



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108366608 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201680072955.5

(22)申请日 2016.12.13

(30)优先权数据

15199757.4 2015.12.14 EP

62/315,238 2016.03.30 US

62/315,295 2016.03.30 US

62/328,068 2016.04.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.06.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2016/080780 2016.12.13

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/102719 EN 2017.06.22

(71)申请人 雀巢产品技术援助有限公司

地址 瑞士沃韦

(72)发明人 N·施耐德 S·迪奥尼

T·巴尔特福伊

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 贾士聪 黄革生

(51)Int.Cl.

A23L 33/16(2006.01)

A23L 33/105(2006.01)

A23L 33/15(2006.01)

A23L 33/12(2006.01)

A61P 25/00(2006.01)

A23L 33/00(2006.01)

A61K 45/00(2006.01)

权利要求书1页 说明书36页 附图39页

(54)发明名称

促进大脑髓鞘形成的营养组合物和婴儿配方食品

(57)摘要

本发明涉及一种用于婴儿和幼儿的营养组合物,诸如婴儿配方食品或较大婴儿配方食品或成长奶,优选婴儿配方食品,并且包含矿物质或其混合物。所述矿物质可促进和/或支持大脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于仅用人类母乳(HBM)喂养的婴儿中所观察到的轨迹。所述婴儿或幼儿的年龄可介于0和60个月之间,优选介于0和12个月之间。

1. 一种用于婴儿和/或幼儿的营养组合物,所述组合物包含矿物质或其混合物,用于促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述脑中的最佳髓鞘形成轨迹接近于在出生后早期几个月中仅用人类母乳喂养的婴儿中所观察到的髓鞘形成轨迹。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的组合物,其中所述组合物促进和/或支持通过最佳的脑和认知功能发育和/或防止神经认知缺陷所表征的健康状态。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的组合物,所述组合物包含高于5mg/100g的量的铁、和/或高于0.08mg/100g的量的锌、和/或高于0.2mg/100g的量的镁、和/或高于0.84mg/100g的量的钙、和/或高于0.2mg/100g的量的镁、和/或高于1.7mg/100g的量的磷。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的组合物,所述组合物还包含鞘磷脂。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的组合物,所述组合物还包含DHA。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的组合物,所述组合物还包含叶酸。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的组合物,其中所述组合物还包含胆碱。

9. 权利要求1至8中任一项所述的组合物用于促进和/或支持婴儿或幼儿脑中的最佳髓鞘形成轨迹的用途。

10. 权利要求1至8中任一项所述的组合物用于防止婴儿或幼儿脑中未达最佳的髓鞘形成轨迹的用途。

11. 用于促进和/或支持婴儿和/或幼儿脑中的最佳髓鞘形成轨迹的方法,所述方法包括给所述婴儿和/或幼儿施用包含铁的营养组合物。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中将权利要求1至8中任一项所述的组合物施用给婴儿和/或幼儿。

13. 一种营养组合物,所述组合物包含:

高于200mg/kg的量的鞘磷脂;

高于5mg/100g的量的铁;和/或高于0.08mg/100g的量的锌;和/或

高于0.2mg/100g的量的镁;和/或高于0.84mg/100g的量的钙;和/或

高于1.7mg/100g的量的磷;

高于30mg/100g的量的胆碱;

高于30mg/100g的量的DHA;

高于50mcg/100g的量的叶酸。

14. 一种营养组合物,所述组合物包含:

在200mg/kg至2g/kg范围内的量的鞘磷脂;

在5mg/100g至40mg/100g范围内的量的铁;和/或在0.5mg/100g至8mg/100g范围内的量的锌;和/或在0.35mg/100g至90mg/100g范围内的量的镁;和/或在84mg/100g至760mg/100g范围内的量的钙;和/或在17mg/100g至516mg/100g范围内的量的磷;

在30mg/100g至1000mg/100g范围内的量的胆碱;

在30mg/100g至300mg/100g范围内的量的DHA;

在50mcg/100g至500mcg/100g范围内的量的叶酸。

## 促进大脑髓鞘形成的营养组合物和婴儿配方食品

### 技术领域

[0001] 本发明涉及用于婴儿和幼儿的营养组合物及其相关的健康有益效果。特别地,本发明涉及包含矿物质或其混合物的营养组合物,该营养组合物用于促进或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于在出生后前几个月仅用人类母乳(HBM)喂养的婴儿中所观察到的轨迹。

