

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 761 555**

51 Int. Cl.:

**A23L 33/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.09.2014 PCT/EP2014/069131**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.06.2015 WO15086178**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.09.2014 E 14761641 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.10.2019 EP 3079497**

54 Título: **Composiciones lácteas sintéticas que comprenden ácido eicosatrienoico n-6 y lípidos polares para niños mayores y menores de tres meses para el establecimiento saludable de la función cognitiva**

30 Prioridad:

**12.12.2013 EP 13196804**

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

**20.05.2020**

73 Titular/es:

**SOCIÉTÉ DES PRODUITS NESTLÉ S.A. (100.0%)  
Entre-deux-Villes  
1800 Vevey, CH**

72 Inventor/es:

**DE CASTRO, CARLOS ANTONIO;  
CRUZ-HERNANDEZ, CRISTINA;  
DESTAILLATS, FREDERIC;  
GIUFFRIDA, FRANCESCA;  
MUKHERJEE, RAJAT y  
THAKKAR, SAGAR**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

**ES 2 761 555 T3**

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

**DESCRIPCIÓN**

Composiciones lácteas sintéticas que comprenden ácido eicosatrienoico n-6 y lípidos polares para niños mayores y menores de tres meses para el establecimiento saludable de la función cognitiva

5

**Campo técnico**

La invención se refiere a formulaciones nutritivas sintéticas, particularmente composiciones lácteas, para bebés y niños. Las composiciones están especialmente adaptadas a la edad del niño. La invención se refiere además a la administración de dichas composiciones para estimular el establecimiento saludable de la función cognitiva en niños y niñas recién nacidos y en niños y niñas pequeños, de hasta treinta y seis meses de edad.

10

**Antecedentes de la invención**

El desarrollo y maduración del sistema nervioso es un fenómeno biológico altamente complejo que implica varios procesos fisiológicos. El sistema nervioso se desarrolla durante la gestación y después se refina formando una red funcional madura durante el periodo postnatal.

15

La inmadurez o retraso de la maduración de la corteza cerebral puede conducir a una capacidad de aprendizaje retardada y/o deteriorada, pérdida o desarrollo reducido del razonamiento superior, dificultades de concentración, retraso en el desarrollo del lenguaje, problemas de memoria y de la función ejecutiva, disminución de la inteligencia y, de esta manera, un bajo rendimiento mental. También pueden resultar otros trastornos, tales como los trastornos del humor y los trastornos asociados a la incapacidad de comunicarse y socializarse normalmente (por ejemplo, autismo, incluyendo el síndrome de Asperger).

20

25

Lo anterior puede observarse en bebés, tales como:

- bebés prematuros, bebés de bajo peso al nacer (<2500 g), bebés de peso muy bajo y extremadamente bajo al nacer (<1500 g) y en bebés pequeños para la edad gestacional [Allen M.C., Neurodevelopmental outcomes of preterm infants, Curr. Opin Neurol., 21(2): 123-8, 2008].
- Los bebés prematuros o nacidos a término que han experimentado un retraso del crecimiento intrauterino (RCIU) que se produce después de cualesquiera sucesos adversos durante la gestación (tabaquismo de la madre, medicación de la madre, baja calidad de la placenta, posición anormal de la placenta, desnutrición de la madre y del feto, estrés/ansiedad excesiva de la madre, etc.) Gregory A. et al., Intrauterine Growth Restriction Affects the Preterm Infant's Hippocampus, Pediatric Research, 63(4): 438-443, 2008].
- Cualquier bebé recién nacido y joven que muestra retraso en el crecimiento del sistema nervioso, por ejemplo tras hipoxemia-isquemia en el nacimiento o cualquier otro suceso adverso [Barrett R.D. et al., Destruction and reconstruction: hypoxia and the developing brain, Birth Defects Res. C. Embryo Today, 81: 163-76, 2007].

30

35

Es conocido que la nutrición desempeña un papel importante en la maduración neuronal en el cerebro (revisión en [Huppi P.S., Nutrition for the Brain, Pediatric Research, 63(3): 229-231, 2008]). Específicamente, estudios clínicos han demostrado que los ácidos grasos esenciales resultan cruciales para garantizar el desarrollo cerebral en el feto y postnatal [Chang C.Y. Et al., Essential fatty acids and human brain, Acta Neurol. Taiwan, 18(4): 231-41, 2009]; [Alessandri, J.M. et al. Polyunsaturated fatty acids in the central nervous system: evolution of concepts and nutritional implications throughout life, Reprod. Nutr. Dev., 44(6): 509-38, 2004].

40

45

Las consecuencias de la malnutrición pueden ser irreversibles y entre ellas pueden incluirse un mal desarrollo cognitivo, educabilidad y, de esta manera, futura productividad económica [Horton, R; (2008) The Lancet, vol. 371, número 9608, página 179; [Laus, M.F. et al. Early postnatal protein-calorie malnutrition and cognition: a review of human and animal studies, Int. J. Environ. Res. Public Health., 8(2): 590-612, 2011].

50

De esta manera, las intervenciones orales son un modo apropiado de impactar positivamente sobre el desarrollo del sistema nervioso, estimulando de esta manera el establecimiento saludable de la función cognitiva y el rendimiento mental en bebés o niños pequeños.

55

En general, la leche materna humana representa el estándar de oro indiscutible en términos de nutrición infantil. En particular, la lactancia materna temprana y una ingesta de proteínas más elevada se ha demostrado que resultan beneficiosos para la maduración neuronal en bebés (revisión en [Huppi P.S., 2008]). Sin embargo, en algunos casos la lactancia materna resulta inadecuada o no tiene éxito por motivos médicos o por la decisión de la madre de no amamantar. Se han desarrollado fórmulas infantiles para dichas situaciones.

60

Un enfoque en el diseño de las fórmulas infantiles ha sido intentar diseñar fórmulas que sean similares a la leche materna. Sin embargo, la complejidad de la composición de la leche humana, de la que todavía se desconoce mucho, hace que este enfoque resulte muy complejo técnicamente.

En el ser humano durante la gestación, hormonas tales como el estrógeno, la progesterona y la prolactina conducen a la proliferación y diferenciación glandular, que prepara las glándulas mamarias para la síntesis de leche. Después del nacimiento, las glándulas mamarias sensibilizadas sintetizan leche que es probable que varía según factores genéticos, ambientales, conductuales, dietéticos y otros factores fisiológicos. Más específicamente, la influencia de la dieta materna sobre la composición de la leche es variada y es específica de los nutrientes.

Añadida a esta complejidad, la lactancia humana es dinámica, produciéndose en etapas de lactancia, cambiando de leche temprana diluida y rica en carbohidratos a leche enriquecida en lípidos y proteínas, energéticamente densa, en etapas posteriores (después de 30 días). En el ser humano, es conocido que la primera leche o calostro (1 a 5 días) es rica en factores inmunológicos, mientras que la leche madura es energéticamente densa. Además, Powe y colaboradores [Powe C.E. et al. (2010); *Infant sex predicts breast milk energy content*, *American Journal of Human Biology*, 22:50-54] recientemente han informado de diferencias de contenido energético basadas en el género del bebé recién nacido. La leche secretada por madres de bebés varones se ha informado que presenta un contenido energético 25% superior que la leche de madres de bebés hembra.

Además de depender de la madurez de la lactancia, se ha demostrado que muchos nutrientes en la leche materna dependen del momento del día en que se muestrea la leche (variaciones diurnas), de si se ha recolectado sólo una parte de la toma (primera leche, segunda leche o leche final) o se ha recolectado toda la leche de la toma, o de si se ha vaciado la mama izquierda o la derecha [Jensen RG., *Lipids in Human Milk*, *Lipids* 34, 1243-1271, 1999]. En términos de caracterización de la leche humana, mientras que existen muchos informes en la técnica anterior sobre las cantidades relativas de nutrientes, incluyendo ácidos grasos y fosfolípidos (expresados como g por cada 100 g de fosfolípidos) en la leche materna [Sala-Vila A., et al., *Lipid composition in human breast milk from Granada (Spain): Changes during lactation*, *Nutrition* 21, 467-473, 2005], existen muy pocos datos sobre las cantidades absolutas (por ejemplo de fosfolípidos). De esta manera, en gran medida sigue sin conocerse cuál es el nivel de ingestión de nutrientes por parte del niño.

Benoit et al. caracterizaron una composición de fosfolípido y esteroles en diferentes muestras de leche materna, en las que la fosfatidiletanolamina, la fosfatidilcolina y la esfingomielina eran las especies de FL principales. Además, se detectaron varios esteroles bioactivos menores en los lípidos polares de las leches humanas, p.ej. desmosterol, latosterol, lanosterol, estigmasterol y  $\beta$ -sitosterol [Benoit et al., *Phospholipid species and minor sterols in French human milks*, *Food Chemistry*, 120(3): 684-691, 2010].

Rueda et al. dan a conocer cambios medibles durante la lactancia de concentración relativa de gangliósidos individuales en la leche humana procedente de madres que dan a luz bebés prematuros y a término [Rueda et al., *Changes during lactation in ganglioside distribution in human milk from mothers delivering preterm and term infants*, *Biological Chemistry*, 377(9): 599-601, 1996].

Imen et al. estudiaron la distribución estereoespecífica de los ácidos grasos en las moléculas de triacilglicerol en leche materna obtenida en tres periodos diferentes de la lactancia. Los datos mostraron que los factores que afectan al contenido de ácidos grasos no alteran su perfil de regiodistribución, aunque las cantidades en cada posición pueden cambiar [Imen et al., *Trends in fatty acids positional distribution in human colostrum, transitional, and mature milk*, *Springer - European Food Research and Technology*, 235(2): 325-332, 2012].

