



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT
SOLICITUD



PATENTE DE INVENCION

08-127148

21. EXPEDIENTE No.

34. TÍTULO "FÓRMULAS INFANTILES PARA EL
DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A231 1/29

71. SOLICITANTE ABBOTT LABORATORIES

DOMICILIO ABBOTT PARK, ESTADO DE ILLINOIS,
ESTADOS UNIDOS DE AMÉRICA

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C.

PETITORIO



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-127148-00000-0000

Fecha: 2008-11-28 16:01:25
Tra. 11 PATENTE IYII
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACION
Eve: 378 FASE NACIONAL
Folios: 105

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

30 ene 2009

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **ABBOTT LABORATORIES**

Dirección: 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Abbott Park, Estado de Illinois, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estado de Illinois, Estados Unidos de América.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDÁ RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º, Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: RUEDA-CABRERA, Ricardo; BARRANCO, Alejandro; RAMIREZ, Maria; VAZQUEZ, Enrique; VALVERDE, Eduardo; PRIETO, Pedro y DOHNALEK, Margaret.

Dirección: Ctra. Huetor Vega, N 38, Urb. Villa Arguez Casa 8, E-18008 Granada; C/Chirivil, N 43, Urb. Los Chopos, E-18110 Las Gabias; C/Ramon y Cajal 54, Portal 2, 4 A, E-18003 Granada; Camino de Gojar 42, Urb Los Nenufares, 52, E-18151 Ogijares; Avda. Hector, E-18198 Cajar; 1644 Crusoe Drive, Columbus, OH 43235 y 1021 Portsmouth Circle, Gurnee, IL 60031.

Nacionalidad o Domicilio: España y Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/072541

Fecha: 29/06/07

Publicación Internacional No. WO 2008/005869 A3

Fecha: 10/01/08

⑥

Título (54)

“FÓRMULAS INFANTILES PARA EL DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO”

⑦

Clasificación Internacional (51) A23L 1/29

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

30/06/06

(31) Número de Solicitud

11/479,621

⑨

Comprobante de Pago No. 08-91,879

Fecha: 25 de Noviembre de 2008

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional, publicación y opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional.

11

FIGURA CARACTERISTICA:

12

Solicito la concesión de la patente

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 91,879
FECHA : NOVIEMBRE 25 DE 2008

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-127148- -00000-0000

Fecha: 2008-11-28 16:01:25 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 105

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	80211891	25/11/2008	5,703,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE/PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE :

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDADA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDADA RICAURTE

T.P. No. 53.215

Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América,

con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias; y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 12 de Julio de 2004

The undersigned, **ABBOTT LABORATORIES**, a corporation organized and existing under the laws of the State of Illinois, United States of America,

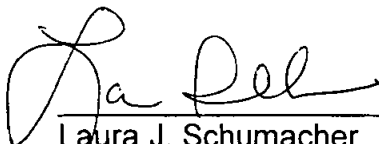
domiciled at 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA

hereby appoint, ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, of Bogota, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications and registrations, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and additionally we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to conciliate, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this 12th day of July, 2004



Laura J. Schumacher
Vice President, Secretary and Deputy General
Counsel



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América

Estado de {ss

Condado de

Hoy 12 de Julio de 2004, compareció
Laura J. Schumacher, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
éles Vice Presidenta, Secretaria y Asesora
de ABBOTT

LABORATORIES, la compañía nombrada en el
documento que antecede, una sociedad
debidamente organizada y existente conforme a las
leyes del Estado de Illinois, Estados
Unidos de América, domiciliada en la ciudad de
Abbott Park, Condado de Lake
Estado de Illinois, Estados Unidos de
América, legalmente constituida para un período de
duración que aún no ha terminado, que ejerce su
objeto social conforme a las leyes del Estado de
Illinois, Estados Unidos de América;
que el declarante está autorizado por dicha
Compañía para conferir este poder; que el sello
estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en
representación de la expresada Compañía, es el
sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se
confiere este instrumento está comprendido dentro
del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
incorporación firmados en Chicago
Estado de Illinois, con fecha Sep. 12, 2003,
y certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America

State of {ss

County of

On this 12th day of July, 2004,

personally
came

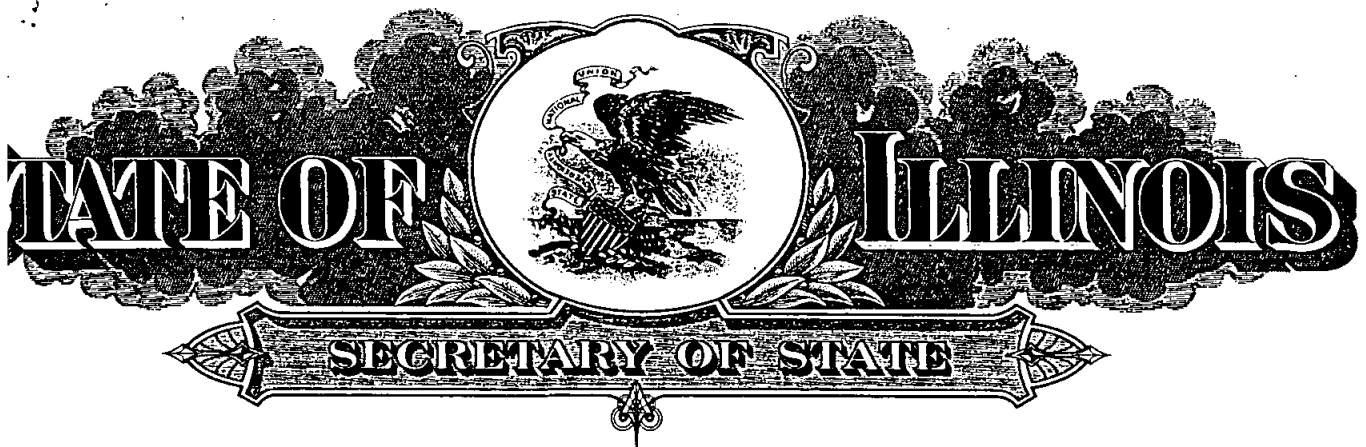
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that she is the Vice President
Secretary and Deputy
General Counsel of ABBOTT

LABORATORIES, the company named within, a
Corporation organized and existing under the laws of
the State of Illinois, United
States of America, domiciled at the City of Abbott Park
County of Lake

State of Illinois, United States of America,
legally constituted for a period of tenure not yet
expired, which exercises its corporate purposes
according to the laws of the State of Illinois,
United States of America; that the deponent is
authorized by said Company to confer this power of
attorney; that the seal affixed hereunto by the
deponent in the name and on behalf of said
Corporation is the corporate seal thereof; and that the
purpose for which this instrument is granted is
included within the corporate purposes of the
Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Chicago, State of Illinois, under date of
September 12, 2003, and hereby
certifies that under the laws of said State the
foregoing acknowledgment is sufficient proof that the
facts therein contained are true, which he attests.





SPRINGFIELD, ILLINOIS

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. Country: United States of America
This public document
2. has been signed by TRINA LEE RUIZ
3. acting in the capacity of NOTARY PUBLIC, LAKE COUNTY
4. bears the seal/stamp of STATE OF ILLINOIS

Certified

5. Springfield, Illinois
6. JULY 20, 2004
7. by the Secretary of State, State of Illinois
8. No. S04VB11001
9. Seal/Stamp:
10. Signature:



Jesse White

JESSE WHITE
SECRETARY OF STATE
STATE OF ILLINOIS

TRADUCCION OFICIAL No. 2008-05-16-324
DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES

Los abajo firmados, **ABBOTT LABORATORIES**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, con domicilio en 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 USA nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes y los registros, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses; y adicionalmente quedan facultados para tomar intervención como demandantes o

demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir, conciliar y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado el 12 de julio de 2004

(firma: ilegible)

Laura J. Schumacher

Vicepresidente, Secretaria y Asesor Legal General Asistente

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América)

Estado de) ss:

Condado de)

En este día 12 de julio de 2004, compareció Laura J. Schumacher, a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que ella es la Vicepresidenta, Secretaria y Asesora de ABBOTT LABORATORIES, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América, domiciliada en la ciudad de Abbott Park, Condado de Lake, Estado de Illinois, Estados Unidos de América, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social conforme a las leyes del Estado de Illinois, Estados Unidos de América; que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en Chicago, Estado de Illinois, con fecha 12 de septiembre de 2003, y certifica que de conformidad con la legislación de dicho Estado la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

(firma: ilegible)

Notario Público



Estado de Illinois
Secretario de Estado
Springfield, Illinois

Apostilla

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
- Este documento público
3. ha sido firmado por Trina Lee Ruiz
3. actuando como Notario Público, Condado de Lake
4. lleva el sello/estampilla del Estado de Illinois

Certificado

5. en Springfield, Illinois
6. el día 20 de julio de 2004
7. por el Secretario de Estado, Estado de Illinois
8. No. S04VB11001
9. Sello/Estampilla
10. Firma (ilegible)
- Sello del Estado de Illinois
- Jesse White
- Secretario de Estado
- Estado de Illinois

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 16 de mayo de 2008,
en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial.
Res. 2177 del 15 de agosto de 1989, Ministerio de Justicia, República de
Colombia.

TRADUCTORA OFICIAL
RES. 2177/89 MINJUSTICIA
Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
1) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A23L 1/29	
2) Fecha de solicitud: 28-11-08		(71) Solicitante(s): ABBOTT LABORATORIES	
0) Prioridad	(31) No. Prioridad 11/479,621	(32) Fecha 30-06-06	(33) País US
		(72) Inventor(es): RUEDA-CABRERA, Ricardo; BARRANCO, Alejandro; RAMIREZ, Maria; VAZQUEZ, Enrique; VALVERDE, Eduardo; PRIETO, Pedro y DOHNALEK, Margaret.	
		(74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE	
5)	Fecha límite inicio fase nacional: 30-01-09	(87) Publicación internacional	
6)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: 10-01-08	
	Fecha de presentación de la solicitud: 29-06-07	N° publicación: WO 2008/005869 A3	
	No. de solicitud: PCT/US2007/072541		
4) Título: FÓRMULAS INFANTILES PARA EL DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO			

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 1.-

Una fórmula infantil que comprende:

- A. Al menos alrededor de 6.5 g/L, sobre una base alimentaria, de un concentrado proteínico de suero enriquecido,
- B. Al menos alrededor de 0.13% de ácido docosahexaenoico por peso de ácidos grasos totales, y,
- C. Al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico por peso de ácidos grasos totales.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud: 28-11-08

(51) Clasificación Internacional: A23L 1/29

(71) Solicitante(s): **ABBOTT LABORATORIES**

(72) Inventor(es): RUEDA-CABRERA, Ricardo; BARRANCO, Alejandro; RAMIREZ, Maria; VAZQUEZ, Enrique; VALVERDE, Eduardo; PRIETO, Pedro y DOHNALEK, Margaret.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad

(31)

No. Prioridad

(32)

Fecha

(33)

País

11/479,621

30-06-06

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30-01-09

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: **10-01-08**

Fecha de presentación de la solicitud: 29-06-07

N° publicación: **WO 2008/005869 A3**

No. de solicitud: **PCT/US2007/072541**

(54) Título:

FÓRMULAS INFANTILES PARA EL DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO

A3



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES**

TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO

PATENTE DE INVENCION ____ PCT X MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 28-11-08

(51) Clasificación Internacional: A23L 1/29

(71) Solicitante(s): **ABBOTT LABORATORIES**

(72) Inventor(es): RUEDA-CABRERA, Ricardo; BARRANCO, Alejandro; RAMIREZ, Maria; VAZQUEZ, Enrique; VALVERDE, Eduardo; PRIETO, Pedro y DOHNALEK, Margaret.

(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País
	11/479,621	30-06-06	US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 30-01-09

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT
Fecha de presentación de la solicitud: 29-06-07
No. de solicitud: **PCT/US2007/072541**

(87) Publicación internacional:

Fecha: **10-01-08**

No. Publicación : **WO 2008/005869 A3**

FIGURA CARACTERISTICA
6 x 6 cm

(54) Título:

FÓRMULAS INFANTILES PARA EL DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO

(57) Resumen:

Reivindicación número 1.-

Una fórmula infantil que comprende:

- A. Al menos alrededor de 6.5 g/L, sobre una base alimentaria, de un concentrado proteínico de suero enriquecido,
- B. Al menos alrededor de 0.13% de ácido docosahexaenoico por peso de ácidos grasos totales, y,
- C. Al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico por peso de ácidos grasos totales.

CONTINUA AL RESPALDO ...

14

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:

ABBOTT LABORATORIES
Attn: Weida, Sandra E.
108146 DS1
625 Cleveland Avenue
Columbus, OH 43215
STATS-UNIS D'AMERIQUE

RECEIVED
FEB 21 2008
ROSS PATENT

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year) 07/02/2008	
Applicant's or agent's file reference 8271WOPI <i>OL</i>	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US2007/072541	International filing date (day/month/year) 29/06/2007
Applicant ABBOTT LABORATORIES	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:
The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the International Application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the International Search Report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: (41-22) 338.82.70
For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional/fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, within **20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the International Searching Authority  European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Eleonora Longo
--	--------------------------------------

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article", "Rule", and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When?

Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How?

Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 8271WOP1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2007/072541	International filing date (day/month/year) 29/06/2007	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 30/06/2006
Applicant ABBOTT LABORATORIES		

This international search report has been prepared by this international Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 5 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6b(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☒ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention

b. ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2007/072541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. A23L1/29 A23L1/30 A23L1/305 A61K31/202 A61K31/685 A61K31/7032 A61P25/00 A61P27/02		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) A23L A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data, FSTA, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/093557 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO [US]; MCMAHON ROBERT J [US]; LOCNISKAR MARY FR) 4 November 2004 (2004-11-04) paragraphs [0010] - [0012], [0019], [0020], [0043] example 5; table 5	1-30
X	WO 2005/000040 A (UNIV KANSAS MEDICAL CT [US]; CARLSON SUSAN E [US]) 6 January 2005 (2005-01-06) page 1, lines 1-7 page 1, line 20 - page 2, line 13 claims 12,16,17,28,29 page 7, lines 1-7 page 8, lines 9-30 page 10, line 27 - page 11, line 20 page 12, lines 1-4 ----- -/--	1-30
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. "Z" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 29 January 2008		Date of mailing of the international search report 07/02/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040. Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Heirbaut, Marc

AB

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GIL A ET AL: "ROLE OF LONG-CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN INFANT NUTRITION" September 2003 (2003-09), EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, XX, XX, PAGE(S) S31-S34 , XP009079816 abstract page S31 page S32, column 1, paragraph 3 - page S33, column 1, paragraph 1 -----	1-30
Y	SANCHEZ-DIAZ A ET AL: "A CRITICAL ANALYSIS OF TOTAL SIALIC ACID AND SIALOGLYCOCONJUGATE CONTENTS OF BOVINE MILK-BASED INFANT FORMULAS" April 1997 (1997-04), JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, PAGE(S) 405-410 , XP008000726 ISSN: 0277-2116 abstract -----	1-30
Y	KAWAKAMI H: "BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF SIALIC ACID-CONTAINING SUBSTANCES IN MILK AND THEIR APPLICATION" 1997, RECENT RESEARCH DEVELOPMENTS IN AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, PAGE(S) 193-208 , XP001064913 page 193, column 1, paragraph 1 - page 194, column 1, paragraph 2 page 205, column 2, paragraph 2 - page 206, column 2, paragraph 1 -----	1-30
Y	WO 2005/051091 A1 (ENZYMOTEC LTD [IL]; SHULMAN AVIDOR [IL]; BEN DROR GAI [IL]; PELLED DOR) 9 June 2005 (2005-06-09) claims 2,7,8,21,22,36-41 -----	1-30
Y	WANG B ET AL: "Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants" 2003, AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, BETHESDA, MD, US, PAGE(S) 1024-1029 , XP002415483 ISSN: 0002-9165 abstract page 1027, column 2, paragraph 1 - page 1029, column 1, paragraph 1 -----	1-30

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2007/072541

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 15-30
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claims 15-30 are directed to a method of treatment of the human body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.
Rule 39.1(iv) PCT - Method for treatment of the human body by therapy
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependant claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers allsearchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2007/072541

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004093557 A	04-11-2004	BR PI0409309 A	18-04-2006
		CA 2522091 A1	04-11-2004
		CN 1802094 A	12-07-2006
		EP 1613169 A1	11-01-2006
		KR 20060006921 A	20-01-2006
		MX PA05010806 A	05-12-2005
		US 2004202765 A1	14-10-2004
		US 2005096295 A1	05-05-2005
WO 2005000040 A	06-01-2005	CA 2530170 A1	06-01-2005
		CN 1842277 A	04-10-2006
		EP 1643862 A1	12-04-2006
		KR 20060030860 A	11-04-2006
		MX PA05014190 A	03-07-2006
WO 2005051091 A1	09-06-2005	NONE	

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 January 2008 (10.01.2008)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2008/005869 A3

(51) International Patent Classification:

A23L 1/29 (2006.01) A61K 31/685 (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 31/7032 (2006.01)
A23L 1/305 (2006.01) A61P 25/00 (2006.01)
A61K 31/202 (2006.01) A61P 27/02 (2006.01)

Margaret [US/US]; 1021 Portsmouth Circle, Gurnee, IL 60031 (US).

(74) Agents: WEIDA, Sandra, E. et al.; 625 Cleveland Avenue, Dept. 108140 DS1, Columbus, OH 43215 (US).

(21) International Application Number:

PCT/US2007/072541

(22) International Filing Date: 29 June 2007 (29.06.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:

11/479,621 30 June 2006 (30.06.2006) US

(71) Applicant (for all designated States except US): ABBOTT LABORATORIES [US/US]; Dept. 377/AP6A-1, 100 Abbott Park Road, Abbott Park, IL 60064 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): RUEDA-CABRERA, Ricardo [ES/ES]; Ctra.Huector Vega, N 38, Urb. Villa Argzcz Casa 8, E-18008 Granada (ES). BARRANCO, Alejandro [ES/ES]; C/Chirivil, N 43, Urb. Los Chopos, E-18110 Las Gabias (ES). RAMIREZ, Maria [ES/ES]; C/Ramon y Cajal 54, Portal 2, 4 A, E-18003 Granada (ES). VAZQUEZ, Enrique [ES/ES]; Camino de Gojar 42, Urb Los Nenufares, 52, E-18151 Ogijares (ES). VALVERDE, Eduardo [ES/ES]; Avda. Hector, E-18198 Cajar (ES). PRIETO, Pedro [US/US]; 1644 Crusoe Drive, Columbus, OH 43235 (US). DOHNALEK,

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:

— with international search report
— before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(88) Date of publication of the international search report:
27 March 2008

(54) Title: INFANT FORMULAS FOR EARLY BRAIN DEVELOPMENT

(57) Abstract: Disclosed are infant formulas comprising at least about 6.5 g/L, on an as-fed basis, of an enriched whey protein concentrate, at least about 0.13% docosahexaenoic acid by weight of total fatty acids, and at least about 0.25% arachidonic acid by weight of total fatty acids. The formulas also typically include at least about 5 mg/L of gangliosides, at least about 150 mg/L of phospholipids, and at least about 70 mg/L of total sialic acid with at least about 2.5% as lipid-bound sialic acid, all of which are provided in whole or in part from the enriched whey protein concentrate. Also disclosed are methods of accelerating brain development, neural migration, and cognitive development in an infant by administering the infant formulas during the first 2-4 months of life, preferably as a sole source of nutrition.

WO 2008/005869 A3

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/US2007/072541

International filing date (day/month/year)
29.06.2007

Priority date (day/month/year)
30.06.2006

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A23L1/29 A23L1/30 A23L1/305 A61K31/202 A61K31/685 A61K31/7032 A61P25/00 A61P27/02

Applicant
ABBOTT LABORATORIES

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1 (a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☒ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Heirbaut, Marc

Telephone No. +49 89 2399-8642



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/072541

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material:
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material:
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing:
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US2007/072541

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 15-30 (industrial applicability)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 15-30 relate to the following subject matter which does not require an international search (*specify*):

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☐ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13ter.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions.

☒ See Supplemental Box for further details

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US2007/072541

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-30</u>
Inventive step (IS)	Yes: Claims	
	No: Claims	<u>1-30</u>
Industrial applicability (IA)	Yes: Claims	<u>1-14</u>
	No: Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VII Certain defects in the International application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Section III

- 1 Present claims 15-30 and the corresponding passages of the description (page 3, paragraphs 1-2; page 15, last paragraph to page 16, paragraph 3) relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Acceleration of brain development, neural migration, vision and cognitive development are considered to represent therapeutic indications. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Section V

- 1 Reference is made to the following prior art documents (D):

- D1: WO-A-2004 093 557
- D2: WO-A-2005 000 040
- D3: GIL A ET AL: "ROLE OF LONG-CHAIN POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN INFANT NUTRITION" September 2003 (2003-09), EUROPEAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, XX, XX, PAGE(S) S31-S34 , XP009079816
- D4: SANCHEZ-DIAZ A ET AL: "A CRITICAL ANALYSIS OF TOTAL SIALIC ACID AND SIALOGLYCOCONJUGATE CONTENTS OF BOVINE MILK-BASED INFANT FORMULAS" April 1997 (1997-04), JOURNAL OF PEDIATRIC GASTROENTEROLOGY AND NUTRITION, RAVEN PRESS, NEW YORK, NY, US, PAGE(S) 405-410 , XP008000726 ISSN: 0277-2116
- D5: KAWAKAMI H: "BIOLOGICAL SIGNIFICANCE OF SIALIC ACID-CONTAINING SUBSTANCES IN MILK AND THEIR APPLICATION" 1997, RECENT RESEARCH DEVELOPMENTS IN AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL CHEMISTRY, PAGE(S) 193-208 , XP001064913
- D6: WO 2005/051091 A1
- D7: WANG B ET AL: "Brain ganglioside and glycoprotein sialic acid in breastfed compared with formula-fed infants" 2003, AMERICAN JOURNAL OF CLINICAL NUTRITION, BETHESDA, MD, US, PAGE(S) 1024-1029 , XP002415483 ISSN: 0002-9165

Particular reference is made to the passages of said prior art documents and the combination of features taught therein as indicated in the search report.

- 2 The subject-matter of present independent claim 1 (infant formula) does not meet the requirements of novelty (Article 33(2) PCT) in the light of any of the prior art documents D1-D2, which teach the combination of features indicated in said claim.

