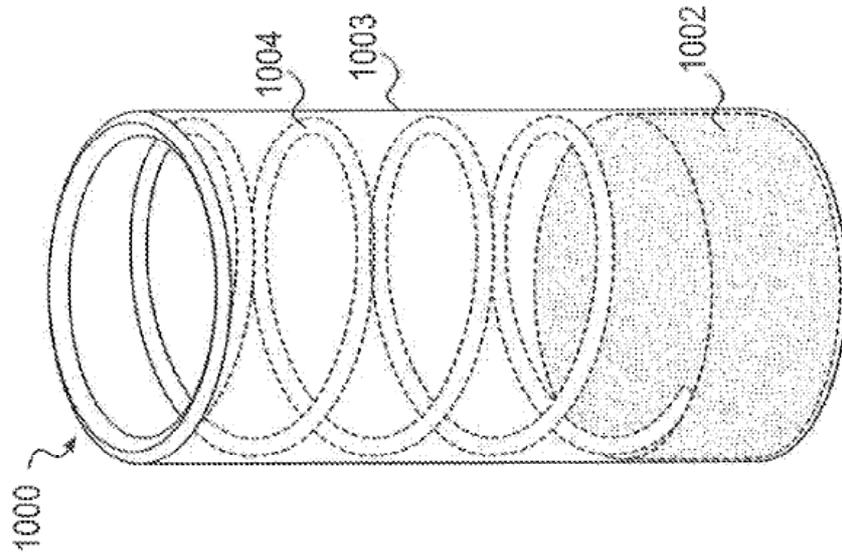


FIG. 10C

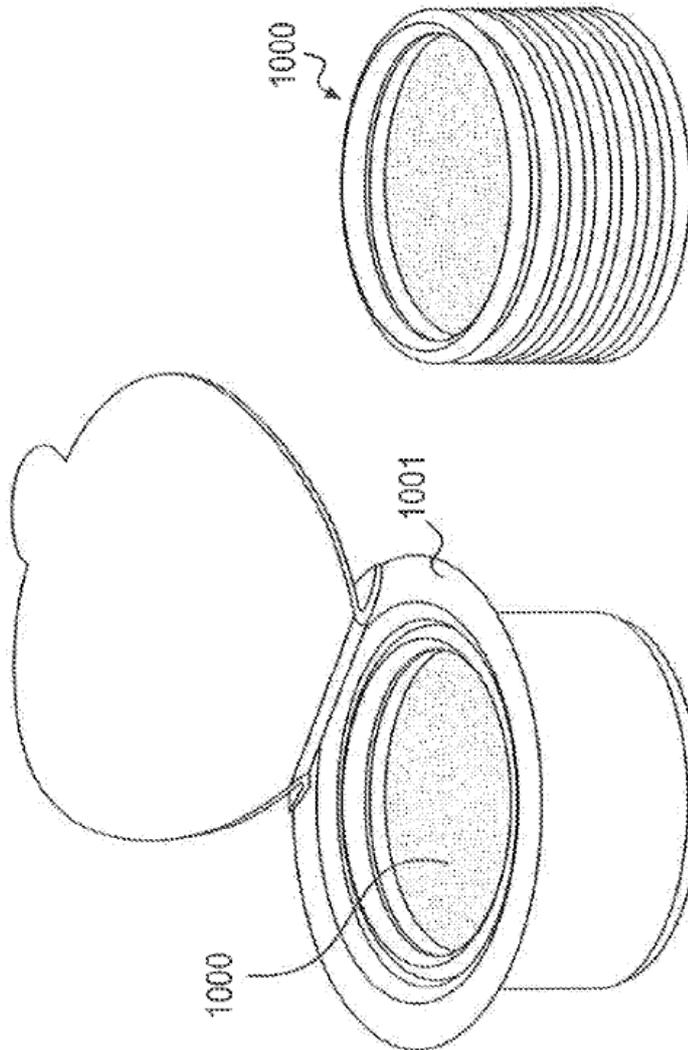
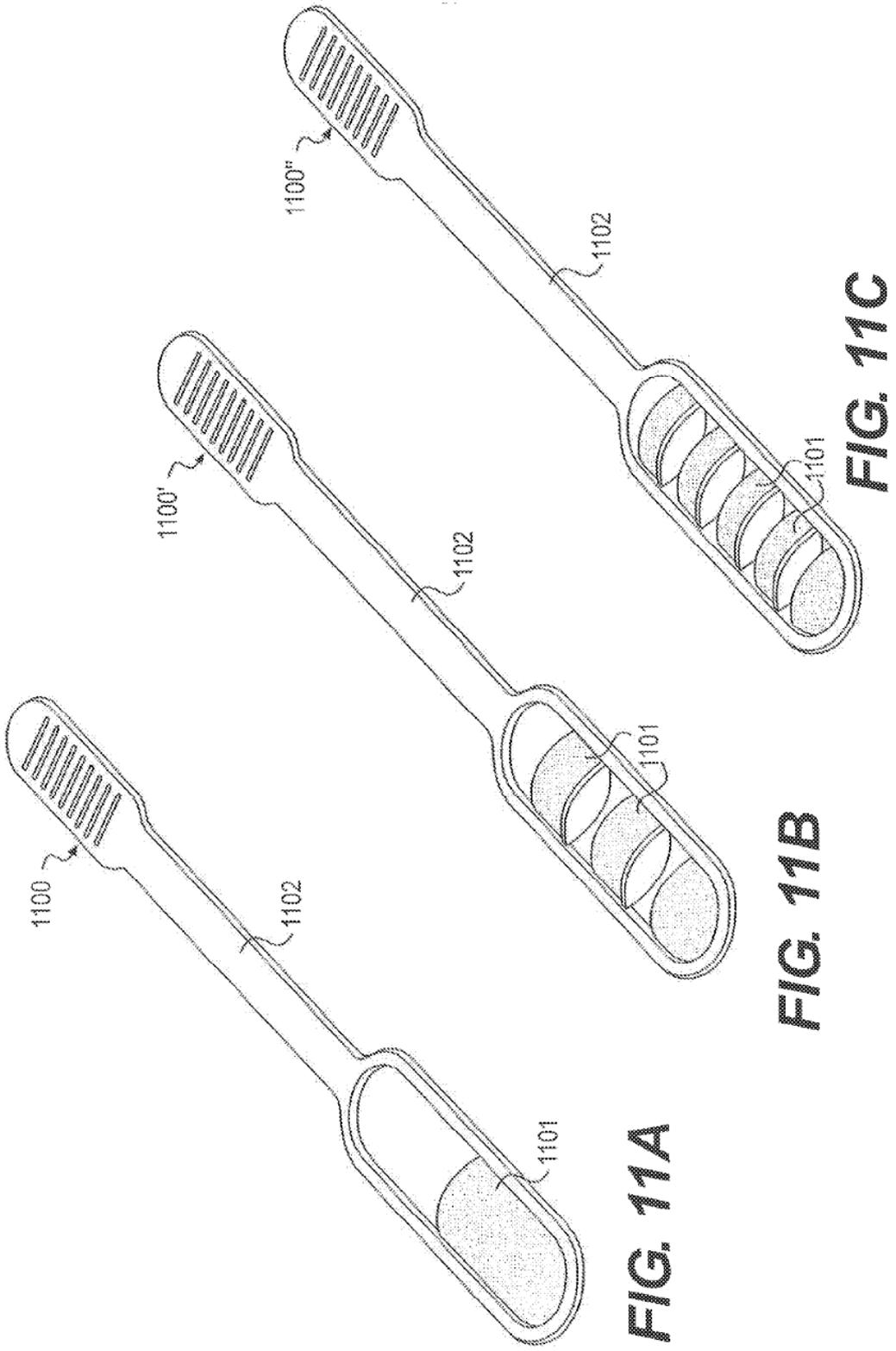