Dada la complejidad de la composición de la leche materna, sigue resultando muy complicado desarrollar composiciones nutritivas sintéticas basadas en la composición de la leche materna.

El documento n° US 2008/003330 A1 se refiere a fórmulas infantiles que comprenden combinaciones seleccionadas de ácido docosahexaenoico, ácido araquidónico, fosfolípidos, gangliósidos y ácido siálico, para asimilar mejor la composición natural de la leche humana y para acelerar el desarrollo temprano del cerebro en bebés [Rueda et al., 2008, *Infant formulas for early brain development*, documento n° US 2008/003330 A1].

El documento n° US 2004/265462 A1 proporciona complementos y fórmulas nutritivas, fórmulas infantiles específicamente enriquecidas que contienen una fuente de ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga ("LC-PUFA", por sus siglas en inglés), una fuente de ácido siálico y una fuente de colesterol [Carlson, 2004, *Nutritional supplement*, documento n° US 2004/265462 A1].

El documento n° WO 2009/057121 A1 describe una composición que comprende por lo menos un triglicérido, por lo menos un fosfolípido y por lo menos un ácido graso poliinsaturado de cadena larga (LC-PUFA) [Bar et al., 2009, *Lipid mixture for infant nutrition*, documento n° WO 2009/057121 A1].

El documento n° WO 2009/068549 A1 define una fuente de proteínas que comprende proteínas del suero y caseína para proporcionar un sistema de nutrición adaptado a la edad para el niño [Haschke et al., 2009, *Age-tailored nutrition system for infants*, documento n° WO 2009/068549 A1].

El documento n° WO 2006/041316 A1 se refiere a un producto lácteo de suero beta reducido en lípidos neutros,

adecuado para la utilización en fórmulas infantiles [Fletcher et al., 2006, Beta-serum dairy products, neutral lipid-depleted and/or polar lipid-enriched dairy products, and processes for their production, documento nº WO 2006/041316 A1].

5 El documento nº EP 2 258 218 A1 proporciona una composición nutritiva que comprende una fuente de proteínas de carbohidratos disponibles y una fuente de lípidos (comprende DHA) [Steenhout, 2010, Nutritional composition for supporting brain development and function of toddlers, documento nº EP 2 258 218 A1].

10 Existe una necesidad de proporcionar intervenciones en la nutrición que satisfagan las necesidades nutricionales de bebés y niños pequeños. En particular, existe una necesidad de proporcionar intervenciones en la nutrición que estén adaptadas a las diferentes necesidades nutricionales de bebés y niños pequeños durante el crecimiento. Existe una necesidad de proporcionar intervenciones en la nutrición que consideren la edad del niño, específicamente en meses, por ejemplo 0-3, 3-6, 6-12 meses, etc.

15 Existe una necesidad de proporcionar composiciones que fomenten y apoyen el establecimiento saludable de la función cognitiva durante las etapas tempranas de la vida del recién nacido, cuando el sistema nervioso está en rápida maduración.

20 Los presentes inventores han diseñado composiciones nutritivas sintéticas que están especialmente adaptadas para satisfacer las necesidades de bebés y niños pequeños durante su desarrollo en los primeros meses de vida. Las composiciones de la presente invención han sido diseñadas para garantizar el establecimiento saludable de la función cognitiva.

#### 25 Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones nutritivas sintéticas para bebés y niños pequeños, referidas en el contexto de la invención, hasta la edad de 36 meses. Las composiciones están especialmente adaptadas a la edad del niño.

30 En un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición nutritiva sintética especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de bebés de menos de tres meses de edad. La composición comprende:

- a. 13,8 a 17 mg/100 ml de ácido eicosatrienoico n-6,
- 35 b. 0,2 a 0,25 mg/100 ml de disialogangliósidos-3 (GD3),
- c. 0,2-0,25 mg/100 ml de monosialogangliósido-3 (GM3),
- d. GM-3 y GD-3 en una proporción GM-3:GD-3 de 1,1 a 1,45, y
- e. 0,4 a 0,52 mg/100 ml de GD-3+GM-3.

40 En una realización preferente, la composición puede comprender, además:

- f. 7,6 a 9,3 mg/100 ml de esfingomielina.

45 En otra realización preferente, la composición puede comprender además un fosfolípido o una mezcla de fosfolípidos g.-j.:

- g. 5,4 a 6,6 mg/100 ml de fosfatidilcolina,
- h. 6,0 a 7,5 mg/100 ml de fosfatidiletanolamina,
- i. 1 a 1,2 mg/100 ml de fosfatidilinositol, y
- 50 j. 0,7 a 0,8 mg/100 ml de fosfatidilserina.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición nutritiva sintética especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de un bebé o niño pequeño de más de tres meses de edad. La composición comprende:

- a. 9,5 a 11,7 mg/100 ml de ácido eicosatrienoico n-6,
- 55 b. 0,15 a 0,20 mg/100 ml de GD-3,
- c. 0,34 a 0,44 mg/100 ml de GM-3,
- d. GM-3 y GD-3 en una proporción GM-3:GD-3 de 5,2 a 6,6, y
- e. 0,50 a 0,62 mg/100 ml de GD-3+GM-3.

60 En una realización preferente de dicho segundo aspecto de la invención, la composición nutritiva sintética comprende, además:

- f. 7,8 a 9,6 mg/100 ml de esfingomielina.

65 En otra realización preferente de dicho segundo aspecto de la invención, la composición nutricional sintética comprende además uno cualquiera o una mezcla de los fosfolípidos g.-j.:

- g. 4,4 a 5,4 mg/100 ml de fosfatidilcolina,
- h. 7,3 a 9,0 mg/100 ml de fosfatidiletanolamina,
- i. 1,0 a 1,2 mg/100 ml de fosfatidilinositol, y
- j. 0,8 a 1,0 mg/100 ml de fosfatidilserina.

En un tercer aspecto de la invención se proporciona un conjunto de dos composiciones nutritivas sintéticas diferentes, en el que la primera composición está especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de un bebé o niño pequeño de menos de tres meses de edad, tal como se ha indicado según el primer aspecto de la invención. La segunda composición tal como se indica según el primer aspecto de la invención está especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de un bebé o niño pequeño de más de tres meses de edad.

Las composiciones indicadas en la presente memoria están especialmente adaptadas para fomentar el establecimiento saludable de la función cognitiva en bebés y niños pequeños. Tal como se indica en la presente memoria, las composiciones definidas según el primer aspecto y la primera composición en los conjuntos de composiciones nutritivas según el tercer aspecto permiten fomentar el establecimiento saludable de la función cognitiva en un bebé o niño pequeño de menos de tres meses de edad. Además, las composiciones según el segundo aspecto y la segunda composición en los conjuntos de composiciones nutritivas según el tercer aspecto permiten fomentar el establecimiento saludable de la función cognitiva en un bebé o niño pequeño de más de tres meses de edad.

Además, las composiciones nutritivas sintéticas indicadas en la presente memoria pueden ser una fórmula infantil preparada a partir de unos polvos, o puede ser un líquido o líquido concentrado, o es un fortificante de la leche humana o una leche de crecimiento. La fórmula infantil puede ser preferentemente una fórmula a base de suero de leche de vaca.

### Breve descripción de las figuras

Las figuras 1 a 3 muestran los resultados del análisis de nutrientes en la leche materna de 50 madres en el ensayo que se detalla en el Ejemplo 1. Se obtuvieron muestras 30, 60 y 120 días después del parto. Las cantidades se midieron en mg/100 ml. Las mediciones de la leche de madre para niños varones se muestran con una línea discontinua, mientras que la línea continua muestra las mediciones de leche de madres para niñas. El valor de P[género] se refiere a las diferencias en la leche con respecto al sexo del bebé. Los valores de P[edad] son diferencias de género con respecto al tiempo; P[edad] es un valor de P que considera un modelo lineal y P[edad<sup>2</sup>], utilizando un modelo cuadrático. La figura 1A muestra el ácido eicosatrienoico n-6; la figura 1B muestra los disialogangliósidos-3 (GD3); la figura 1C muestra el monosialogangliósido-3 (GM3); la figura 1, la proporción GM3:GD3; la figura 1E muestra la suma GD-3+GM-3; la figura 2 muestra la esfingomielina (SM); la figura 3A muestra la fosfatidilcolina; la figura 3B muestra la fosfatidiletanolamina; la figura 3C muestra el fosfatidilinositol, y la figura 3D muestra la fosfatidilserina.

### Descripción detallada

Para una comprensión completa de la presente invención y las ventajas de la misma, se hace referencia a la descripción detallada siguiente de la invención.

En la presente descripción, los términos siguientes reciben una definición que debe tomarse en consideración al leer e interpretar la descripción, ejemplos y reivindicaciones.

Definiciones:

Bebés: según la directiva de la Comisión nº 2006/141/EC de 22 de diciembre, 2006, relativa a fórmulas infantiles y fórmulas de seguimiento, artículo 1.2 (a), el término "bebés" se refiere a niños de menos de 12 meses de edad.

Niños pequeños (incluyendo niños y niñas pequeños): según las directivas de la Comisión nº 2006/141/EC de 22 de diciembre, 2006, y/o nº 91/321/EEC de 14 de mayo, 1991, sobre las fórmulas infantiles y las fórmulas de seguimiento, artículo 1.2 (b), la expresión "niños pequeños" se refiere a niños con edades comprendidas entre uno y tres años.