Document D1 discloses a nutritionally complete infant feeding product comprising 300-600 mg/l of sialic acid for supporting normal growth and development of the infant. The source of sialic acid may be free N-acetylneuraminic acid (NANA), sialyllactose, sialic acid-containing gangliosides and casein macropeptide. In a particular embodiment disclosed, the product additionally comprises ARA, DHA and lecithin (being a phospholipid) in amounts as indicated in claim 1, and the sialic acid is derived from whey protein concentrate and caseino glyco macropeptide. Whey protein concentrate is also the preferred source of sialic acid, including the lipid-bound fraction thereof, in the present application, and also comprises gangliosides. In the case of gangliosides, lipid-bound sialic acid is present in significant amounts (see paragraph 34 of the present application). Thus, the proportion of at least 2.5 wt% of sialic acid being lipid-bound is implicitly disclosed in document D1.

Document D2 discloses an infant formula comprising 200-2300 mg/l sialic acid, DHA, and AA, which can be provided through egg phospholipid in amounts as claimed in present claim 1. The sialic acid may be derived from gangliosides, and in an embodiment disclosed gangliosides provide an amount of 5% of the total source of sialic acid. This implies an amount of at least 10 mg/l of gangliosides (5% of 200 mg/l of sialic acid, being the lower limit of the range disclosed). The administration of said infant formula enhances neurological development.

Furthermore, it is stressed that the feature "enriched whey protein concentrate" is unclear, and cannot distinguish the subject-matter of said claims from prior art documents in which the presence of whey protein concentrate is disclosed (see also section VIII, paragraph 1.2).

- 3 The subject-matter of present independent claim 15 (method) does not meet the requirements of novelty (Article 33(2) PCT) in the light of the prior art documents D1-D2, which teach the combination of features indicated in said claim.

See paragraph 2 *supra* for a discussion of said documents. As they disclose an infant formula, the administration thereof during the first 2-4 months of life of an infant is implicitly disclosed.

- 4 The subject-matter of present independent claims 28-30 (method) meets the requirements of novelty (Article 33(2) PCT).

None of the prior art documents cited in the international search report teaches the subject-matter having the combination of features indicated in said claims, in particular the specific effects of the use of the claimed infant formula.

- 5 The subject-matter of present independent claims 28-30 (method) does not meet the requirements of inventive step (Article 33(3) PCT) in the light of (1) the teachings of any of the prior art documents D1 or D2 alone or (2) in the light of the combined teachings of documents D3-D7, and (3) because it has not been shown convincingly that the technical problem underlying the present application has been solved successfully.

- 5.1 The disclosure of documents D1 and D2 is discussed in paragraph 2 *supra*.

The subject-matter of claims 28-30 differs from the teaching of documents D1 and D2 in that specific effects of the use of said formula (*ie* acceleration of neural migration, vision development, cognitive development) are disclosed.

However, document D1 discloses that there is evidence that NANA is important for the development and function of the neonatal brain where it is a major component of gangliosides, that cow-milk based formulae generally have a low sialic acid content, and that the infant formula disclosed overcomes this defect. Hence, the skilled person, seeking to achieve the effects disclosed in claims 28-30, would have inferred from document D1 itself that it would be suitable for that purpose, as acceleration of brain development, neural migration, vision and cognitive development are aspects of neonatal brain development and the administration during 2 or 4 months as a sole source of nutrition is obvious, as said formula is designed as to replace human milk during the neonatal phase.

Document D2 discloses that the administration of said infant formula enhances neurological development. Since acceleration of neural migration, vision development, cognitive development are aspects of neurological development, the

skilled person would have inferred these specific effects from the general effect disclosed in document D2.

- 5.2 The subject-matter of said claims also lacks inventive step in view of the combined teachings of documents D3-D7, which disclose the important role each of the components of the infant formula in the amounts disclosed in said claims plays in neurological development, such as in cognitive and visual development. Hence, the skilled person would have been motivated to combine said ingredients in an infant formula, hence arriving at the subject-matter of said claims without inventive skill. No synergistic effect of said combination has been demonstrated in the present application.

Document D3 discloses that supplementation of infant formula with DHA and AA at levels such as present in human milk is recommended, these PUFAs have a positive influence on visual and brain function parameters, such as cognitive development, perception and visual acuity; they are preferably administered through phospholipids.

Document D4 discloses that total sialic acid and sialoglycoconjugate content of a number of bovine milk based infant formulae is lower than of human milk. Consequently, supplementation of formulae for neonates with sialic acid containing glycoconjugates is recommended.

Document D5 discloses that an infant formula comprising increased levels of sialic acid and gangliosides approximates human milk better than conventional cow based formulae. The role of sialic acid and gangliosides in neurological development of neonates is specifically referred to.

Document D6 discloses a homogeneous lipid preparation comprising combination of PC, PE, PG, PI wherein the quantitative ratio between said glycerophospholipids essentially mimics their corresponding ratio in naturally occurring human milk fat, can further comprise sphingomyelin, AA and DHA.

Document D7 discloses a comparison of brain ganglioside and glycoprotein ganglioside in breastfed and formula fed infants. It is specifically disclosed that both

gangliosides and DHA are considered important building blocks in neurological and cognitive development.

- 5.4 Furthermore, no conclusive evidence has been provided that the technical problem has actually been successfully solved. The experimental results do not show a significant difference between the composition according to the claimed invention and comparative compositions, which comprise lower amounts of DHA and AA or which comprise "conventional" whey protein concentrate. Particular reference is made to page 34 paragraph 3 to page 35 paragraph 2; page 38 last paragraph to page 39 paragraph 3. Moreover, the term "enriched whey protein concentrate" employed is vague (see also section VIII, paragraph 1.2). It is clear from the present description that a specific whey protein concentrate, defined on page 7 paragraph 1, should be used. However, the scope of said claims encompasses embodiments in which other types of whey protein concentrate are employed. Consequently, these embodiments do not solve the technical problem underlying the present application.
- 6 The dependent claims do not appear to contain any features which, in combination with the features of the independent claims to which they refer, meet the requirements of novelty and inventive step (Articles 33(2) and 33(3) PCT). Furthermore, it is stressed that dependent claims are only allowable if appended to (a) patentable independent claim(s) (Rule 6.4 PCT).
- 7 The subject-matter of present claims 1-14 meets the requirements of industrial applicability (Article 33(4) PCT), as it can be applied in the food industry. For the assessment of present claims 15-30 on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognise as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Section VII

- 1 The present application does not meet the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, as the relevant background art disclosed in the documents D1-D7 has not been mentioned in the description, nor have these documents been identified therein.
- 2 The present application does not meet the requirements of PCT Guidelines 4.26, as it contains statements that documents are incorporated by reference (page 12, last paragraph; page 13 paragraph 1; page 22, paragraph 2).

Section VIII

- 1 The present application does not meet the requirements of clarity (Article 6 PCT).
 - 1.1 The definition of the term "enriched whey protein concentrate" employed in present claims 1 and 15, which is disclosed on page 7 paragraph 1, has not been incorporated into said claims. Furthermore, the definition of the term "as fed" employed in present claims 1, 14-16, 20, 27, disclosed on page 5, paragraph 4, has not been incorporated into said claims either. The meaning of the terms of a claim should, as far as possible, be clear for the person skilled in the art from the wording of the claim alone (PCT Guidelines 5.20).
 - 1.2 The feature "enriched whey protein concentrate" employed in present claims 1 and 15 is unclear, as it is not specified in which components the whey protein concentrate has been enriched. Consequently, said feature cannot distinguish the subject-matter of said claims from prior art documents in which the presence of an unspecified whey protein concentrate is disclosed.
 - 1.3 There are inconsistencies between the present description and the claims (PCT Guidelines 5.29).

The present description indicates that all percentages are by weight (see in particular page 5 paragraph 7). However, this is not reflected in the present claims.

The present description indicates that all ingredient ranges used are by weight of infant formula on an as-fed basis (see in particular page 5 paragraph 6). However, this is not reflected in the present claims.

The present description indicates that phospholipid sources of arachidonic and docosahexaenoic acid are not included as a phospholipid component. However, present claims 2-3, 5-8, 10, 16, 18, 20, 22-23, which refer to the amount of phospholipid present in the claimed composition, do not reflect this.

- 1.4 Present claims 2-3, 5, 16, 18, 20 are characterised by a parameter, *ie* the presence of a specific amount of gangliosides, but the measurement method of the parameter, as indicated on page of the present description, is not referred to in said claims, leading to a lack of clarity.
- 1.5 The terms "about" employed in present claims 1-6, 9, 11, 14-16, 18-21, 24-25, 27, and "substantially free" employed in present claims 10, 26 are vague and unclear, and leave the reader in doubt as to the meaning of the technical feature to which they refer, thereby rendering the scope of said claims unclear (PCT Guidelines 5.38).
- 1.6 The vague and imprecise statements in the description on page 6 paragraphs 2-3 imply that the subject-matter for which protection is sought may be different from that defined by the claims, thereby resulting in lack of clarity when used to interpret them (PCT Guidelines 5.30).

Possible steps after receipt of the international search report (ISR) and written opinion of the International Searching Authority (WO-ISA)

General information	For all international applications filed on or after 01/01/2004 the competent ISA will establish an ISR. It is accompanied by the WO-ISA. Unlike the former written opinion of the IPEA (Rule 66.2 PCT), the WO-ISA is not meant to be responded to, but to be taken into consideration for further procedural steps. This document explains about the possibilities.
Amending claims under Art. 19 PCT	Within 2 months after the date of mailing of the ISR and the WO-ISA the applicant may file amended claims under Art. 19 PCT directly with the International Bureau of WIPO. The PCT reform of 2004 did not change this procedure. For further information please see Rule 46 PCT as well as form PCT/ISA/220 and the corresponding Notes to form PCT/ISA/220.
Filing a demand for international preliminary examination	In principle, the WO-ISA will be considered as the written opinion of the IPEA. This should, in many cases, make it unnecessary to file a demand for international preliminary examination. If the applicant nevertheless wishes to file a demand this must be done before expiry of 3 months after the date of mailing of the ISR/ WO-ISA or 22 months after priority date, whichever expires later (Rule 54bis PCT). Amendments under Art. 34 PCT can be filed with the IPEA as before, normally at the same time as filing the demand (Rule 66.1 (b) PCT). If a demand for international preliminary examination is filed and no comments/amendments have been received the WO-ISA will be transformed by the IPEA into an IPRP (International Preliminary Report on Patentability) which would merely reflect the content of the WO-ISA. The demand can still be withdrawn (Art. 37 PCT).
Filing informal comments	After receipt of the ISR/WO-ISA the applicant may file informal comments on the WO-ISA directly with the International Bureau of WIPO. These will be communicated to the designated Offices together with the IPRP (International Preliminary Report on Patentability) at 30 months from the priority date. Please also refer to the next box.
End of the international phase	At the end of the international phase the International Bureau of WIPO will transform the WO-ISA or, if a demand was filed, the written opinion of the IPEA into the IPRP, which will then be transmitted together with possible informal comments to the designated Offices. The IPRP replaces the former IPER (international preliminary examination report).
Relevant PCT Rules and more information	Rule 43 PCT, Rule 43bis PCT, Rule 44 PCT, Rule 44bis PCT, PCT Newsletter 12/2003, QJ 11/2003, QJ 12/2003

Bitte beachten Sie, dass angeführte Nichtpatentliteratur (wie z. B. wissenschaftliche oder technische Dokumente) je nach geltendem Recht dem Urheberrechtsschutz und/oder anderen Schutzarten für schriftliche Werke unterliegen könnte. Die Vervielfältigung urheberrechtlich geschützter Texte, ihre Verwendung in anderen elektronischen oder gedruckten Publikationen und ihre Weitergabe an Dritte ist ohne ausdrückliche Zustimmung des Rechtsinhabers nicht gestattet.

Veillez noter que les ouvrages de la littérature non-brevets qui sont cités, par exemple les documents scientifiques ou techniques, etc., peuvent être protégés par des droits d'auteur et/ou toute autre protection des écrits prévue par les législations applicables. Les textes ainsi protégés ne peuvent être reproduits ni utilisés dans d'autres publications électroniques ou imprimées, ni rediffusés sans l'autorisation expresse du titulaire du droit d'auteur.

Please be aware that cited works of non-patent literature such as scientific or technical documents or the like may be subject to copyright protection and/or any other protection of written works as appropriate based on applicable laws. Copyrighted texts may not be copied or used in other electronic or printed publications or re-distributed without the express permission of the copyright holder.

XS CPRTENFRDE

FÓRMULAS INFANTILES PARA EL DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

Se revelan fórmulas infantiles que comprenden al menos alrededor de 6.5 g/L, sobre una base alimentaria, de un concentrado proteínico de suero enriquecido, al menos alrededor de 0.13% de ácido docosahexaenoico por peso de ácidos grasos totales, y al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico por peso de ácidos grasos totales. Las fórmulas también incluyen típicamente al menos alrededor de 5 mg/L de gangliósidos, al menos alrededor de 150 mg/L de fosfolípidos, y al menos alrededor de 70 mg/L de ácido siálico total con al menos alrededor de 2.5% como ácido siálico enlazado a lípidos, todos los cuales son proporcionados completamente o en partes desde el concentrado proteínico de suero enriquecido. También se revelan métodos para la aceleración del desarrollo del cerebro, migración neural y desarrollo cognitivo en un infante mediante la administración de las fórmulas infantiles durante los primeros 2-4 meses de vida, preferiblemente como una fuente exclusiva de nutrición.

FÓRMULAS INFANTILES PARA EL DESARROLLO TEMPRANO DEL CEREBRO

Campo técnico

La presente invención se refiere a fórmulas infantiles que comprenden combinaciones seleccionadas de concentrado proteínico de suero enriquecido, ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico para asimilar mejoradamente la composición natural de la leche humana y para acelerar el desarrollo temprano del cerebro en infantes.

Antecedentes de la invención

Las fórmulas infantiles comerciales son comúnmente utilizadas actualmente para proporcionar fuentes exclusivas o suplementarias de nutrición temprana en la vida. Estas fórmulas comprenden un rango de nutrientes para satisfacer las necesidades nutricionales del infante en crecimiento, y típicamente incluyen grasas, carbohidratos, proteínas, vitaminas, minerales y otros nutrientes útiles para el óptimo crecimiento y desarrollo de los infantes.

Las fórmulas infantiles comerciales están diseñadas para asimilar, tan cercanamente como sea posible, la composición y función de la leche humana. En Estados Unidos, la ley federal de comidas, drogas y cosméticos (LF CDC) define fórmula infantil como: "una comida que pretende ser o está representada para uso dietario especial exclusivo como una comida para infantes por razones de su simulación de la leche humana o su idoneidad como un sustituto completo o parcial de la leche humana." (LF CDC 201(z)).

Las fórmulas infantiles comerciales, bajo las reglas de la LF CDC, están definidas por nutrientes básicos que deben estar formulados en fórmulas infantiles sin excepción en los Estados Unidos. Estos nutrientes incluyen, por cada 100 kcal de fórmula: proteína (1.8-4.5 g al menos nutricionalmente equivalente a caseína), grasa (3.3-6.0 g), linoleico (al menos 300 mg), vitamina A como equivalentes de retinol (75-225 mcg), vitamina D (40-100 IU), vitamina K (al menos 4.0 mcg), vitamina E (al menos 0.7 IU/g de ácido linoleico), ácido ascórbico (al menos 8.0 mg), tiamina (al menos 40 mcg), riboflavina (al menos 60 mcg), piridoxina (al menos

35 mcg con 15 mcg/g de proteína en la fórmula), vitamina B12 (al menos 0.15 mcg), niacina (al menos 250 mcg), ácido fólico (al menos 4.0 mcg), ácido pantoténico (al menos 300.0 mcg), biotina (al menos 1.5 mcg), colina (al menos 7.0 mcg), inositol (al menos 4.0 mcg), calcio (al menos 50.0 mcg), fósforo (al menos 25.0 mg con una razón calcio a fósforo de 1.1-2.0), magnesio (al menos 6.0 mg), hierro (al menos 0.15 mg), yodo (al menos 5 mcg), zinc (al menos 0.5 mcg), cobre (al menos 60.0 mcg), manganeso (al menos 5.0 mcg), sodio (20.0-60.0 mcg), potasio (80.0-200.0 mg) y cloruro (55.0-150.0 mg).

A pesar de los controles regulatorios estrictos, las fórmulas infantiles comerciales aún no son idénticas ni en composición ni en función a la leche humana. Al menos 200 compuestos diferentes han sido identificados en la leche humana, 100 de los cuales aún no han sido encontrados en cantidades significantes, o en ninguna cantidad en las fórmulas comerciales. Tales compuestos incluyen varias inmunoglobulinas, enzimas, hormonas, ciertas proteínas, lactoferrina, gangliósidos, fosfolípidos (esfingomielina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil colina, fosfatidil serina, fosfatidil inositol) y así sucesivamente. Muchos de estos materiales son únicos para la leche humana o están presentes tan solo en cantidades menores en leche de vaca o en otras fuentes de proteína usadas en la preparación de fórmulas infantiles comerciales.

Hay una necesidad latente, por lo tanto, de nuevas fórmulas infantiles que contengan aún mas de los ingredientes naturales encontrados en la leche humana, para que por lo tanto proporcionen potencialmente mas beneficios de los actualmente logrados en los infantes alimentados con pecho.

La presente invención está dirigida a fórmulas infantiles con concentraciones seleccionadas y tipos de aquellos compuestos encontrados inherentemente en la leche humana, incluyendo el ácido docosahexaenoico, el ácido araquidónico, fosfolípidos, gangliósidos y el ácido siálico. En virtud de estos ingredientes seleccionados y sus correspondientes concentraciones en las fórmulas infantiles, los perfiles de nutrición de las fórmulas infantiles descritas aquí son mas parecidas a la leche humana que las fórmulas infantiles convencionales.

Ha sido descubierto, sin embargo, que éstas fórmulas no solo representan de manera sobresaliente los ingredientes naturales de la leche humana, sino que ellas

también pueden acelerar la migración de neuroblastos durante los primeros 3-4 meses de vida, proporcionando por lo tanto una fórmula infantil que ayuda a acelerar el desarrollo cerebral y cognitivo en infantes. Interesantemente, el efecto sobre la migración de neuroblastos fue notado únicamente durante la fase de infancia temprana (ver el estudio animal descrito aquí), lo que enfatiza la importancia del uso seleccionado de estas fórmulas durante la fase de infancia temprana.

Resumen de la invención

Una primera realización de la presente invención está dirigida a fórmulas infantiles que comprenden al menos alrededor de 6.5 g/L, sobre una base alimentaria, de un concentrado proteínico de suero enriquecido, y al menos alrededor de 0.13% de ácido docosahexaenoico por peso de ácidos grasos totales, y al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico por peso de ácidos grasos totales. Las fórmulas también pueden incluir sobre una base alimentaria alrededor de 5 mg/L de gangliósidos, al menos alrededor de 150 mg/L de fosfolípidos, y al menos alrededor de 70 mg/L de ácido siálico total con al menos alrededor de 2.5% como ácido siálico enlazado a lípidos, todos los cuales pueden ser proporcionados completamente o en parte a partir del concentrado proteínico de suero enriquecido.

Una segunda realización de la presente invención está dirigida a un método de aceleramiento de la migración de neuroblastos durante los primeros 2-4 meses de vida, dicho método comprendiendo la administración oral de una fórmula infantil que comprende al menos alrededor de 6.5 g/L, sobre una base alimentaria, de un concentrado proteínico de suero enriquecido, y al menos alrededor de 0.13% de ácido docosahexaenoico por peso de ácidos grasos totales, y al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico por peso de ácidos grasos totales. Las fórmulas también pueden incluir sobre una base alimentaria alrededor de 5 mg/L de gangliósidos, al menos alrededor de 150 mg/L de fosfolípidos, y al menos alrededor de 70 mg/L de ácido siálico total con al menos alrededor de 2.5% como ácido siálico enlazado a lípidos, todos los cuales pueden ser proporcionados completamente o en partes a partir del concentrado proteínico de suero enriquecido.

Una tercera realización de la presente invención está dirigida a un método de aceleramiento del desarrollo cognitivo en un infante, especialmente durante los primeros 2-4 meses de vida, dicho método comprende la administración oral de una fórmula infantil que comprende al menos alrededor de 6.5 g/L, sobre una base alimentaria, de un concentrado proteínico de suero enriquecido, y al menos alrededor de 0.13% de ácido docosahexaenoico por peso de ácidos grasos totales, y al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico por peso de ácidos grasos totales. Las fórmulas también pueden incluir sobre una base alimentaria alrededor de 5 mg/L de gangliósidos, al menos alrededor de 150 mg/L de fosfolípidos, y al menos alrededor de 70 mg/L de ácido siálico total con al menos alrededor de 2.5% como ácido siálico enlazado a lípidos, todos los cuales pueden ser proporcionados completamente o en partes a partir del concentrado proteínico de suero enriquecido.

Ha sido descubierto que estas fórmulas no solamente representan mejor los ingredientes naturales encontrados en la leche humana; ellas también aceleran la migración de neuroblastos durante la fase temprana de la infancia, proporcionando por tanto una fórmula infantil que ayuda a acelerar el desarrollo cerebral y cognitivo en infantes. Interesantemente, el efecto sobre la migración de neuroblastos fue notado únicamente durante la fase de infancia temprana (ver estudio animal descrito aquí) enfatizando por lo tanto la importancia del uso seleccionado de estas fórmulas durante los primeros 2-4 meses de vida.

También ha sido descubierto que el efecto sobre la migración de neuroblastos ocurrió únicamente cuando el concentrado proteínico de suero enriquecido fue usada en combinación con altos niveles de ácidos docosahexaenoico y araquidónico. Composiciones idénticas, pero con bajas concentraciones de ácidos docosahexaenoico y araquidónico no afectaron significativamente la migración de neuroblastos en el modelo animal seleccionado.

También fue descubierto que el efecto sobre la migración de neuroblastos ocurre únicamente cuando las fórmulas infantiles comprenden un nivel de concentrado proteínico de suero enriquecido que excede una cantidad umbral mínima, tal como se define aquí.

Breve descripción de las figuras

La figura 1.1 muestra un segmento de cerebro de cerdo para mediciones histológicas en el estudio animal descrito aquí. (Experimento 1).

La figura 1.2 es una sección magnificada de la sección de cerebro de cerdo de la figura 1.1, la cual muestra el área subependimal teñida con hematoxilina:eosina; puntos teñidos oscuros son núcleos; los neuroblastos migran desde el área subependimal hacia la sustancia blanca (Experimento 1).

La figura 1.3 muestra las áreas 1, 2 y 3 de la sección de cerebro de cerdo magnificada de la figura 1.2 para conteo de núcleos; área 1 es el área de fascículo subcallosal, migración de neuroblastos y proliferación; el área 2 es el área de migración eludiendo agregados de neuroblastos; y el área 3 es la sustancia blanca subsiguiente al fascículo subcallosal (Experimento 1).