FIG. 10B

FIG. 10A



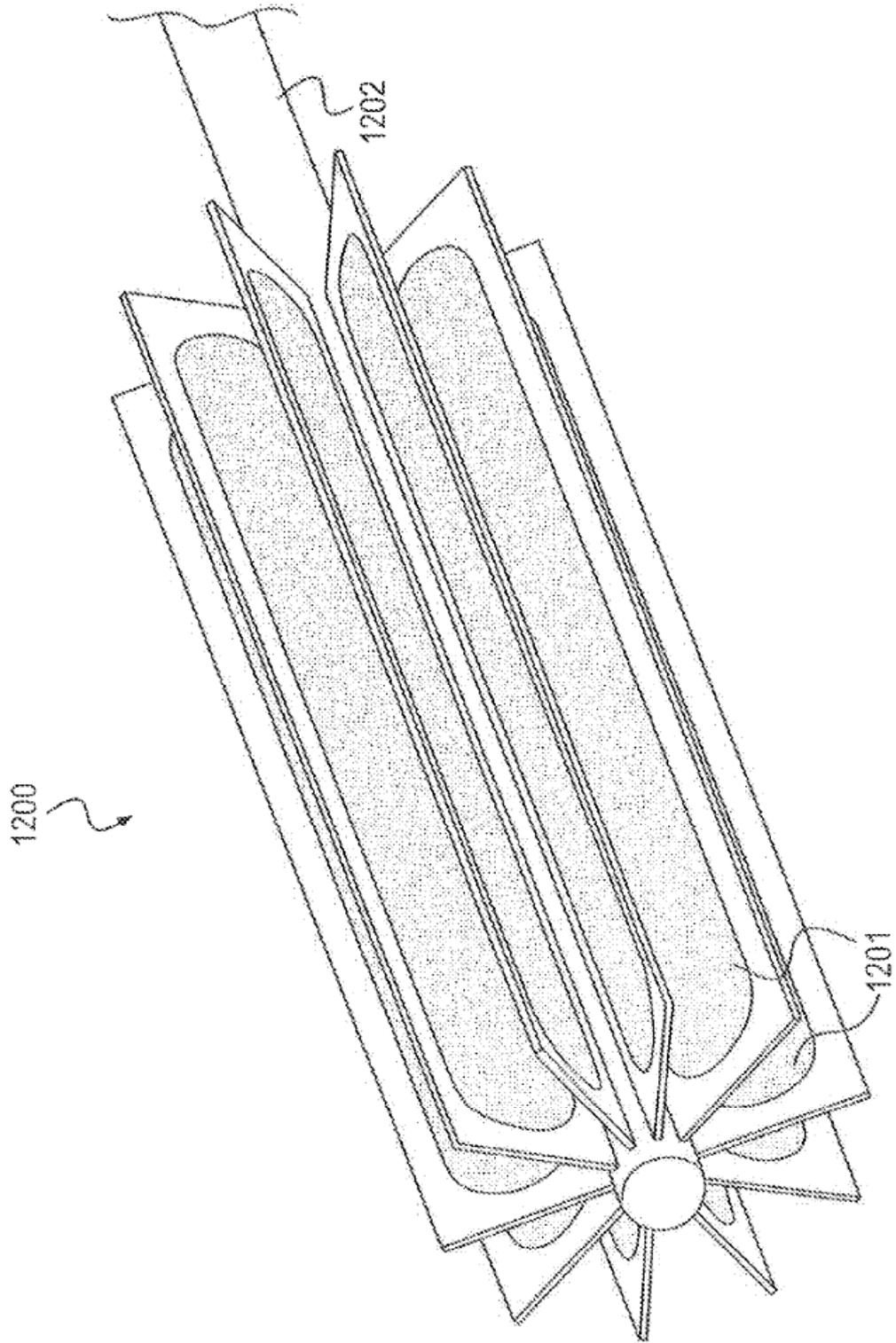


FIG. 12

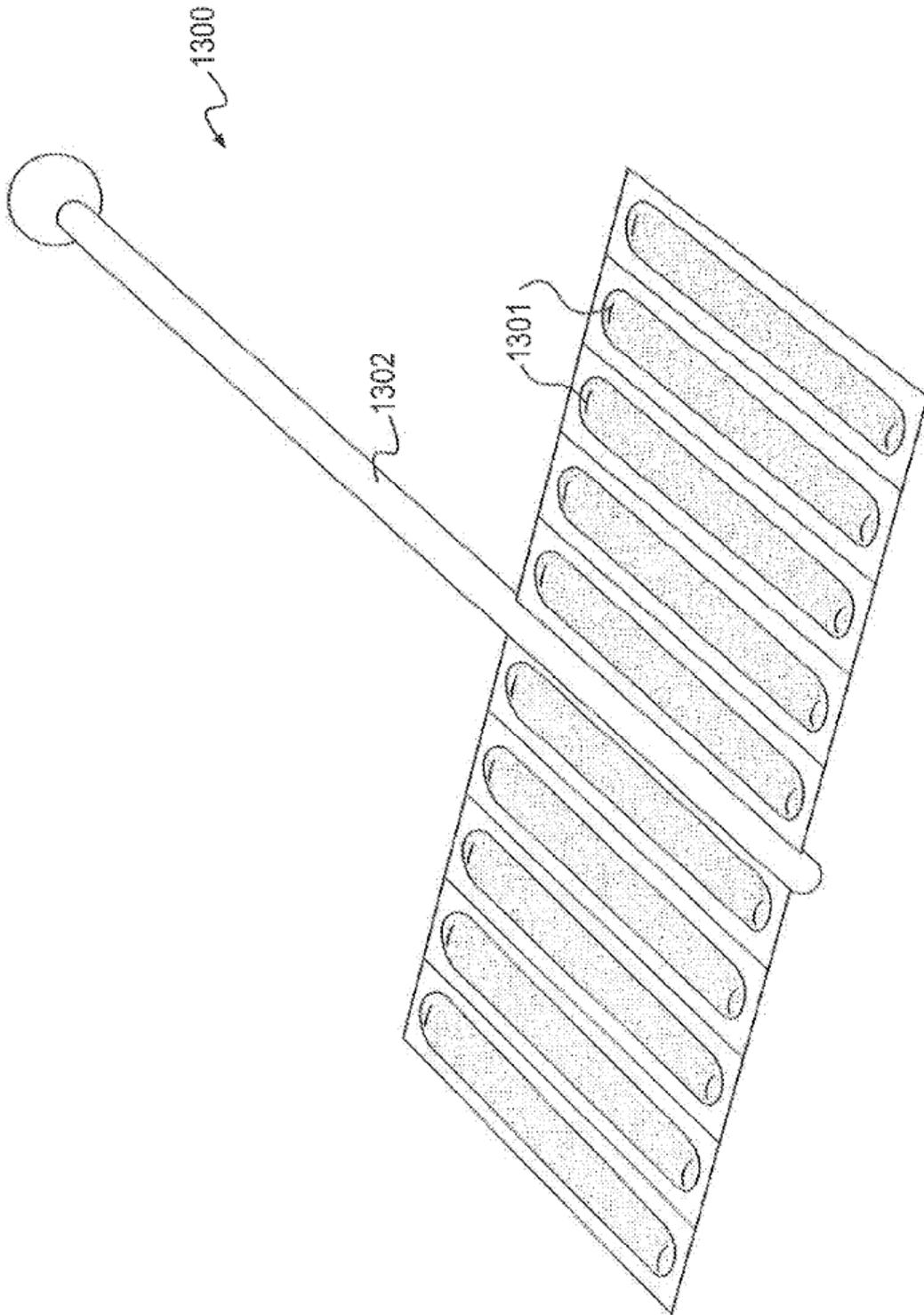


FIG. 13A

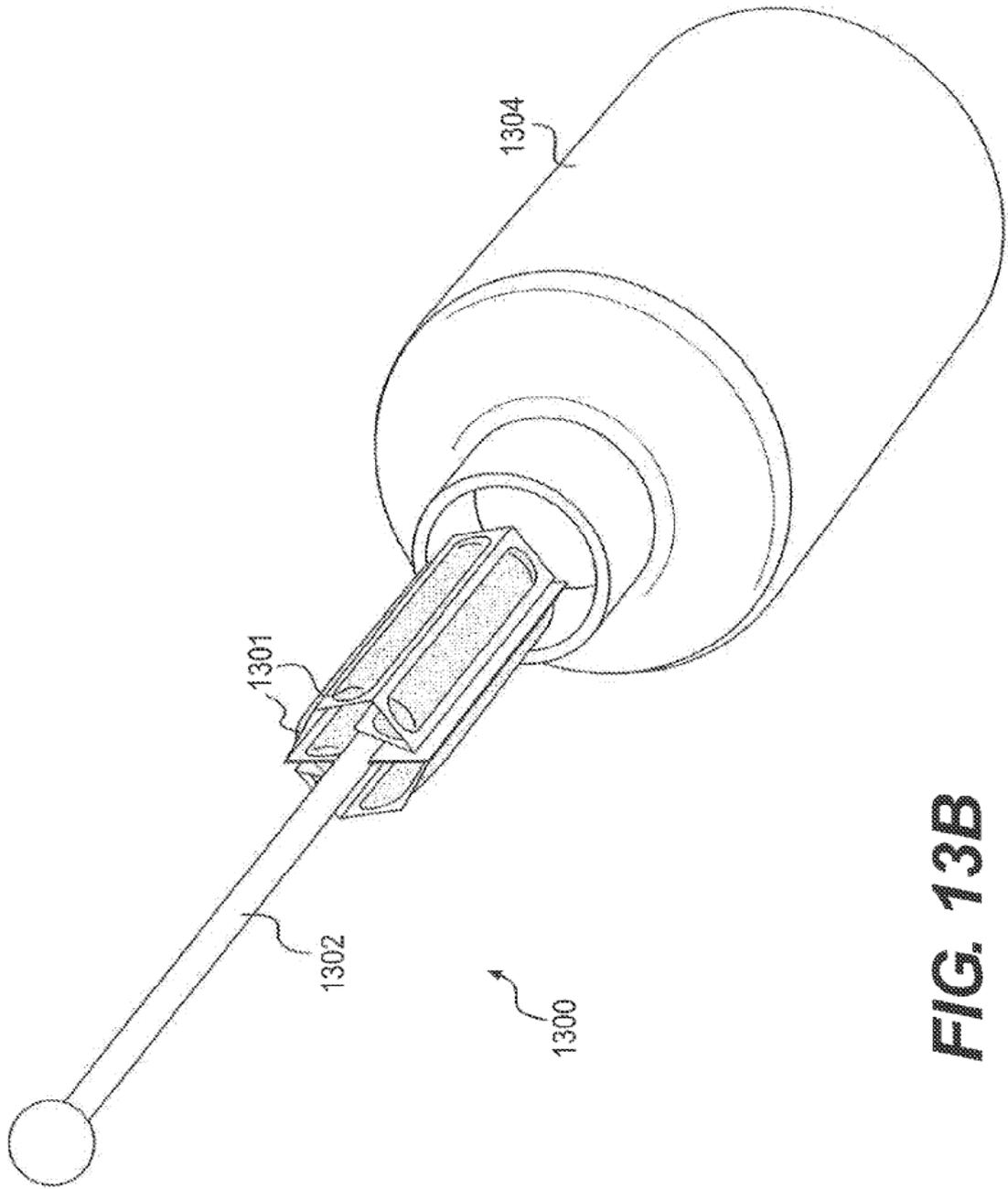


FIG. 13B

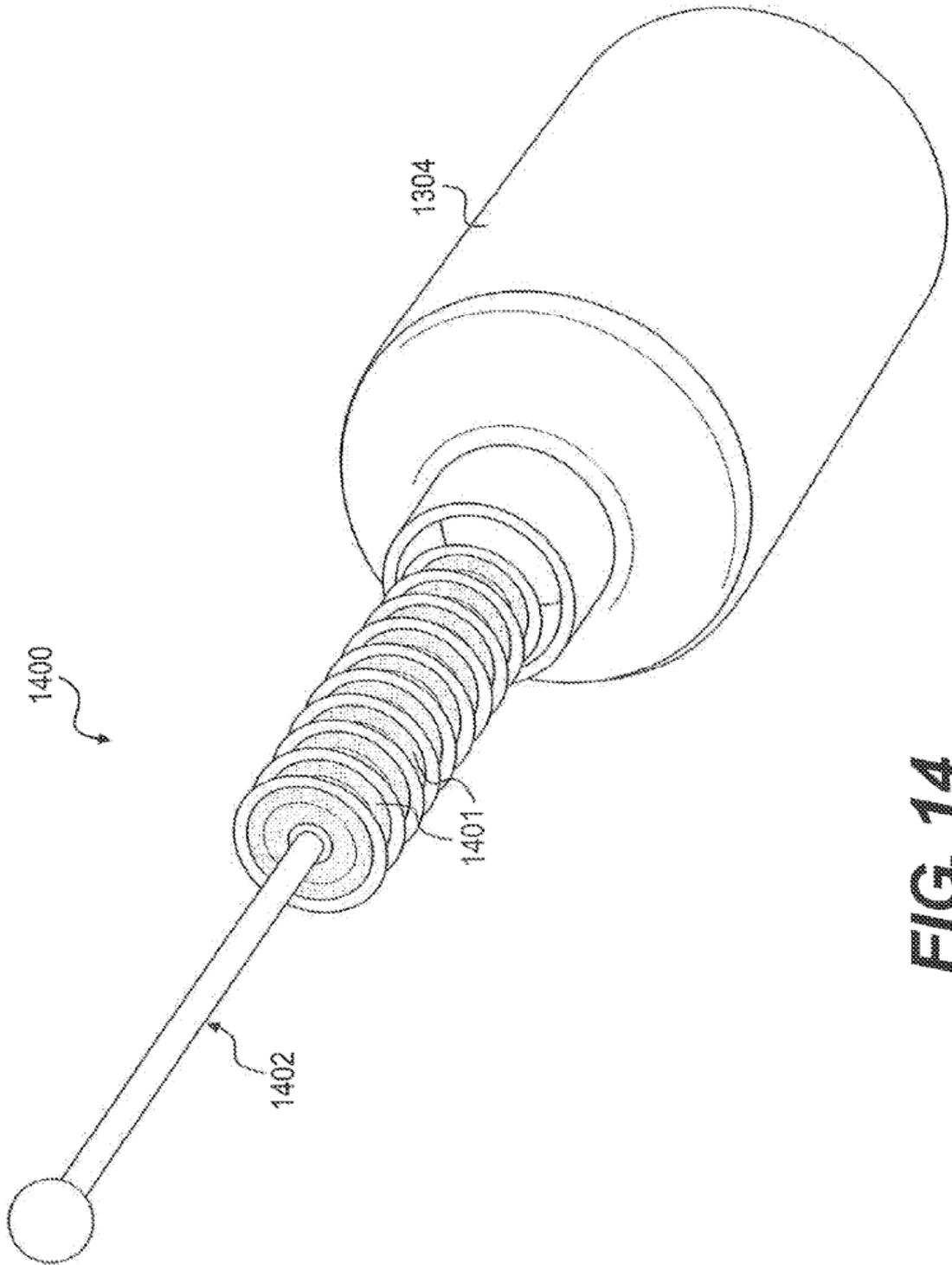