Fórmula infantil: según las directivas de la Comisión nº 2006/141/EC de 22 de diciembre, 2006, y/o nº 91/321/EEC de 14 de mayo, 1991, relativas a fórmulas infantiles y fórmulas de seguimiento, artículo 1.2 (c), la expresión "fórmula infantil" se refiere a productos alimentarios destinados al uso nutricional particular por bebés durante los primeros cuatro a seis meses de edad y que satisfacen por sí mismas los requisitos nutricionales de esta categoría de personas. Debe entenderse que los bebés pueden ser alimentados exclusivamente con fórmulas infantiles, o que las fórmulas infantiles pueden ser utilizadas por el cuidador como un complemento de la leche humana. Es sinónima de la expresión ampliamente utilizada "fórmula de inicio".

Fórmula de seguimiento: según las directivas de la Comisión nº 2006/141/EC de 22 de diciembre, 2006, y/o nº 91/321/EEC de 14 de mayo, 1991, relativas a fórmulas infantiles y fórmulas de seguimiento, artículo 1.2 (d), la

expresión “fórmula de seguimiento” se refiere a productos alimentarios destinados a la utilización nutricional particular por bebés de más de cuatro meses y que constituye el elemento líquido principal en una dieta progresivamente diversificada de esta categoría de personas.

5 Leche de crecimiento: composición nutritiva a base de leche, especialmente adaptada para un niño de uno a tres años de edad.

Fortificante de leche humana: composición nutricional para bebés o niños pequeños destinada a la adición o dilución con leche humana.

10 La expresión “composición hipoalérgica” se refiere a una composición que es improbable que cause reacciones alérgicas.

La expresión “oligosacárido sialilado” se refiere a un oligosacárido que presenta un residuo de ácido siálico.

15 La expresión “oligosacárido fucosilado” se refiere a un oligosacárido que presenta un residuo de fucosa.

El término “prebiótico” se refiere a carbohidratos no digeribles que afectan beneficiosamente al huésped mediante la estimulación selectiva del crecimiento y/o la actividad de bacterias saludables, tales como bifidobacterias, en el colon del ser humano [Gibson GR, Roberfroid MB., Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr. 125:1401-12, 1995].

El término “probiótico” se refiere a preparaciones de células microbianas o componentes de células microbianas con un efecto beneficioso sobre la salud o bienestar del huésped [Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al. "Probiotics: how should they be defined", Trends Food Sci. Technol. 10:107-10, 1999].

25 Todos los porcentajes se proporcionan en peso, a menos que se indique lo contrario.

30 Tal como se utiliza en la presente especificación, los términos “comprende”, “comprendiendo” y términos similares, no deben interpretarse en un sentido exclusivo o exhaustivo. En otras palabras, pretenden significar “incluyendo, aunque sin limitación”.

35 Cualquier referencia a documentos de la técnica anterior en la presente especificación no debe considerarse una admisión de que dicha técnica anterior es ampliamente conocida o forma parte del conocimiento general común en el campo.

Los presentes inventores han llevado a cabo un gran estudio sobre la composición de la leche materna. Dicho estudio implicó tanto el desarrollo de tecnologías analíticas avanzadas para analizar muestras de leche y la realización de un ensayo clínico longitudinal con muestreo de leche humana 30, 60 y 120 días después del parto (ver el Ejemplo 1). Las muestras de leche se analizaron cuantitativamente para macronutrientes, ácidos grasos, fosfolípidos y gangliósidos. Los inventores han encontrado inesperadamente diferencias muy significativas con el tiempo (entre 0 y 120 días) en los niveles de nutrientes. Estas diferencias eran significativas para determinados ácidos grasos, fosfolípidos y gangliósidos.

45 Los resultados de dicho ensayo indicaron inesperadamente diferencias significativas en los niveles de ácido eicosatrienoico n-6 (también conocido como DGLA), monosialogangliósido-3 (GM3), la suma de GM3 y disialogangliósidos-3 (GD3), la proporción de GM3 a GD-3, esfingomielina, fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina (ver la Tabla 2 y las figuras 1 a 3).

50 Basándose en los resultados de dicho estudio, los inventores han diseñado composiciones que están especialmente adaptadas para satisfacer las necesidades nutricionales de bebés y niños pequeños de menos o de más de tres meses. Según los conocimientos del inventor, hasta la fecha no se conocen tales formulaciones específicas según edad para bebés o niños pequeños.

55 Las composiciones según la invención:

Las composiciones de la invención están diseñadas para satisfacer las necesidades nutricionales de bebés y niños pequeños de menos de tres meses de edad o de entre tres y treinta y seis meses de edad. Las composiciones fomentan el establecimiento saludable de la función cognitiva en estos bebés o niños pequeños.

60 Las composiciones nutritivas sintéticas de la invención pueden ser una fórmula infantil preparada a partir de unos polvos. La fórmula infantil puede estar basada en una leche de vaca, leche de cabra o leche de búfala. La fórmula infantil puede ser una fórmula de inicio para bebés de menos de 6 meses de edad o una fórmula de seguimiento para bebés de más de 6 meses de edad. La composición indicada en la presente memoria puede ser una leche de crecimiento, o un fortificante de leche humana. De manera similar, la composición puede ser una fórmula infantil a base de suero de leche de vaca. La fórmula también puede ser una fórmula hipoalérgica (HA) en la que las proteínas

de leche de vaca han sido (parcial o extensivamente) hidrolizadas. La fórmula también puede estar basada en leche de soja o una fórmula no alergénica, por ejemplo una basada en aminoácidos libres.

5 Las composiciones nutricionales de la invención contienen cantidades específicas de un ácido graso poliinsaturado esencial (PUFA) conocido como ácido eicosatrienoico n-6 (también conocido como ácido digamma-linolénico o DGLA) dependiendo de si la composición es para bebés de menos de 3 meses, o bebés o niños pequeños de más de 3 meses de edad. Las cantidades de los gangliósidos monosialogangliósido-3 (GM3), disialogangliósidos-3 (GD3), así como la suma de GM3 y GD3 y la proporción entre los dos gangliósidos, también varían dependiendo de si la composición es para bebés de menos o de más de 3 meses de edad. Las cantidades de esfingomielina y de los fosfolípidos fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol y fosfatidilserina también varían.

Todos estos últimos componentes: ácidos grasos esenciales, gangliósidos, esfingomielina y fosfolípidos, es conocido que participan en el desarrollo de la función cognitiva.

15 Las cantidades de todos los nutrientes, expresadas en la presente memoria como mg/100 ml o g/100 ml, reflejan las cantidades de nutrientes presentes en el producto líquido final, que debe ser consumido por el bebé o niño pequeño. Por ejemplo, la composición puede ser una fórmula infantil en polvo que se diluye con agua para proporcionar un producto líquido final. La composición indicada en la presente memoria también puede ser un líquido concentrado que se diluye con agua para conseguir el producto líquido final. La composición tal como se indica en la presente memoria puede ser un producto líquido que es directamente consumido por el bebé o niño sin modificación. Además, la composición indicada en la presente memoria puede ser un fortificante de leche humana que se añade o se diluye con leche humana. En este caso, la concentración de los nutrientes ya presentes en la leche humana (a la que se añade el fortificante de leche humana) deben considerarse valores medios para madres lactantes que son conocidos o que se predicen a partir de datos clínicos publicados.

25 En un primer aspecto de la invención, se proporciona una composición nutritiva sintética especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de bebés de menos de tres meses de edad. La composición comprende:

- a. 13,8 a 17 mg/100 ml, preferentemente 15 a 16 mg/100 ml de ácido n-6 eicosatrienoico,
- 30 b. 0,2 a 0,25 mg/100 ml, preferentemente 0,21 a 0,24 mg/100 ml de disialogangliósidos-3 (GD3),
- c. 0,2 a 0,25 mg/100 ml, preferentemente 0,21 a 0,23 mg/100 ml de monosialogangliósido-3 (GM3),
- d. GM-3 y GD-3 en una proporción GM-3:GD-3 de 1,1 a 1,45, preferentemente de 1,2 a 1,35, y
- e. 0,4 a 0,52 mg/100 ml, preferentemente 0,45 a 0,5 mg/100 ml de GD-3+GM-3.

35 En una realización preferente, la composición puede comprender, además:

- f. 7,6 a 9,3 mg/100 ml, preferentemente 8,2 a 8,7 mg/100 ml de esfingomielina.

40 En otra realización preferente, la composición puede comprender además un fosfolípido o una mezcla de fosfolípidos g.-j.:

- g. 5,4 a 6,6 mg/100 ml, preferentemente 5,9 a 6,1 mg/100 ml de fosfatidilcolina,
- h. 6,0 a 7,5 mg/100 ml, preferentemente 6,7 a 7,0 mg/100 ml de fosfatidiletanolamina,
- i. 1 a 1,2 mg/100 ml, preferentemente 1,1 mg/100 ml de fosfatidilinositol, y
- 45 j. 0,7 a 0,8 mg/100 ml, preferentemente 0,75 mg/100 ml de fosfatidilserina.

En un segundo aspecto de la invención, se proporciona una composición nutritiva sintética especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de un bebé o niño pequeño de más de tres meses de edad. La composición comprende:

- 50 a. 9,5 a 11,7 mg/100 ml, preferentemente 10 a 11 mg/100ml de ácido eicosatrienoico n-6,
- b. 0,15 a 0,19 mg/100 ml, preferentemente 0,16 a 0,18 mg/100 ml de GD-3,
- c. 0,34 a 0,44 mg/100 ml, preferentemente 0,38 a 0,41 mg/100 ml de GM-3,
- d. GM-3 y GD-3 en una proporción GM-3:GD-3 de 5,2 a 6,6, preferentemente de 5,9 a 6,1, y
- 55 e. 0,50 a 0,62 mg/100 ml, preferentemente 0,54 a 0,56 mg/100ml de GD-3+GM-3.

En una realización preferente de dicho segundo aspecto de la invención, la composición nutritiva sintética comprende, además: f. 7,8 a 9,6 mg/100 ml de esfingomielina.