La figura 2 incluye tres gráficos que corresponden al conteo de núcleos del área 1, área 2 y área 3 del fascículo subcallosal en lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) durante el período de estudio descrito aquí. Los datos son la media $\pm$ DE. A: significativamente diferente del tiempo inicial a $p < 0.05$; b: significativamente diferente de 8-9 d a $p < 0.05$; *: significativamente diferente de la dieta A a $p < 0.05$ (Experimento 1).

La figura 3.1 incluye un gráfico correspondiente al número de núcleos teñidos con H&E en el fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra (Experimento II).

La figura 3.2 incluye un gráfico correspondiente al número de núcleos teñidos con H&E en la sustancia blanca adyacente al fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra (Experimento II).

La figura 3.3 incluye un gráfico correspondiente al número de células positivas de BrdU en el fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra (Experimento II).

La figura 4.1 incluye un gráfico correspondiente al número de células positivas de BrdU en la sustancia blanca adyacente al fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra (Experimento II).

La figura 4.2 incluye un gráfico correspondiente al número de células positivas de Ki67 en el fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra (Experimento II).

La figura 4.3 incluye un gráfico correspondiente al número de células positivas de Ki67 en la sustancia blanca adyacente al fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra (Experimento II).

Descripción detallada de la invención

Las composiciones de la presente invención comprenden combinaciones seleccionadas de concentrado proteínico de suero enriquecida, ácido docosahexaenoico, y ácidos araquidónicos, cada uno de los cuales es descrito en detalle de aquí en adelante.

El término "infante" como es usado aquí se refiere a individuos con no mas de alrededor de un año de edad, e incluye a infantes entre 0 y alrededor de 4 meses de edad, infantes entre alrededor de 4 y alrededor de 8 meses de edad, infantes entre alrededor de 8 y alrededor de 12 meses de edad, infantes con un peso de nacimiento bajo, menor que 2,500 gramos al nacer, y infantes prematuros que nacieron luego de menos de alrededor de 37 semanas de gestación, típicamente entre alrededor de 26 semanas y alrededor de 34 semanas de gestación.

El término "como alimento" como es usado aquí, y a menos de que se especifique otra cosa, se refiere a fórmulas líquidas disponibles para administración oral directa a un infante, en donde las fórmulas son líquidos listos para consumir, polvos reconstituídos o concentrados diluídos.

El término "fórmula infantil" como es usado aquí, y a menos de que se especifique otra cosa, se refiere a formulaciones que comprenden grasa, proteína,

carbohidratos, vitaminas y minerales, y que están disponibles para administración oral a infantes como fuentes únicas, primarias o suplementarias de nutrición, donde ejemplos no limitantes incluyen polvos reconstituíbles, concentrados diluibles y líquidos listos para consumir.

Todos los rangos de ingredientes como son usados aquí, a menos de que se especifique otra cosa, caracterizan las fórmulas infantiles de la presente invención por peso de la fórmula infantil sobre una base alimétrica.

Todos los porcentajes, partes y razones como son usadas aquí, son por peso de la composición total, a menos que se especifique otra cosa. Como todos los pesos están referidos a ingredientes listados, éstos se basan sobre el nivel activo, y por lo tanto, no incluyen solventes o subproductos que puedan estar incluidos en materiales disponibles comercialmente, a menos de que se especifique otra cosa.

Las fórmulas infantiles de la presente invención también pueden estar substancialmente libres de cualquier ingrediente esencial o seleccionado o característica descrita aquí, aclarando que la fórmula remanente aún contiene todos los ingredientes requeridos o las características que han sido descritas aquí. En este contexto, y a menos de que se especifique otra cosa, el término "substancialmente libre" significa que la composición contiene menos que una cantidad funcional del ingrediente opcional, típicamente menos que el 0.1% en peso, y también incluyendo un 0% en peso de tal ingrediente esencial opcional o seleccionado.

Todas las referencias a características singulares o limitaciones de la presente invención, incluirán la correspondiente característica o limitación plural, y viceversa, a menos de que se especifique otra cosa o que claramente implique lo contrario al contexto en el cual la combinación referenciada se está haciendo.

Todas las combinaciones de etapas de método o proceso tal como se emplean aquí pueden desarrollarse en cualquier orden, a menos de que se especifique otra cosa o que claramente implique lo contrario al contexto en el cual la combinación referenciada se está haciendo.

Los métodos y composiciones de la presente invención, incluyendo componentes del mismo, pueden comprender, consistir de, o consistir esencialmente de los elementos esenciales y limitaciones de la invención descrita aquí, así como cualquier otro ingrediente, componente o limitación adicional u opcional descrita aquí, ó cualquier otra cosa útil en aplicaciones de fórmulas nutricionales.

Concentrado proteínico de suero enriquecido

Las fórmulas infantiles de la presente invención comprenden niveles seleccionados de concentrados de proteína como una fuente de gangliósidos, fosfolípidos y ácido siálico en la fórmula infantil. Todo o parte de tales gangliósidos, fosfolípidos y ácido siálico en la fórmula pueden ser proporcionados por el concentrado proteínico de suero enriquecido.

El nivel de concentrado proteínico de suero enriquecido en la fórmula infantil debe exceder alrededor de 6.5 g/L de la fórmula, sobre una base alimentaria. Tales concentraciones también pueden estar en el rango entre alrededor de 6.5 y alrededor de 10.9 g/L, incluyendo el rango entre alrededor de 6.6 y alrededor de 8.5 g/L, y también incluyendo el rango entre alrededor de 6.7 y alrededor de 7.3 g/L de la fórmula sobre una base alimentaria.

El concentrado proteínico de suero enriquecido para uso en las fórmulas infantiles de la presente invención son aquellas que tienen una alta concentración de materiales de membrana de glóbulo de grasa de leche. Los materiales de membrana de glóbulo de grasa de leche son los materiales de membrana y asociados a membrana que rodean a los glóbulos de grasa de leche ricos en triaciglicerol en leche de bovino o de otros mamíferos. Muchos de los compuestos identificados en los materiales de membrana de glóbulo de grasa de leche están presentes en mayores concentraciones en la leche de humano que en las fórmulas infantiles comerciales. Al adicionar concentrados proteínicos de suero enriquecido con tales materiales a una fórmula infantil, la fórmula resultante se parece mas en cuanto a composición a la leche humana, especialmente con respecto a las concentraciones en leche humana de gangliósidos, fosfolípidos y ácido siálico.

El término "concentrado proteínico de suero enriquecido" como es usado aquí, y a menos de que se especifique otra cosa, se refiere generalmente a un concentrado

proteínico de suero que tiene al menos alrededor de 3%, mas típicamente al menos alrededor de 5% en peso de fosfolípidos, de los cuales al menos el 20% en peso es esfingomielina; al menos alrededor de 0.5% en peso, típicamente al menos alrededor de 1.2% en peso de ácido siálico; y al menos alrededor de 0.05%, típicamente al menos alrededor de 0.1% en peso de gangliósidos. Al menos alrededor de 2.5% en peso del ácido siálico del concentrado está enlazado a lípidos.

Fuentes apropiadas de concentrado proteínico de suero enriquecido para uso en las fórmulas de la invención incluye cualquier concentrado proteínico de suero que tiene los niveles de ingredientes enriquecientes descritos anteriormente, donde ejemplos no limitantes incluyen LACPRODAN® MFGM-10, concentrado proteínico de suero, disponible en Arla Food Ingredients, Dinamarca, el cual contiene 6.5% de fosfolípidos, 0.2% de gangliósidos, 1.80% de ácido siálico (al menos 2.5% de ácido siálico enlazado a lípidos por peso de ácidos grasos totales), y 1.5% de lactoferrina, por peso del concentrado.

El concentrado proteínico de suero enriquecido proporciona preferiblemente entre alrededor del 10% al 100%, incluyendo entre alrededor del 50% al 100%, también incluyendo entre alrededor del 50% al 90%, y también incluyendo entre alrededor del 60% al 85% del total de fosfolípidos, gangliósidos y ácido siálico en la fórmula infantil. Aunque estos últimos compuestos pueden adicionarse individualmente, como compuestos aislados de leche de mamífero o de otras fuentes disponibles, es preferible que muchos, si no todos los compuestos sean proporcionados por el concentrado proteínico de suero enriquecido.

Ácido siálico

Las fórmulas infantiles de la presente invención pueden comprender ácido siálico a una concentración, sobre una base alimentaria, de al menos 70 mg/L, incluyendo de alrededor de 90 mg/L a alrededor de 4000 mg/L, también incluyendo de alrededor de 190 mg/L a alrededor de 2000 mg/L, también incluyendo de alrededor de 300 mg/L a alrededor de 900 mg/L, en donde al menos el 2.5%, incluyendo de alrededor de 2.6% a alrededor de 10%, incluyendo de alrededor de 2.7% a alrededor de 5% por peso de ácido siálico enlazado a lípidos. Algo o todo del ácido

siálico puede ser proporcionado por el concentrado proteínico de suero enriquecido como ha sido descrito aquí.

El componente de ácido siálico enlazado a lípidos de la fórmula infantil está típicamente en la forma de un gangliósido, el cual inherentemente contiene ácido siálico enlazado a lípidos. El componente gangliósido de la presente invención, como es descrito de aquí en adelante, puede por lo tanto ser una funete única o primaria del componente de ácido siálico enlazado a lípidos de la presente invención.

El término "ácido siálico" como es usado aquí, a menos que se especifique otra cosa, se refiere a todas las formas conjugadas y no conjugadas de ácido siálico, incluyendo derivados de ácido siálico. El ácido siálico en la fórmula infantil de la presente invención puede por lo tanto incluir ácido siálico libre, ácido siálico enlazado a proteína, ácido siálico enlazado a lípidos (incluyendo gangliósidos), ácido siálico enlazado a carbohidratos, y combinaciones o derivados de los mismos. Todas las concentraciones de ácido siálico descritas aquí están basadas en el porcentaje en peso del compuesto ácido siálico o mitades del mismo, menos la proteína, lípido, carbohidrato u otro conjugado enlazado a la estructura del ácido siálico.

Las fuentes de ácido siálico para uso en las fórmulas infantiles pueden ser adicionadas u obtenidas como ingredientes separados. Mas típicamente, sin embargo, el ácido siálico es proporcionado primariamente como un ingrediente inherente de un componente de concentrado proteínico de suero, preferiblemente de un concentrado proteínico de suero enriquecido como ha sido descrito aquí. Aunque menos preferido, el ácido siálico puede ser obtenido de y adicionado como un ingrediente separado a la fórmula infantil, en cuyo caso el ácido siálico adicionado es combinado con el ácido siálico inherente de otros ingredientes para proporcionar el contenido de ácido siálico total en la fórmula infantil.

Como un compuesto individual o mitad, el ácido siálico es un amino azúcar de 9 carbonos, cuya estructura se encuentra descrita en la literatura química. Otros nombres generalmente aceptados para el ácido N-acetilneuramínico son el ácido siálico, el ácido o-siálico; el ácido 5-acetamido-3,5-dideoxi-D-glicero-D-galacto-2-nonulosónico; el ácido 5-acetamido-3,5-dideoxi-D-glicero-D-galactonulosónico; el

ácido aceneurámico; el N-acetil-neuraminato; el ácido N-acetilneuramínico; el NANA; el NANA, Neu5Ac; y el Neu5Ac.

Las fuentes de ácido siálico adecuadas pueden ser naturales o sintéticas, e incluyen cualquiera de mas de 40 derivados de ácido siálico identificados actualmente y que se presentan naturalmente, los cuales incluyen ácido siálico libre, conjugados oligosacáridos (por ejemplo sialiloligosacáridos), conjugados de lípidos (es decir glicolípidos), conjugados de proteína (es decir glicoproteínas) y combinaciones de los mismos.

El ácido siálico adecuado para su uso aquí incluye sialiloligosacáridos encontrados comúnmente en la leche humana, sea natural o sintética, siendo los mas abundantes el 3'sialillactosa (3'SL, NeuNAc α 2-3Galactosa β 1-1Glucosa) y 6'sialillactosa (6'SL, NeuNAc α 2-6Galactosa β 1-1Glucosa). Otros oligosacáridos adecuados incluyen aquellos que contienen una o mas moléculas de ácido siálico conjugadas para alargar la de la leche humana u otros oligosacáridos mas complejos.

Otros ácidos siálicos adecuados para su uso aquí incluyen cualquier glicolípido correspondiente que es también adecuado para uso en un fórmula infantil, incluyendo gangliósidos tales como glicolípidos incluyendo ácido siálico que comprenden una molécula de ácido graso, esfingosina, glucosa, galactosa, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina y ácido N-acetilneuramínico. Estos compuestos de ácido siálico también pueden incluir uno o mas de varias glicoproteínas encontradas comúnmente en leche humana que son conocidas para ser sialilatadas (por ejemplo k-caseína, α -lactalbúmina, lactoferrina).

Fuentes adecuadas de ácido siálico para uso aquí aislados, concentrados o extractos de leche de mamífero o productos de leche, incluyendo leche humana y bovina. La leche bovina es una fuente preferida para uso aquí, incluyendo concentrados de proteína de suero enriquecido talo como han sido descritos aquí.

Fuentes individuales de ácido siálico adecuadas para uso aquí incluyen Lacprodan CGMP-10 (caseinglicomacropéptido con 4.2% de ácido siálico) disponible en Arla Food Ingredients, Dinamanrca; y glicomacropéptido biopuro (con 7-8% de ácido

siálico), disponible en Davisco Food International, Eden Prairie, Minnesota, Estados Unidos.

Aunque las fórmulas infantiles pueden comprender glicomacropéptidos como una fuente de ácido siálico, las fórmulas son preferiblemente reducidas substancialmente en el contenido de glicomacropéptidos. El glicomacropéptido hace parte de la molécula de caseína de la proteína de leche bovina. Solo muy pequeñas cantidades de glicomacropéptido libre se encuentra en leche descremada, pero el concentrado proteínico de suero contiene altas cantidades de glicomacropéptido libre. Se ha encontrado que los glicomacropéptidos no son tolerados por infantes, así como otras fuentes de ácido siálico. Por lo tanto, las fórmulas infantiles hechas con concentrado proteínico de suero tienen mayor contenido de glicomacropéptido libre, pero también pueden ser menos tolerados por un infante. En este contexto, el término "substancialmente reducido" significa que las fórmulas infantiles contienen preferiblemente menos que el 0.5%, incluyendo menos que el 0.4%, y también incluyendo menos que el 0.35% y también incluyendo el 0 % en peso de la fórmula como glicomacropéptido libre sobre una base alimentaria. Las fórmulas infantiles convencionales contienen típicamente entre el 0.6 y el 0.8% de glicomacropéptido como un ingrediente inherente de un concentrado proteínico de suero típico de suero de queso.

Gangliósidos

Las fórmulas infantiles de la presente invención también pueden comprender concentraciones enriquecidas de uno o mas gangliósidos, un grupo de compuestos conformados por un glicosfingolípido (ceramida y oligosacárido) con uno o mas ácidos siálicos (ácido N-acetilneuramínico) unido a la cadena de oligosacárido. Algunos o todos los gangliósidos pueden ser proporcionados por el concentrado proteínico de suero enriquecido tal como ha sido descrito aquí.

Los gangliósidos son componentes normales de membranas de plasma de células mamíferas y son particularmente abundantes en células neuronales. Ellos son glicosfingolípidos que comprenden una porción hidrofóbica, la ceramida, y una porción hidrofílica, una cadena de oligosacárido que contiene una o mas moléculas de ácido siálico. Las mitades de oligosacárido de los gangliósidos tienen estructuras químicas diferentes lo que constituye la base de referencia para la

separación de gangliósidos y su reconocimiento como entidades individuales. La mitad ceramida de los gangliósidos mas comunes tienen una composición de ácido graso heterogénea, con una prevalencia de derivados C18 y C20.

Los gangliósidos son mas comúnmente nombrados usando designaciones M, D y T, lo que se refiere a mono-, di- y trialogangliósidos, respectivamente, y los números 1, 2, 3, etc se refieren al orden de migración de los gangliósidos en cromatografía en capa delgada. Por ejemplo, el orden de migración de monosialogangliósidos es GM3>GM2>GM1. Para indicar las variaciones dentro de las estructuras básicas, se adicionan subíndices adicionales, por ejemplo, GM1a, GD1b, etc.

Las fórmulas infantiles de la presente invención pueden comprender al menos alrededor de 5 mg/L de gangliósidos, incluyendo entre alrededor de 7 mg/L y 50 mg/L, también incluyendo entre alrededor de 10 mg/L y 30 mg/L. Estas concentraciones de gangliósidos son similares a las encontradas en la leche humana, la cual contiene típicamente al menos alrededor de 3 mg/L de gangliósidos, mas típicamente entre alrededor de 3 mg/L y alrededor de 30 mg/L de gangliósidos. Estos gangliósidos para uso en fórmulas infantiles típicamente comprenden uno o mas, mas típicamente todos los gangliósidos GD3, O-acetil-GD3 y GM3. Estos gangliósidos generalmente representan al menos alrededor del 80%, mas típicamente al menos alrededor del 90% en peso de los gangliósidos totales en la fórmula infantil aquí revelada.

Las fuentes adecuadas de gangliósidos para uso aquí incluyen aislados, concentrados o extractos de leche de mamífero o productos de leche, incluyendo leche humana y bovina. La leche bovina es una fuente de gangliósidos preferida para su uso en la presente invención, incluyendo concentrados proteínicos de suero enriquecido tal como han sido descritos anteriormente.

Fuentes individuales adecuadas de gangliósidos incluyen gangliósido 500 (>0.5% GM3 y <1.0% GD3) y gangliósido 600 (>1.2% GD3) disponibles en Fonterra, Nueva Zelanda.

Las concentraciones de gangliósidos para propósitos de definir las fórmulas infantiles de la presente invención son medidas por el método de gangliósido descrito mas adelante.

Fosfolípidos

Las fórmulas infantiles de la presente invención pueden comprender también concentraciones enriquecidas de fosfolípidos. Tales concentraciones son mayores a las encontradas en fórmulas infantiles convencionales pero similares a las encontradas en la leche humana. Algo o todo de los fosfolípidos pueden ser proporcionados por el concentrado proteínico de suero enriquecido tal como ha sido descrito anteriormente.

Los fosfolípidos adecuados para su uso aquí incluyen aquellos comúnmente encontrados en leche de bovino y de otros mamíferos. Los fosfolípidos preferidos incluyen esfingomielina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil colina, fosfatidil inositol, fosfatidil serina y combinaciones de los mismos. Lo mas preferido son las combinaciones de los cinco fosfolípidos, especialmente tales combinaciones en las cuales la esfingomielina representa al menos el 20% en peso del total de los fosfolípidos.

Las concentraciones de fosfolípidos en las fórmulas infantiles de la presente invención pueden ser de al menos alrededor de 150 mg/L, incluyendo entre alrededor de 200 mg/L y alrededor de 600 mg/L, también incluyendo entre alrededor de 250 mg/L y alrededor de 450 mg/L. Por comparación, la leche humana contiene generalmente entre alrededor de 163 a alrededor de 404 mg/L de fosfolípidos, en donde la esfingomielina representa alrededor del 51% del total de los fosfolípidos.

Las fuentes adecuadas de fosfolípidos para uso aquí incluyen aislados, concentrados o extractos de leche de mamífero o productos de leche, incluyendo leche humana y bovina. La leche bovina es la fuente de fosfolípidos preferida para uso aquí, incluyendo concentrados de proteína de suero enriquecido tal como ha sido descrito anteriormente.

Otras fuentes adecuadas de fosfolípidos incluyen la soya, tal como la lecitina de soya. Las fórmulas infantiles de la presente invención, sin embargo, son preferiblemente substancialmente libres de fosfolípidos provenientes de fuentes de soya. Las fórmulas infantiles son también preferiblemente substancialmente libres de fosfolípidos de huevo. En este contexto, el término "substancialmente libre" significa que las fórmulas infantiles contienen menos que un 0.5%, mas preferiblemente menos que un 0.1%, incluyendo un 0% en peso de fosfolípidos de soya o huevo.

Fuentes individuales adecuadas de fosfolípidos para uso aquí incluyen fuentes derivados de leche tales como concentrado de Fosfolípido 600 (>18.0% de esfingomielina, >36.0% de fosfatidil colina, >9.0% de fosfatidil etanolamina, 4.0% de fosfatidilserina), disponible en Fonterra, Nueva Zelanda.

Ácidos docosahexaenoico y araquidónico

Las fórmulas infantiles de la presente invención comprenden adicionalmente ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico, o fuentes de los mismos, en donde la fórmula debe contener al menos alrededor de 0.13% de ácido docosahexaenoico y al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico. Estos dos ácidos grasos poliinsaturados también son encontrados en la leche humana.

Por lo tanto, las fórmulas infantiles de la presente invención deben contener ácido araquidónico, en concentraciones mínimas de al menos alrededor del 0.25%, preferiblemente al menos alrededor del 0.3%, mas preferiblemente al menos alrededor del 0.4% en peso de los ácidos grasos totales en la fórmula. Las concentraciones de ácido araquidónico en la fórmula infantil puede estar en un rango hasta de alrededor del 2.0%, incluyendo hasta alrededor del 1.0%, también incluyendo hasta alrededor del 0.6% en peso de los ácidos grasos totales en la fórmula.

Asimismo, las fórmulas infantiles de la presente invención deben contener ácido docosahexaenoico, en concentraciones mínimas de al menos alrededor de 0.13%, preferiblemente de al menos alrededor de 0.14%, mas preferiblemente al menos alrededor de 0.15% en peso de los ácidos grasos totales en la fórmula. Las concentraciones de ácido docosahexaenoico en la fórmula infantil puede estar en

un rango hasta alrededor de 1.0%, incluyendo hasta alrededor de 0.5%, también incluyendo hasta alrededor de 0.25% en peso de los ácidos grasos totales en la fórmula.

Ejemplos no limitantes de algunas fuentes adecuadas de ácido araquidónico, y/o ácido docosahexaenoico incluyen aceite marino, aceites derivados de huevo, grasa de leche, aceite de homgós, aceite de algas, otros aceites de células simples y combinaciones de los mismos. Las composiciones son substancialmente libres de aceites derivados de huevo, lo que en este contexto significa menos que alrededor del 0.05%, incluyendo 0% en peso de aceites derivados de huevo.