FIG. 14

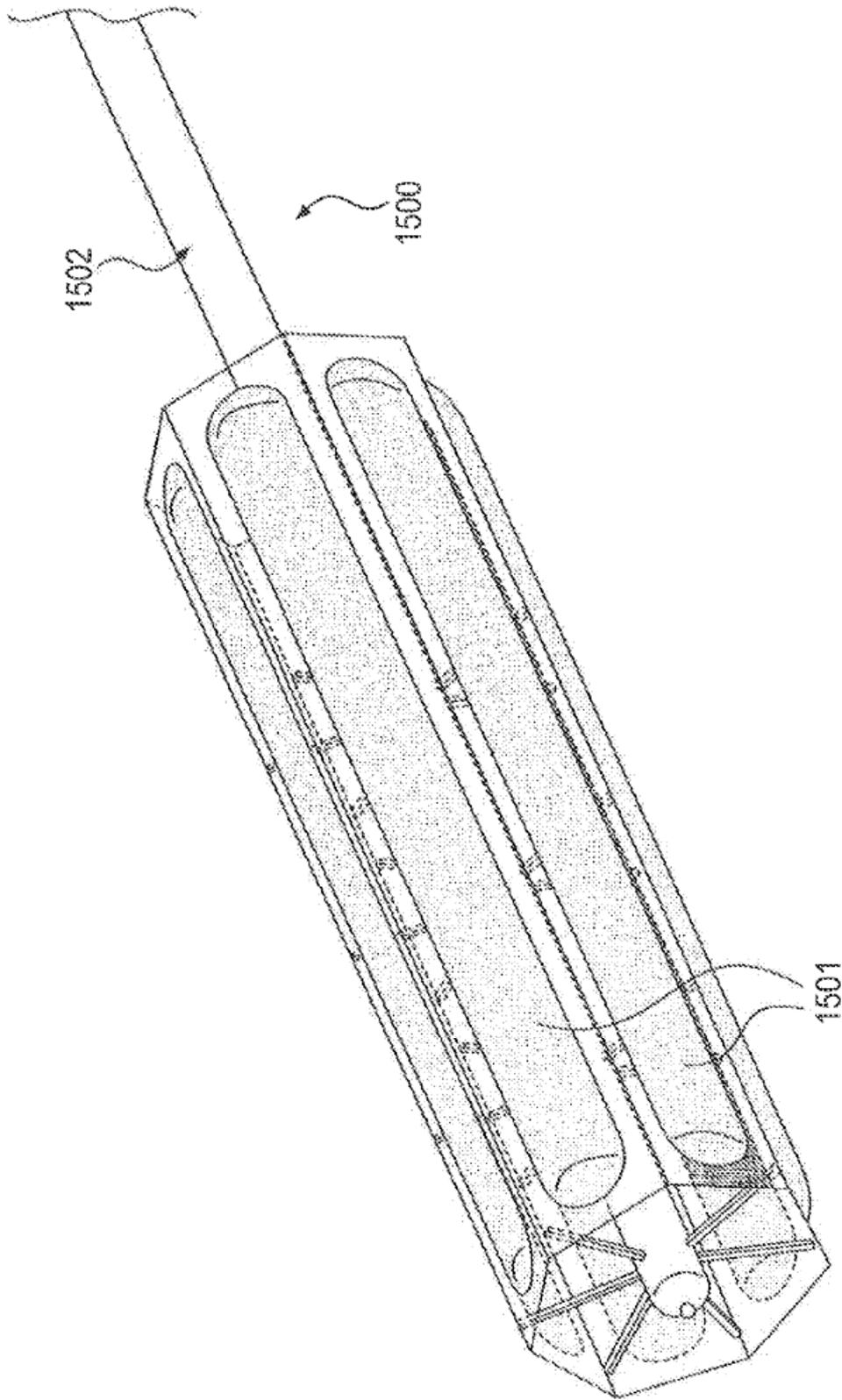


FIG. 15

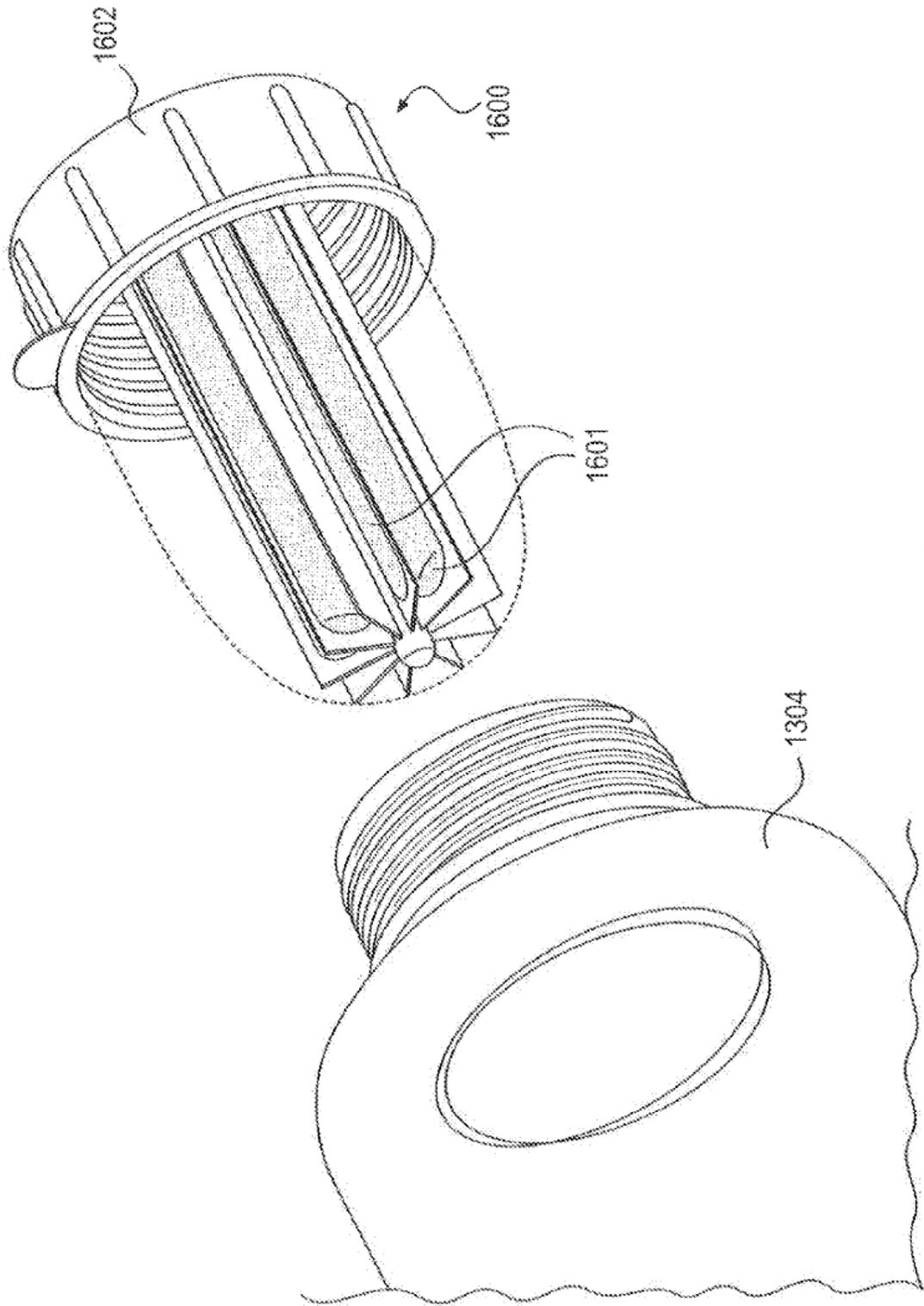


FIG. 16

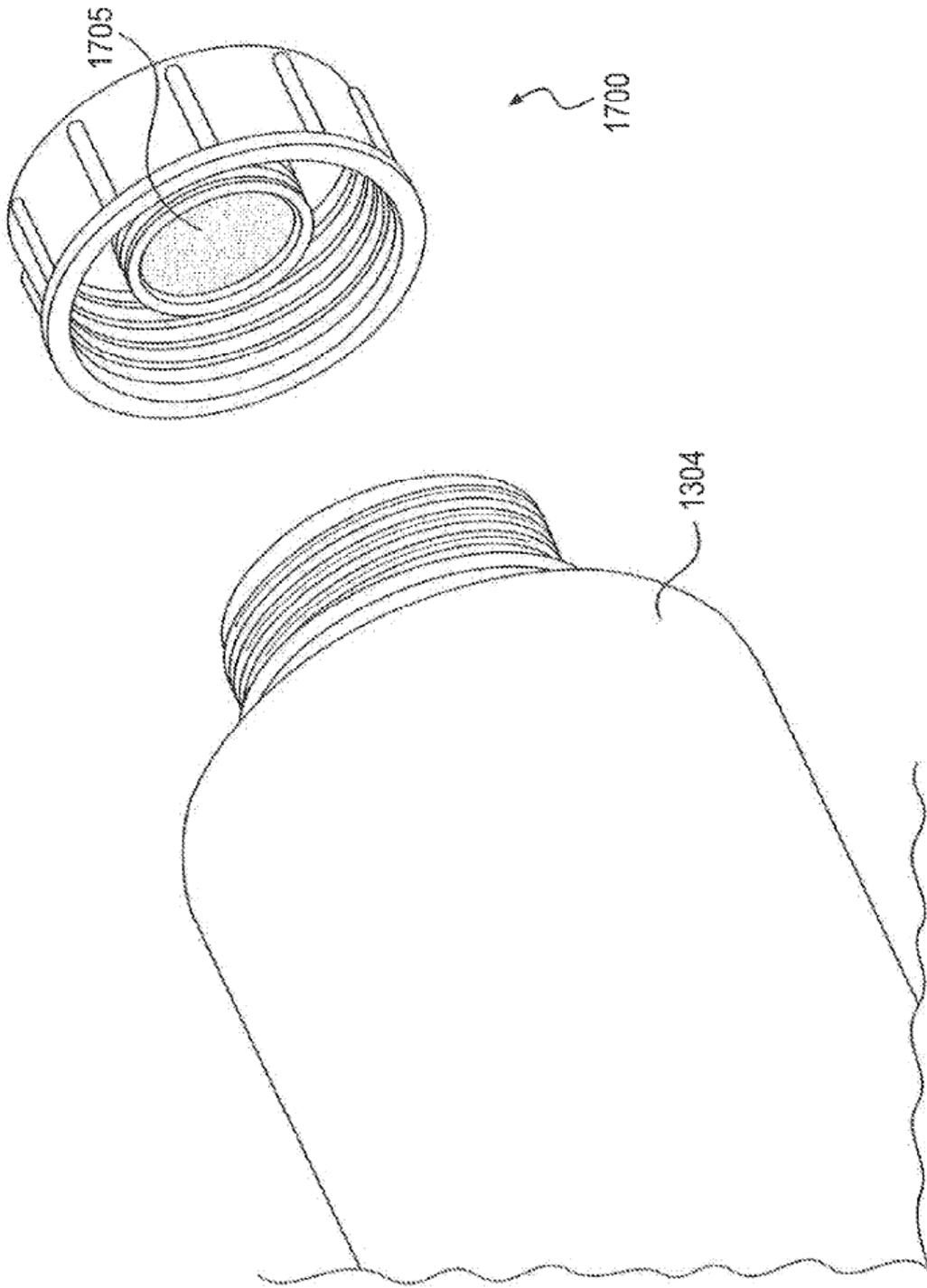


FIG. 17A