60 En otra realización preferente de dicho segundo aspecto de la invención, la composición nutricional sintética comprende además uno cualquiera o una mezcla de los fosfolípidos g.-j.:

- g. 4,4 a 5,4 mg/100 ml, preferentemente 4,7 a 5,1 mg/100 ml de fosfatidilcolina,
- h. 7,3 a 9,0 mg/100 ml, preferentemente 7,9 a 8,3 mg/100 ml de fosfatidiletanolamina,
- i. 1,0 a 1,2 mg/100 ml, preferentemente 1,5 -1,9 mg/100 ml de fosfatidilinositol, y
- 65 j. 0,8 a 1,0 mg/100 ml, preferentemente 0,87 a 0,92 mg/100 ml de fosfatidilserina.

Las composiciones nutritivas sintéticas pueden ser una fórmula infantil preparada a partir de unos polvos.

5 En un tercer aspecto de la invención, se proporciona un conjunto de dos composiciones nutritivas sintéticas diferentes, en el que la primera composición está especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de un bebé o niño pequeño de menos de tres meses de edad, tal como se ha indicado según el primer aspecto de la invención. La segunda composición tal como se indica según el primer aspecto de la invención está especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de un bebé o niño pequeño de más de tres meses de edad.

10 La primera y segunda composiciones son diferentes en el sentido de que difieren en por lo menos 10% de la cantidad de por lo menos uno de los componentes comunes seleccionados de entre a. y j.

15 La primera y segunda composiciones se acondicionan por separado. La primera y segunda composiciones en el conjunto se comercializan bajo el paraguas del mismo concepto comercial. La primera y segunda composiciones pueden, de esta manera, acondicionarse por separado, o agruparse en otro envase o embalaje externo. El embalaje puede ser, por ejemplo, simplemente una capa de película de plástico, una bolsa, caja, trozo de papel de aluminio u otros medios para mantener juntos la primera y segunda composiciones.

20 El conjunto puede comprender tercera, cuarta y quinta, etc. composiciones adicionales que están especialmente adaptadas para satisfacer las necesidades nutricionales de bebés o niños pequeños de, por ejemplo, 3 a 6 meses de edad, de 6 a 9 meses de edad o de 9 a 12 meses de edad. El conjunto puede contener además composiciones adicionales con diana del mismo modo en niños de más de un año y hasta tres años de edad.

25 El conjunto de la invención puede preferentemente comercializarse bajo el mismo concepto comercial (por ejemplo, segmentación por edad y/o adaptación específica de las composiciones nutricionales para bebés o niños de edad específica).

Otros ingredientes en las composiciones:

30 otros ingredientes estándares conocidos por el experto en la materia para la formulación de una fórmula infantil, fortificante de leche humana o leche de crecimiento también pueden encontrarse presentes en las composiciones de la invención.

35 Las composiciones nutricionales de la invención pueden contener otros ingredientes que pueden actuar reforzando el efecto técnico de los componentes a.-k.

Prebióticos:

40 Los prebióticos que pueden utilizarse de acuerdo con la presente invención no se encuentran particularmente limitados y entre ellos se incluyen todas las sustancias alimentarias que fomentan el crecimiento de probióticos o microorganismos beneficiosos para la salud en los intestinos. Preferentemente, pueden seleccionarse del grupo que consiste en oligosacáridos, que opcionalmente contienen fructosa, galactosa, manosa, fibras dietéticas, en particular fibras solubles, fibras de soja, inulina, o mezclas de los mismos. Los prebióticos preferentes son fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS), isomalto-oligosacáridos (IMO), xilo-oligosacáridos (XOS), arabino-xilo-oligosacáridos (AXOS), manano-oligosacáridos (MOS), oligosacáridos de la soja, glucosilsacarosa (GS), lactosacarosa (LS), lactulosa (LA), oligosacáridos de palatinosa (PAO), malto-oligosacáridos, gomas y/o hidrolizados de los mismos, pectinas y/o hidrolizados de los mismos.

50 En particular, los oligosacáridos de la leche humana, por ejemplo los oligosacáridos sialilados, indicados en el documento nº WO 2012/069416, publicado el 31 de mayo de 2012, pueden incluirse en la composición según la invención. Los últimos oligosacáridos pueden actuar sinérgicamente con los ácidos grasos esenciales y fosfolípidos de la invención fomentando el establecimiento saludable de la función cognitiva en el bebé o niño pequeño en desarrollo.

55 Pueden añadirse probióticos a la composición. Pueden añadirse adicionalmente todos los microorganismos probióticos. Preferentemente, el probiótico puede seleccionarse con este propósito del grupo que consiste en *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Candida*, en particular seleccionados del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus johnsonii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus salivarius*, *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii* o mezclas de los mismos, preferentemente seleccionados del grupo que consiste en *Bifidobacterium longum* NCC3001 (ATCC nº BAA-999), *Bifidobacterium longum* NCC2705 (CNCM I-2618), *Bifidobacterium longum* NCC490 (CNCM I-2170), *Bifidobacterium lactis* NCC2818 (CNCM I-3446), *Bifidobacterium breve* cepa A, *Lactobacillus paracasei* NCC2461 (CNCM I-2116), *Lactobacillus johnsonii* NCC533

(CNCM I-1225), *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC53103), *Lactobacillus rhamnosus* NCC4007 (CGMCC 1.3724), *Enterococcus faecium* SF 68 (NCC2768; NCIMB10415), y mezclas de los mismos.

5 Las composiciones nutritivas sintéticas pueden comprender además probióticos activos o inactivados, muertos o vivos, preferentemente en una dosis suficiente para resultar eficaces (p.ej., entre  $10^6$  y  $10^{11}$  o entre  $10^7$  y  $10^9$  ufc /g de composición). En una realización, la primera composición para bebés de menos de 3 meses tal como se indica en la presente memoria puede comprender un probiótico con un efecto específico para esa edad y que es diferente del probiótico comprendido en la segunda composición para bebés de más de 3 meses tal como se indica en la presente memoria. En una realización, dichos probióticos comprenden *Lactobacillus rhamnosus* en la primera composición y *B.*  
10 *longum* en la segunda composición (o posiblemente viceversa). En una realización, dichos probióticos comprenden *Bifidobacterium lactis* en la primera composición y *Lactobacillus rhamnosus* en la segunda composición (o posiblemente viceversa). La selección de probióticos está específicamente adaptada a las necesidades particulares de los bebés de una edad específica.

15 Pueden añadirse vitaminas, minerales y otros micronutrientes adecuados para la administración en niños de menos de tres años a las composiciones indicadas en la presente memoria.

20 Las composiciones indicadas en la presente memoria fomentan el establecimiento saludable de la función cognitiva. Los nutrientes de las composiciones de la invención están especialmente asociados a la maduración cerebral, especialmente al desarrollo de la función cognitiva en mamíferos jóvenes.

25 El ser humano no puede sintetizar ALA (ácido  $\alpha$ -linolénico), un ácido graso omega-3, ni LA (ácido linoleico), un ácido graso omega-6, y de esta manera, deben obtenerse a partir de la dieta. Adicionalmente, pueden sintetizarse a partir de AL dos ácidos grasos omega-3 de cadena larga: ácido eicosapentaenoico (EPA) y ácido docosahexaenoico (DHA). Existen muchos informes en la literatura que sugieren que estos ácidos grasos podrían resultar esenciales para un desarrollo óptimo de la función cognitiva. Entre sus muchas funciones, DHA influye sobre la función de la barrera hematocefálica, la actividad de los enzimas unidos a membrana y los canales iónicos, la neurotransmisión dopaminérgica y serotoninérgica, y la transducción de señales [Yaboob, P. Annu. Rev. Nutr. 29:257-282, 2009].

30 La acreción de gangliósidos en el cerebro en desarrollo es más elevada en el útero y en la vida neonatal temprana, durante los periodos de ramificación dendrítica y formación de nuevas sinapsis. Además, el cerebro contiene el contenido relativo más elevado de gangliósidos del cuerpo, particularmente en las membranas de las células neuronales concentrado en la zona de la membrana sináptica. Es conocido que los gangliósidos desempeñan un papel en el crecimiento, migración y maduración neuronal, neuritogénesis, sinaptogénesis y mielinización [McJarrow, P.,  
35 Nutr. Rev. Aug; 67(8):451-63, 2009].

La colina observada en los fosfolípidos es el precursor del neurotransmisor acetilcolina. La pérdida de neuronas colinérgicas se asocia al deterioro de la función cognitiva [Poly et al., Am. J. Clin. Nutr., 94(6):1584-91, 2011].

40 La esfingomielina es un tipo de esfingolípido presente en las membranas de las células animales, especialmente en la vaina membranosa de mielina que circunda algunos axones de células nerviosas.

45 De esta manera, las composiciones indicadas en la presente memoria están especialmente adaptadas para fomentar el establecimiento saludable de la función cognitiva en bebés y niños pequeños. La expresión "establecimiento saludable de la función cognitiva" se refiere a que la función cognitiva del bebé o niño pequeño, medida mediante un método estándar, se encuentra en el intervalo normal.

50 Los métodos estándares conocidos por el experto en la materia son las escalas de Bayley de desarrollo de bebés y niños pequeños (Bayley Scales of Infant and Toddler Development®) (actualmente en la tercera edición (Bayley-III)). Dicho test incluye elementos cognitivos, del lenguaje, motores, socioemocionales y de adaptación general. Las puntuaciones en bruto de los ítems completados con éxito se convierten en puntuaciones en la escala y en puntuaciones compuestas. Estas puntuaciones se utilizan para determinar el rendimiento del niño en comparación con normas obtenidas de niños de desarrollo típico de su misma edad (en meses). Las puntuaciones en percentil entre 85 y 115 se aceptan habitualmente como desarrollo cognitivo normal [Black M. M. y Matula K. (1999), Essentials of Bayley  
55 Scales of Infant Development II, Assessment, New York: John Wiley, ISBN 978-0-471-32651-9].