### 背景技术

[0002] 每当母亲不能母乳喂养其婴儿时,婴儿配方食品可为使用人类母乳的天然喂养提供合适的替代方案。用于婴儿和幼儿的营养组合物通常作为用水重构的散剂或在某些情况下作为即饮型或浓缩液体组合物出售。这些组合物旨在覆盖婴儿或幼儿的大部分或所有营养需要。

[0003] 然而,已经知道人类母乳代表婴儿的营养方面终极的黄金标准。婴儿配方食品制造商已作出许多尝试来产生接近或类似于人类母乳的益处的营养健康影响。

[0004] 建议所有婴儿采用母亲的乳汁喂养。然而,在一些情况下,由于某些医学原因,母乳喂养不足或不可能或不成功,或者母亲不选择母乳喂养。已针对这些情况研发了婴儿配方食品。

[0005] 然而在许多实例中,研究表明,与人类母乳相比,婴儿配方食品不会对身体产生相同的影响。

[0006] 例如,用婴儿配方食品喂养的婴儿和喂食人类母乳(HBM)的婴儿可表现出髓鞘形成轨迹不同。髓鞘形成通常从产前开始在脑中发生,并在产后继续发生直至成年早期。

[0007] 髓鞘形成是神经发育的基本过程,其包括由脂肪髓鞘将轴突装入鞘中,脂肪髓鞘有利于动作电位传递。髓鞘形成已被认为在脑细胞和网络之间的协调通信中起关键作用。有髓鞘的白物质随认知和学习能力一同成熟。

[0008] 婴儿期和幼儿期,特别是从出生后前几个星期到2至5岁,都是大脑髓鞘形成的敏感时期,取决于大脑的面积。

[0009] 最近的一项研究(“Breastfeeding and early white matter development:a cross sectional study”,Deoni等人,NeuroImage 82,(2013),77-86)已证明,与用婴儿配方食品喂养的婴儿相比,母乳喂养的孩子在晚期成熟的额区及相关大脑区域中表现出增加的白质发育。白质微观结构与母乳喂养持续时间之间的正相关关系也表现在若干大脑区域,这些区域在解剖学上与观察到的认知和行为表现测量结果的改善一致。

[0010] 因此这项研究的结果表明,不仅发生髓鞘形成以避免认知缺陷是重要的,而且髓鞘形成在婴儿生命的早期发生,理想的是遵循母乳喂养的婴儿中会产生的轨迹(随时间推移的髓鞘形成)也是重要的。此外,研究表明,标准婴儿配方食品通常不提供这种最佳的髓鞘形成轨迹。

[0011] 因此,需要提供一种用于婴儿或幼儿的营养组合物,其将会促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于仅用人类母乳(HBM)喂养的婴儿中所观察到的轨迹。

[0012] 对于用婴儿配方食品喂养的婴儿来说,需要促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹。

[0013] 对于用婴儿配方食品的喂养婴儿来说,还需要为他们提供能够促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹的最佳营养,这种轨迹接近于仅用人类母乳喂养 (HBM) 的婴儿中所观察到的轨迹。

[0014] 对于婴儿配方食品的喂养婴儿来说,需要通过可促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹的营养来促进和/或支持最佳的短期或长期健康状态,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹;这种健康状态包括最佳的大脑和认知功能发育以及防止神经认知缺陷。

[0015] 需要补偿非母乳喂养的婴儿中所观察到的未达最佳的髓鞘形成。

## 发明内容

[0016] 本发明涉及用于婴儿和幼儿的营养组合物,诸如早产儿配方食品、婴儿配方食品、较大婴儿配方食品、成长奶或婴孩食物,优选婴儿配方食品。该组合物包含矿物质或其混合物。矿物质或其混合物可促进或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹。

[0017] 在一个方面,提供了用于婴儿和/或幼儿的营养组合物,其包含矿物质或其混合物,用于促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹。

[0018] 在一个方面,提供了用于婴儿和/或幼儿的营养组合物,其包含矿物质或其混合物,用于促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹,这种轨迹导致促进和/或支持通过最佳的脑和认知功能发育和/或防止神经认知缺陷所表征的健康状态。