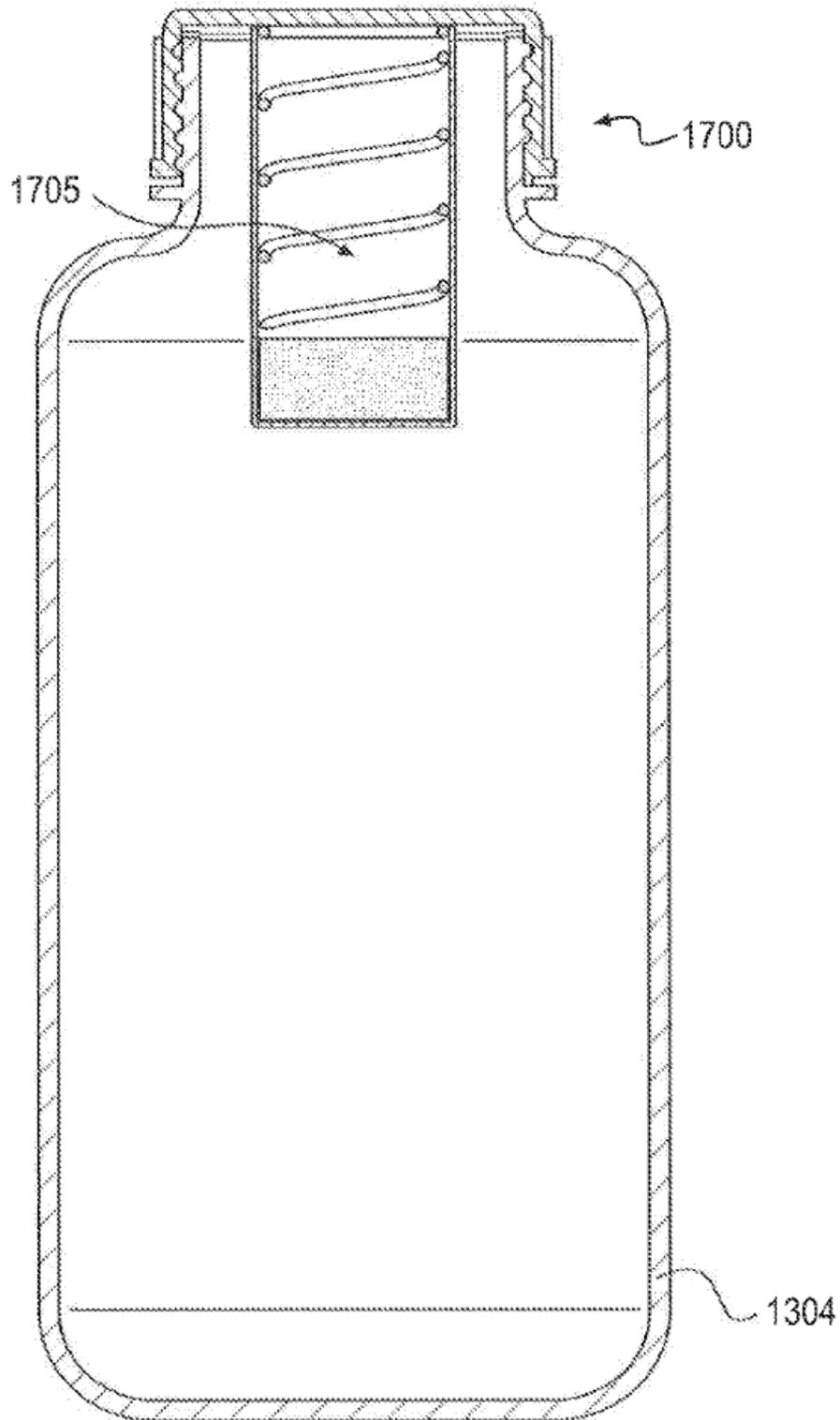


FIG. 17B

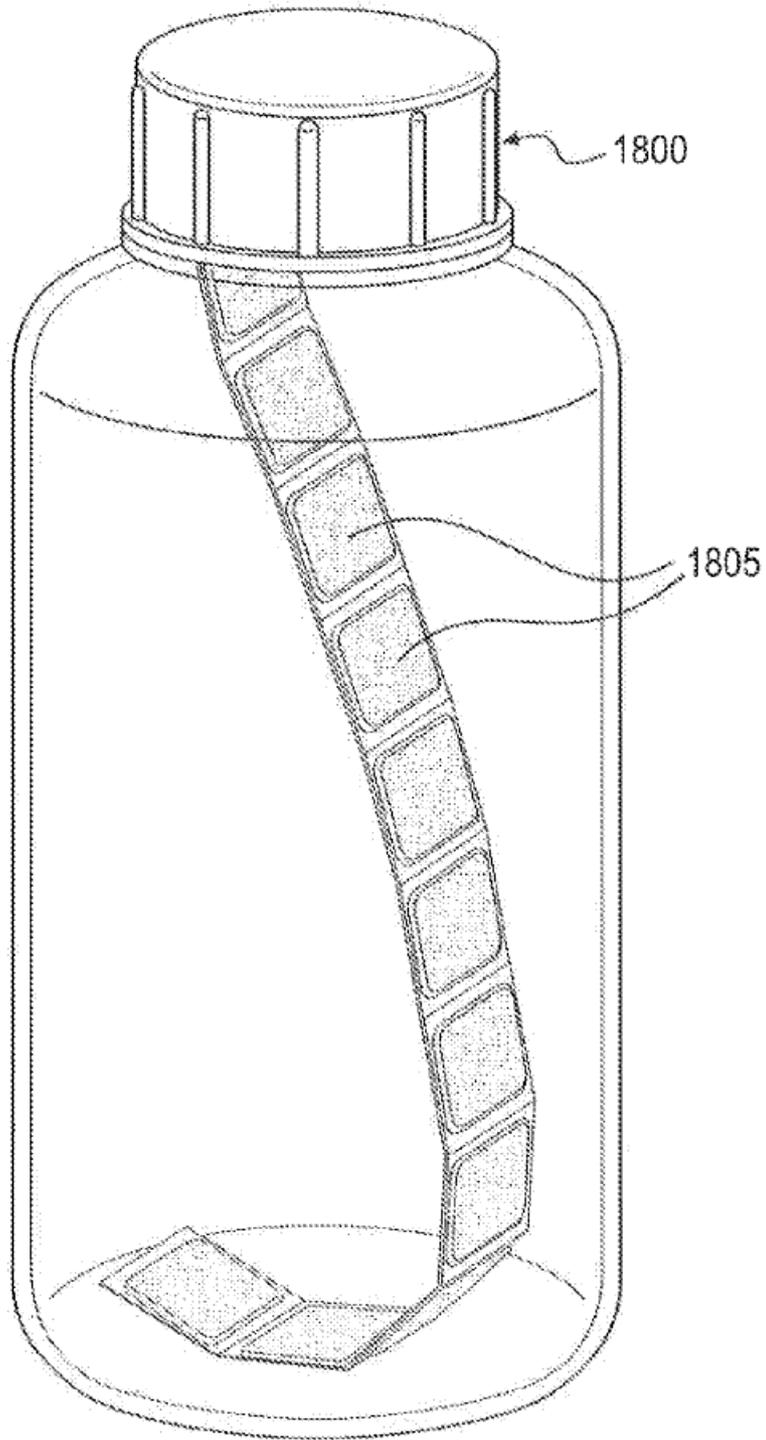


FIG. 18

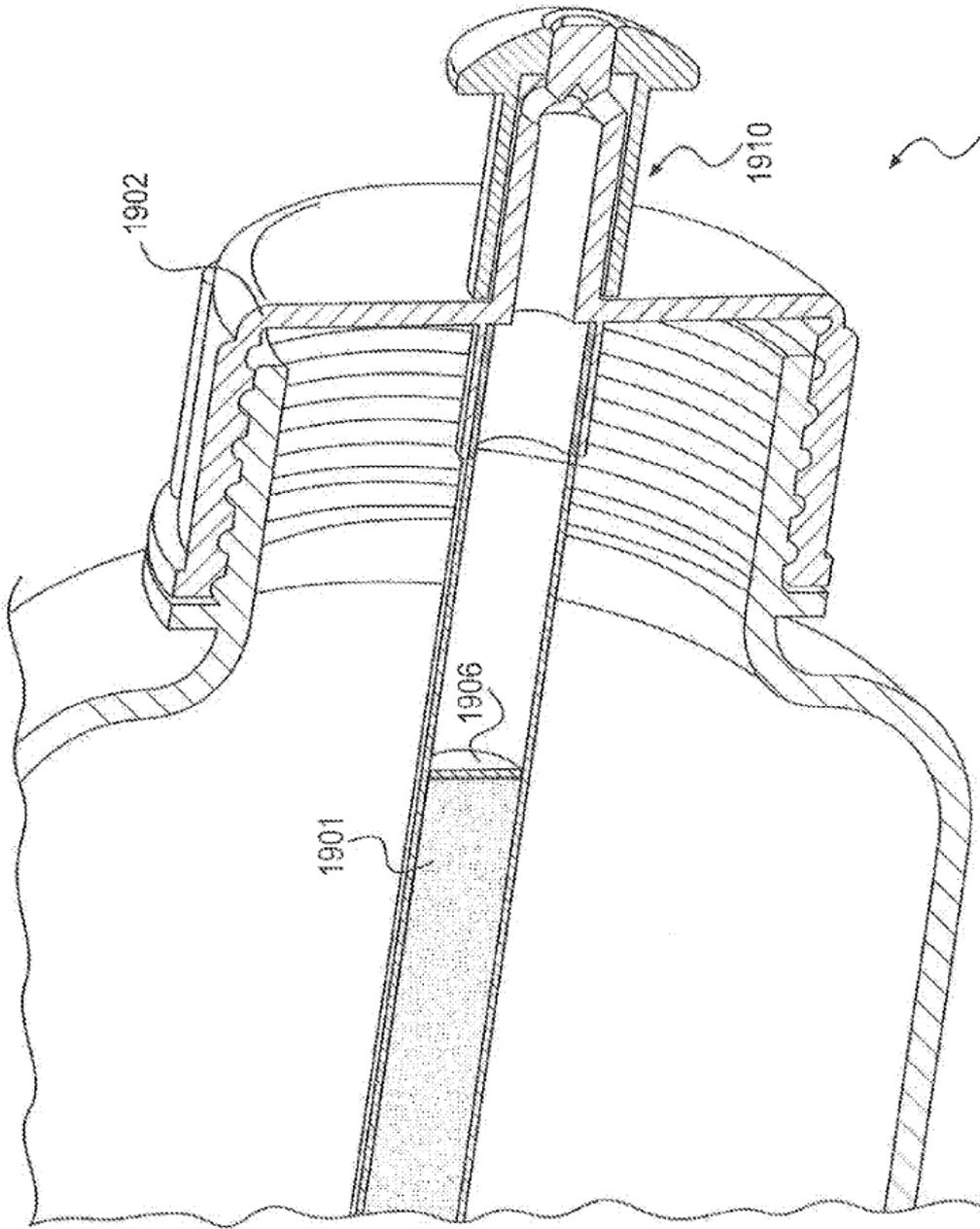


FIG. 19

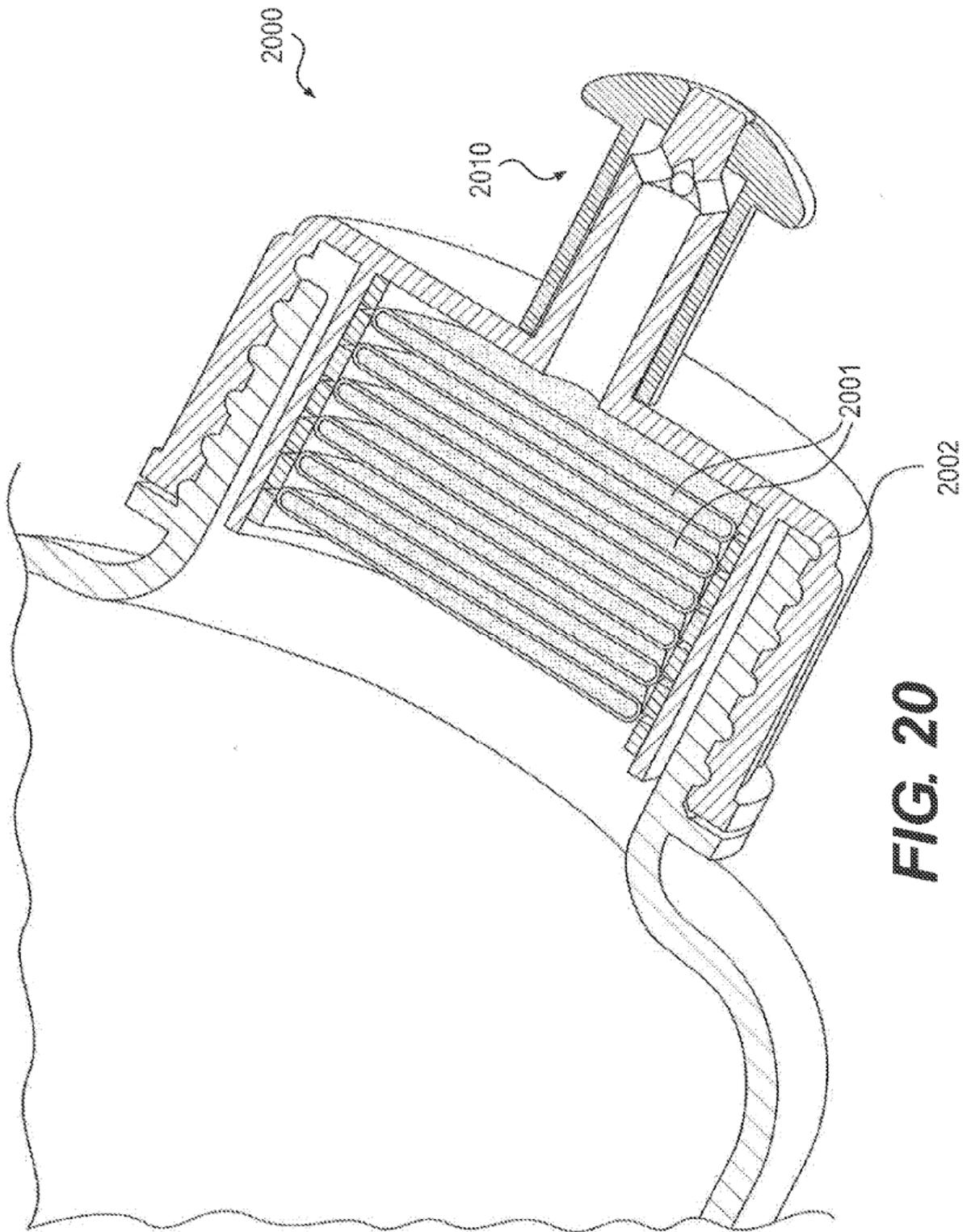


FIG. 20