Otra escala que puede utilizarse para medir la función cognitiva es la escala de Griffiths [Chaudhary T, et al. (2012), Predictive and Concurrent Validity of Standardized Neurodevelopmental Examinations by the Griffiths Scales and Bayley Scales of Infant Development II., Klin. Pediatr., dic. 2012].

60 Según una realización preferente de la invención, las composiciones según el primer aspecto de la invención y la primera composición en los conjuntos de composiciones nutritivas según el tercer aspecto de la invención, presentan como diana los niños de menos de tres meses de edad. Según otra realización preferente de la invención, las composiciones según el segundo aspecto de la invención y la segunda composición en los conjuntos de  
65 composiciones nutritivas según el tercer aspecto de la invención, presentan como diana bebés y niños pequeños de más de tres meses de edad y de menos de treinta y seis meses.

Las composiciones nutritivas también pueden estar destinadas a bebés que han experimentado retardo del crecimiento intrauterino (RCIU) y/o que presentan un peso al nacer bajo, muy bajo o extremadamente bajo, son pequeños para la edad gestacional, y/o que sufren o han sufrido de deterioro de la función cognitiva en el útero o durante o después del nacimiento.

La invención se describe adicionalmente en referencia a los Ejemplos siguientes. Se apreciará que la invención según se reivindica no pretende encontrarse limitada en modo alguno a estos ejemplos.

## Ejemplos:

Ejemplo 1:

Prueba clínica longitudinal:

Los presentes inventores diseñaron una prueba clínica longitudinal con 50 madres lactantes con muestreo de leche el día 30 (visita 1), 60 (visita 2) y 120 (visita 3) después del parto. Las muestras de leche se analizaron cuantitativamente para energía y sólidos totales.

Recolección de leche humana: el protocolo y recolección de leche humana fue revisado y aprobado por el comité ético local de Singapur. El estudio tuvo lugar en la National University of Singapore. Las muestras de leche materna fueron proporcionadas por madres voluntarias de bebés a término, que aparentemente estaban sanas y no eran fumadoras ( $n = 50$ ;  $31,1 \pm 3,1$  años de edad) (aproximadamente 30 ml; 4 semanas después del parto). Las muestras se recogieron tras la extracción completa de una mama utilizando una bomba de leche y mientras se alimentaba al bebé en la otra mama. Se realizaron todos los esfuerzos para recoger una toma completa que incluyese primera leche, segunda leche y leche final como representación de una toma y para evitar la variación dentro de la toma de contenido de lípidos. Se separó una alícuota de aproximadamente 30 ml en un tubo de polipropileno cónico para el presente estudio y el resto se utilizó para alimentar al bebé. Las muestras recogidas para la investigación se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta los análisis.

Análisis de macronutrientes mediante ensayo de infrarrojo medio (IRM): los análisis de IRM se llevaron a cabo con el analizador de leche humana (HMA, por sus siglas en inglés, Miris, Suecia). El HMA se basa en una espectroscopía de transmisión IRM de semisólidos, diseñada específicamente para la determinación de la composición de macronutrientes de la leche humana. La utilización del aparato se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, 1 ml de muestra de leche previamente calentada (hasta  $40^{\circ}\text{C}$  en un baño de agua) se sonicó durante 1 min antes de la inyección manual en la entrada de leche. El análisis de llevó a cabo dentro del siguiente minuto antes de recuperar la leche y lavar la entrada con agua desionizada. La celda se lavó además con detergente suministrado cada 5 inyecciones de muestra. También cada 10 muestras se pasó un control del propio laboratorio, así como un estándar de calibración proporcionado por Miris, con fines de control de la calidad.

Análisis de ácidos grasos: se prepararon metil-ésteres de ácido graso (FAME, por sus siglas en inglés) utilizando HCl/metanol (3N) como catalizador. El procedimiento de metilación fue el siguiente: En una probeta de 15 ml dotada de tapones enroscables revestidos de Teflon, se añadieron 250  $\mu\text{l}$  de leche humana, seguido de 300  $\mu\text{l}$  de estándar interno FAME 11:10 y 300  $\mu\text{l}$  de estándar interno TAG 13:0, 2 ml de metanol, 2 ml de metanol/HCl (3N) y 1 ml de n-hexano. Las probetas se cerraron firmemente, se agitaron vigorosamente y se calentaron a  $100^{\circ}\text{C}$  durante 60 min, con agitación adicional ocasionalmente. Se procuró que el tapón se ajustase bien al revestimiento del tapón para evitar fugas al calentar los tubos a  $100^{\circ}\text{C}$ . Tras enfriar hasta la temperatura ambiente, se añadieron 2 ml de agua y se agitó vigorosamente para la centrifugación a 1200g durante 5 min, seguido de la transferencia de la fase superior (hexano) a viales de GC. Para una óptima separación de GLC, se recomienda la utilización de una columna capilar altamente polar larga (100 m). Estas columnas permiten una separación precisa de FAME, incluyendo los isómeros *cis* y *trans*. Se llevaron a cabo análisis de GLC según condiciones estándares conocidas por el experto en la materia. Se utilizó un cromatógrafo de gases 7890A con un automuestreador 7693 con módulo de estación preparativa (Agilent Technologies, Palo Alto, CA) dotado de una columna capilar CP-Sil 88 de sílice fusionada (100% cianopropilpolisiloxano, 100 m, di de 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$  de grosor de la película; Agilent, Palo Alto, CA) con un inyector con fraccionamiento (proporción 1:25) calentado a  $250^{\circ}\text{C}$  y un detector de ionización de llama funcionando a  $300^{\circ}\text{C}$ . La programación de temperatura del horno utilizada era  $60^{\circ}\text{C}$  isotérmicos durante 5 min, incremento a  $165^{\circ}\text{C}$  a  $15^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , isotérmico durante 1 min a esta temperatura y después incremento a  $195^{\circ}\text{C}$  a  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y mantenimiento isotérmico durante 14 min y después incremento a  $215^{\circ}\text{C}$  a  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  y mantenimiento isotérmico durante 8 min a  $215^{\circ}\text{C}$ . Se utilizó hidrógeno como gas portador en modo de flujo constante a 1,5 ml/min.

Análisis de fosfolípidos: se separaron las familias de fosfolípidos mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de fase normal utilizando 2 columnas Nucleosil 50-5, 250 x 3mm, 5 $\mu$  (Macherey-Nagel, Easton, USA) dotadas de precolumna Nucleosil 50-5, 8 x 3mm, 5 $\mu$  (Macherey-Nagel, Easton, USA). El sistema de cromatografía consistía en un módulo Agilent 1200 (Agilent Technologies, Basel, Suiza) y un detector evaporativo de dispersión lumínica en línea PL-ELS 1000 (Polymer Laboratories, Shropshire, Inglaterra). Todas las cromatografías se llevaron a cabo a  $55^{\circ}\text{C}$ . El solvente A estaba compuesto de formato amónico 3 g/l y el solvente B era de acetonitrilo/metanol (100/3, v/v). Las

condiciones del gradiente para el análisis de fosfolípidos fueron las siguientes: tiempo=0 min, 1% de solvente A; tiempo=190 min, 30% de solvente A; tiempo=21 min, 30% de solvente A; tiempo=24 min, 1% de solvente A; el caudal era de 1 ml/min. Los datos se recogieron y procesaron utilizando el software Agilent Chem. Station.

5 Análisis de gangliósidos: se separaron los gangliósidos mediante CL utilizando una columna Aquity BEH C18 (1,7 µm; 150 x 2,1 mm de d.i.; Waters). El sistema de cromatografía consistía en módulos Infinity1290 (Agilent Technologies, Basel, Suiza) acoplados con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo (Applied biosystems/MSD Sciex, 5500 Ontario, Canadá). Todas las cromatografías se llevaron a cabo a 50°C. El solvente A estaba compuesto de agua/metanol/acetato amónico (1 mM) (90/10/0,1, v/v/v) y el solvente B, de metanol/acetato amónico (1 mM) (100/0,1, v/v). Las condiciones del gradiente fueron las siguientes: tiempo=0 min, 10% de solvente A; tiempo=0,2 min, 10% de solvente A; tiempo=8,2 min, 5% de solvente A; tiempo=12,2 min, 5% de solvente A; tiempo=12,4 min, 0% de solvente A; tiempo=18,4 min, 0% de solvente A; tiempo=18,6 min, 10% de solvente A; tiempo=21, 10% de solvente A. El caudal era de 0,2 ml/min. El espectrómetro de masas estaba dotado de una fuente iónica de ionización por electropulverización (ESI, por sus siglas en inglés). El espectro de masas de ESI se registró en el modo de iones negativos bajo las condiciones siguientes: voltaje de pulverización iónica (IS) -4000 V, temperatura de la fuente: 250°C, potencial de desagrupación (DP): -40 V. Se monitorizaron los disialogangliósidos-3 (GD3) y los monosialogangliósidos-3 (GM3) mediante transiciones de los iones precursores al ion de producto de m/z 290 listado en la Tabla 1. El ion de m/z 290 corresponde a los fragmentos Neu5Ac obtenidos del tipo B de corte según (13). Los datos se recogieron y procesaron utilizando el software Multiquant 2.1 (Applied Biosystems, Sciex, Ontario, Canadá). La cuantificación se llevó a cabo mediante curva de calibración. Se prepararon soluciones patrón de GD3 y GM3 en metanol al 70% (1 mg/ml) y se llevaron a cabo diluciones adicionales hasta el volumen con metanol al 70%, proporcionando 6 niveles de concentración que cubrían el rango de 7,5 a 22,5 µg/ml. Se calculó el área total de GD3 y GM3 como las sumas de las superficies de los picos de las transiciones de los iones precursores al ion producto de m/z 290.