Los ácido araquidónico y docosahexaenoico pueden ser adicionados a la fórmula en cualquier forma que sea adecuada para uso por un infante, incluyendo compuestos o materiales que puedan por lo demás una fuente de tales ácidos grasos libres sobre o continuando la administración al infante, incluyendo fosfolípidos y ésteres de glicéridos (mono-, di- y tri-) de ácidos grasos poliinsaturados. Ácidos grasos poliinsaturados y fuentes de los mismos son descritos en la patente U.S. 6,080,787 (Carlason y compañeros) y en la patente U.S. 6,495,599 (Auestad y compañeros), cuya descripción es incorporada aquí como referencia. Para propósitos de definición de la presente invención, las fuentes de fosfolípidos de los ácidos araquidónico y docosahexaenoico no son incluidos como un componente fosfolípido como ha sido descrito anteriormente.

Estos ácidos grasos también son descritos en la patente U.S. 6,495,599 (Auestad y compañeros), cuya descripción es incorporada aquí como referencia.

Otros nutrientes

Las fórmulas infantiles de la presente invención comprenden grasa, proteína, carbohidrato, vitaminas y minerales, los cuales son seleccionados en cuanto a tipo y cantidad para satisfacer las necesidades de nutrición de los infantes hacia los cuales va dirigido o de la población onfantil definida anteriormente.

Son conocidas diversas fuentes y tipos de carbohidratos, grasas, proteínas, minerales y vitaminas, y pueden ser usadas en las fórmulas aquí descritas, con la

provisión de que tales nutrientes son compatibles con los ingredientes adicionados en la formulación seleccionada y son por lo demás adecuadas para uso en una fórmula infantil.

Los carbohidratos adecuados para usarse en las fórmulas aquí descritas pueden ser simples o complejos, conteniendo lactosa o libres de lactosa, o combinaciones de los mismos; ejemplos no limitantes incluyen almidón de maíz natural o modificado químicamente, maltodextrina, polímeros de glucosa, sacarosa, jarabe de maíz, sólidos de jarabe de maíz, carbohidratos derivados de arroz y papa, glucosa, fructosa, lactosa, jarabe de maíz rico en fructosa y oligosacáridos indigeribles tales como fructooligosacáridos (FOS), galactooligosacáridos (GOS) y combinaciones de los mismos.

Las proteínas adecuadas para uso en las fórmulas aquí descritas incluyen proteínas o fuentes de proteínas hidrolizadas, parcialmente hidrolizadas, y no hidrolizadas o intactas y pueden derivarse de cualquier fuente conocida o de cualquier otra forma adecuada tales como leche (por ejemplo, caseína, suero, proteína de leche humana), animal (por ejemplo, carne, pescado), cereal (por ejemplo arroz, maíz), vegetal (por ejemplo soya) o combinaciones de los mismos.

Las proteínas que pueden emplearse aquí también pueden incluir, o ser enteramente o parcialmente reemplazadas por aminoácidos libres conocidos como adecuados para uso en fórmulas infantiles, en donde ejemplos no limitantes incluyen alanina, arginina, asparagina, carnitina, ácido aspártico, cistina, ácido glutámico, glutamina, glicina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, prolina, serina, taurina, treonina, triptófano, taurina, tirosina, valina y combinaciones de los mismos. Estos aminoácidos son usados típicamente en su forma L, aunque los correspondientes isómeros D también pueden utilizarse cuando son nutricionalmente equivalentes. También pueden ser usadas mezclas racémicas o isoméricas.

Las grasas adecuadas para su uso en las fórmulas descritas incluyen aceite de coco, aceite de soya, aceite de maíz, aceite de oliva, aceite de cártamo, aceite de cártamo rico en oleico, aceite de alga, aceite TCM (triglicéridos de cadena media), aceite de girasol, aceite de girasol rico en oleico, aceites de palma y corazón de palma, oleína de palma, aceite de canola, aceites marinos, aceites de semilla de

algodón y combinaciones de los mismos. Las fórmulas infantiles de la presente invención incluyen aquellas realizaciones que comprenden menos de alrededor de 1.0%, incluyendo menos de alrededor de 0.2%, incluyendo 0% en peso de grasa de leche sobre una base alimentaria. Las Vitaminas y otros ingredientes similares adecuados para ser usados en las fórmulas reveladas incluyen vitamina A, vitamina D, vitamina E, vitamina K, tiamina, riboflavina, piridoxina, vitamina B12, niacina, ácido fólico, ácido pantoténico, biotina, vitamina C, colina, inositol, sales y derivados de los mismos y combinaciones de los mismos.

Los minerales adecuados para ser usados en las fórmulas reveladas incluyen calcio, fósforo, magnesio, hierro, zinc, manganeso, cobre, cromo, yodo, sodio, potasio, cloruro y combinaciones de los mismos.

Las fórmulas de nutrición infantiles de la presente invención comprenden preferiblemente nutrientes según las guías para fórmulas infantiles relevantes para el consumidor a quien va dirigido o para la población usuaria, de lo cual un ejemplo es la acción de fórmula infantil 21 U.S.C. sección 350(a). Las concentraciones preferidas de carbohidrato, lípidos, y proteína para las fórmulas reveladas son definidas en la siguiente tabla.

Tabla 1: Rangos de macronutrientes

Nutriente	Rango 1	Gm/100 kcal	Gm/100 gm de polvo	Gm/litro como comida
Carbohidrato	Preferido	8-16	30-90	54-108
	Mas preferido	9-13	45-60	61-88
Lípidos	Preferido	3-8	15-35	20-54
	Mas preferido	4-6.6	25-25	27-45
Proteína	Preferido	1-3.5	8-17	7-24
	Mas preferido	1.5-3.4	10-17	10-23

Preferiblemente, todos los valores numéricos son modificados por el término "alrededor".

Las fórmulas infantiles también pueden incluir por cada 100 kcal de fórmula uno o mas de los siguientes: vitamina A (entre alrededor de 250 a alrededor de 750 IU), vitamina D (entre alrededor de 40 y alrededor de 100 IU), vitamina K (mayor que alrededor de 4 µg), vitamina E (al menos alrededor de 0.3 IU), vitamina C (al menos alrededor de 8 mg), tiamina (al menos alrededor de 8 mg), vitamina B12 (al menos alrededor de 0.15 µg), niacina (al menos alrededor de 250 µg), ácido fólico (al

menos alrededor de 4 μg), ácido pantoténico (al menos alrededor de 300 μg), biotina (al menos alrededor de 1.5 μg), colina (al menos alrededor de 7 mg) e inositol (al menos alrededor de 2 mg).

Las fórmulas infantiles también pueden incluir por cada 100 kcal de fórmula uno o mas de los siguientes: calcio (al menos alrededor de 50 mg), fósforo (al menos alrededor de 25 mg), magnesio (al menos alrededor de 6 mg), hierro (al menos alrededor de 0.15 mg), yodo (al menos alrededor de 5 μg), zinc (al menos alrededor de 0.5 mg), cobre (al menos alrededor de 60 μg), manganeso (al menos alrededor de 5 μg), sodio (alrededor de 20 hasta alrededor de 60 mg), potasio (alrededor de 80 hasta alrededor de 200 mg), cloruro (alrededor de 55 hasta alrededor de 150 mg) y selenio (al menos alrededor de 0.5 mcg).

Las fórmulas infantiles pueden comprender adicionalmente fructopolisacáridos en concentraciones que pueden estar en un rango hasta del 5% en peso de la fórmula, sobre una base alimentaria, incluyendo desde alrededor de 0.05% hasta alrededor del 3%, y también incluyendo desde alrededor de 0.1% hasta alrededor de 2.0%. Estos fructopolisacáridos pueden ser de cadena larga (por ejemplo inulina), de cadena corta (por ejemplo FOS o fructooligosacáridos), o combinaciones de los mismos, con mezclas que comprenden estructuras de longitud de cadena variada, muchas de las cuales tienen un GP (grado de polimerización) de alrededor de 2 hasta alrededor de 60.

Las fórmulas infantiles pueden comprender adicionalmente otros ingredientes opcionales que pueden modificar las características físicas, químicas, estéticas o de procesamiento de las composiciones, o servir como componentes farmacéuticos o nutricionales adicionales cuando son usados en los infantes a quienes se encuentra dirigida o en la población infantil. Muchos de tales ingredientes opcionales son conocidos o son adecuados para el uso en productos nutricionales y también pueden ser usados en las fórmulas infantiles de la presente invención, con la provisión de que tales materiales opcionales son compatibles con los materiales esenciales descritos aquí y son por lo demás adecuados para uso en una fórmula infantil.

Ejemplos no limitantes de tales ingredientes opcionales incluyen antioxidantes adicionales, agentes emulsificantes, reguladores de pH, colorantes, saborizantes,

lactoferrina, alfa lactalbúmina adicional, nucleótidos y nucleósidos, probióticos, prebióticos, y derivados relacionados, agentes espesantes y estabilizantes, etc.

Método de uso

La presente invención también está dirigida a un método de aceleramiento del desarrollo cerebral en un infante, mediante la preparación de las fórmulas infantiles descritas anteriormente y su posterior administración o instrucción al cuidador para administrar la fórmula a un infante durante los primeros dos meses, preferiblemente durante los primeros 4 meses de vida.

La presente invención también está dirigida a un método de aceleramiento de la migración neural en un infante, mediante la preparación de las fórmulas infantiles descritas anteriormente y su posterior administración o instrucción al cuidador para administrar la fórmula a un infante durante los primeros dos meses, preferiblemente durante los primeros 4 meses de vida.

La presente invención también está dirigida a un método de aceleramiento del desarrollo de la visión en un infante, mediante la preparación de las fórmulas infantiles descritas anteriormente y su posterior administración o instrucción al cuidador para administrar la fórmula a un infante durante los primeros dos meses, preferiblemente durante los primeros 4 meses de vida.

La presente invención también está dirigida a un método de aceleramiento del desarrollo cognitivo en un infante, mediante la preparación de las fórmulas infantiles descritas anteriormente y su posterior administración o instrucción al cuidador para administrar la fórmula a un infante durante los primeros dos meses, preferiblemente durante los primeros 4 meses de vida.

La presente invención también está dirigida a un método para proporcionar nutrición primaria, suplementaria o como fuente exclusiva a un infante, mediante la preparación de las fórmulas infantiles descritas anteriormente y su posterior administración o instrucción al cuidador para administrar la fórmula a un infante durante los primeros dos meses, preferiblemente durante los primeros 4 meses de vida.

Todos los métodos de la presente invención estén dirigidos al uso seleccionado de las fórmulas infantiles durante los primeros 2-4 meses de vida, aunque se entiende que tales métodos pueden incluir la administración adicional, de manera que después del período de 2-4 meses inicial el infante continúa alimentándose con la misma fórmula hasta los 9-12 meses. Sin embargo, para obtener los beneficios de la presente invención, la administración debe ocurrir durante los primeros 2-4 meses de vida, incluso si tal administración se extiende por un período de tiempo.

En el contexto de los métodos de la presente invención, las fórmulas infantiles pueden proporcionar única, primaria o suplementaria, aunque es preferida la nutrición como fuente única. Para realizaciones en polvo, cada método puede incluir el paso de reconstitución del polvo (o el paso de instruir al cuidador para realizar la reconstitución) con un vehículo acuoso, mas típicamente agua o leche humana, para formar la densidad calórica deseada, la cual entonces es administrada oral o enteramente al infante para proporcionar la nutrición deseada. El polvo es reconstituido con una cantidad de agua, u otro fluido disponible como la leche humana, para producir un volumen y un perfil de nutrición adecuado para una alimentación.

Las fórmulas infantiles de la presente invención tienen una densidad calórica que está típicamente en un rango entre alrededor de 19 y alrededor de 24 kcal/fl por onza, mas típicamente en un rango entre alrededor de 20 y alrededor de 21 kcal/fl por onza, sobre una base alimentaria.

Método analítico de gangliósidos

Las concentraciones de gangliósidos para su uso en las fórmulas de la presente solicitud son determinadas de acuerdo con el siguiente método analítico.

Los lípidos totales son extraídos de muestras de Lacprodan MFGM-10 o de fórmulas infantiles con una mezcla de cloroformo:metanol:agua. Los gangliósidos son purificados del extracto de lípidos totales mediante una combinación de una

partición éter diisopropílico (EDIP)/1-butanol/fase acuosa y una extracción en fase sólida a través de cartuchos C-18. El ácido siálico enlazado a lípidos (ASEL) presente en los gangliósidos purificados es medido espectrofotométricamente mediante reacción con resorcinol. La cantidad de gangliósidos en las muestras es obtenida al multiplicar el valor ASEL por un factor de conversión. Este factor es obtenido a partir de la razón de los pesos moleculares de los gangliósidos y del ácido siálico. Debido a que los gangliósidos son una familia de compuestos con diferentes pesos moleculares y al número de residuos de ácido siálico, la separación por CLAE es usada para medir la distribución de gangliósidos individuales con el fin de calcular el factor de conversión de manera mas efectiva.

Estándares

- Disialogangliósido GD1a, de cerebro bovino, min. 95% (TLC) SIGMA, ref G-2392.
- Monosialogangliósido GM1, de cerebro bovino, min 95% (TLC) SIGMA, ref G7641.
- Sal de amonio de disialogangliósido GD3, de suero de leche, min. 98% (TLC), Calbiochem, ref 345752 o Matreya, ref 1503.
- Sal de amonio de monosialogangliósido GM3, de leche de bovino, min. 98% (TLC) Calbiochem, ref 345733 o Matreya, ref 1504.
- Acido N-acetilneuramínico, (ácido siálico, NANA) de Escherichia coli, min. 98% SIGMA, ref A-2388.

Los estándares de gangliósidos no son considerados como verdaderos estándares debido a que los proveedores típicamente no garantizan sus concentraciones. Por esta razón, Las concentraciones son estimadas mediante la medida de ASEL por el método del resorcinol. Los estándares son diluidos con cloroformo:metanol (C:M) 1:1 (v/v) a una concentración teórica de 1-2.5 mg/ml, dependiendo del tipo de gangliósido. Son tomadas alícuotas de 10, 20 y 40 μ l, haciéndolo en seco bajo flujo de nitrógeno y medidos como se explicará mas adelante (Medidas de ASEL). Una concentración promedio de las tres alícuotas se considera como la concentración de los estándares de gangliósidos expresados como ASEL.

La concentración de gangliósidos es obtenida mediante la multiplicación de ASEL por un factor de conversión obtenido de las razones de los pesos moleculares

(factor de conversión: PM de gangliósido/n x PM de ácido siálico, donde n = número de unidades de ácido siálico).

Reactivos

- Cloroformo, grado CLAE, Prolabo.
- Metanol, grado CLAE, Merck
- Eter diisopropílico, grado CLAE, Prolabo
- Acetato de butilo, PA, Merck
- 1-butanol, PA, Merck
- Fosfato dibásico de sodio, PA, Panreac.
- Acido clorhídrico 35%, PA, Panreac.
- Sulfato de cobre, PA, Panreac
- Resorcinol, 99%, Merck
- Cloruro de sodio, PA, Panreac

Equipos

- Balanza analítica, con precisión de 0,1 mg
- Viales CLAE, tapa de tornillos e insertos De Waters.
- Micro jeringas Hamilton (50, 100, 250, 500, 1000 μ l).
- CLAE: Alliance 2690 de Waters
- Detector UV de CLAE, número de Referencia 2487, de Waters
- Integrador de CLAE: Waters millennium 32
- Funda de filtro Solvac (polipropileno) Ref. No, 4020
- Filtros de membrana Durapore de 0.45 μ m, Ref. No. VLP04700
- Agitador multi-reax (Heidolph)
- Pipetas digitales (2-20, 5-50, 40-200, 200-1000 μ l)
- Tubo de centrifuga de 10 ml de vidrio de fondo redondo
- Tubo de centrifuga de 50 ml de vidrio de fondo redondo
- Tubo de centrifuga de 40 ml de vidrio de fondo cónico
- Cartuchos C-18 de 500 mg (5 ml, ref.
- Centrifuga
- Baño ultrasónico
- Colectores de vacío SPE, modelo de 24 puertos
- Bomba de vacío de diafragma
- Termo de reacción de triple bloque (Pierce)
- Bomba de vacío de agua
- Pipeta Pasteur de vidrio
- Dispensador de solvente orgánico (2.5-25 ml)
- Agitador (Heidolph)
- Baño de agua 40-100 °C
- Pipetas de vidrio (5, 10, 25 ml)
- Espectrofotómetro (ThermoSpectronic UV500)

52604-U, Supelco)

- Evaporador Reacti-Vap III de 27 puertos (Pierce)

Procedimiento

Extracción de lípidos: Los extractos de lípidos son preparados como sigue: muestras de 1 g de fórmula o 100 mg de Lacprodan MFGM-10 son pesadas en tubos para centrifuga de vidrio de fondo redondo (tubos de 50 ml para la fórmula y tubos de 10 ml para Lacprodan MFGM-10). Se adicionaron veinticinco ml de cloroformo:metanol:agua (C:M:A) 50:50:10 (v/v) por gramo de muestra, dispersando completamente las muestras mediante agitación o sonicación durante 1 minuto. Los tubos son incubados durante 45 minutos a temperatura ambiente con agitación vigorosa y continua (2000 rpm) con pulsos de baño de ultrasonido de 1 minuto cada 15 minutos. Las muestras son centrifugadas (1500 x g, 10 minutos, 15 °C). Los sobrenadantes son transferidos a tubos de vidrio para centrifuga de 40 ml de fondo cónico y se lleva hasta secado bajo N₂ a 37 °C. Entretanto, los pelets son re-extraídos con 12.5 ml de C:M:A por g durante 15 minutos a temperatura ambiente y con agitación continua (2000 rpm) y con pulsos de baño de ultrasonido de 1 minuto cada 7.5 minutos. Después de la centrifugación, los sobrenadantes son colocados junto con los primeros en los tubos de 40 ml y se continúa con el proceso de evaporación. Los pelets son lavados con C:M 1:1 (v/v) e incubados durante 10 minutos en las mismas condiciones planteadas previamente, con pulsos de ultrasonido cada 5 minutos. Después de la centrifugación, los sobrenadantes también son adicionados a los tubos de 40 ml y posteriormente secados por evaporación.

La fracción de gangliósidos es purificada a partir del extracto de lípidos totales mediante una combinación de una partición éter diisopropílico (EDIP)/1-butanol/ fase acuosa descrita por Ladisch S. y Gillard B. (1985); Un método de partición por solventes para purificación de gangliósidos a microescala, Anal. Biochem, 146:220-231. Lo anterior es seguido por una extracción en fase sólida a través de cartuchos C-18, tal como es descrito por Williams M. y McCluer R. (1980), El uso de cartuchos C18 Sep-Pak™ durante el aislamiento de gangliósidos, J. Neurochem, 35:266-269, con modificaciones.

Partición éter diisopropílico/1-butanol/NaCl acuoso: 4 ml de EDIP/1-butanol 60:40 (v/v) son adicionados al extracto de lípidos secos. Las muestras son agitadas y sonicadas para lograr una suspensión fina del extracto de lípidos. Son adicionados 2 ml de una solución acuosa de NaCl al 0.1%, y los tubos son frecuentemente agitados y sonicados por pulsos de 15 segundos durante 2 minutos, y luego centrifugados (1500 x g, 10 minutos, 15 °C). La fase orgánica superior (conteniendo los lípidos neutrales y los fosfolípidos) es removida cuidadosamente mediante una pipeta Pasteur, teniendo cuidado de no remover la interfase. La fase acuosa inferior que contiene los gangliósidos es extraída dos veces con el volumen original de solvente orgánico fresco. Las muestras son parcialmente evaporadas bajo flujo de N₂ a 37 °C durante 30-45 minutos hasta que el volumen se reduce a aproximadamente la mitad del volumenn original.

Extracción en fase sólida (EFS) mediante cartuchos C-18 de fase reversa: Cartuchos C-18 de 500 mg son adaptados a 24 puertos en línea de colectores de vacío de EFS y son activados con tres lavados consecutivos de 5 ml de etanol, 5 ml de C:M 2:1 (v/v) y 2.5 ml de metanol. Luego, los cartuchos son equilibrados con 2.5 ml de solución acuosa de NaCl al 0.1%:metanol 60:40 (v/v). Los volúmenes de las fases inferiores evaporados parcialmente son medidos, llevados hasta 1.2 ml con agua y adicionados con 0.8 ml de metanol. Entonces, son centrifugados (1500 x g, 10 minutos) para remover cualquier material insoluble y cargarlos dos veces en los cartuchos C-18. Los cartuchos de EFS son lavados con 10 ml de agua destilada para remover las sales y los contaminantes solubles en agua, y entonces secados durante 30 segundos al vacío. Los gangliósidos son eluidos con 5 ml de metanol y 5 ml de C:M 2:1 (v/v), secados bajo flujo de nitrógeno y redissueltos en 2 ml de C:M 2:1 (v/v). Las muestras y los solventes se pasan a través de los cartuchos por gravedad o forzados mediante un vacío débil con una velocidad de flujo de 1-1.5 ml/minuto. Los gangliósidos son almacenados a -30 oC hasta su análisis. Los gangliósidos totales son medidos como ASEL. Una alícuota de 500 µl es colocada en un tubo de vidrio para centrifuga de 10 ml, secado bajo N₂ y medido mediante el ensayo con resorcinol. (3).

Medida de ASEL: Son adicionados 1 ml de reactivo de resorcinol y 1 ml de agua. Los tubos son calentados durante 15 minutos a 100 oC en un baño de agua hirviendo. Luego del calentamiento, los tubos son enfriados en un baño de hielo-agua, y se adicionan 2 ml de acetato de butilo, luego los tubos son agitados

vigorosamente durante 1 minuto y posteriormente centrifugados a 750 x g durante 10 minutos. Las fases superiores son recogidas y medidas a 580 nm es un espectrofotómetro Standars ; soluciones de NANA (0,2,4,8,16,32 y 64 µg/ml) son manejados de la misma forma y posteriormente empleados para calcular la concentración de ácido siálico en las muestras.

El reactivo de resorcinol es preparado como sigue: 10 ml de resorcinol al 2% en agua desionizada, 0.25 ml de sulfato de cobre 0.1 M y 80 ml de ácido clorhídrico concentrado se completan hasta 100 ml con agua. El reactivo es preparado diariamente y protegido de la luz.

Separación de gangliósidos por CLAE: Los gangliósidos son separados mediante CLAE en un equipo Alliance 2690 con detector de absorbancia dual, de Waters y utilizando una columna Luna-NH2, 5 µm, 100 Å, 250 x 4.6 mm de Phenomenex, ref. 00G-4378-EO. Son eluidos a temperatura ambiente con el siguiente sistema de solventes: buffer acetonitrilo-fosfato a diferentes razones de volumen y fuerzas iónicas de acuerdo con el método de Gazzotti G., Sonnion S., Ghidonia R., (1985), Separación de mezclas de gangliósidos no derivatizados mediante cromatografía líquida de alta resolución de fase normal, J. Chromatogr. 348:371-378.