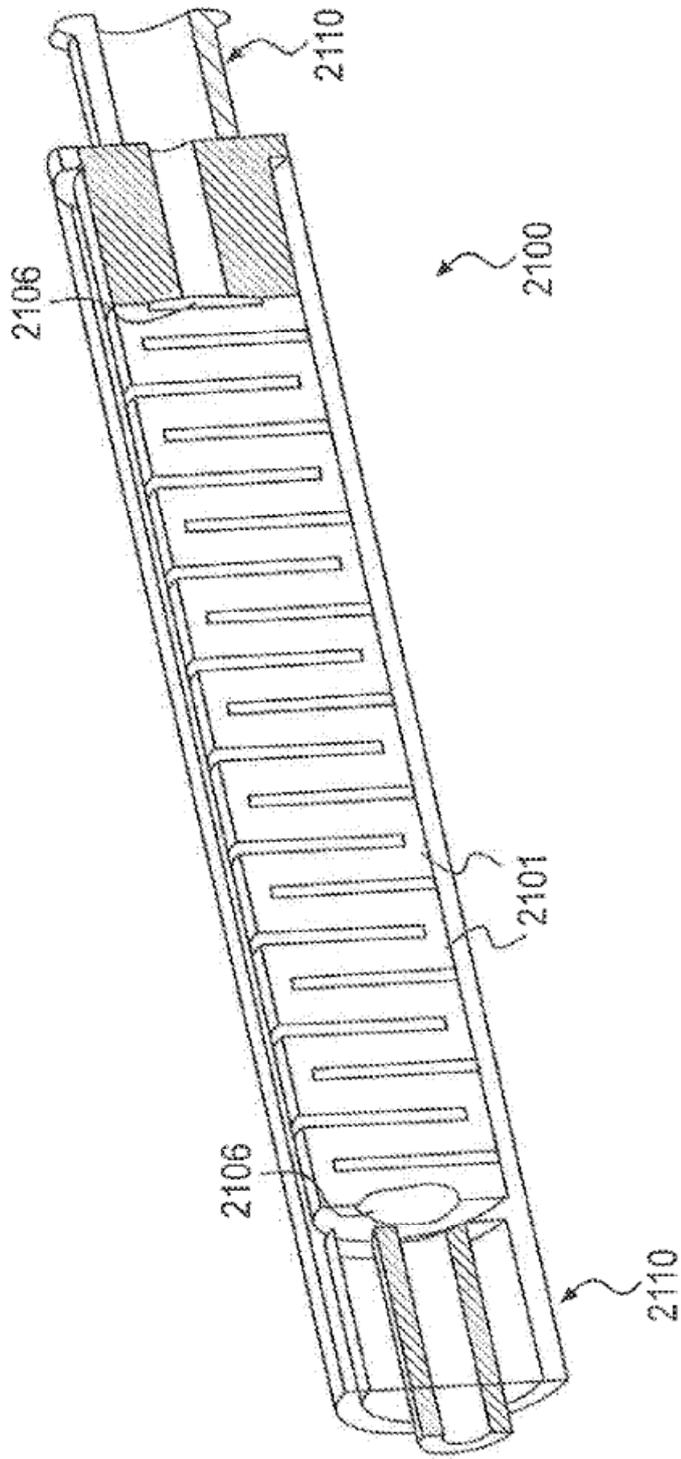


FIG. 21

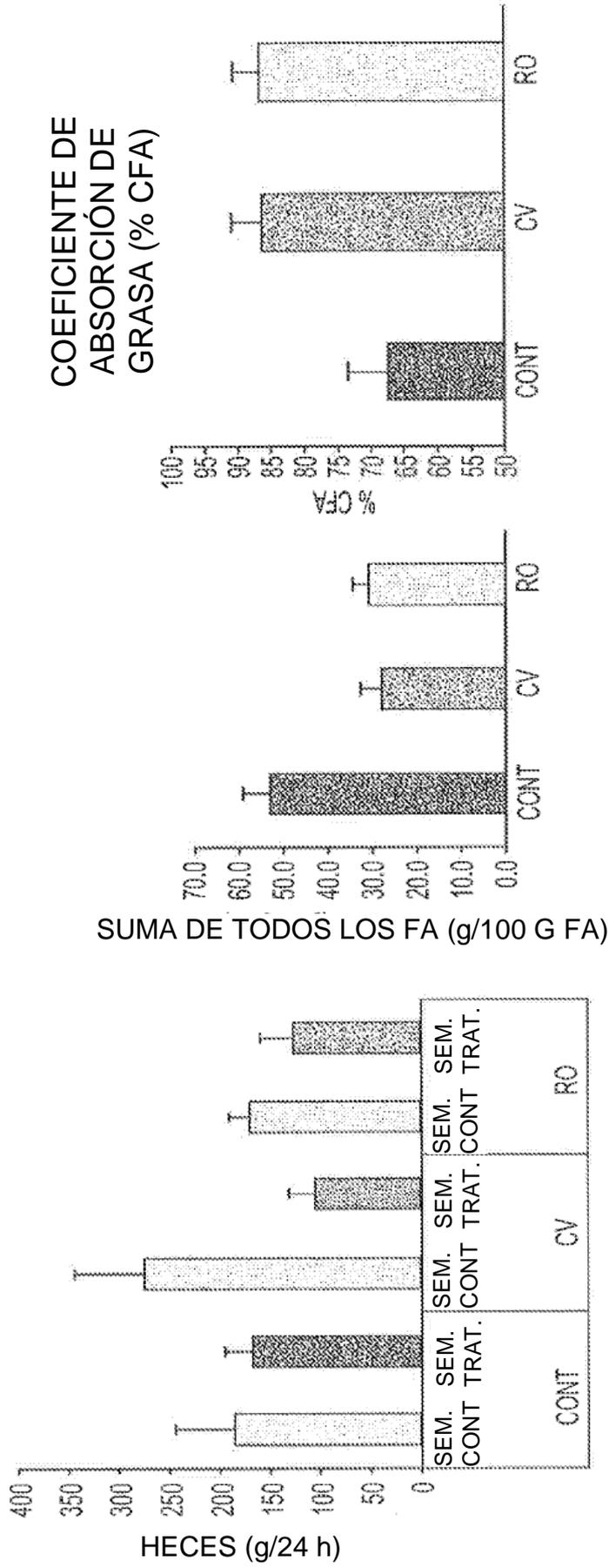


FIG. 22A

FIG. 22B

FIG. 22C

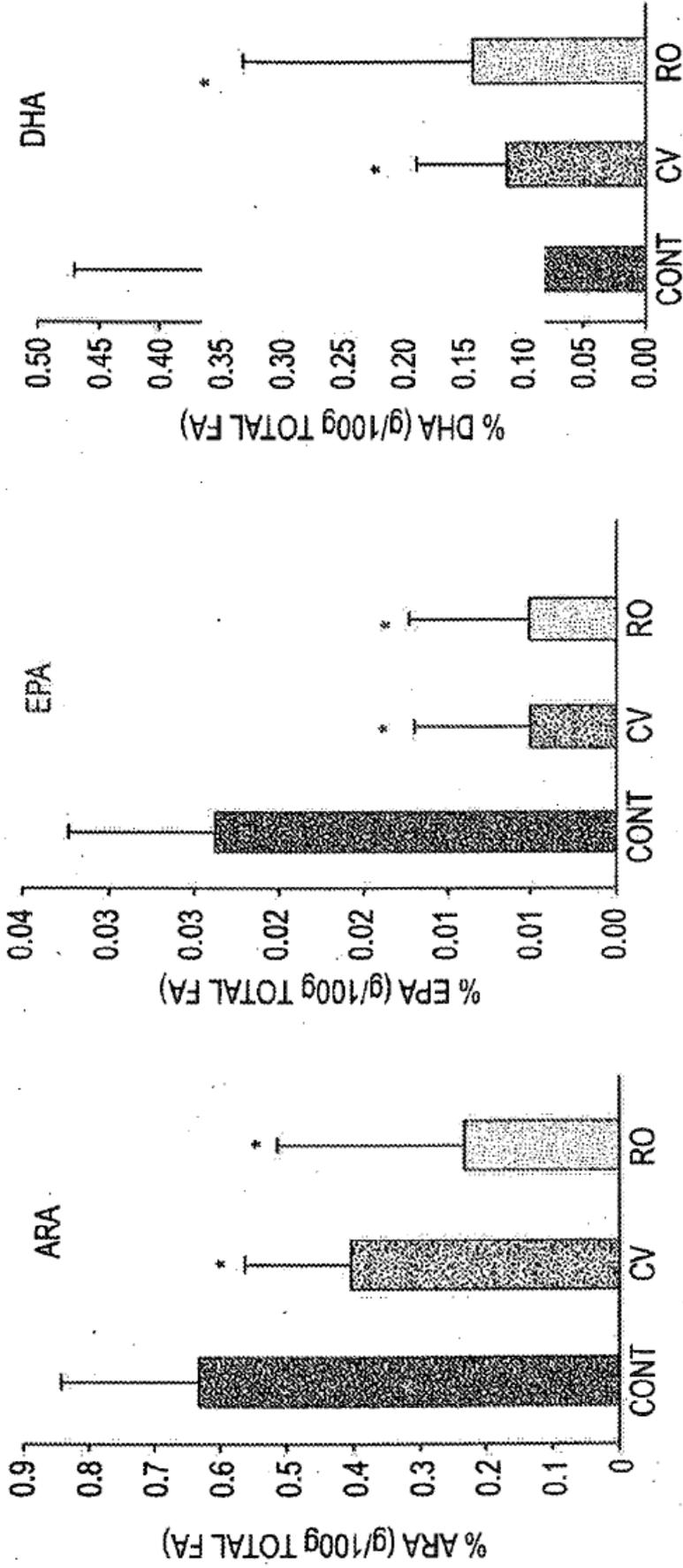


FIG. 23A

FIG. 23B

FIG. 23C