[0019] 在另一个方面,提供了矿物质或其混合物的用途,其用于制造待施用给婴儿和/或幼儿以促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹的营养组合物,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹。

[0020] 在另一个方面,提供了矿物质或其混合物的用途,其用于制造待施用给婴儿和/或幼儿以促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹的营养组合物,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹,这种轨迹导致促进和/或支持通过最佳的脑和认知功能发育和/或防止神经认知缺陷所表征的健康状态。

[0021] 在另一方面,提供了促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹的方法,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹,该方法包括给婴儿和/或幼儿施用包含矿物质或其混合物的营养组合物。

[0022] 在另一方面,提供了促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹的方法,该方法包括给婴儿和/或幼儿施用包含矿物质或其混合物的营养组合物,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所观察到的轨迹并且导致促进和/或支持通过最佳的脑和认知功能发育和/或防止神经认知缺陷所表征的健康状态。

[0023] 在另一个方面,提供了矿物质或其混合物的用途,其用于在婴儿和/或幼儿中促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于仅用人类母乳 (HBM) 喂养的婴儿中所

观察到的轨迹。

[0024] 在另一个方面,提供了矿物质或其混合物的用途,其用于在婴儿和/或幼儿中促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹,这种轨迹接近于仅用人类母乳(HBM)喂养的婴儿中所观察到的轨迹并且导致促进和/或支持通过最佳的脑和认知功能发育和/或防止神经认知缺陷所表征的健康状态。

[0025] 婴儿或幼儿年龄可介于0和60个月之间,或者年龄介于0和24个月之间,或者年龄介于0和12个月之间,或者年龄介于0和6个月之间。

[0026] 在另一个方面,提供了一种营养组合物,其除了矿物质(特别是铁、镁、磷、铜、钙和/或锌)之外,还包含:

[0027] 磷脂(例如鞘磷脂)、磷脂、其代谢前体和/或其代谢物、脂肪酸衍生物(例如DHA和/或ARA、神经酸和/或硬脂酸)、胆碱、维生素B12和/或叶酸。

[0028] 在本发明的另一个方面,提供了包含鞘磷脂、铁、胆碱、DHA和叶酸的营养组合物。

## 附图说明

[0029] 图1:示出了用母乳喂养的婴儿和幼儿相比于用两种含有不同铁水平的商业配方食品喂养的婴儿和幼儿的髓鞘形成轨迹。数据从实施例2中描述的实验中获得。

[0030] 图2:示出了2-氨基-4-十八烯-1,3-二醇(下文所定义的鞘氨醇)的结构。

[0031] 图3:示出了含有N,N,N-三甲基乙醇铵阳离子的季铵盐(下文所定义的胆碱)的结构。

[0032] 图4:示出了用母乳喂养的婴儿和幼儿相比于用两种含有不同锌水平的商业配方食品喂养的婴儿和幼儿的髓鞘形成轨迹。数据从实施例2中描述的实验中获得。

[0033] 图4a:示出了DHA在第18天和/或第30天对MBP、NF和/或MBP/NF的影响。

[0034] 图5:示出了硬脂酸在第6天、第18天和/或第30天对A2B5、MBP、MAG、NF、MBP/NF和/或MAG/NF的影响。

[0035] 图7:示出了维生素B12在第12天、第18天和/或第30天对A2B5、NF、MBP/NF和/或MAG的影响。

[0036] 图8:示出了叶酸在第12天、第18天和/或第30天对A2B5、NF、MAG、MAG/NF和/或MBP/NF的影响。

[0037] 图9:示出了胆碱在第12天、第18天或第30天对A2B5、MAG和/或MBP的影响。

[0038] 图13:示出了铁在第12天、第18天和/或第30天对A2B5、MBP、MAG、NF和/或MAG/NF的影响。

[0039] 图10:示出了锌在第12天、第18天和/或第30天对MBP、NF和/或MBP/NF的影响。

[0040] 图11:示出了磷在第12天、第18天和/或第30天对MAG、NF和/或MAG/NF的影响。

[0041] 图12:示出了镁在第12天、第18天和/或第30天对A2B5、MBP、NF、MAG、MBP/NF和/或MAG/NF的影响。

[0042] 图13:示出了铜在第12天和/或第18天对A2BF、MAG和/或MAG/NF的影响。

[0043] 图14:示出了磷脂酰胆碱在第12天对A2B5的影响和在第18天对MAG的影响。

[0044] 图15:示出了磷脂酰肌醇在第12天、第18天和/或第30天对A2B5、MBP、MAG、NF、MAG/NF的影响。

- [0045] 图16:示出了磷脂酰丝氨酸在第12天和/或第18天对A2B5、NF和/或MAG/NF的影响。
- [0046] 图17:示出了鞘磷脂在第12天、第18天和/或第30天对A2B5、MAG和/或MBP的影响。
- [0047] 图18:示出了神经酰胺在第12天对A2B5的影响和在第18天对MAG的影响。
- [0048] 图19:示出了半乳糖神经酰胺在第12天和/或第30天对A2B5、MBP、NF和/或MBP/NF的影响。
- [0049] 图20:示出了葡萄糖神经酰胺在第12天对A2B5的影响以及在第12天和第18天对NF的影响。
- [0050] 图21:示出了D-赤式神经酰胺在第12天对A2B5的影响和在第18天对MAG的影响。
- [0051] 图22:示出了神经酰胺-1-磷酸在第12天对A2B5的影响和在第18天对NF和MAG的影响。
- [0052] 图23:示出了单唾液酸神经节苷脂-3 (GM3) 在第12天、第18天和/或第30天对A2B5、MBP、MAG和/或MBP/NF的影响。
- [0053] 图24:示出了二唾液酸神经节苷脂3 (GD3) 在第12天、第18天和/或第30天对A2B5、MBP、NF和/或MAG的影响。
- [0054] 图25:示出了实施例3中所用的磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰胆碱 (PC)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 和鞘磷脂的脂肪酸概况。
- [0055] 图26:示出了维生素B12对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0056] 图27:示出了ARA对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0057] 图28:示出了硬脂酸对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0058] 图29:示出了锌对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0059] 图30:示出了磷脂酰肌醇对MAG和MBP mRNA表达的影响。
- [0060] 图31:示出了GD3对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0061] 图32:示出了DHA对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0062] 图33:示出了神经酸对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0063] 图34:示出了铁对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0064] 图35:示出了磷脂酰胆碱对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0065] 图36:示出了磷脂酰丝氨酸对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0066] 图37:示出了叶酸对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0067] 图38:示出胆碱对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0068] 图39:示出了神经酰胺对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0069] 图40:示出了半乳糖神经酰胺对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0070] 图41:示出了葡萄糖神经酰胺对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0071] 图42:示出了神经酰胺-1-磷酸对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。

[0072] 图43:示出了D-赤式神经酰胺对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。

[0073] 图44:示出了鞘磷脂对MBP和BetaIII共表达的影响。

[0074] 图45:示出了GM3对MBP和BetaIII共表达的影响。

## 具体实施方式

### [0075] 定义

[0076] 如本文所用,下列术语具有如下含义。

[0077] 在本发明的语境中,术语“髓鞘形成的轨迹”表示在婴儿期和幼年早期随时间推移的髓鞘形成程度(与髓鞘水分数相关)。

[0078] 在本发明的语境中,术语“髓鞘形成的最佳轨迹”表示如上所定义的髓鞘形成轨迹,其尽可能接近在出生后前(3个)月期间纯母乳喂养的婴儿中所实现的髓鞘形成轨迹。

[0079] 如果婴儿的髓鞘形成轨迹和在出生后前(3个)月期间纯母乳喂养的婴儿的髓鞘形成轨迹上的任何等价/相同测量点之间的距离最高至50%、特别是最高至25%、更特别是最高至20%,则该婴儿的髓鞘形成轨迹可被认为是尽可能接近所述纯母乳喂养的婴儿中所实现的髓鞘形成轨迹。在最高至50%的范围内的非限制性示例包括50%、40%、30%、25%、20%、10%、5%、1%、0.5%和0.01%。特别地,髓鞘形成轨迹将被认为是生物等价的。