Se utiliza un gradiente con dos fases móviles:

Solvente A: Buffer acetonitrilo-fosfato 5mM, pH 5.6 (83:17). Este buffer es preparado con 0.6899 g de NaH2PO4.H2O en 1 litro de agua, ajustando el pH a 5.6

Solvente B: Buffer acetonitrilo-fosfato 5mM, pH 5.6 (83:17). Este buffer es preparado con 2.7560 g de NaH2PO4.H2O en 1 litro de agua, ajustando el pH a 5.6

El siguiente programa de gradiente de elución es usado:

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% A	% B
0	1	100	0
7	1	100	0
60	1	66	34
61	1	0	100
71	1	0	100
72	1	100	0
85	1	100	0

Las muestras son extraídas en fase líquida, particionadas y extrídas en fase sólida en la forma como se explicó previamente. Una alícuota de 0.5 ml de una muestra de 2 ml en C:M 2:1 es evaporada bajo nitrógeno y redisuelta en 0.150 ml de agua. Para una reconstitución perfecta, la muestra es agitada y sonicada. La solución final es transferida a un vial de CLAE. El volumen de inyección es 30 μ l de cada muestra y estándar.

Los estándares GD3 y GM3 son medidos mediante el procedimiento del resorcinol y las concentraciones verdaderas son calculadas como se explicó anteriormente. Las concentraciones de los estándares de calibración están en el rango entre aproximadamente 0-0.5 mg/ml para GD3 y aproximadamente 0-0.2 mg/ml para GM3. La concentración exacta de cada grupo de estándares puede variar dependiendo de la pureza de los estándares.

Un grupo de estándares es inyectado cada vez que el sistema es calibrado, por ejemplo, para utilizar una nueva columna. El rendimiento apropiado del sistema es probado mediante la inyección de un estándar de concentración intermedia cada diez corridas. Si la concentración interpolada no está entre el 95% y el 105% de la concentración teórica, un nuevo grupo de calibración es inyectado y usado para los cálculos posteriores.

Método de fabricación

Las fórmulas infantiles de la presente invención pueden ser preparadas por cualquier otra técnica efectiva conocida, adecuada para hacer y formular fórmulas infantiles u otras similares. Tales técnicas y variaciones de las mismas para cualquier fórmula dada son determinadas y aplicadas fácilmente por una persona versada en el arte de fabricación o formulación nutricional infantil, durante la preparación de las fórmulas descritas en la presente invención.

Los métodos de fabricación de las fórmulas infantiles de la presente invención pueden incluir la formación de una lechada de una o mas soluciones que pueden contener agua y uno o mas de los siguientes: carbohidratos, proteínas, lípidos, estabilizadores, vitaminas y minerales. Esta lechada es emulsificada, homogenizada y enfriada. Otras soluciones, mezclas u otros materiales pueden adicionarse a la emulsión resultante, antes, durante o después del proceso

adicional. Esta emulsión puede ser diluída, esterilizada y empacada un líquido concentrado o listo para consumir, o puede ser esterilizada y posteriormente procesado y empacado como un polvo reconstituible (por ejemplo atomización en seco, mezcla seca, aglomerado).

Otros métodos disponibles para hacer fórmulas infantiles son descritos, por ejemplo, en la patente US 6,365,218 (Borschel) y en la solicitud de patente US 20030118703 A1 (Nhuyen y compañeros) cuyas descripciones son incorporadas aquí como referencia.

EXPERIMENTO 1

El propósito de este estudio es comparar los beneficios de actuación en cerdos neonatales alimentados ya sea con una fórmula de control o con una o dos fórmulas diferentes con concentraciones enriquecidas de gangliósidos, fosfolípidos y ácido siálico, y concentraciones diferentes de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico.

Antecedente

El lechón neonatal constituye un modelo apropiado para evaluar la intervención nutricional como paso previo al diseño e implementación de pruebas clínicas en humanos. Dicha factibilidad radica en las similitudes de la fisiología gastrointestinal entre el lechón y el neonato humano (Miller, E.r. Ullrey, El cerdo como modelo para la nutrición humana, Annu. Rev Nutr 1987; 7;361-82). Adicionalmente, el cerebro del lechón crece por impulsos, tal como ocurre en el humano, extendiéndose desde la vida prenatal última hasta la vida postnatal temprana, lo cual también constituye una gran ventaja de este modelo de animal (Pond WG y compañeros, Ontogenia perinatal del crecimiento del cerebro en el cerdo doméstico. PSEBM 2000, 223:102-108). El período crítico a considerar es entre los 70 hasta los 140 días luego de la concepción (el nacimiento se presenta luego de cerca de 112-113 días luego de la concepción). El presente estudio está diseñado para proporcionar una valoración biológica de los efectos de tres fórmulas de prueba, una de las cuales es una fórmula infantil convencional de control.

Resumen

Los datos de los estudios muestran una significativa migración neural a los 12-13 días de edad en los lechones neonatales. Este período de tiempo en el lechón debe corresponder a entre 3 y 4 meses en un infante humano (Miller, E.R., Ullrey, El cerdo como modelo para la nutrición humana, Annu Rev Nutr 1987: 7: 361-82).

Diseño Experimental

El estudio es longitudinal e incluye tres grupos de lechones alimentados con las dietas experimentales A, B o C (ver Tabla 2) con tres momentos de sacrificio después de 8-9, 15-16 y 29-30 días de alimentación. Un grupo adicional, sacrificado al inicio del estudio, es usado como referencia. El estudio es dividido en dos experimentos. Los lechones utilizados en el estudio tienen certificados de granja.

En el primero de los dos experimentos del estudio, 33 lechones domésticos machos (4-5 días de edad) son encerrados en jaulas de alambre de acero inoxidable (2 animales por jaula) en un cuarto acondicionado a 27-30 °C. Los animales son alimentados 4 veces por día con una dieta para cerdo adaptada, de acuerdo con requerimientos nutricionales. Luego de un período de adaptación de 3 días, los lechones son sacrificados. El momento en el que estos lechones son sacrificados se le denomina "tiempo cero" dentro del estudio. El resto de los lechones son emparejados por peso y camada, y son divididos en tres grupos (n=10, n=10 y n=10, respectivamente) que también son alimentados 4 veces al día con las siguientes dietas:

- Dieta A: Similar a la fórmula infantil Similac® Advance®, disponible en Abbott Laboratories, Columbus, Ohio USA (0.4% de ácido araquidónico, 0.15% de ácido docosahexaenoico, por peso de ácidos grasos totales, y concentrado proteínico de suero convencional).
- Dieta B: Fórmula infantil de la presente invención con 0.4% de ácido araquidónico y 0.15% de ácido docosahexaenoico, por peso de ácidos grasos de fórmula total, y concentrado proteínico de suero enriquecido a un nivel de 7.1 g/L de fórmula sobre una base alimentaria.

- Dieta C: Fórmula infantil similar a la dieta B pero con concentraciones reducidas de ácido araquidónico y ácido docosahexaenoico (0.2% y 0.1%, respectivamente, por peso de ácidos grasos de la fórmula total) y concentrado proteínico de suero enriquecido a un nivel de 7.1 g/L de fórmula sobre una base alimentaria.

Las dietas A, B y C son adaptadas en términos de micronutrientes (minerales y vitaminas) a los requerimientos especiales de lechones neonatales. La siguiente tabla muestra la composición de la dieta de cerdo estándar y de las dietas A, B y C.

Tabla 2: Dietas experimentales

	Dieta de cerdo estándar por 100 g	Dieta de cerdo estándar por 100 ml	Dietas A, B, C por 100 g	Dietas A, B, C por 100 ml
Proteína	25.5	4.79	10.9	1.40
Grasa	36.3	6.82	28.9	3.71
Carbohidratos	31	5.83	53	6.81
Cenizas	5.2	0.98	5.2	0.67
Humedad	2	0.38	2	0.26
Minerales				
Na (mg)	201.9	37.96	201.9	25.94
K (mg)	800	150.40	800	102.80
Cl (mg)	300	56.40	300	38.55
Fe (mg)	32.7	6.15	32.7	4.20
Zn (mg)	13	2.44	13	1.67
Cu (mg)	0.8	0.15	0.8	0.10
Mg (mg)	61.4	11.54	61.4	7.89
Mn (mg)	0.5	0.09	0.5	0.06
Ca (mg)	1069	200.97	1069	137.37
P (mg)	792	148.90	792	101.77
I (mcg)	61.7	11.60	61.7	7.93
Se (mcg)	20	3.76	20	2.57
Vitaminas				
Vitamina A (IU)	400	75.20	400	51.40
Vitamina D (IU)	53	9.96	53	6.81
Vitamina E (IU)	5	0.94	5	0.64
Vitamina K (mcg)	21.5	4.04	21.5	2.76
Tiamina (mg)	0.2	0.04	0.2	0.03
Riboflavina (mg)	0.5	0.09	0.5	0.06

Piridoxina (mg)	0.317	0.06	0.317	0.04
Cianocobalamina (mcg)	3.5	0.66	3.5	0.45
Acido pantoténico (mg)	2	0.38	2	0.26
Acido fólico (mcg)	100	18.80	100	12.85
Biotina (mg)	26.5	4.98	26.5	3.41
Niacina (mg)	3	0.56	3	0.39
Vitamina C (mg)	71.25	13.40	71.25	9.16
Colina (mg)	170	31.96	170	21.85
Otros				
Nucleótidos (mg)	-	-	56.14	7.21
Energía	552.7	103.91	515.7	66.27

Tabla 3

	Dieta A (control)	Dieta B	Dieta C
Proteína	Milacteal-651	PSNU 29002 (7.1 g/L como alimento)	PSNU 29002 (7.1 g/L como alimento)
Gangliósido mg/L	3.2-4.8	14	14
Acido siálico mg/L	115-150	190	190
Acido siálico enlazado a lípidos (% en peso de ácido siálico total)	<0.1%	2.5-3.0	2.5-3.0
Fosfolípidos mg/L	118	450	450
Lactoferrina mg/L	2.6	100	100
FOS g/L	0	2	2
Acido araquidónico - % en peso de ácidos grasos totales	0.4	0.4	0.2
Acido docosahexaenoico - % en peso de ácidos grasos totales	0.15	0.15	0.1

Todas las dietas, una vez preparadas, son usadas inmediatamente o son almacenadas en latas en atmósfera inerte a 4 °C y usadas dentro de las 24 horas siguientes. Las dietas están en forma de polvo y son reconstituídas con agua hasta un 18.8% en peso para la dieta de cerdo adaptada y hasta un 12.85% en peso para las dietas A, B y C. Las dietas líquidas reconstituídas son colocadas en las jaulas de alimentación. El líquido remanente es removido y medido, y los alimentadores son limpiados como paso previo a la siguiente comida.

Por cada grupo, 3 o 4 lechones son sacrificados a los 8-9, 15-16 y 29-30 días luego de haber iniciado la alimentación con el control (dieta A) o con las dietas experimentales (Dietas B y C).

En el segundo experimento del estudio, 44 lechones domésticos machos (de 4-5 días de edad) son enjaulados individualmente en el mismo tipo de jaulas y en el mismo cuarto descrito para el primer experimento. El protocolo de alimentación es el mismo y 4 lechones son sacrificados, luego del período adaptativo, para completar el grupo de referencia. El resto de los lechones son emparejados por peso y camada y divididos en 3 grupos (n=13, n=13 y n=14, respectivamente) que son alimentados con las dietas A, B y C. Uno o dos lechones mas son incluidos en cada grupo para reemplazar abandonos.

El consumo dietario y la ganacia de peso son monitoreados 4 veces al día y dos veces a la semana, respectivamente, para cada uno de los lechones.

En el momento apropiado, cada lechón es anestesiado rápidamente con Cetamina/Domtor luego de la noche y luego es sacrificado mediante hemorragia terminal por perforación yugular.

Preparación de las muestras

Los lechones no son alimentados durante la noche y se desangran hasta morir por perforación de la vena yugular, mientras están anetesiados. La sangre es recogida utilizando EDTA tripotásico (2.7 mm/L) como anticoagulante y centrifugada a 1500 x g durante 10 minutos a 4 °C.

Se abren los cráneos y el cerebro es removido y pesado. Se realiza la disección del hemisferio izquierdo y luego se coloca en formaldehído al 4% con pH controlado de 7.4 y en etanol a 70° durante una semana para el análisis histológico. El hemisferio derecho es almacenado a -80 °C para análisis bioquímico. Los ojos son removidos. El ojo izquierdo también se coloca en formaldehído. Dos horas después, el polo anterior del ojo es separado con un bisturí y el ojo se deja nuevamente en formaldehído durante 18 horas. Se realiza la disección del ojo derecho y la retina es removida y pesada. El plasma, el hemisferio derecho y la retina son almacenadas a -80 °C hasta su análisis.

Composición de ácidos grasos del plasma

Las muestras de plasma son metiladas por el método de Lepage y Roy (6) y analizadas por cromatografía líquida. Doscientos microlitros (μL) de plasma se adicionan junto con ácido pentadecanoico con estándar interno (0.04 mg/muestra), 2 ml de una mezcla de metanol:hexano (4:1) y 0.2 ml de cloruro de acetilo. Los tubos son tapados y calentados a 100 °C durante 1 hora. Luego son enfriados en un baño de hielo, adicionándoles 5 ml de K_2CO_3 al 6%, y centrifugados durante 10 minutos a 1500xg. Tres microlitros de la capa superior de hexano se inyectan en un equipo cromatográfico Hewlett-Packard 6890 con detector de ionización de llama y una columna SP2330 de 60 m de longitud, 0.32 mm de id y una película de grosor capilar de 0.2 μm (Supelco). Flujo de helio a 1 ml/min es utilizado como gas transportador, con radio de separación 1:40. El programa de temperatura consiste en 165 °C durante 3 minutos, incrementos de 2 °C/min hasta 195 °C, estabilidad durante dos minutos, incrementos de 3 °C/min hasta 211 °C y estabilidad durante 10 minutos. La temperatura del inyector y el detector es de 250 °C. Los ácidos grasos son identificados al comparar sus tiempos de retención con aquellos de estándares auténticos (Sigma). Los resultados son expresados como porcentajes normalizados de área o concentraciones para cada éster metílico de ácido graso.

Composición del cerebro

El hemisferio derecho es homogeneizado con un homogenizador Heidolph. Un gramo del cerebro homogeneizado es homogeneizado adicionalmente con 15 ml de PBS en ultraturrax durante 1 minuto y posteriormente diluido hasta 100 ml con PBS. El contenido de ADN es medido en alíquotas de 10 μL , por triplicado, mediante reacción con el reactivo de Hoechst y flurimetría utilizando el kit de investigaciones moleculares F-2962.

El contenido de proteína es determinado en una dilución de 1:4 de 1g/100 ml homogéneo mediante el procedimiento de Lowry y utilizando el kit Sigma TP0300 con modificaciones para medir en microplacas. Brevemente, 20 μl de muestra o estándar, por triplicado, son colocados en microplacas de 96 pozos. Se adicionan ochenta μl de agua, y 100 μl de reactivo de Lowry y se incuban durante 20 minutos

con agitación. Se adicionan 50 μ l de reactivo de Folin-Ciocalteu y se incuban durante 30 minutos con agitación. Se mide la absorbancia a 690 nm.

El colesterol es medido con un método espectrofotométrico-colorimétrico luego de realizar la extracción de la muestra con solventes orgánicos. Doscientos mg de cerebro homogeneizado son homogeneizados adicionalmente en 1 ml de agua utilizando un homogeneizador Heidolph. Las muestras son completadas con 5 ml de hexano:isopropanol (3:2), agitadas durante 1 minuto, sonicadas durante 5 minutos y centrifugadas a 4 °C durante 10 minutos a 1500xg. La capa superior es recogida y la capa inferior es re-extraída con 3 ml de solventes. La capa superior es recogida, mezclada con la primera y evaporada bajo flujo de nitrógeno. El extracto es disuelto en 3 ml de cloroformo, luego de lo cual 20 μ l se toman por duplicado para realizar el análisis de colesterol. El solvente se avpora y se adicionan 100 μ l de isopropanol. La determinación del colesterol se realiza usando un kit Randox n° CH201 de acuerdo con las instrucciones del distribuidor. Se utiliza una línea de calibración de colesterol de 0.25 a 2 mg/ml.

La composición de ácidos grasos es medida como se explicó anteriormente para el plasma, usando 40 mg de homogeneizado y sin estándar interno. Los resultados son expresados como porcentajes normalizados de área para cada éster metílico de ácido graso.

El contenido de gangliósido es medido tanto por CLAE como espectrofotometría como ácido siálico enlazado a lípidos (ASEL) luego de la extracción, partición y purificación de lípidos. Una porción de cerebro homogeneizado (1.250 g) se extrae con 18 ml de cloroformo:metanol (C:M) 1:1 (v/v); la mezcla se agita durante 45 minutos a 4 °C y se centrifuga a 1500xg durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante es recogido y el pelet es re-extraído dos veces con 18 ml y 12 ml de la mezcla de solventes, respectivamente. Los tres sobrenadantes son mezclados y llevados hasta 50 ml con la mezcla de solventes, luego se toman dos alícuotas de 20 ml y se incuban toda la noche a -30 oC. Luego de la incubación, las mezclas son centrifugadas y los sobrenadantes son recogidos y secados bajo flujo de nitrógeno. Los gangliósidos son purificados del extracto de lípidos totales mediante una combinación de partición con éter diisopropílico (EDIP)/1-butanol/fase acuosa (descrito por Ladisch y Gillard, 1985, Un método de partición con solventes para la purificación de gangliósidos a microescala, Anal, Biochem., 46:220-231), seguido

por una extracción en fase sólida mediante cartuchos C-18 (de acuerdo con el método de Williams y McCluer, 1980, El uso de cartuchos C18 Sep-PakTM durante el aislamiento de gangliósidos, J. Neurochem. 35:266-269) con modificaciones.

Se adicionan cuatro ml de EDIP/1-butanol 60:40 (v/v) al extracto de lípidos secos. Las muestras son agitadas y sonicadas para lograr la suspensión fina de los lípidos. Luego se adicionan 2 ml de una solución acuosa de NaCl al 0.3% y los tubos son agitados y sonicados por pulsos de 15 segundos durante dos minutos y posteriormente centrifugados. La fase orgánica superior (que contiene lípidos neutrales y fosfolípidos) se remueve cuidadosamente usando una pipeta Pasteur y teniendo cuidado de no remover la interfase. La fase acuosa inferior que contiene los gangliósidos se extrae dos veces con el volumen original de solvente orgánico fresco. Las muestras son evaporadas parcialmente bajo flujo de N₂ a 37 °C durante 30-45 minutos, hasta que el volumen (cercano a 2 ml) se reduce hasta aproximadamente la mitad del volumen original.

Cartuchos C-18 de 500 mg son empotrados a un colector de vacío PSE de 24 líneas y activados con tres lavados de 5 ml de metanol, 5 ml de C:C 2:1 (v/v) y 2.5 ml de metanol. Luego, los cartuchos son equilibrados con 2.5 ml de solución acuosa de NaCl al 0.3%:metanol 60:40 (v/v). Los volúmenes de las fases inferiores evaporadas parcialmente, son medidas, llevadas hasta 1.2 ml con agua y mezcladas con 0.8 ml de metanol. Posteriormente, son centrifugadas para remover cualquier material insoluble y son cargadas dos veces sobre los cartuchos C-18. Los cartuchos SPE son terminados de llenar con 10 ml de agua destilada para remover sales y contaminantes solubles en agua, y entonces, son secados por 30 segundos al vacío. Los gangliósidos son eluidos con 5 ml de metanol y 5 ml de C:M 2:1 (v/v), secados bajo flujo de N₂ y redissueltos en 1 ml de C:M 1:1 (v/v). Los gangliósidos totales son medidos como ASEL. Una alícuota de 50 µl es colocada en tubos de vidrio para centrifuga de 10 ml, secados bajo N₂ y medidos por el ensayo del resorcinol (Svennerholm, L., 1957, Estimación cuantitativa de ácido siálico: Un método colorimétrico de resorcinol-ácido clorhídrico, Biochem. Biophys. Acta., 24:604-611).

Se adicionan 1 ml de reactivo de resorcinol y 1 ml de agua. Los tubos son tapados y calentados durante 15 minutos a 100 °C en un baño de agua hirviendo. Luego del calentamiento, los tubos son enfriados en un baño de agua-hielo, y se les adicionan

2 ml de acetato de butilo:butanol 85:15 (v/v). Los tubos son agitados vigorosamente durante 1 minuto y posteriormente son centrifugados a 750xg durante 10 minutos. Las fases superiores se toman y se miden a 580 nm en un espectrofotómetro. Soluciones estándar de NANA de entre 2-64 µg/ml son manipuladas de la misma forma y luego son usadas para calcular las concentraciones de ácido siálico en las muestras.

El reactivo de resorcinol es preparado como sigue: 10 ml de resorcinol al 2% en agua desionizada, 0.25 ml de sulfato de cobre 0.1 M y 80 ml de ácido clorhídrico concentrado son llevados hasta 100 ml con agua. El reactivo es preparado diariamente y protegido de la luz.

Ciento cincuenta mcg del extracto de lípido purificado remanente se utiliza para el análisis de gangliósidos por CLAE. Los gangliósidos son separados mediante CLAE en un equipo Alliance 2690 con detector de absorbancia dual, de Waters, y utilizando una columna Luna-HH2, de 5 µm, 100 Å, y 250 x 4.6 mm de Phenomenex.

Posteriormente, son eluidos a temperatura ambiente con el siguiente sistema de solventes: buffer de acetonitrilo-fosfato con diferentes razones de volumen y fuerzas iónicas (de acuerdo con el método de Gazzotti, Sonnino y Ghidoni, 1985, Separación de mezclas de gangliósidos no derivatizados mediante cromatografía líquida de alta eficacia de fase normal, L. Chromatogr., 348:371-378).

Se utiliza un gradiente con dos fases móviles:

Solvente A: Buffer acetonitrilo-fosfato 5mM, pH 5.6 (83:17).

Solvente B: Buffer acetonitrilo-fosfato 20mM, pH 5.6 (1:1).

El siguiente programa de gradiente de elución es usado:

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% A	% B
0	1	100	0
7	1	100	0
60	1	66	34
80	1	36	64

81	1	0	100
90	1	0	100
91	1	100	0
105	1	100	0

Las soluciones de GD3 de 0.4 mg/ml son utilizadas como estándares de calibración y la solución de cerebro de bovino es usada para identificar los tipos de gangliósidos.