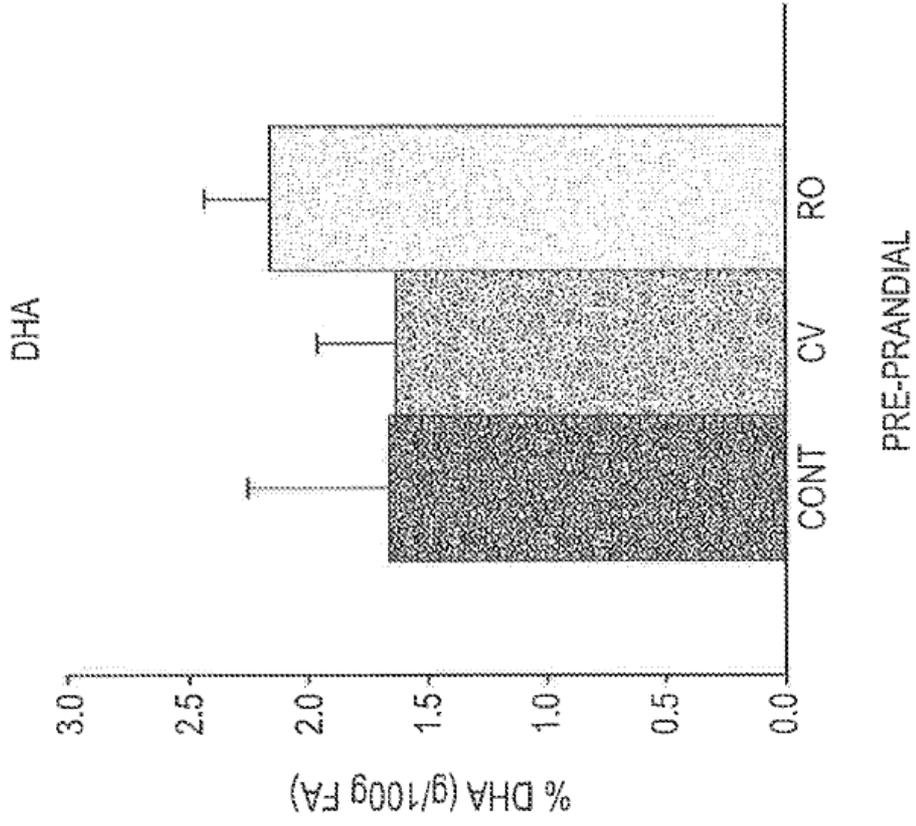


FIG. 24B

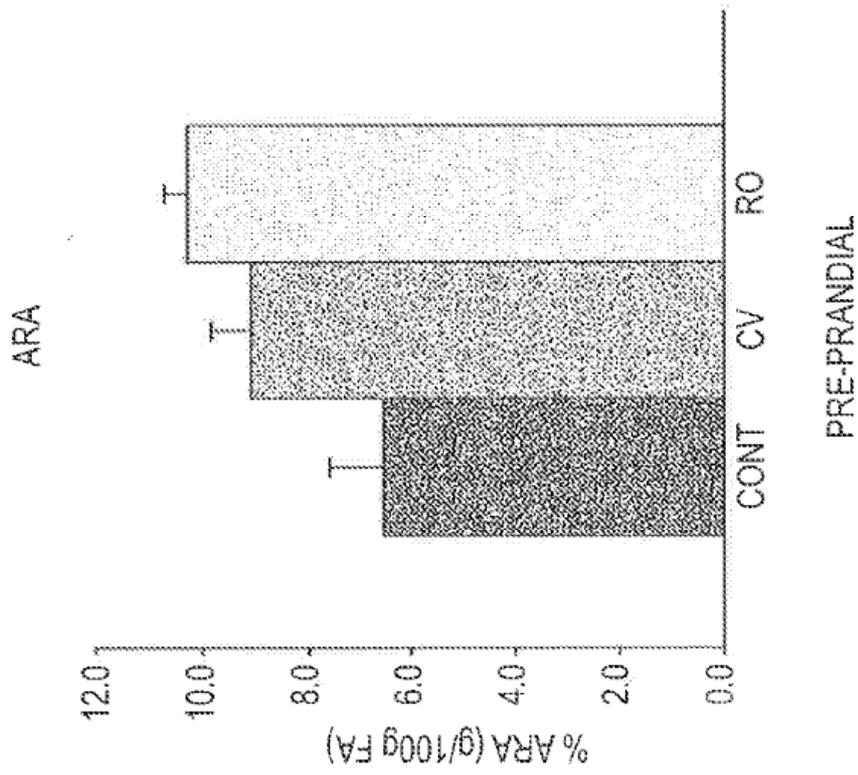


FIG. 24A

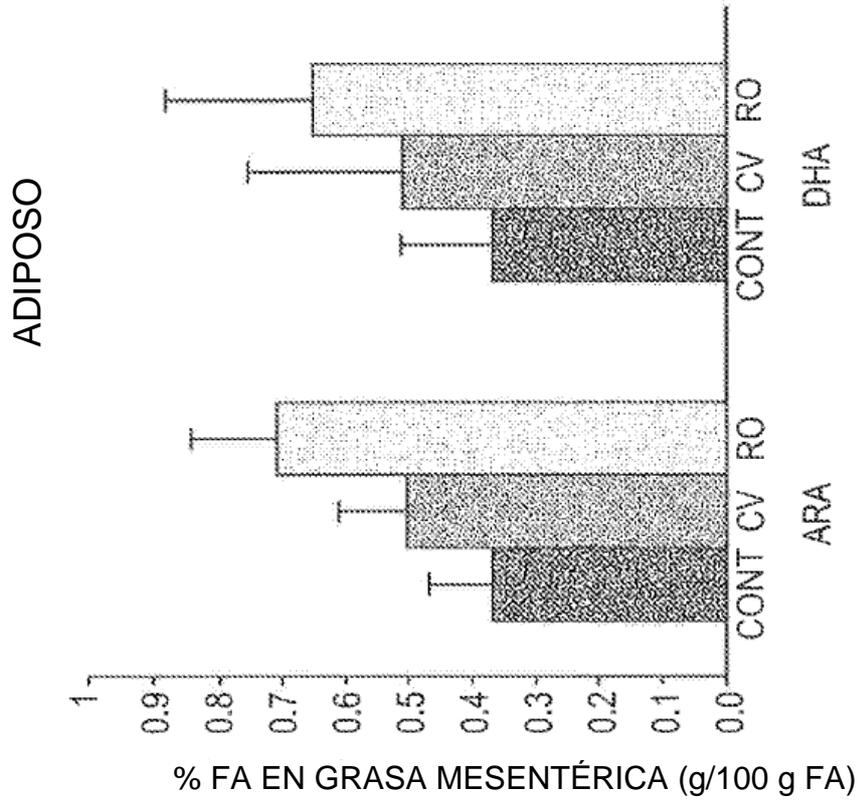


FIG. 25B

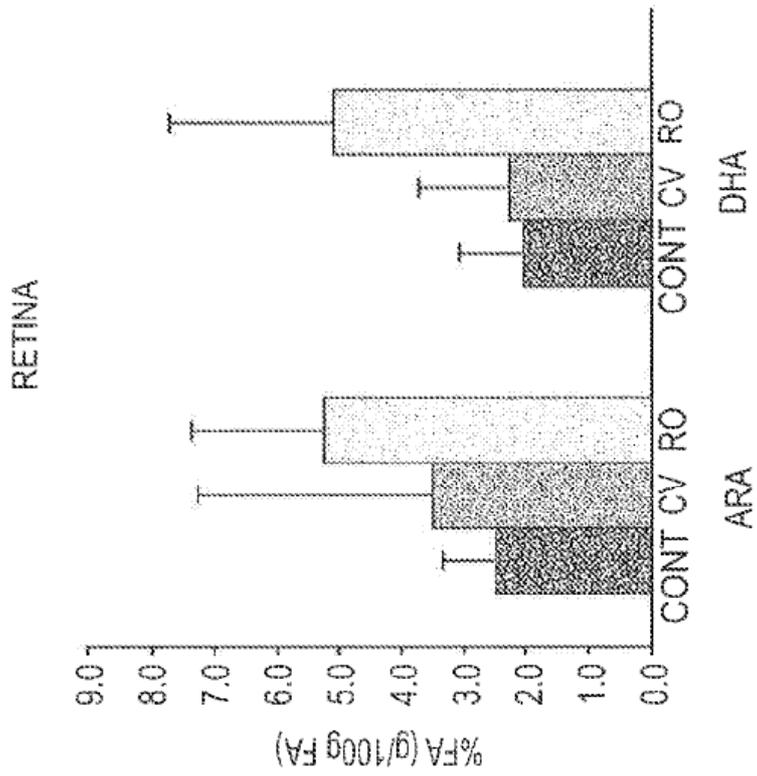


FIG. 25A