25 Análisis estadísticos:

Puntos de recolección de datos: 1, 2 y 4 meses después del nacimiento del bebé. La Tabla 2 muestra el min., media, SD y Max para cada unidad de medición. Los modelos estadísticos ajustados a los datos en bruto se muestran en las figuras 1 a 3. Se llevó a cabo un análisis longitudinal utilizando modelos mixtos lineales. Las figuras muestran además el efecto secuencial de cada uno de los términos edad, edad<sup>2</sup>, género e interacciones edad-género en este orden particular, en términos del valor de P para la prueba F correspondiente. De esta manera, P[edad] es un valor de P considerando un modelo lineal y P[edad<sup>2</sup>] corresponde a uno cuadrático. Se seleccionó el modelo apropiado de acuerdo con si la trayectoria era lineal (P[edad]) o curva (P[edad<sup>2</sup>]).

35 Se calcularon los R cuadrados ajustados a fin de obtener el grado de variabilidad explicado por los modelos estadísticos utilizados.

El análisis se llevó a cabo utilizando el modelo lineal de efectos mixtos siguiente:

40 
$$\text{Conc} = \text{Edad} + \text{Edad}^2 + \text{Género} + \text{Edad} \times \text{Género} - (\text{Edad}^2) \times \text{Género} + \text{Efectos aleatorios}$$

Los efectos aleatorios son términos específicos de sujeto que modelan la correlación subyacente entre las medidas repetidas.

45 Tabla 1. Iones precursores para GD3 y GM3. La energía de colisión (EC) se fijó en -40V.

Tipo de ion molecular	m/z predicho	m/z observado	Error de masa (ppm)	Estructura asignada
[M-H] <sup>-</sup>	1125,6897	1125,6902	8,7	GM3d32:0
[M-H] <sup>-</sup>	1151,7053	1151,7059	-5,1	GM3d34:1
[M-H] <sup>-</sup>	1149,6897	1149,6002	8,5	GM3d34:2
[M-H] <sup>-</sup>	1175,7053	1175,7059	5,0	GM3d36:3
[M-H] <sup>-</sup>	1173,6869	1173,6902	8,3	GM3d36:4
[M-H] <sup>-</sup>	1207,7679	1207,7685	1,3	GM3d38:1
[M-H] <sup>-</sup>	1235,7992	1235,7998	0,2	GM3d40:1
[M-H] <sup>-</sup>	1223,7992	1223,7998	0,2	GM3d40:7
[M-H] <sup>-</sup>	1263,8305	na	-	GM3d42:1
[M-H] <sup>-</sup>	1261,8149	na	-	GM3d42:2
[M-2H] <sup>2-</sup>	706,8808	706,8814	-1,9	GD3d32:1
[M-2H] <sup>2-</sup>	721,9043	721,9048	-6,7	GD3d34:0
[M-2H] <sup>2-</sup>	720,8965	720,8970	4,1	GD3d34:1
[M-2H] <sup>2-</sup>	719,8887	719,8892	0,2	GD3d34:2
[M-2H] <sup>2-</sup>	718,8808	718,8814	-1,9	GD3d34:3
[M-2H] <sup>2-</sup>	728,9121	728,9127	-3,7	GD3d35:0
[M-2H] <sup>2-</sup>	735,9195	735,9205	0,5	GD3d36:0

(continuación)

Tipo de ion molecular	m/z predicho	m/z observado	Error de masa (ppm)	Estructura asignada
[M-2H] <sup>2-</sup>	733,9043	733,9048	-6,6	GD3d36:2
[M-2H] <sup>2-</sup>	742,9278	742,9283	2,3	GD3d37:0
[M-2H] <sup>2-</sup>	741,9200	741,9205	-0,7	GD3d37:1
[M-2H] <sup>2-</sup>	749,9356	749,8984	2,1	GD3d38:0
[M-2H] <sup>2-</sup>	747,9200	747,9205	0,7	GD3d38:2
[M-2H] <sup>2-</sup>	746,9121	746,9127	-3,6	GD3d38:3
[M-2H] <sup>2-</sup>	745,9043	745,9048	6,5	GD3d38:4
[M-2H] <sup>2-</sup>	744,8965	744,8970	-9,4	GD3d38:5
[M-2H] <sup>2-</sup>	743,8887	743,8892	1,1	GD3d38:6
[M-2H] <sup>2-</sup>	763,9513	763,9528	-2,3	GD3d40:0
[M-2H] <sup>2-</sup>	762,9434	762,9440	-5,2	GD3d40:1
[M-2H] <sup>2-</sup>	777,9669	777,9674	3,3	GD3d42:0
[M-2H] <sup>2-</sup>	775,9513	775,9048	-6,2	GD3d42:2

nd: no detectado

na: la identificación mediante el espectrómetro de masas de elevada resolución másica no resultó posible debido a que se encontraba fuera del rango de capacidad de m/z del instrumento.

5

Tabla 2. Evolución longitudinal de la concentración de gangliósidos de ácido eicosatrienoico n-6 (DGLA) y fosfolípidos en leche humana (N=50)

Nutriente (mg por cada 100 ml)	Visita	Min.	Media	DE	Max.
Ácido eicosatrienoico n-6 (DGLA)	V1	2,04	15,38	6,43	31,92
	V2.	0,00	11,70	7,42	33,70
	V3.	0,00	10,64	8,67	38,90
GD3	V1.	0,08	0,23	0,12	0,69
	V2.	0,02	0,19	0,20	1,06
	V3.	0,00	0,17	0,19	0,89
GM3	V1.	0,08	0,23	0,08	0,45
	V2.	0,11	0,29	0,14	0,65
	V3.	0,01	0,39	0,18	0,89
GM3/GD3	V1	0,13	1,29	0,77	3,60
	V2.	0,16	3,28	2,96	13,44
	V3.	0,11	5,97	7,12	37,11
GM3+GD3	V1	0,21	0,46	0,15	1,07
	V2.	0,17	0,47	0,23	1,37
	V3.	0,06	0,55	0,27	1,49
Esfingomielina	V1	4,84	8,47	1,72	12,65
	V2.	2,45	7,71	3,01	17,74
	V3.	9,16	12,27	3,61	32,48
Fosfatidilcolina	V1	3,29	5,97	1,34	9,23
	V2.	1,62	4,84	2,06	11,92
	V3.	1,97	4,94	1,88	10,16
Fosfatidiletanolamina	V1	3,15	6,76	1,86	11,12
	V2.	2,35	6,36	3,11	18,25
	V3.	2,67	8,08	3,10	15,38
Fosfatidilinositol	V1	0,54	1,07	0,35	2,25
	V2.	0,41	1,13	0,55	2,70
	V3.	0,64	1,67	0,66	3,88
Fosfatidilserina	V1	0,27	0,75	0,31	1,93
	V2.	0,35	0,75	0,33	1,71
	V3.	0,39	0,91	0,33	1,93

Ejemplo 2:

- 10 Se proporciona a continuación un ejemplo de una fórmula infantil de inicio para bebés de hasta tres meses de edad. La fuente de proteínas era una mezcla convencional de proteínas de suero y caseína.

ES 2 761 555 T3

Nutriente	por cada 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	659,2
Proteínas (g)	1,67	11,02
Grasas (g)	6,28	41,72
Ácido linoleico (g)	0,85	5,66
Ácido $\alpha$ -linolénico (mg)	60	400,4
Ácido eicosatrienoico n-6 (mg)	20	153,8
Lactosa (g)	9,7	62,76
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50
Mn ( $\mu$ g)	8	50
Se ( $\mu$ g)	2	13
Vitamina A ( $\mu$ g de ER)	105	700
Vitamina D ( $\mu$ g)	1,5	10
Vitamina E (mg de ET)	0,8	5,4
Vitamina K1 ( $\mu$ g)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,5
Ácido fólico ( $\mu$ g)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 ( $\mu$ g)	0,3	2
Biotina ( $\mu$ g)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I ( $\mu$ g)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
GM3 (mg)	0,35	2,3
GD3 (mg)	0,33	2,3
Fosfatidilcolina (mg)	9,14	59,7
Fosfatidiletanolamina (mg)	10,33	67,6
Fosfatidilinositol (mg)	1,66	10,7
Fosfatidilserina (mg)	1,17	7,5

Ejemplo 3:

- 5 A continuación, se proporciona un ejemplo de la composición de una fórmula infantil hipoalergénica (HA) para niños de más de tres meses de edad según la presente invención. Dicha composición se proporciona exclusivamente a título ilustrativo. La fuente de proteínas era una mezcla convencional de proteínas de suero y caseína.