Composición de la retina

La retina es homogeneizada con 3.5 ml de C:M 1:1 (v/v) en un ultraturrax durante 1 minuto, agitada durante 45 minutos y centrifugada. El sobrenadante es recogido y los pelets son re-extraídos dos veces con 2 ml de la mezcla de solventes. Los tres sobrenadantes son mezclados y secados bajo B2. Los extractos se disuelven en 1 ml de cloroformo y luego se toman alícuotas de 100 μ l para el análisis de ácidos grasos y fosfolípidos. El resto del extracto se seca nuevamente y se somete al mismo procedimiento de partición y purificación de las muestras de cerebro. Los extractos purificados son disueltos en 1 ml de C:M 1:1, luego de lo cual 0.5 ml son medidos por el procedimiento del resorcinol y 0.5 ml son usados para el análisis de gangliósidos por CLAE.

La composición de ácidos grasos es medida con las alícuotas de 100 μ l en la forma como se explicó para el caso del plasma. Los resultados son expresados como porcentajes normalizados de área para cada éster metílico de ácido graso.

El contenido de fosfolípidos en las muestras de retina se mide por CLAE en una columna Spherisorb de sílica, de 5 μ m, y 150x4.6 mm, usando el siguiente sistema de solventes: buffer de acetonitrilo-fosfato con diferentes razones en volumen y fuerzas iónicas.

Se utiliza un gradiente con dos fases móviles:

Solvente A: Acetonitrilo

Solvente B: Buffer acetonitrilo-fosfato 20mM, pH 5 (80:20).

El siguiente programa de gradiente de elución es usado, trabajando con la columna a 55 °C:

Tiempo (min)	Flujo (ml/min)	% A	% B
0	2	95	5
2	2	95	5
5	2	70	30
12	2	10	90
20	2	95	95

Veinte μ l de la alícuota de 100 μ l son inyectados al sistema (Alliance 2690 con detector de absorbancia dual, de Waters). La detección es hecha a 201 nm. Se utilizan estándares de calibración de fosfatidilserina (FS), fosfatidiletanolamina (FE), fosfatidilcolina (FC) y esfingomielina (EM) con concentraciones entre 0.2-5 mg/ml. El fosfatidilinositol se inyecta por separado debido a que éste contiene FE como contaminante. Se utilizan los mismos rangos de concentraciones.

Análisis histológico de cerebro y ojo

Los hemisferios del cerebro son seccionados transversalmente en muestras de 50 mm de grosor. Luego de un análisis preliminar, los bloques centrales (4, 5 o 6 según el tamaño del cerebro) son seleccionados para las cuantificaciones.

Una muestra del nervio óptico con una longitud mínima de 5 mm es seccionada transversalmente, mantenida en formalina con pH controlado durante 3 horas y luego preservada en buffer de fosfatos (pH 7.4) a 4-6 °C.

Los ojos son seccionados frontalmente en 3 muestras, marcados y enterrados en parafina. Se hacen secciones seriales de todos los bloques de parafina para su posterior teñido.

Luego del seccionamiento serial sobre un microtomo y su posterior montaje sobre láminas normales y especiales para procedimientos de inmunohistoquímica, las muestras son teñidas con el tite clásico: Haematoxilina-eosina, reacción de Schiff

ácida periódica (SAP) y azul rápido Luxol de Klüver-barrera. El teñido inmunohistoquímico también se desarrolla en secciones histológicas de las mismas series pero utilizando el teñido clásico. Los siguientes marcadores son utilizados:

Proteína Ab-1 de Anticuerpo monoclonal S100. La S100 pertenece a la familia de proteínas que se enlazan a calcio, tales como calmodulina y troponina C. La proteína S100 también se expresa en las células que presentan antígeno, tales como las células Langerhans de la piel, células de retículo entrelazado del paracortex en nodos de linfa y células de cepas de astroglia. El inmunógeno usado es proteína S100 de cerebro de bovino purificada (reactividad de especies: humano, vaca, rata y ratón).

Núcleo anti-neural de anticuerpo monoclonal (NeuN). El NeuN (o núcleo neuronal) reacciona con muchos tipos de células neuronales. Durante el desarrollo, la inmunoreactividad se observaprimero inicialmente después de que las neuronas se vuelven postmitóticas; en zonas proliferativas no se ha observado tinción. El teñido inmunohistoquímico está localizado principalmente en el núcleo de las neuronas con ligero teñido en el citoplasma. Reactividad de especies: humano, ratón, rata, cerdo, hurón, pollo y salamandra.

Anticuerpo monoclonal bcl-2. La expresión de oncoproteína bcl-2alfa inhibe la muerte celular programada (apoptosis). Reactividad de especies: humano y cerdo.

Se capturaron treinta imágenes de fascículo subcallosal y otras mas de la substancia blanca adyacente con una cámara de video a blanco y negro Sony XC-ST500CE (sony corporation, Tokyo, Japón) acoplada a un microscopio Olympus BH-2 (20 Watts) con un adaptador MTV-3 (Olympus Optical Company, Ltda., Tokio, Japón). El uso de objetivos de poder de 20x y 60x Olympus PLCN60X (60x/0.80) generó una magnificación total de 600x. El procesamiento de imágenes se realizó usando el software Visilog 6.0 (Noesis S.A. Courteboeuf, Francia).

Resultados

Abandonos

Experimento 1: Un lechón del grupo A es muy pequeño al nacer y no se puso al nivel del resto de los lechones. Un lechón del grupo C murió después de 10 días de iniciada la prueba. Otro lechón del grupo C es una hembra, lo cual fue confirmado al final del experimento. Consecuentemente, el valor de n para el grupo A luego de 29-30 días es 3 en lugar de 4, y el valor de n para el grupo C en la misma edad es 2 en lugar de 4.

Experimento 2: Un lechón murió durante el período de adaptación. Otro lechón del grupo B murió después de 6 días de iniciada la prueba. Dos cerdos del grupo A y uno del grupo B fueron excluidos del estudio debido a que eran muy pequeños al nacer y no crecieron como el resto de los lechones.

Consecuentemente, el estudio completo de 7 lechones para cada punto y grupo fue logrado en todos los grupos, excepto para el grupo A a los 29-30 días (n=6).

Peso corporal e ingesta dietaria

La evolución del peso corporal y la ingesta dietaria es muy similar para los 3 grupos dietarios diferentes. No hay diferencias en la evolución del peso corporal entre los grupos durante la evolución del experimento. La ingesta dietaria es significativamente mayor en el grupo C con respecto a los grupos A y B, únicamente para el intervalo de tiempo entre 16 y 28 días. Para el resto del tiempo no hay diferencias entre los grupos. Cuando la ingesta está representada como la ingesta dietaria acumulada, no hay diferencias entre los grupos. Asimismo, la evolución de la eficiencia de la comida, calculada como los gramos de peso del cuerpo/100 kcal de ingesta es similar para los tres grupos. Tampoco hubo diferencias entre los grupos cuando son considerados intervalos de tiempo diferentes o cuando se considera el período de estudio completo.

Composición de ácido graso de plasma

Todos los ácidos grasos tendieron a disminuir a los 8-9 días y luego se incrementaron en el tiempo hasta los 29-30 días de alimentación. Esto es debido posiblemente a la baja ingesta de la fórmula durante la primera semana de estudio debido a la incidencia de diarrea y/o asuntos de adaptación. Con respecto a los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, no hay diferencias significativas

entre los grupos en cada momento. Sin embargo, el grupo C tiene la menor concentración de estos ácidos grasos al final del estudio, asemejando a la composición de la fórmula.

Composición del cerebro

Los contenidos de proteína, ADN y colesterol en el cerebro son medidos como índices de masa de proteína, número de células (ADN) y mielinización (colesterol). No hay diferencias significativas entre grupos en cada momento. Sin embargo, hay algunas evidencias que pueden concluirse a partir de los datos. La cantidad de ADN no incrementó en el cerebro, mientras que la proteína tendió a incrementar, lo que indica que la densidad celular en el cerebro es similar en lechones durante el período de estudio y que la multiplicación celular ocurre como una consecuencia del crecimiento del cerebro. El colesterol incrementó tanto por gramo de tejido como cuando se consideró el cerebro completo, lo que significa que la mielinización toma lugar al menos durante el período de estudio considerado en el diseño experimental.

Con respecto a la composición de ácido graso, no hay diferencias significativas entre grupos para ninguna de las concentraciones de ácidos grasos en cualquier punto de la prueba. Hay algunas tendencias con el tiempo para los grupos de estudio: decrecimiento de 16:0 y 20:4n-6 e incremento de acetatos dimetilo, 18:1n-9, y 18:2n-6.

Las concentraciones totales de gangliósidos y ácido siálico enlazado a lípidos (ASEL), expresada por órgano, no cambió con el tiempo o entre grupos, y se encontró una alta variabilidad especialmente para aquellos gangliósidos a bajas concentraciones. Sin embargo, el contenido total de ASEL y de gangliósidos incrementó con el tiempo para todos los tres grupos. Por lo tanto, ASEL y gangliósidos incrementaron en el cerebro como una función del crecimiento del cerebro y no ocurrió un enriquecimiento por gramo de tejido con el tiempo.

Composición de retina

No hay diferencias significativas en la composición de ácido graso de la retina entre los grupos alimentados. En la retina se encontraron tendencias similares a las del

cerebro con respecto a los porcentajes de ácido graso con el paso del tiempo, excepto que el porcentaje de 22:6n-3 incrementó con el tiempo. Dicho resultado está de acuerdo con el importante papel de éste ácido graso para el desarrollo de la retina.

Con respecto al contenido de ASEL, gangliósidos totales y clases principales de gangliósidos en la retina, no hay diferencias significativas entre grupos a tiempos diferentes o entre tiempos dentro de cada grupo. Lo mismo es cierto para el contenido total de fosfolípidos y clases individuales principales, fosfatidilcolina (FC) y fosfatidiletanolamina (FE). A pesar de la falta de diferencias significativas, aún puede notarse que estos lípidos importantes tienden a incrementar con el tiempo y que el mayor contenido se encuentra en el grupo B luego de una semana de alimentación.

Histología del cerebro

Fueron evaluados la migración neuronal y el desarrollo y maduración del sistema nervioso central. El análisis macroscópico y microscópico de los cerebros no mostró lesiones grotescas (hemorragias, áreas isquémicas, malformaciones o lesiones neoplásicas), y tampoco se encontraron signos de enfermedad.

Las técnicas histológicas de rutina son usadas para cuantificar el número total de células en campos seleccionados del fascículo subcallosal y de la sustancia blanca adyacente. Esta área es seleccionada debido a que los neuroblastos migran y se diferencian a través de varias capas justo detrás del endimio (ver figuras 1.1 y 1.2). El conteo de núcleo se realiza en tres áreas diferentes del fascículo subcallosal (ver figuras 1.2 y 1.3):

Area 1: Area de migración y proliferación adyacente a ventrículos laterales.

Area 2: Area 1 pero evitando agregados de neuroblastos en el endimio (ver figura 1.3)

Area 3: Sustancia blanca anexa al fascículo subcallosal

En el área 1, sin importar el grupo dietario, hay un pico en el número de núcleos a los 8-9 días de alimentación. Este pico es debido principalmente al alto número de núcleos en el grupo B a este tiempo (Figura 2), aunque las diferencias con los otros

grupos no logran ser estadísticamente significantes ($p=0.108$ Vs. Grupo C). Esto es posiblemente debido a la agragación de núcleos teñidos al lado del brode del ventrículo lateral, lo cual incrementa la variabilidad de la medida. Cuando el área de los núcleos agregados es evitada (medidas en el área 2) se obtiene el mismo patrón pero con una variabilidad reducida; por lo tanto, el número de núcleos en el grupo B es mayor que en los otros grupos, siendo significativamente diferente al grupo A. No se encontraron diferencias en el área 3.

Conclusiones

No hay diferencias significativas entre los grupos en ningún momento con respecto al contenido de proteínas, ADN y colesterol en el cerebro. Los incrementos con el tiempo en los contenidos de colesterol y proteínas en el cerebro reflejan los procesos normales de crecimiento del cerebro y la mielinización, respectivamente, lo que toma lugar durante el período de estudio.

La composición de ácido graso de la retina sigue una tendencia similar a la encontrada en el cerebro, sin diferencias significativas entre grupos y curso de tiempo similar de porcentajes de ácido graso, excepto para 22:6n-3, el cual incrementó con el tiempo. No hay diferencias significativas entre grupos en cualquier momento o entre tiempos dentro de cada grupo para el contenido total en retina de ácido siálico enlazado a lípidos, gangliósidos y fosfolípidos, así como para gangliósidos individuales y fosfolípidos. A pesar de la falta de diferencias significativas, es importante puntualizar que un alto contenido de todos estos lípidos es encontrado a los 8-9 días de alimentación del grupo B. En efecto, separando el diseño experimental y desarrollando ANOVA de 1 camino a los 8-9 días entre los grupos A, B y C, son encontradas diferencias significativas para un alto contenido de fosfolípidos y ácidos grasos totales, así como de fosfatidiletanolamina, y de ácidos grasos 20:4n-6 y 22:6n-3 en el grupo B.

En el análisis histológico del cerebro del número de células totales en campos seleccionados del fascículo subcallosal y de la sustancia blanca adyacente, se detectó un área de migración de neuroblastos y un alto número de núcleos para el grupo B. Este efecto transitorio es debido a la alta proporción de migración de neuroblastos a los 8-9 días de alimentación (12-13 días de vida) en animales

alimentados con la dieta B, la cual contiene tanto Lacprodan MFGM-10 así como niveles altos de ácidos araquidónico y docosahexaenoico.

Los resultados descritos en la conclusiones 2 y 3 anteriores sugieren un efecto potencial de la dieta B (que contiene tanto Lacprodan MFGM-10 como niveles altos de los ácidos araquidónico y docosahexaenoico) sobre el desarrollo neural y visual. El hecho de que estos efectos no sean encontrados en el grupo C, el cual también contiene Lacprodan MFGM-10 o en el grupo A que contiene los mismos niveles de ácidos araquidónico y docosahexaenoico, demuestra un efecto sinérgico entre ambos ingredientes (Lacprodan MFGM-10 y ácidos araquidónico y docosahexaenoico) solo cuando los ácidos araquidónico y docosahexaenoico se encuentran al menos en el nivel usado en la dieta B. Esto sugiere un papel causativo de los ingredientes de la dieta B (gangliósidos, fosfolípidos, ácido n-acetilneuramínico y altas concentraciones de los ácidos araquidónico y docosahexaenoico, especialmente gangliósidos y ácido docosahexaenoico) en la migración neural y el crecimiento del exsón.

EXPERIMENTO 2

Un segundo estudio animal es conducido con un protocolo similar al usado en el Experimento 1, excepto que este estudio compara el desarrollo benéfico de los siguientes alimentos:

- Dieta A (grupo A): La fórmula infantil de la presente invención con 0.4% de ácido araquidónico y 0.2% de ácido docosahexaenoico, por peso de ácidos grasos totales y concentrado proteínico de suero enriquecido a un nivel de 6.4 g/L de fórmula sobre una base alimentaria.
- Dieta B (grupo B): Fórmula infantil Similac® Advance®, disponible en Abbott laboratories, Columbus, Ohio, USA (0.4% de ácido araquidónico, 0.15% de ácido docosahexaenoico, por peso de ácidos grasos totales y concentrado proteínico de suero enriquecido).
- Dieta C (grupo C): Fórmula infantil Enfalac® 1 Tailandia, disponible en Bristol-Myers Squibb (Tailandia) (0.65% de ácido araquidónico, 0.35% de

ácido docosahexaenoico, por peso de ácidos grasos totales y concentrado proteínico de suero enriquecido).

- Grupo de control alimentado con leche de cerdo hembra.

Resumen

Los datos del estudio mostraron una significativa proliferación neural a los 14-16 días de edad en lechones neonatales alimentados con leche de cerdo hembra.

Los datos también mostraron que las fórmulas que contienen bajos niveles de concentrados proteínicos de suero enriquecido (6.4 g/L por alimento) son insuficientes para duplicar la migración acelerada de neuroblastos que fue demostrada en el primer estudio (Experimento 1) en los que se usaron niveles altos de concentrado proteínico de suero enriquecido (7.1 g/L por comida).

Diseño experimental

El estudio es longitudinal e incluye tres grupos de lechones alimentados con las dietas experimentales A, B y C (ver tabla 4) con dos puntos de sacrificio luego de 7-8 días y luego de 14-15 días de alimentación. Un grupo adicional de lechones alimentados con leche de cerdo hembra se incluye en el estudio como referencia. Los animales en el grupo alimentado con leche de cerdo hembra son escogidos por edad para coincidir con los tiempos de sacrificio de los animales alimentados con las dietas experimentales. Los animales del grupo alimentado con leche de cerdo hembra son sacrificados al inicio del estudio, luego de 14-16 días de edad, y luego de 23-24 días de edad.

Sesenta lechones domésticos (3-4 días de edad) son suministrados por una granja certificada. Ocho lechones del grupo de referencia de leche de cerdo hembra son sacrificados. Cuarenta y ocho de los lechones son organizados por peso, camada y sexo, y son divididos en tres grupos ($n=16$, $n=16$ y $n=16$, respectivamente). Cuatro de los lechones remanentes son localizados aleatoriamente en los tres grupos (1 al grupo A, 1 al grupo B y 2 al grupo C).

Los lechones son encerrados en jaulas de lambre de acero inoxidable en un cuarto acondicionado a 27 °C. Los animales son alimentados 4 veces al día con una dieta

de cerdo adaptada, de acuerdo con sus requerimientos nutricionales durante un período de tres días. Luego del periodo de tres días de adaptación, los lechones son alimentados cuatro veces al día con una a tres dietas experimentales. El momento en el cual los animales son alimentados por primera vez con la dieta experimental es considerado “el tiempo cero” en el estudio.

Las siguientes tablas muestran la composición de la dieta estándar de cerdo y de las dietas A, B y C:

Tabla 4: Dietas experimentales

	Dieta de cerdo estándar por 100 g	Dieta de cerdo estándar por 100 ml	Dietas A y B por 100 g	Dietas A y B por 100 ml	Dieta C por 100 g	Dieta C por 100 ml
Proteína	25.5	4.79	10.9	1.40	12	1.5
Grasa	36.3	6.82	28.9	3.71	30	3.9
Carbohidratos	31	5.83	55.3	7.1	52	6.7
Cenizas	5.2	0.98	2.9	0.37	3.5	0.45
Minerales						
Na (mg)	201.9	37.96	126	16	147	19
K (mg)	800	150.40	552	71	620	80
Cl (mg)	300	56.40	342	44	390	50
Fe (mg)	32.7	6.15	9.5	1	9.4	1
Zn (mg)	13	2.44	3.94	1	5.8	1
Cu (mg)	0.8	0.15	0.473	0.061	.370	.048
Mg (mg)	61.4	11.54	32	4	47	6
Mn (mg)	0.5	0.09	0.05	0.006	.076	.01
Ca (mg)	1069	200.97	410	53	390	50
P (mg)	792	148.90	221	28	260	33
I (mcg)	61.7	11.60	32	4	79	10
Se (mcg)	20	3.76	12	2	17.3	2
Vitaminas						
Vitamina A (IU)	400	75.20	1577	203	470	60
Vitamina D (IU)	53	9.96	315	41	310	40
Vitamina E (IU)	5	0.94	16	2	9.4	1
Vitamina K (mcg)	21.5	4.04	42	5	50	6
Tiamina (mg)	0.2	0.04	0.53	.07	0.39	.05
Riboflavina (mg)	0.5	0.09	0.79	0.1	0.85	0.1

Piridoxina (mg)	0.317	0.06	0.32	0.04	0.35	0.05
Cianocobalamina (mcg)	3.5	0.66	1.31	0.17	2.1	0.27
Acido pantoténico (mg)	2	0.38	2365	304	3000	386
Acido fólico (mcg)	100	18.80	79	10	84	11
Biotina (mg)	26.5	4.98	23	3	14.7	2
Niacina (mg)	3	0.56	5.5	1	6.3	1
Vitamina C (mg)	71.25	13.40	47	6	120	15
Otros						
Nucleótidos (mg)	-	-	56	7	17	2
Energía	552.7	103.91	525	68	523	67

Tabla 5

	Dieta A	Dieta B	Dieta C
Proteína PSNU 2900 ¹ , g/L por comida	6.4	0	0
Gangliósido mg/L	17.2	4	4.6
Acido siálico mg/L	157	139	248
Acido siálico enlazado a lípidos (% en peso de ácido siálico total)	4.4	1.1	0.6
Fosfolípidos mg/L	440	140	850
Prebióticos g/L	0.8 g/L FOS	0	3.6 (GOS+Inulin)
Acido araquidónico - % en peso de ácidos grasos totales	0.4	0.4	0.65
Acido docosahexaenoico - % en peso de ácidos grasos totales	0.2	0.15	0.35

1. Lacprodan MFGM10, concentrado proteínico de suero enriquecido, Arla Food Ingredients, Dinamarca

Todas las dietas, una vez preparadas, son usadas inmediatamente o son almacenadas en latas con atmósfera inerte a 4 oC y usadas dentro de 24 horas. Las dietas están en forma de polvo y son reconstituídas con agua a 12.85% en peso para lad dietas A, B y C. Las dietas líquidas reconstituídas son vertidas en los alimentadores de las jaulas. El líquido remanente es removido y medido y los alimentadores son limpiados antes de la alimentación siguiente.

Para cada grupo, 8 lechones son sacrificados a los 7-8 y a los 14-15 días luego de haber iniciado la alimentación con control (dietas B y C) o fórmulas experimentales (dieta A).

Resultados

Abandonos

Cuatro lechones de cada grupo murieron. Tres de los lechones en el grupo A y uno de los lechones en el grupo B murieron durante el período de adaptación. Un lechón del grupo B fue excluido del estudio debido a que el lechón era muy pequeño y no creció como el resto de los lechones.

Consecuentemente, a los 7-8 días, n para el grupo A es 7, n para el grupo B es 8 y n para el grupo C es ocho. A los 14-15 días, n para el grupo A es 6, n para el grupo B es 4 y n para el grupo C es 6.

Peso corporal e ingesta dietaria

La evolución del peso corporal y la ingesta dietaria es muy similar para los 3 grupos dietarios diferentes. No hay diferencias en la evolución del peso corporal entre los grupos durante la evolución del experimento. No hay diferencias entre los grupos cuando la ingesta es representada como la ingesta dietaria acumulada. La evolución de la eficiencia de comida, calculada como gramos de peso corporal/100 kcal de ingesta, es mayor pero no significativamente diferente en el grupo C con respecto a los grupos A y B, únicamente para el intervalo de tiempo entre 7 y 14 días. Una alta variabilidad es observada para el intervalo de tiempo entre 0 y 6 días, pero no hay diferencias entre grupos.