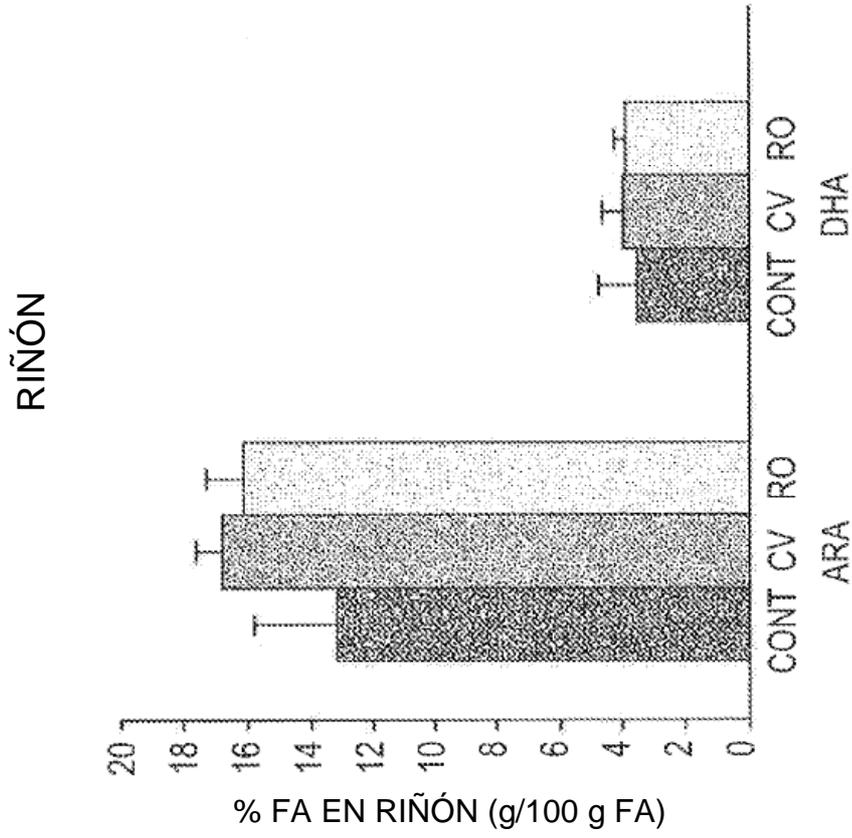


FIG. 26B

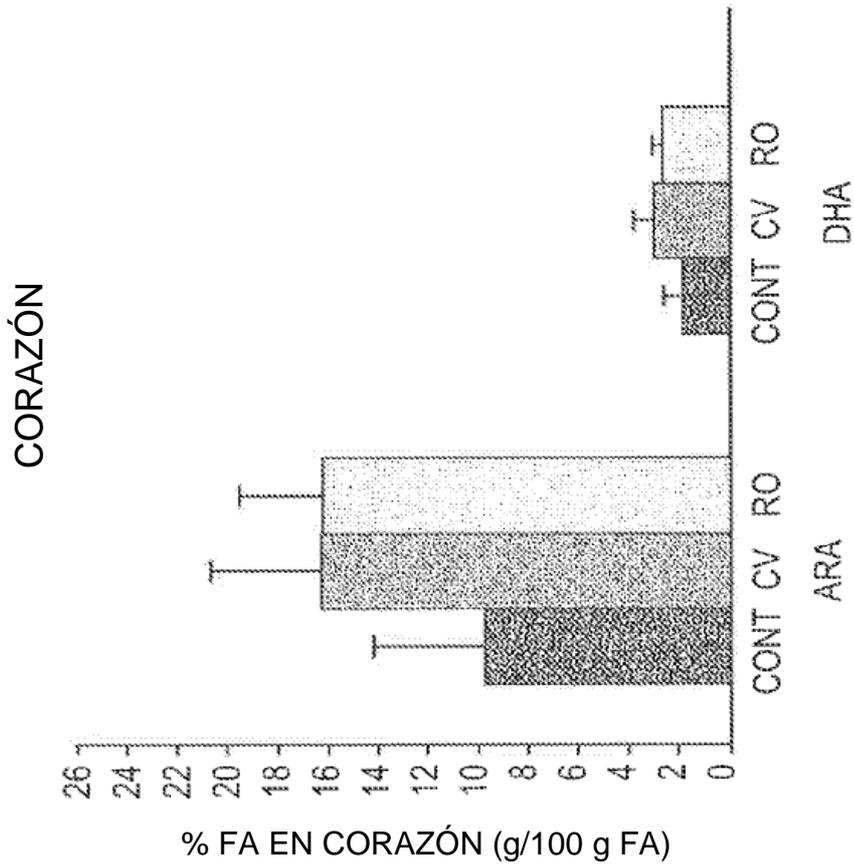


FIG. 26A

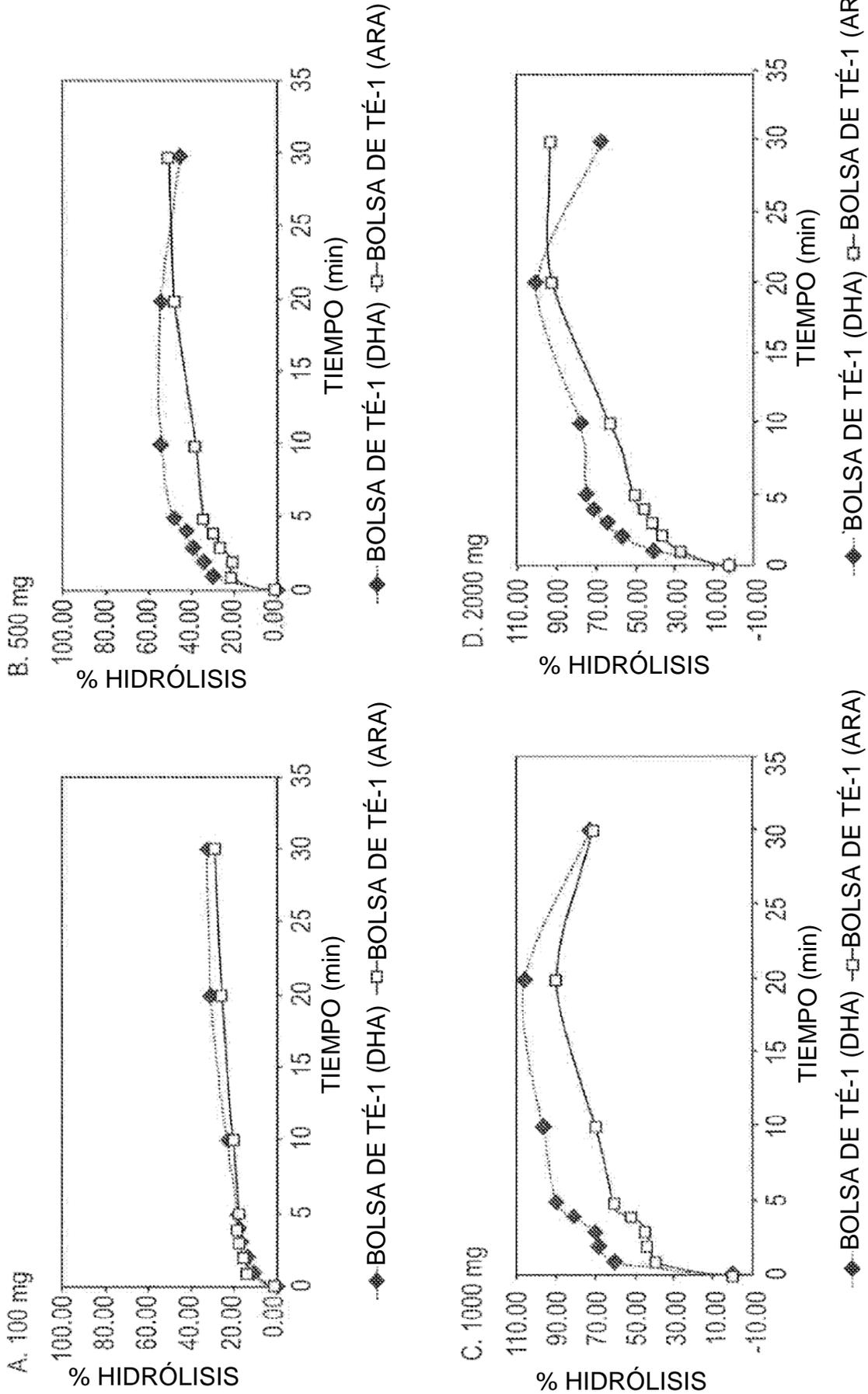


FIG. 27

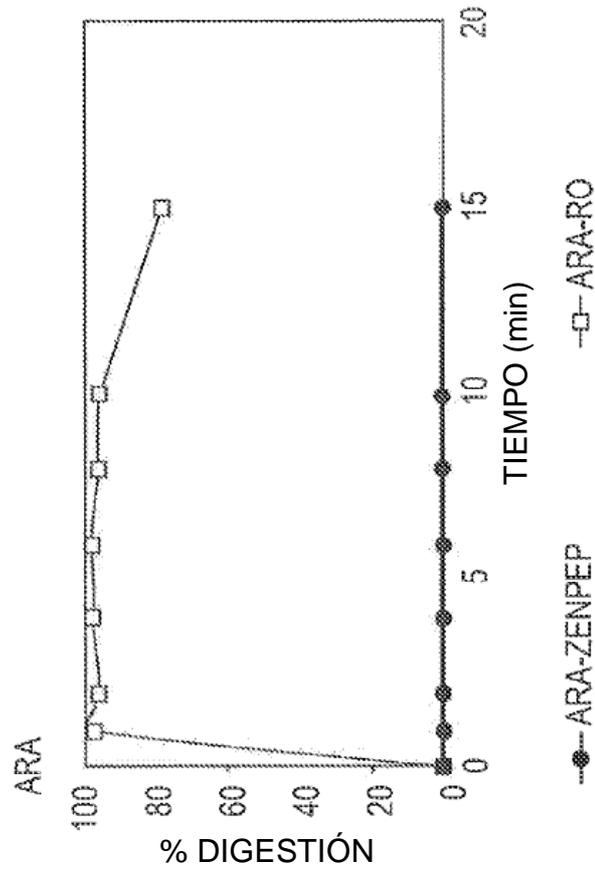


FIG. 28B