Nutriente	por cada 100 kcal	por litro
Energía (kcal)	100	702,43
Proteínas (g)	1,29	8,31
Grasas (g)	6,31	46,47
Ácido linoleico (g)	0,87	6,28
Ácido $\alpha$ -linolénico (mg)	50	380,5
Ácido eicosatrienoico n-6 (mg)	10	106,4
Lactosa (g)	9,48	64,45
Minerales (g)	0,37	2,5
Na (mg)	23	150
K (mg)	89	590
Cl (mg)	64	430
Ca (mg)	62	410
P (mg)	31	210
Mg (mg)	7	50

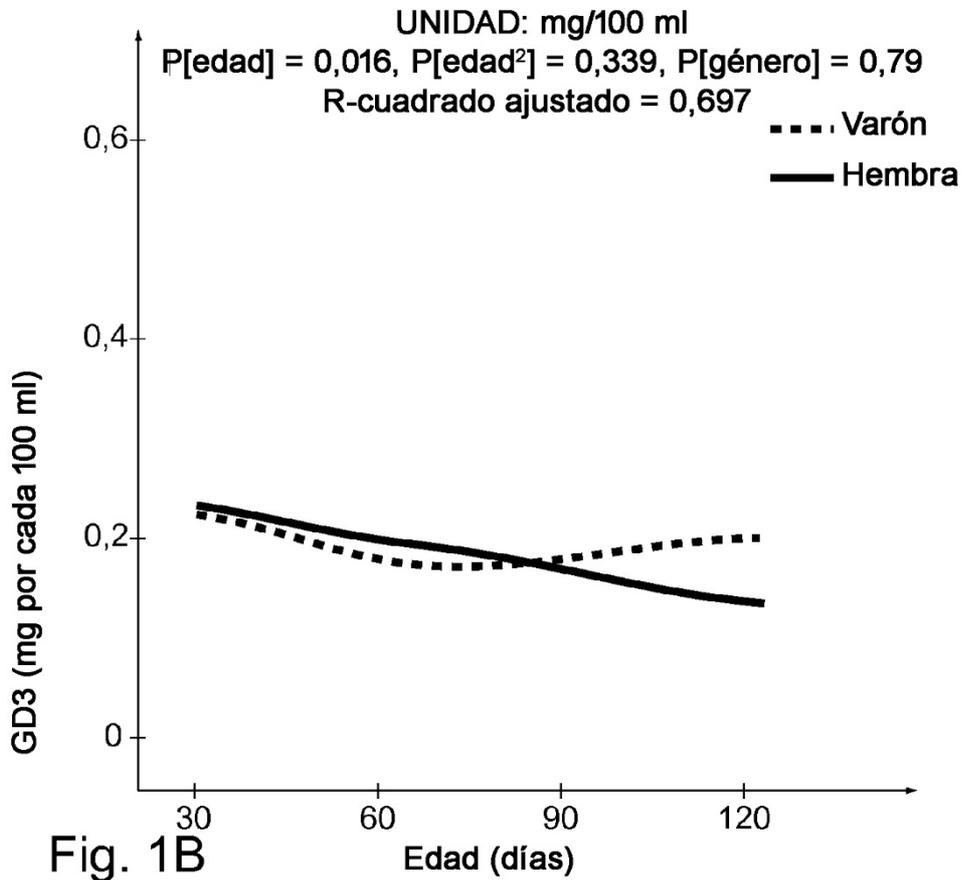
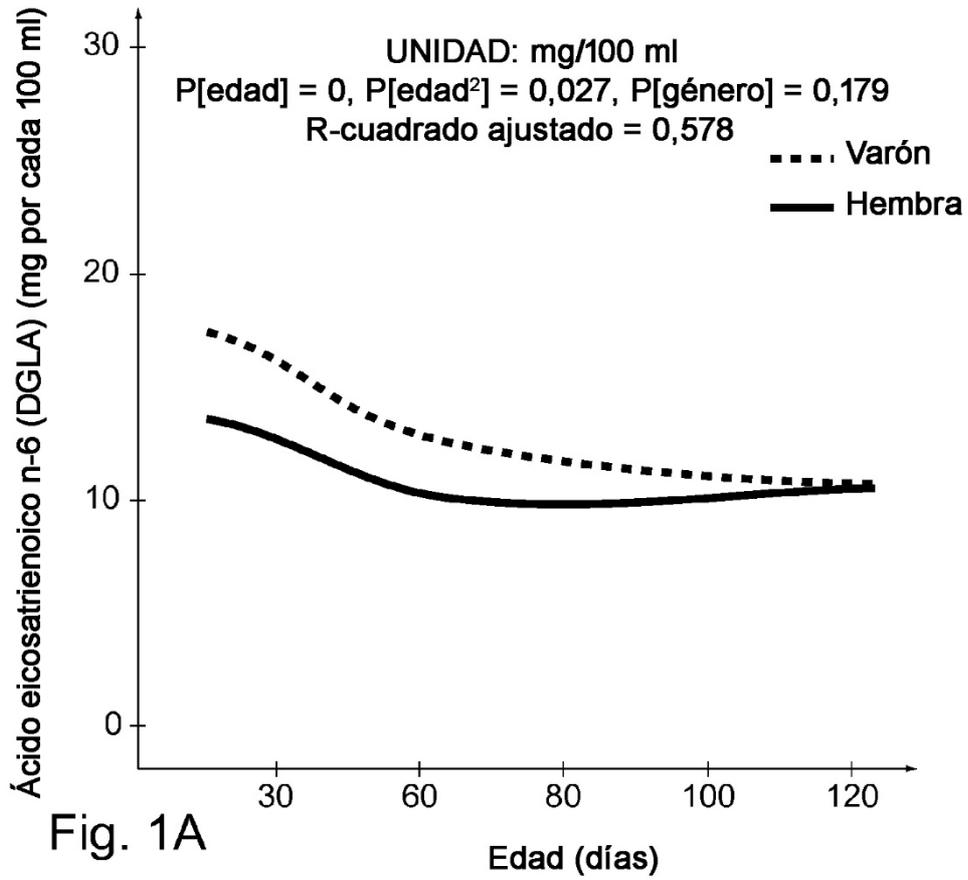
ES 2 761 555 T3

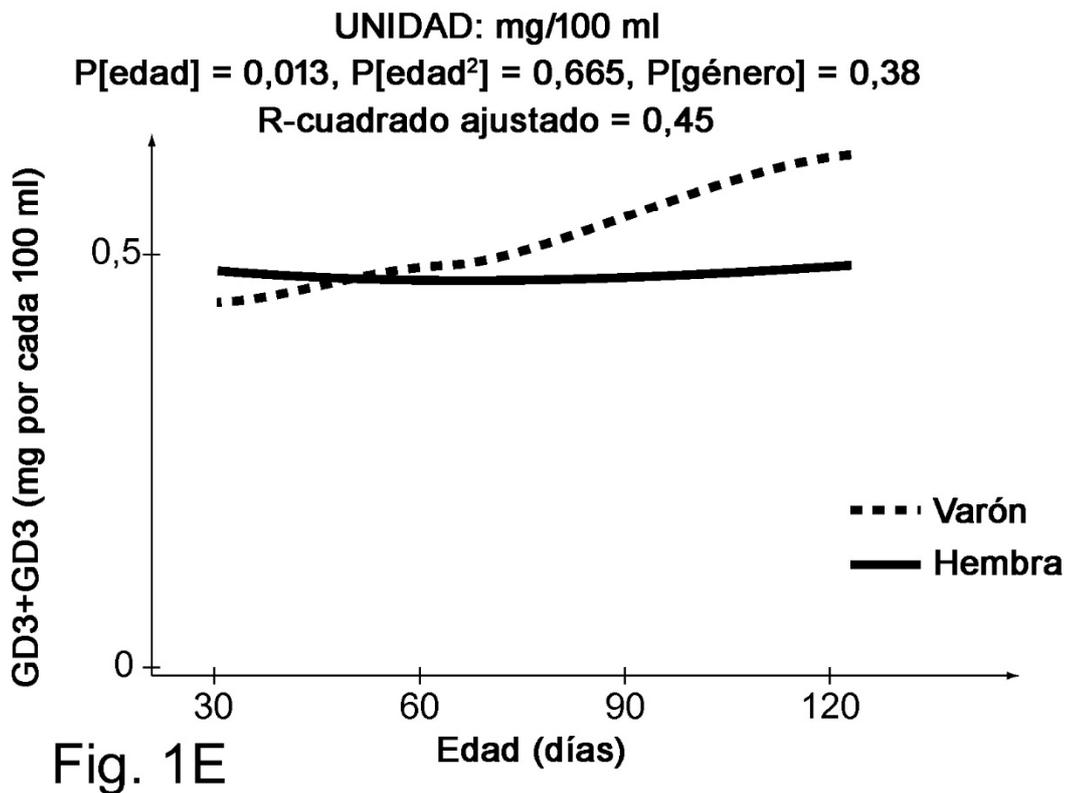
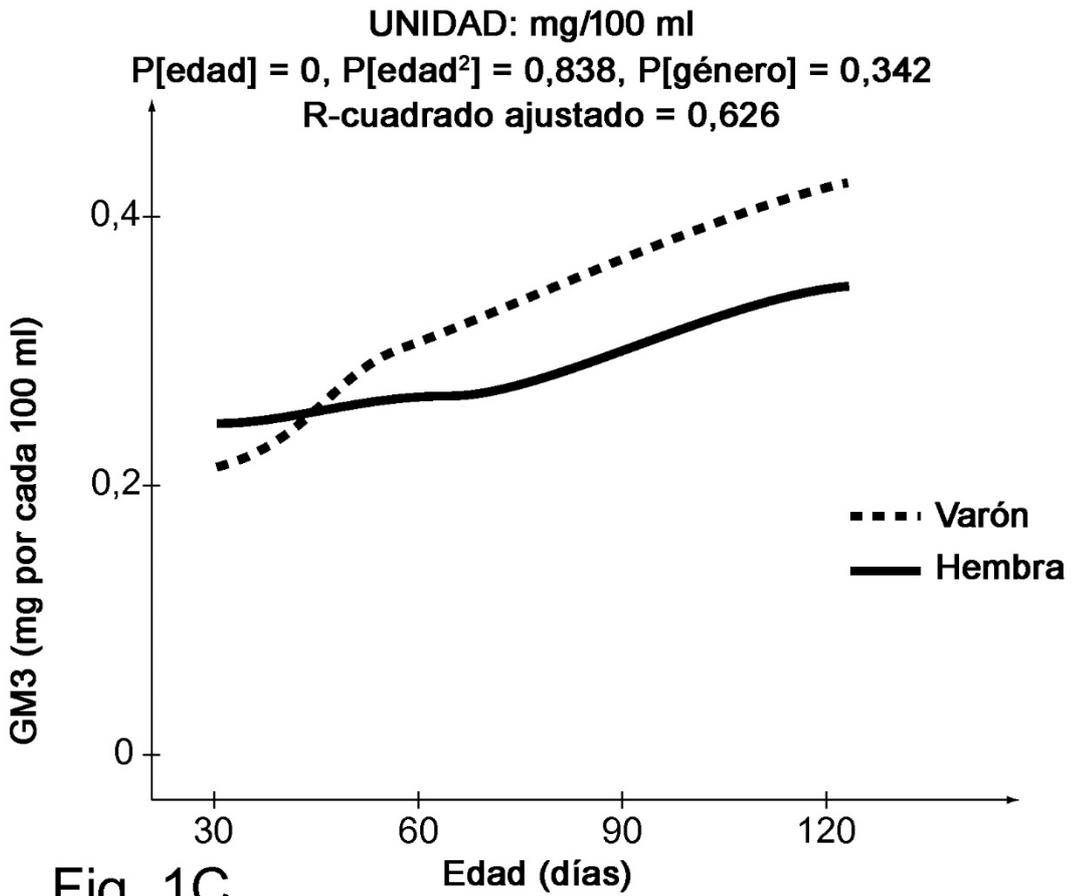
(continuación)