Histología del cerebro

Técnicas histológicas de rutina son usadas para cuantificar el número total de células en campos seleccionados del fascículo subcallosal y de la sustancia blanca adyacente.

No hay diferencias significativas entre grupos en cualquier momento en la substancia blanca adyacente al fascículo subcallosal (figura 3.2, figura 4.1 y figura 4.3). No hay diferencias significativas entre grupos en cualquier momento en el número de células teñidas con H & E en el fascículo subcallosal (figura 3.1). Sin embargo, hay una alta cantidad de células BrdU y Ki67 teñidas en el fascículo subcallosal (figura 3.3 y figura 4.2) a los 14-16 días de edad, en el grupo alimentado con leche de cerdo hembra. La diferencia entre el grupo alimentado con leche de cerdo hembra y el grupo B es significativamente diferente para las células BrdU positivas.

Conclusiones

Los datos de los experimentos 1 y 2 sugieren una relación sinérgica entre ciertas combinaciones de concentrado proteínico de suero enriquecido, ácido docosahexaenoico y ácido araquidónico, especialmente basados en las siguientes observaciones:

El experimento 1 muestra que las fórmulas infantiles (dieta B) con concentrado proteínico de suero enriquecido (7.1 g/L como alimento), ácido docosahexaenoico (0.15%) y ácido araquidónico (0.4%) aceleran la migración de neuroblastos.

El experimento 1 muestra que las fórmulas infantiles (dieta C) con concentrado proteínico de suero enriquecido (7.1 g/L como alimento), y bajas concentraciones de ácido docosahexaenoico (0.1%) y ácido araquidónico (0.2%) no aceleran la migración de neuroblastos.

El experimento 2 muestra que las fórmulas infantiles (dieta A) con ácido docosahexaenoico (0.2%), ácido araquidónico (0.4%) y bajos niveles de concentrado proteínico de suero enriquecido (6.4 g/L como alimento) no aceleran la migración de neuroblastos.

El experimento 2 también muestra que las fórmulas infantiles (dieta B) con ácido docosahexaenoico (0.15%), ácido araquidónico (0.4%) pero sin concentrado proteínico de suero enriquecido no aceleran la migración de neuroblastos.

Por lo tanto, los resultados de ambos experimentos muestran que ciertas combinaciones de concentrado proteínico de suero enriquecido, ácido docosahexaénoico y ácido araquidónico generan la migración acelerada de neuroblastos, con la provisión de que sus respectivas concentraciones en la fórmula exceden los niveles umbrales definidos en la presente invención. Por el contrario, estos experimentos también muestran que dichos componentes, ADH/AAR y concentrados proteínicos de suero enriquecido, son inefectivos para los parámetros probados cuando son usados individualmente.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos representan realizaciones específicas dentro del alcance de la presente invención, cada uno de los cuales es dado únicamente con el propósito de ilustración y no pueden ser constituidos como una limitación de la presente invención, así como muchas variaciones de los mismos son posibles sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Todas las cantidades ejemplificadas son porcentajes en peso basadas en el peso total de la composición, a menos de que se especifique otra cosa.

Fórmulas infantiles en polvo

Las siguientes son realizaciones de fórmula en polvo de la presente invención, incluyendo los métodos de uso de las fórmulas en infantes. Los ingredientes de cada fórmula son listados en la siguiente tabla .

Tabla 6: Ejemplos 1-4

INGREDIENTE	CANTIDAD POR 1000 KG DE FÓRMULA			
	EJEMPLO 1	EJEMPLO 2	EJEMPLO 3	EJEMPLO 4
	AA 0.4% ADH 0.2% 1	AA 0.4% ADH 0.15% 1	AA 0.2% ADH 0.1% 1	AA 0.4% ADH 0.2% 1
LACTOSA	428.76	428.76	428.76	525.02
LECHE SECA SIN GRASA CALOR BAJO	199.62	197.62	197.62	N/A
ACEITE DE GIRASOL ALTO EN OLEICO	106.53	106.53	106.53	102.97
ACEITE DE COCO	90.74	91.09	92.87	87.57
ACEITE DE SOYA	86.37	86.37	86.37	83.49
LACPRODAM MFGM-10	51.00	53.96	53.96	154.18
CITRATO DE POTASIO	7.20	7.20	7.20	7.20
OLIGOFRUCTOSA	7.04	7.04	7.04	7.04

(FRUCTOOLIGOSACARIDO)				
CARBONATO DE CALCIO	4.018	4.02	4.02	9.563
ACIDO ARAQUIDONICO (AA)	2.87	2.87	1.44	2.87
CLORURO DE POTASIO	1.614	1.61	1.61	1.717
ACIDO DOCOSAHEXAENOICO (ADH)	1.40	1.05	0.70	1.40
CLORURO DE SODIO	1.303	1.30	1.30	3.280
CLORURO DE COLINA	1.04	1.04	1.04	1.04
ACIDO ASCORBIDO	766.88	766.88	766.88	766.88
VITAMINA PREMIX 25913	746.460	746.46	746.46	746.460
CLORURO DE MAGNESIO	641.63	641.63	641.63	2.18
SULFATO FERROSO	511.98	511.98	511.98	508.79
TAURINA	373.84	373.84	373.84	373.84
ASCORBIL PALMITATO	349.22	349.22	349.22	349.22
VITAMINA A, D, RRR-E, K PREMIX	345.00	345.00	345.00	345.00
M-INOSITOL	254.64	254.64	254.64	254.64
CITIDINA 5'-MONOFOSFATO	243.188	243.19	243.19	243.188
URIDINA 5'-MONOF. DISODICA .25%	192.286	192.29	192.29	192.286
GUANOSINA 5'-MONOF. DISODICA	175.452	175.45	175.45	175.452
ANTIOXIDANTE GRADO COMIDA				
TOCOFEROL-2	166.37	166.37	166.37	166.37
SULFATO DE ZINC	165.70	165.70	165.70	206.02
ADENOSINA 5'-MONOFOSFATO	92.043	92.04	92.04	92.043
SULFATO DE COBRE ENCAPSULADO	26.136	26.14	26.14	27.691
BETACAROTENO 30%	11.64	11.64	11.64	11.64
FOSFATO TRICALCICO	3.000	3.00	3.00	3.000
SULFATO DE MANGANESO	1.00	1.00	1.00	1.00
SELENATO DE SODIO	232.03	232.03	232.03	232.03

AA y ADH – Porcentaje por peso de ácidos grasos totales en la fórmula

Cada uno de los ejemplos puede prepararse de manera similar al hacer al menos dos papillas separadas que finalmente son mezcladas, tratadas mediante calor, estandarizadas, evaporadas, secadas y empacadas.

Inicialmente, en un tanque de mezcla de aceite, bajo condiciones de nitrógeno, una papilla de aceite es preparada mediante la combinación de aceite de girasol alto en oleico, aceite de soya y aceite de coco, seguido por la adición de ascorbil palmitato, betacaroteno, vitamina ADEK y tocoferoles mezclados. El tanque es posteriormente agitado durante 20 minutos y se realiza el análisis QA. Luego del despeje QA e inmediatamente antes del procesamiento, se adicionan el aceite ARA y el aceite DHA al tanque de mezcla de aceite. La papilla de aceite obtenida se mantiene bajo

agitación moderada a temperatura ambiente ($<30^{\circ}\text{C}$) hasta que se mezcla con las otras papillas preparadas.

La papilla leche descremada-aceite se prepara por combinación de la papilla mezclada de aceite a aproximadamente 40% del fluido de la leche descremada a $35-45^{\circ}\text{C}$ en un proceso de agitación continua seguido de la adición de un concentrado proteínico de suero enriquecido. Esta papilla de aceite – proteína se calienta a $65 - 70^{\circ}\text{C}$, dos etapas homogenizadas a $154 - 190/25-45$ bares, enfriadas a $3 - 6^{\circ}\text{C}$ y almacenadas en el proceso de silo.

La papilla de carbohidratos de leche descremada se prepara al disolver lactosa y polvo de leche descremada en aproximadamente 60% del fluido de la leche descremada a $60 - 75^{\circ}\text{C}$. Esta papilla se tiene bajo agitación en el tanque de solubilización por aproximadamente 2 minutos antes del bombeo a la placa intercambiadora donde se enfría a $3-6^{\circ}\text{C}$ y transportado al proceso de silo donde se mezcla con la papilla leche – aceite descremada.

La papilla mineral 1 se prepara por disolución de cloruro de magnesio, cloruro de sodio, cloruro de potasio y citrato de potasio en agua a $40-60^{\circ}\text{C}$ y puesta bajo agitación por un mínimo de 5 minutos. La papilla mineral 1 es adicionada al proceso de silo.

La papilla mineral 2 se prepara por disolución de fosfato tricalcico y carbonato de calcio en agua a $40-60^{\circ}\text{C}$ y puesta bajo agitación por un mínimo de 5 minutos. La papilla mineral 2 es adicionada al proceso de silo.

La papilla de oligofructosa se prepara por disolución de oligofructosa en agua a $40-60^{\circ}\text{C}$ y puesta bajo agitación por un mínimo de 5 minutos. La papilla de oligofructosa es adicionada al proceso de silo.

El lote es agitado en el proceso de silo por un mínimo de 45 minutos antes de tomar una muestra para pruebas analíticas. Basados en los resultados analíticos de las pruebas de control de calidad, se lleva a cabo un proceso de estandarización apropiado.

La papilla de vitamina C se prepara por disolución de citrato de potasio y ácido ascórbico en agua a 40-60 °C y puesta bajo agitación por un mínimo de 5 minutos. La papilla de vitamina C es adicionada al proceso de silo.

La papilla vitaminas solubles en agua–inositol se prepara por disolución de citrato de potasio, premix de vitaminas solubles en agua e inositol en agua a 40-60 °C y puesta bajo agitación por un mínimo de 5 minutos. La papilla vitaminas – inositol soluble en agua es adicionada al proceso de silo.

La papilla de sulfato ferroso se prepara por disolución de citrato de potasio y sulfato ferroso en agua a temperatura ambiente y puesta bajo agitación por un mínimo de 5 minutos.

La papilla nucleótidos-colina se prepara por disolución premix nucleotido - colina en agua a temperatura ambiente y puesta bajo agitación por un mínimo de 5 minutos. La papilla nucleótidos-colina es adicionada al proceso de silo.

El lote final se agita en el proceso de silo por un mínimo de 60 minutos antes de tomar una muestra para ensayos analíticos. Basados en los resultados analíticos de las pruebas de control de calidad, una corrección apropiada de pH y vitamina C puede llevarse a cabo. El lote final es puesto bajo agitación moderada a 3-6°C.

Tras una espera por un periodo no mayor a 7 días, la mezcla resultante es precalentada a 90-96 °C, calentada a 110-130 °C por tres segundos. La mezcla calentada se pasa a través de un refrigerador flash para reducir la temperatura a 93-97 °C y luego a través de un evaporador para alcanzar los sólidos deseados. El producto se calienta luego a 75-78 °C y se bombea a la torre spray-de secado. El producto en polvo resultante es recogido y almacenado en silos de polvo y sometido a pruebas de calidad. El producto terminado es colocado en contenedores apropiados. Se toma muestras para pruebas analíticas y microbiológicas, ambas durante el proceso (in-process) y en las etapas de producto terminado.

Procesos Alternativos

Cada uno de los ejemplificados puede ser preparado de forma similar haciendo al menos dos papillas separadas que son mezcladas luego, tratadas con calentamiento, estandarizadas, secadas, mezcladas en seco y empacadas.

Inicialmente, la papilla mineral-leche descremada se prepara por disolución de aproximadamente 80% de polvo de leche descremada en agua desmineralizada a 60-65 °C, seguida de la adición de citrato de potasio e hidróxido de potasio. El pH de la mezcla resultante se ajusta a 7.7 – 8.7 con hidróxido de potasio o ácido cítrico.

El resto del polvo de leche descremada y cloruro de magnesio se adicionan a la mezcla previamente. El pH de la mezcla resultante se ajusta a 6.7 – 7.2 con hidróxido de potasio o ácido cítrico.

En un tanque separado se prepara una nueva papilla por disolución de cloruro de colina e inositol en agua desmineralizada a temperatura ambiente. La papilla resultante se combina con la papilla mineral – leche descremada y es puesta bajo agitación moderada a 60 – 65 °C por un tiempo no mayor a una hora y es mezclada luego con los ingredientes adicionales.

En un tanque separado se prepara una nueva papilla por disolución de Taurina en agua desmineralizada a 70 °C. La papilla resultante se combina con la papilla mineral – leche descremada y es puesta bajo agitación moderada a 60 – 65 °C por un tiempo no mayor a una hora hasta que es mezclada mas tarde con los ingredientes adicionales.

Un concentrado proteínico de suero enriquecido se adiciona a la papilla mineral - leche descremada seguida por lactosa y oligofructosa. La papilla se agita en el proceso de silo por mínimo 30 minutos antes de tomar una muestra para prueba analítica. El pH de la mezcla resultante se ajusta a 6.7 – 7.1 con hidróxido de potasio o ácido cítrico.

En un tanque de proceso de aceite, bajo condiciones de Nitrógeno, una papilla de aceite se prepara por combinación de aceite de girasol oleico alto, aceite de coco y de soja, seguido por la adición de vitamina ADEK, beta caroteno, mezcla de tocoferoles, palmitato de ascorbilo, aceite de ARA y aceite de DHA. La papilla de

aceite resultante es puesta bajo agitación moderada a temperatura ambiente por un tiempo no mayor a seis horas hasta ser mezclado después con la papilla proteína-carbohidrato-mineral.

Tras una espera por un periodo no menor a 30 minutos, ni mayor a 6 horas, con la papilla proteína-carbohidrato-mineral es precalentada a 70-80 °C y calentada a 84 – 86 °C. En éste punto del proceso la papilla de aceite se inyecta sobre una línea a 50 – 80 °C. La mezcla final se enfría a 68 – 72 °C y se emulsifica a través de un homogeneizador de etapa doble a 145 – 155 bares en la primera etapa y a 30 – 40 bares en la segunda etapa. La mezcla calentada se pasa a través de una placa enfriadora para reducir la temperatura a 3-5 °C y se almacena en un proceso silo.

Una solución mineral y una solución de ácido ascórbico se preparan separadamente por adición de los siguientes ingredientes al mezclado procesado. La solución mineral se prepara por la adición de los siguientes ingredientes a suficiente cantidad de agua desmineralizada con agitación: ácido cítrico, sulfato de manganeso, selenato de sodio y sulfato de zinc.

La solución de ácido ascórbico se prepara por la adición de ácido ascórbico a suficiente cantidad de agua desmineralizada para disolver los ingredientes. La mezcla procesada es puesta bajo agitación moderada a 3 – 5°C por un tiempo no mayor a 48 horas. Se toman muestras para pruebas analíticas.

La mezcla enfriada se calienta a 69 – 73 °C y se homogeniza a 60 – 70/30-40 bares y se envía a la torre de secado de spray. La base en polvo del producto se recoge y almacena en contenedores de polvo. Se toman muestra para pruebas microbiológicas y analíticas.

Después de que se completan las correspondientes pruebas microbiológicas y analíticas. La base en polvo del producto se libera para el mezclado en seco del resto de los ingredientes. Las cantidades de los ingredientes remanentes requeridos para obtener el producto en polvo final se determinan y entran en el sistema de peso automático.

El sistema pesa todos los componentes del premix mezclado seco (Lactosa, carbonato de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, premix soluble en agua, nucleótido de citidina 5-monofosfato, nucleótido de adenosina 5-monofosfato, sulfato de cobre y fosfato tribásico de calcio. La base en polvo del producto y la

mezcla premix seca es transportada a la licuadora. La mezcla se deja bajo agitación por un período no menos a 20 minutos.

Después de que la mezcla se completa, el producto terminado se transporta a la máquina de empaque y se coloca en contenedores apropiados. Se toman muestra para pruebas microbiológicas y analíticas.

Las fórmulas ejemplificadas (Ejemplos 1-4) no están limitadas a los ejemplos de realizaciones de fórmulas en polvo de la presente invención. Cada fórmula es reconstituida con agua antes de usar una densidad calórica que va desde alrededor de 19 a alrededor de 24 kcal/oz y luego de alimentar a los infantes como única fuente de nutrición durante los primeros 4 meses de vida, incluyendo los primeros 2 meses de vida. Las fórmulas ayudan a acelerar la migración neural, el desarrollo del cerebro y el desarrollo cognitivo en los infantes.

Fórmulas Infantiles Líquidas

Los ejemplos 1-4 son modificados por medios convencionales para formar realizaciones de fórmula líquida lista para consumir (ejemplos 5 – 8) de la presente invención. Los ingredientes para los ejemplos 5 -8 corresponden a los ingredientes en los ejemplos 1 – 4, respectivamente.

Las fórmulas ejemplificadas (Ejemplos 5 – 8) no están limitando los ejemplos de realizaciones de fórmulas líquidas de la presente invención. Cada fórmula se ajusta a una densidad calórica que va de alrededor de 19 a alrededor de 24 kcal/oz. La fórmula completa es proporcionada a un infante como única fuente de nutrición durante los primeros 4 meses de vida, incluyendo los primeros 2 meses de vida. Las fórmulas ayudan a acelerar la migración neural, el desarrollo del cerebro y el desarrollo cognitivo en los infantes.

REIVINDICACIONES

Lo que se reivindica es:

1. Una fórmula infantil que comprende:
 - A. Al menos alrededor de 6.5 g/L, sobre una base alimentaria, de un concentrado proteínico de suero enriquecido,
 - B. Al menos alrededor de 0.13% de ácido docosahexaenoico por peso de ácidos grasos totales, y,
 - C. Al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico por peso de ácidos grasos totales.
2. La fórmula infantil de la reivindicación 1, en donde la fórmula incluye al menos alrededor de 5 mg/L de gangliósidos, al menos alrededor de 150 mg/L de fosfolípidos, y al menos alrededor de 70 mg/L de ácido siálico total con al menos alrededor de 2.5% en peso del ácido siálico como ácido siálico enlazado a lípidos.
3. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 2, en donde entre alrededor del 50% y el 100% en peso de la combinación de gangliósidos, fosfolípidos y ácido siálico proviene de un concentrado proteínico de suero enriquecido.
4. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el ácido siálico enlazado a lípidos representa entre alrededor del 2.7% y alrededor del 5% en peso del ácido siálico total.
5. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende, sobre una base alimentaria: (A) entre alrededor de 7 mg/L y alrededor de 50 mg/L de gangliósidos, (B) entre alrededor de 200 mg/L y alrededor de 600 mg/L de fosfolípidos, y (C) entre alrededor de 90 mg/L y alrededor de 250 mg/L de ácido siálico.
6. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende, por peso de ácidos grasos totales, entre alrededor de 0.4% y alrededor de 2.0% de

ácido araquidónico y entre alrededor de 0.15% y alrededor de 1.0% de ácido docosahexaenoico.

7. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 2, en donde los fosfolípidos totales comprenden al menos 20% en peso de esfingomielina.

8. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 7, en donde los fosfolípidos comprenden esfingomielina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil colina, fosfatidil inositol y fosfatidil serina.

9. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la fórmula contiene menos que alrededor de 0.5% en peso de glicomacropéptidos libres, sobre una base alimentaria.

10. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la fórmula infantil está substancialmente libre de fosfolípidos de soya, fosfolípidos de huevo y combinaciones de los mismos.

11. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 2, en donde la fórmula contiene menos que alrededor de 0.2% en peso de grasa de leche.

12. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fórmula infantil es un polvo.

13. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la fórmula infantil es un líquido listo para consumir.

14. Una fórmula infantil de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende, sobre una base alimentaria, al menos alrededor de 190 mg/L de ácido siálico total con al menos alrededor de 2.5% en peso del ácido siálico como ácido siálico enlazado a lípidos.

15. Un método de aceleramiento del desarrollo del cerebro en un infante, que comprende:

A. Preparar una fórmula infantil que comprende

- i. Al menos alrededor de 6.5 g/L, sobre una base alimentaria, de un concentrado proteínico de suero enriquecido,
 - ii. Al menos alrededor de 0.13% de ácido docosaheptaenoico por peso de ácidos grasos totales, y,
 - iii. Al menos alrededor de 0.25% de ácido araquidónico por peso de ácidos grasos totales; y entonces,
 - B. Administrar o instruir a un cuidador para administrar la fórmula a un infante durante los primeros dos meses de vida.
16. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la fórmula infantil incluye, sobre una base alimentaria:
- A. Al menos alrededor de 5 mg/L de gangliósidos,
 - B. Al menos alrededor de 150 mg/L de fosfolípidos, y
 - C. Al menos alrededor de 70 mg/L de ácido siálico total con al menos alrededor de 2.5% en peso de ácido siálico como ácido siálico enlazado a lípidos.
17. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la fórmula es administrada durante los primeros 4 meses de vida.
18. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde entre alrededor del 50% y el 100% en peso de la combinación de gangliósidos, fosfolípidos y ácido siálico proviene de un concentrado proteínico de suero enriquecido.
19. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el ácido siálico enlazado a lípidos representa entre alrededor del 2.7% y alrededor del 5% en peso del ácido siálico total.
20. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la fórmula infantil incluye, sobre una base alimentaria: (A) entre alrededor de 7 mg/L y alrededor de 50 mg/L de gangliósidos, (B) entre alrededor de 200 mg/L y alrededor de 600 mg/L de fosfolípidos, y (C) entre alrededor de 90 mg/L y alrededor de 250 mg/L de ácido siálico.
21. Un método de acuerdo con la reivindicación 15, en donde la fórmula comprende, por peso de ácidos grasos totales, entre alrededor de 0.4% y alrededor

de 2.0% de ácido araquidónico y entre alrededor de 0.15% y alrededor de 1.0% de ácido docosahexaenoico.

22. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde los fosfolípidos totales comprenden al menos 20% en peso de esfingomielina.

23. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde los fosfolípidos comprenden esfingomielina, fosfatidil etanolamina, fosfatidil colina, fosfatidil inositol y fosfatidil serina.

24. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la fórmula contiene menos que alrededor de 0.2% en peso de grasa de leche.

25. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la fórmula contiene menos que alrededor de 0.5% en peso de glicomacropéptidos libres.

26. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la fórmula infantil está substancialmente libre de fosfolípidos de soya y fosfolípidos de huevo.

27. Un método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la fórmula infantil incluye, sobre una base alimentaria, al menos alrededor de 190 mg/L de ácido siálico total con al menos alrededor de 2.5% en peso del ácido siálico como ácido siálico enlazado a lípidos.