[0080] 髓鞘形成轨迹可以在任何时间点组合测量。特别地,时间点是在人生命的前5年内,更特别地,在人生命的前2和前3年,甚至更特别地,在人生命的第一年。

[0081] 可通过在不同时间点,特别是在人受试者生命的前5年、更特别是人生命的前2年和前3年、甚至更特别是人生命的第一年的不同时间点,测量受试者中髓鞘相关水分数和/或髓鞘相关水库(myelin associated water pool)来测定髓鞘形成轨迹。可以使用多组分弛豫(MCR)磁共振成像(MRI)技术并且特别是使用mcDESPOT技术(Deoni等2008)来测量受试者中的髓鞘相关水分数和/或髓鞘相关水库。特别地,髓鞘形成轨迹可以通过使用mcDESPOT技术(Magn.Reson.Med.200860:1372-1387,特此以引用的方式将其主题并入本文)测量髓鞘相关水库来测定。

[0082] 在本发明的语境中,术语“促进”表示导致某一过程发生的因素或多个因素。

[0083] 在本发明的语境中,术语“支持”表示一旦某一过程开始发生就维持该过程的因素或多个因素。

[0084] 在本发明的语境中,“学习”这一表述是指通过经验、学习或通过教授来获取知识或技能。

[0085] 术语“认知”是指一个个体通过其知晓、感知或理解理念的智力过程;因此是指思考和理解的能力。认知包括信息处理、知觉、关注、思考、推理、理解和记忆以及精神运动、语言、记忆、专注、执行功能和解决问题的能力的所有方面。

[0086] 术语“婴儿”是指年龄在12个月以下的小孩。

[0087] 表述“幼儿”意指年龄介于一岁和五岁之间的儿童(包括学步儿童)。

[0088] 表述“儿童”通常是指最大至十八岁的人类。

[0089] “早产婴儿”或“早产儿”是指不足月生产的婴儿或幼儿。通常是指妊娠期满37周之前出生的婴儿。

- [0090] 表述“足月婴儿”是指在妊娠37周后出生的婴儿。
- [0091] 在本发明的语境中,术语“低出生体重儿”表示由于早产(即在妊娠37周之前)和/或由于胎儿生长受限,低于2500g(5.5磅)的新生儿体重。
- [0092] 在本发明的语境中,术语“小于胎龄儿(SGA)”是指出生体重低于相同胎龄的婴儿的第10个百分位的婴儿。
- [0093] 表述“产后期”是儿童从出生后即刻算起并且延续约六周的时期。
- [0094] 表述“营养组合物”是指供给受试者养分的组合物。一般情况下,营养组合物经胃肠道或不经胃肠道摄入,或者以口服或静脉注射方式摄入,并通常包含脂质或脂肪源和蛋白质源。优选地,营养组合物用于口服使用。
- [0095] 表述“低变应原营养组合物”是指不大可能引起变态反应的营养组合物。
- [0096] 表述“合成组合物”是指采用化学和/或生物方法获得的混合物,该混合物的化学性质可能与哺乳动物乳汁中天然存在的混合物相同。
- [0097] 表述“婴儿配方食品”是指专用于供给出生后4至6个月婴儿营养,而且本身可满足这类婴儿的多种营养需求的食品(符合欧盟委员会1991年5月14日颁发的针对婴儿配方食品和较大婴儿配方食品的第91/321/EEC号指令中第1.2条的规定)。
- [0098] 表述“1段婴儿配方食品”是指专用于供给出生后不满4个月婴儿营养的食品。
- [0099] 术语“较大婴儿配方食品”是指专用于供给4个月以上大的婴儿营养、并且是这类婴儿逐渐多元化的饮食中的主要流质食物的食品。
- [0100] 在本发明的语境中,术语“成长奶(GUM)”表示可在停止婴儿配方食品后给予儿童的营养配方食品。“成长奶”(或GUM)从一岁开始使用。其通常为适合幼儿的特殊营养需求的乳基饮料。
- [0101] 术语“婴孩食物”是指专用于供给出生后不满1岁婴儿营养的食品。
- [0102] 表述“强化剂”是指适宜与母乳或婴儿配方食品混合的液态或固态营养组合物。
- [0103] 术语“断乳期”是指在婴儿饮食中逐步用其它食物替代母亲的乳汁的这一时期。
- [0104] “母亲的乳汁”应理解为母亲的母乳或初乳(=人类母乳=HBM)。
- [0105] 本文所用的术语“低聚果糖”是指果糖低聚物。其可为长链或短链,具体取决于低聚果糖的聚合度(单体的数量)。优选地,本发明的低聚果糖为短链低聚果糖,最优选地其具有2至10的聚合度,例如2至8的聚合度。
- [0106] 本文所用的术语“sn-2棕榈酸酯”是指棕榈酸在甘油三酯的sn-2位与其键合。
- [0107] “高sn-2棕榈酸甘油三酯”是指在sn-2位含有超过30%的棕榈酸的甘油三酯(TG)。例如,由脂类营养公司(Lipid Nutrition)出售的可商购获得的高sn-2棕榈酸酯成分是Betapol™B-55。其为来源于植物油的甘油三酯混合物,其中至少54%的棕榈酸处于甘油分子的sn-2位。
- [0108] “α-乳白蛋白”是指高品质、易消化的乳清蛋白,其占总人类母乳(HBM)蛋白质的20%-25%并且是HBM中存在的主要蛋白质。α-乳白蛋白的结构由123个氨基酸和4个二硫键组成,并且该蛋白质具有14.2K道尔顿的分子量。由于α-乳白蛋白具有高含量的必需氨基酸(具体地色氨酸),所以它是低蛋白婴儿配方食品的理想选择。根据本发明,α-乳白蛋白也代表鞘磷脂的来源。
- [0109] 术语“益生元”是指通过选择地刺激健康细菌(诸如人类结肠中的双歧杆菌)的生