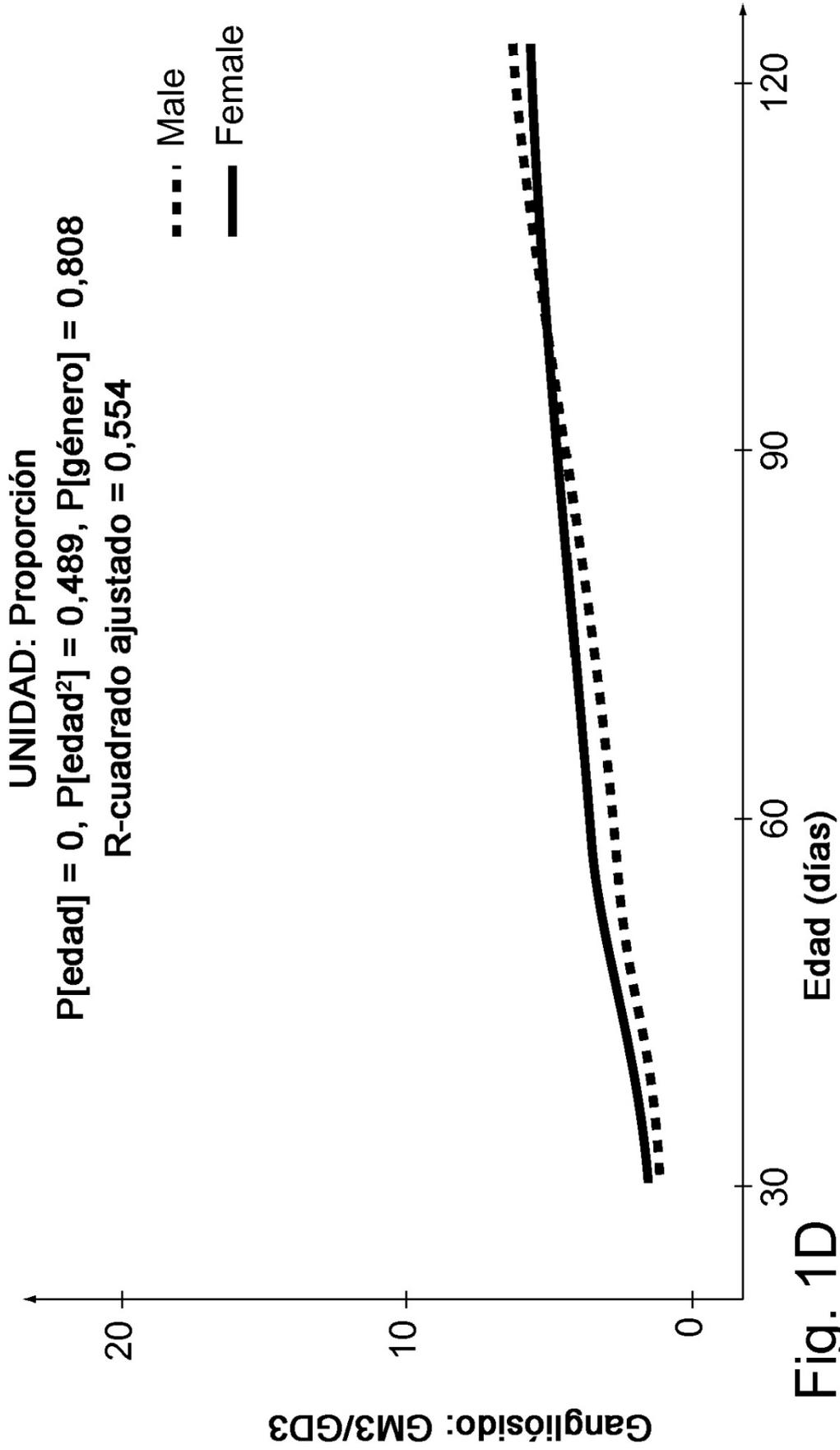
Nutriente	por cada 100 kcal	por litro
Mn (µg)	8	50
Se (µg)	2	13
Vitamina A (µg de ER)	105	700
Vitamina D (µg)	1,5	10
Vitamina E (mg de ET)	0,8	5,4
Vitamina K1 (µg)	8	54
Vitamina C (mg)	10	67
Vitamina B1 (mg)	0,07	0,47
Vitamina B2 (mg)	0,15	1
Niacina (mg)	1	6,7
Vitamina B6 (mg)	0,075	0,5
Ácido fólico (µg)	9	60
Ácido pantoténico (mg)	0,45	3
Vitamina B12 (µg)	0,3	2
Biotina (µg)	2,2	15
Colina (mg)	10	67
Fe (mg)	1,2	8
I (µg)	15	100
Cu (mg)	0,06	0,4
Zn (mg)	0,75	5
GM3 (mg)	0,56	3,9
GD3 (mg)	0,27	1,7
Fosfatidilcolina (mg)	6,89	49,4
Fosfatidiletanolamina (mg)	11,28	80,8
Fosfatidilinositol (mg)	2,34	16,7
Fosfatidilserina (mg)	1,3	9,1

**REIVINDICACIONES**

1. Composición nutritiva sintética para bebés, que comprende:
- 5 a. 13,8 a 17 mg/100 ml de ácido eicosatrienoico n-6,  
b. 0,2 a 0,25 mg/100 ml de GD-3,  
c. 0,2 a 0,25 mg/100 ml de GM-3,  
d. GM-3 y GD-3 en una proporción GM-3:GD-3 de 1,1 a 1,45, y  
e. 0,4 a 0,52 mg/100 ml de GD-3+GM-3,
- 10 en la que la composición está especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de bebés de menos de tres meses de edad.
2. Composición nutricional sintética según la reivindicación 1, en la que la composición comprende, además: f: 7,6 a 9,3 mg/100 ml de esfingomiélin.
- 15 3. Composición nutricional sintética según la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en la que la composición comprende, además, uno cualquiera o una mezcla de los fosfolípidos g.-j.:
- 20 g. 5,4 a 6,6 mg/100 ml de fosfatidilcolina,  
h. 6,0 a 7,5 mg/100 ml de fosfatidiletanolamina,  
i. 1 a 1,2 mg/100 ml de fosfatidilinositol, y  
j. 0,7 a 0,8 mg/100 ml de fosfatidilserina.
- 25 4. Composición nutritiva sintética para bebés o niños pequeños, que comprende:
- a. 9,5 a 11,7 mg/100 ml de ácido n-6 eicosatrienoico,  
b. 0,15 a 0,20 mg/100 ml de GD-3,  
c. 0,34 a 0,44 mg/100 ml de GM-3,  
30 d. GM-3 y GD-3 en una proporción GM-3:GD-3 de 5,2 a 6,6, y  
e. 0,50 a 0,62 mg/100 ml de GD-3+GM-3,
- en la que la composición está especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de bebés o niños pequeños de más de tres meses de edad.
- 35 5. Composición nutricional sintética según la reivindicación 4, en la que la composición comprende, además: f: 7,8 a 9,6 mg/100 ml de esfingomiélin.
6. Composición nutricional sintética según la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en la que la composición comprende, además, uno cualquiera o una mezcla de los fosfolípidos g.-j.:
- 40 g. 4,4 a 5,4 mg/100 ml de fosfatidilcolina,  
h. 7,3 a 9,0 mg/100 ml de fosfatidiletanolamina,  
i. 1,0 a 1,2 mg/100 ml de fosfatidilinositol, y  
45 j. 0,8 a 1,0 mg/100 ml de fosfatidilserina.
7. Método para la preparación de una fórmula infantil, que comprende las etapas:
- 50 - proporcionar una fórmula infantil en polvo que contiene ácido n-6-eicosatrienoico, GD-3 y GM-3,  
- diluir la composición de polvos con agua, proporcionando un producto líquido final según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.
8. Conjunto de por lo menos dos composiciones nutricionales sintéticas para bebés o niños pequeños, en el que la primera composición es según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y la segunda composición es según cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en el que la primera composición está especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de bebés de menos de tres meses de edad y la segunda composición está especialmente adaptada a las necesidades nutricionales de bebés o niños pequeños de más de tres meses de edad.
- 55 60







**Fig. 1D**