28. Un método de aceleramiento de la migración neural en un infante, el cual comprende la administración o la instrucción a un cuidador para administrar como una fuente única de nutrición la fórmula infantil de la reivindicación 1 a un infante durante los primeros 4 meses de vida.

29. Un método de aceleramiento del desarrollo de la visión en un infante, el cual comprende la administración o la instrucción a un cuidador para administrar como una fuente única de nutrición la fórmula infantil de la reivindicación 1 a un infante durante los primeros 4 meses de vida.

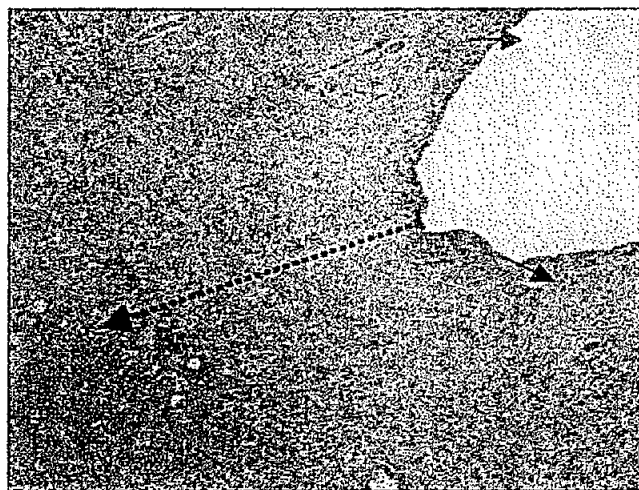
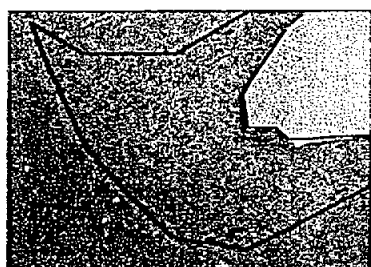
30. Un método de aceleramiento del desarrollo cognitivo en un infante, el cual comprende la administración o la instrucción a un cuidador para administrar como

una fuente única de nutrición la fórmula infantil de la reivindicación 1 a un infante durante los primeros 4 meses de vida.

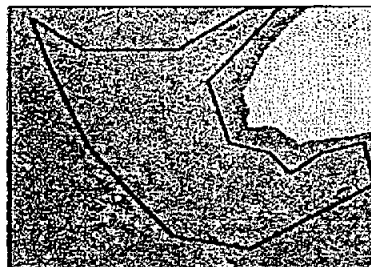
A 2.00mm



Fig. 1.1 Sección de cerebro de cerdo

Fig. 1.2 Sección de cerebro de cerdo
magnificada

Area 1



Area 2



Area 3

Fig. 1.3. Secciones de cerebro de cerdo magnificadas para conteo de núcleos. Area 1: Area de Fascículo subcallosal, migración de neuroblastos y proliferación. Area 2: Area de migración evitando agregados de neuroblastos. Area 3: Substancia blanca contigua al fascículo subcallosal.

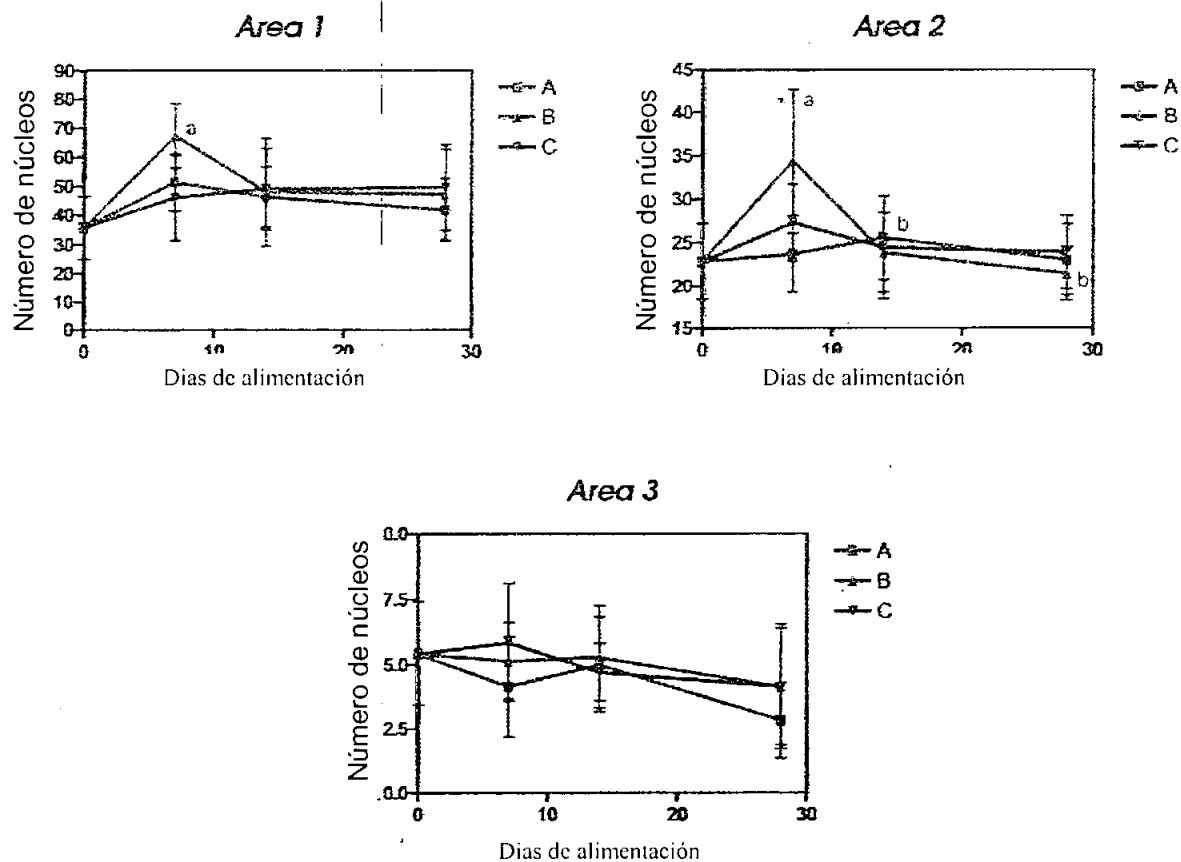


Fig. 2. Número de núcleos en las áreas 1, 2 y 3 del fascículo subcallosal en lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) durante el período de estudio. Los datos son la media $\pm$ DE. A: significativamente diferente del tiempo inicial a $p < 0.05$; B: significativamente diferente de 8-9 d a $p < 0.05$; *: significativamente diferente de la dieta A a $p < 0.05$.

Figure 3.1

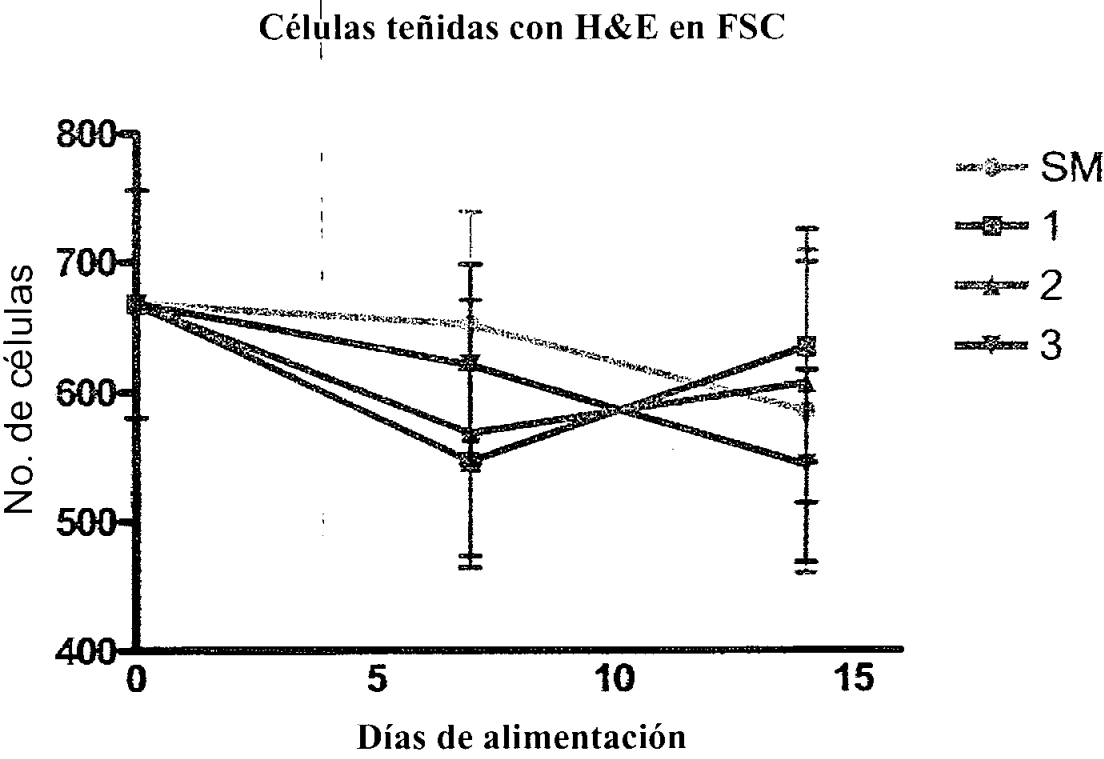


Figura 3.1. Número de núcleos teñidos con H&E en el fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra.

150

Figura 3.2

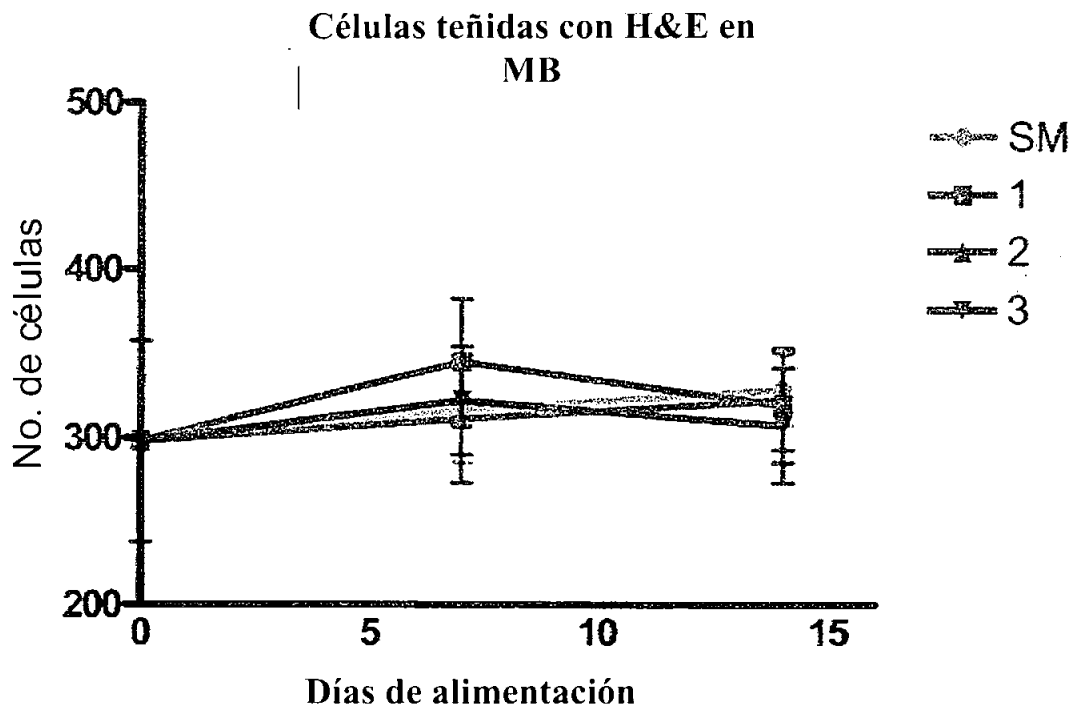


Figura 3.2. Número de núcleos teñidos con H&E en la sustancia blanca adyacente al fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra

121

Figura 3.3

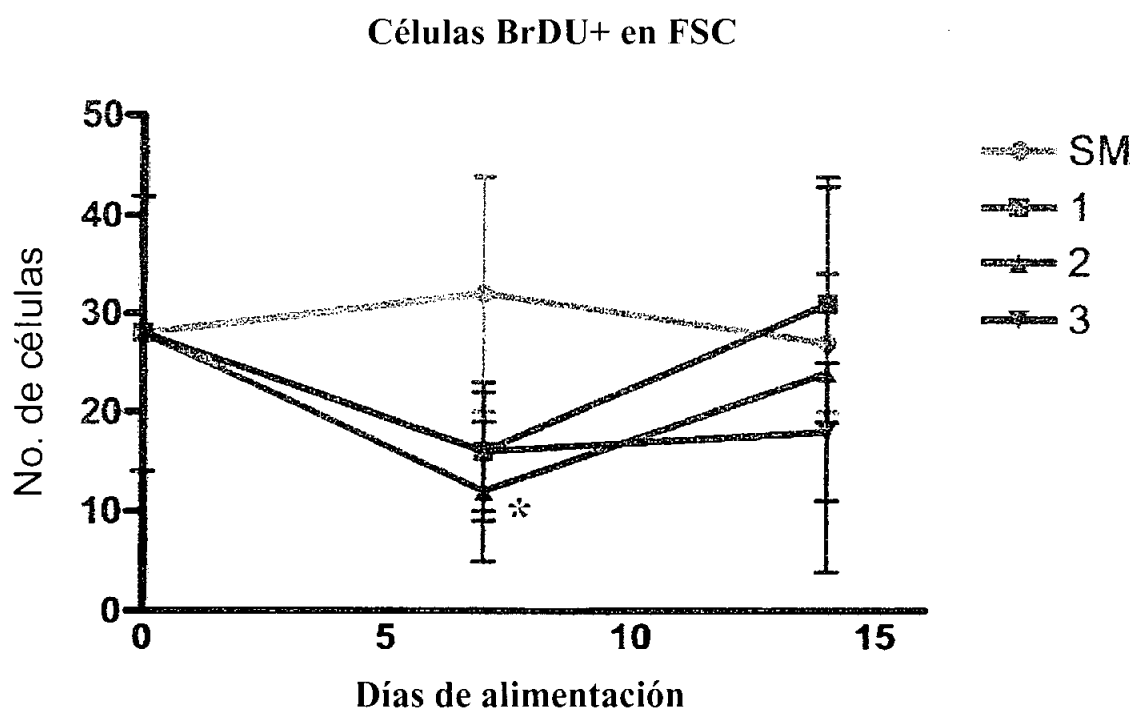


Figura 3.3. Número de células positivas de BrdU en el fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra

Figura 4.1

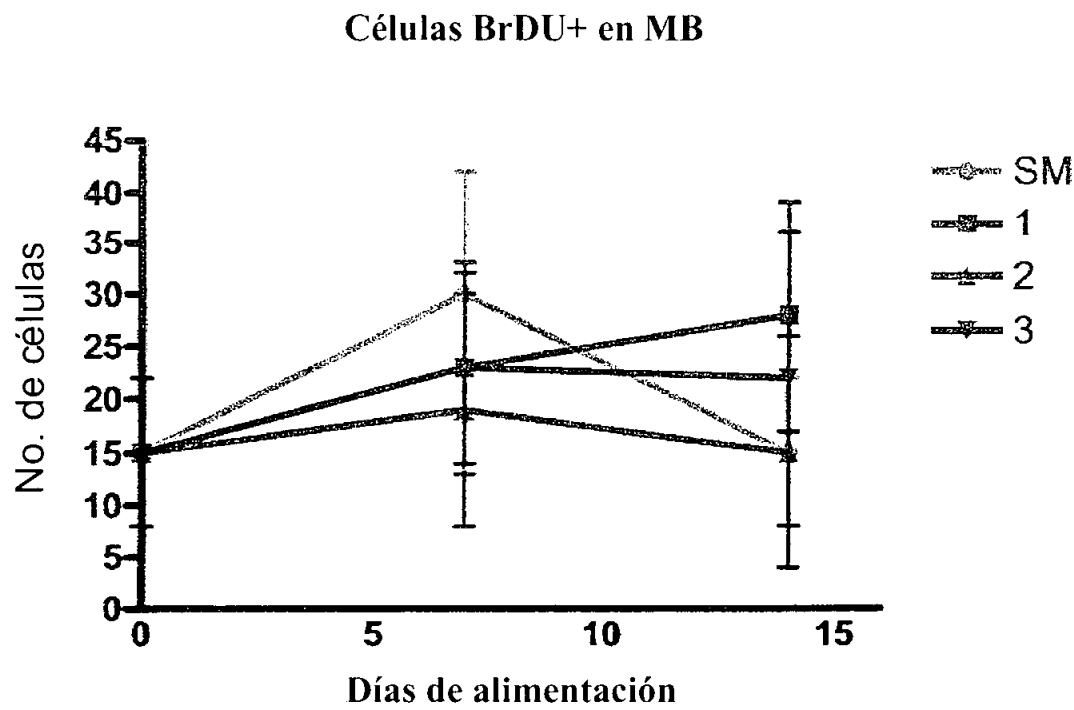


Figura 4.1. Número de células positivas de BrdU en la sustancia blanca adyacente al fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra

Figura 4.2

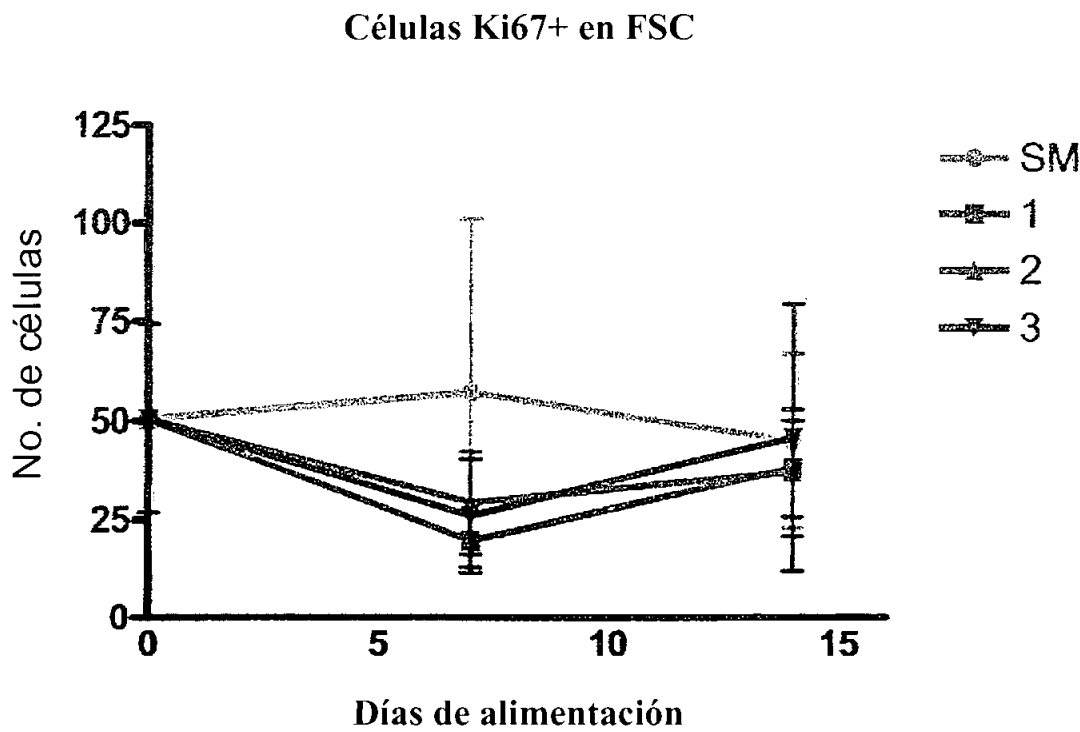


Figura 4.2. Número de células positivas de Ki67 en el fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra

Figura 4.3

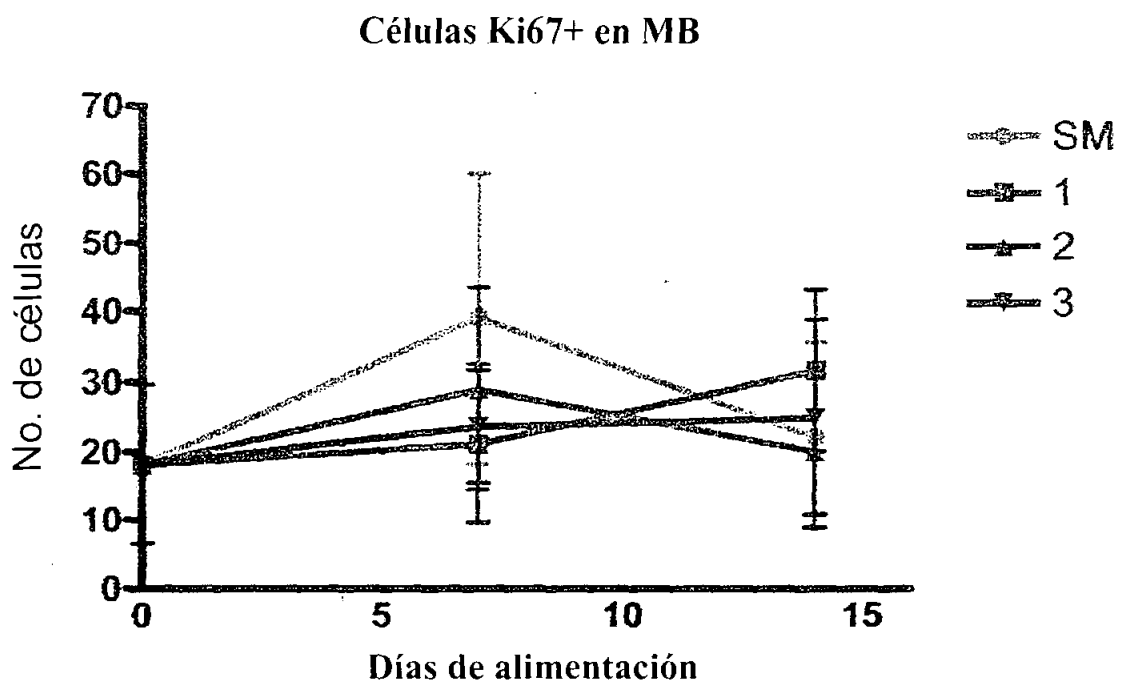


Figura 4.3. Número de células positivas de Ki67 en la sustancia blanca adyacente al fascículo subcallosal de lechones alimentados con dietas diferentes (A, B, C) o con leche de cerdo hembra