长和/或其活性而对宿主产生有利影响的非消化性碳水化合物 (Gibson GR, Roberfroid MB. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. J Nutr. 1995; 125: 1401-72)。

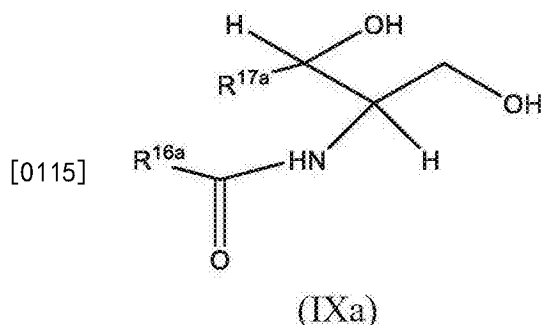
[0110] 术语“益生菌”是指对宿主的健康或良好状态具有有益影响的微生物细胞制剂或微生物细胞组分。(Salminen S, Ouwehand A, Benno Y. et al. “Probiotics: how should they be defined” Trends Food Sci. Technol. 1999; 10: 107-10 (Salminen S., Ouwehand A., Benno Y. 等人, “如何定义益生菌”, 《食品科学与技术趋势》, 1999年, 第10卷, 第107-110页))。微生物细胞一般为细菌或酵母。

[0111] 术语“鞘氨醇”表示具有图2所述结构的2-氨基-4-十八烯-1,3-二醇。如下所述, 鞘氨醇可以构成鞘脂类的主链。

[0112] 术语“鞘氨醇碱”表示鞘氨醇和一类在结构上由其衍生的化合物, 诸如二氢鞘氨醇、二氢鞘氨醇和植物鞘氨醇。术语“类鞘氨醇碱”还包括二氢鞘氨醇、鞘氨醇、二氢鞘氨醇和植物鞘氨醇的磷酸化形式。在一个实施方案中, 鞘氨醇碱选自: 二氢鞘氨醇、鞘氨醇以及它们的磷酸化形式。

[0113] 术语“鞘脂类”表示一类含有鞘氨醇碱主链的脂质, 其中氨基基团 ( $-NH_2$ ) 被脂肪酸残基酰化。下文所定义的“神经酰胺”和“鞘磷脂”是示例性的鞘脂类。

[0114] 术语“神经酰胺”表示一种脂质分子, 其中鞘氨醇主链被脂肪酸残基酰化。当在本说明书中使用术语神经酰胺时, 它可以指单种神经酰胺物质以及单种神经酰胺物质的混合物。特别地, 神经酰胺是式 (IXa) 化合物或式 (IXa) 化合物的混合物



[0116] 其中,

[0117] R16a为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,

[0118] R17a为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0119] 更特别地, R16a为C13至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团, 其与相邻的羰基基团合在一起对应于C14至C44饱和或不饱和脂肪酸残基。