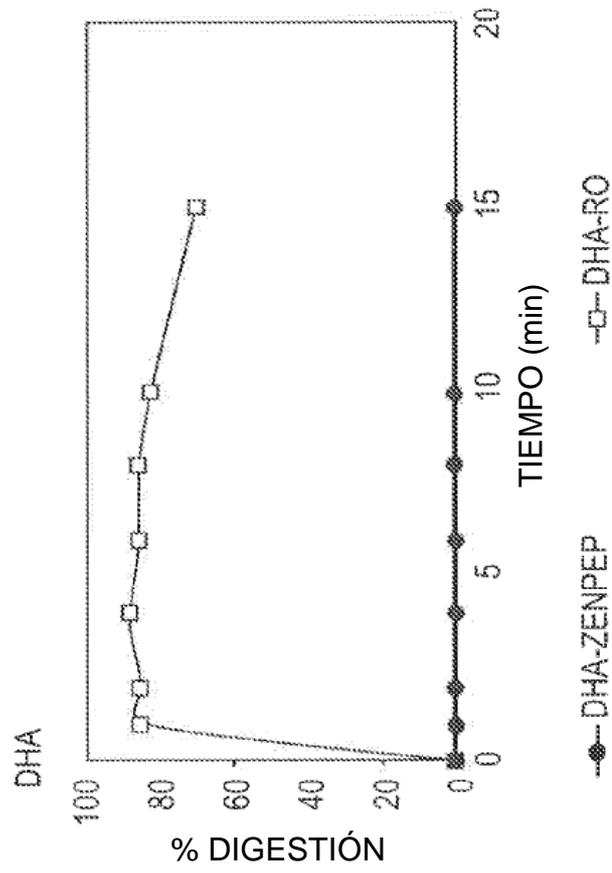


FIG. 28A

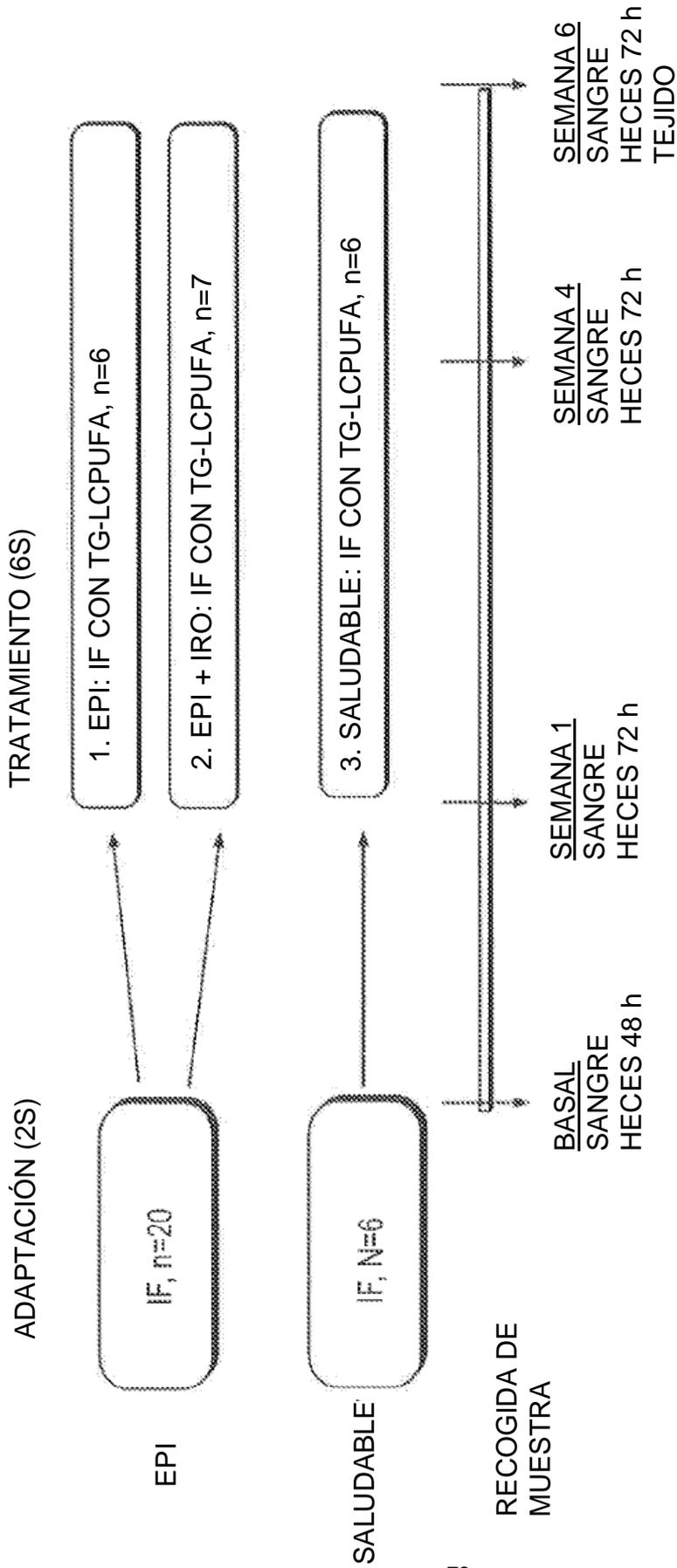


FIG. 29

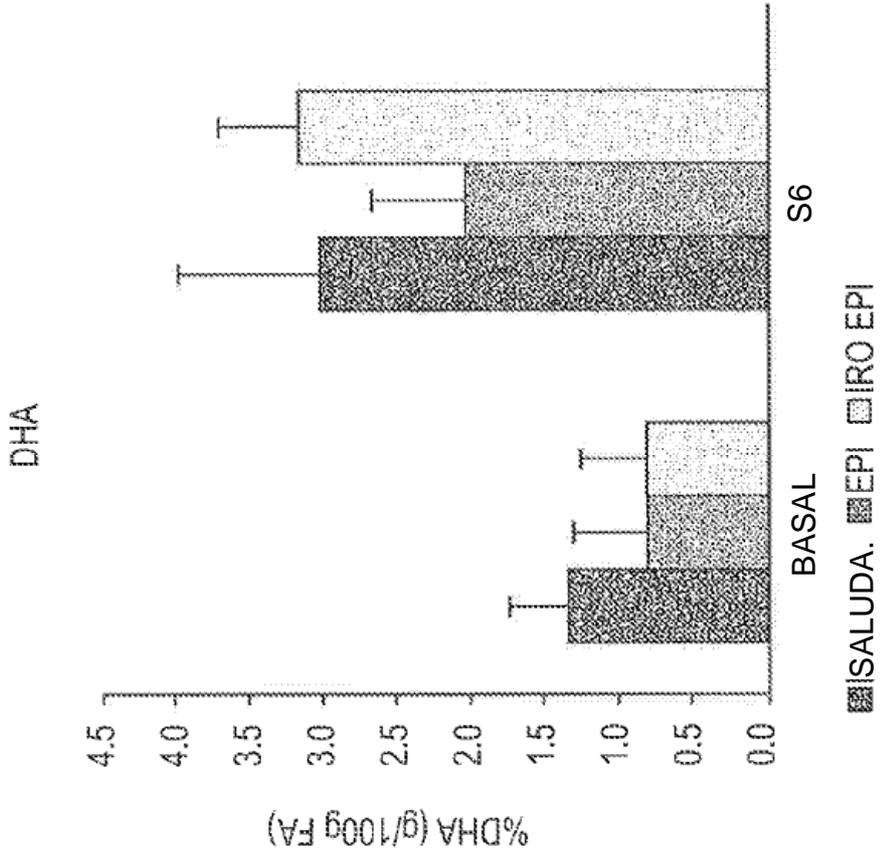


FIG. 30B

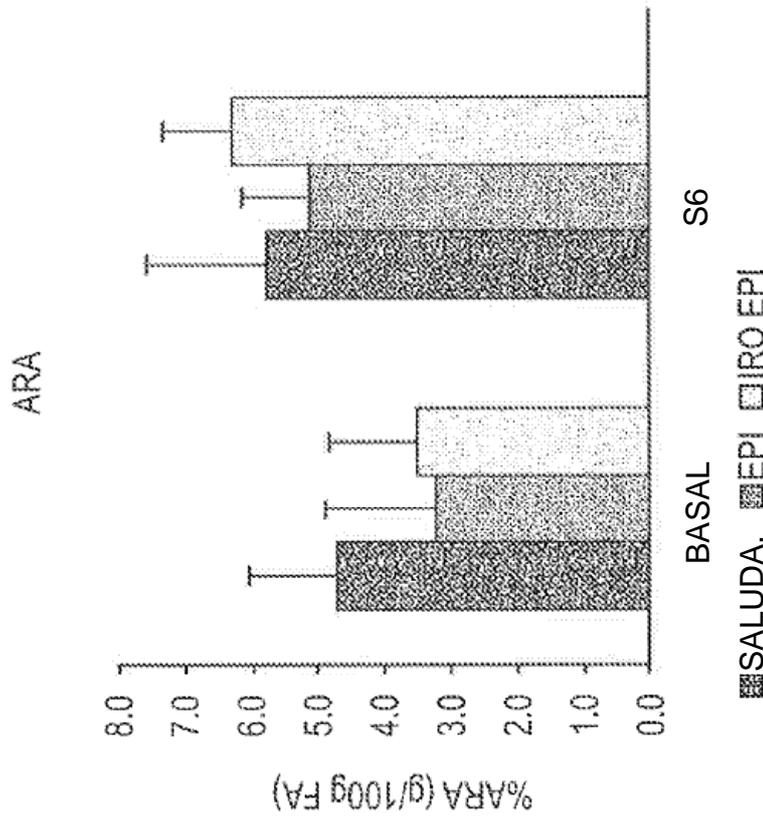


FIG. 30A