[0120] 衍生该脂肪酸残基的C14至C44饱和或不饱和脂肪酸的非限制性示例包括: C14:0、C15:0、C16:0、C18:0、C20:0、C21:0、C22:0、C23:0、C24:1、C25:0、C28:1、C30:2、C30:1、C30:0、C32:3、C32:2、C32:1、C32:0、C33:1、C34:3、C34:2、C34:1、C34:0、C35:2、C35:0、C36:4、C36:3、C36:2、C36:1、C36:0、C37:1、C37:0、C38:4、C38:3、C38:1、C38:0、C39:1、C39:0、C40:2、C40:1、C40:0、C41:2、C41:1、C41:0、C42:4、C42:3、C42:2、C42:1、C42:0、C44:3、C44:1。

[0121] 甚至更特别地, R16a为C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团, 其与相邻羰基基团合在一起对应于C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基, 其中衍生所述脂肪酸残基的脂肪酸选自: C14:0、C15:0、C16:0、C18:0、C20:0、C21:0、C22:0、C23:0、C24:0、C18:1n-

9、C18:2n-6和C24:1n-9,并且更特别地,选自C16:0、C18:0、C20:0、C22:0和C24:0。

[0122] 甚至更特别地,神经酰胺是式(IXa)化合物的混合物,其中该混合物使得混合物中包含的脂肪酸残基(R16a与相邻羰基基团合在一起)的总数主要是饱和脂肪酸,并且最不占优势的是不饱和脂肪酸。更特别地,该混合物将使得混合物中80%至96%的所述脂肪酸残基是饱和脂肪酸,特别是C14、C15、C16、C18、C20、C22、C23、C24饱和脂肪酸,更特别是C16、C18、C20、C22和C24。

[0123] 本文所用的术语“神经节苷脂”表示包含如本文所定义的式IXa神经酰胺的残基的寡糖基神经酰胺脂质分子。当在本说明书中使用术语神经节苷脂时,其可指包含如本文所定义的式IXa神经酰胺的残基的单种神经节苷脂物质以及单种神经节苷脂物质的混合物。

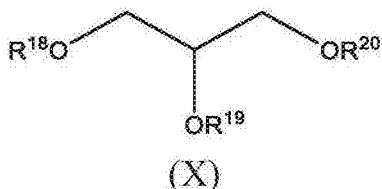
[0124] 术语“鞘磷脂”表示一种脂质分子,其中鞘氨醇主链在氨基基团(-NH<sub>2</sub>)处被脂肪酸残基酰化,并且其中鞘氨醇主链1位处的羟基基团与磷酸-胆碱或磷酸-乙醇胺基团连接。当在本说明书中使用术语鞘磷脂时,其可指单种鞘磷脂物质以及单种鞘磷脂物质的混合物,其中优选脂肪酸残基是C14至C44脂肪酸的残基,该C14至C44脂肪酸的非限制性示例包括C14至C44饱和或不饱和脂肪酸,可衍生脂肪酸残基的C14至C44饱和或不饱和脂肪酸的非限制性示例包括:C14:0、C15:0、C16:0、C18:0、C20:0、C21:0、C22:0、C23:0、C24:1、C25:0、C28:1、C30:2、C30:1、C30:0、C32:3、C32:2、C32:1、C32:0、C33:1、C34:3、C34:2、C34:1、C34:0、C35:2、C35:0、C36:4、C36:3、C36:2、C36:1、C36:0、C37:1、C37:0、C38:4、C38:3、C38:1、C38:0、C39:1、C39:0、C40:2、C40:1、C40:0、C41:2、C41:1、C41:0、C42:47、C42:3、C42:2、C42:1、C42:0、C44:3、C44:1。更优选地,脂肪酸残基为C16、C18、C20、C22或C24饱和脂肪酸的残基。

[0125] 术语“胆碱”指含有N,N,N-三甲基乙醇铵阳离子并具有图3中报道的结构季铵盐。

[0126] 在本发明的语境中,术语“胆碱”应旨在指存在于本发明营养组合物中的所有胆碱,胆碱为游离形式(或其盐的形式)或衍生自包含它的结构诸如例如:磷脂酰胆碱、氢氧化胆碱或鞘磷脂的形式。更优选地,术语“胆碱”旨在指存在于本发明营养组合物中的游离形式或其盐的形式(例如氢氧化胆碱)的所有胆碱。

[0127] 本文所用的术语“脂肪酸衍生物”是指除磷脂以外的包含脂肪酸的化合物,并且特别是指游离脂肪酸、和/或单酰基甘油(下文称为MAG)和/或二酰基甘油(下文称为DAG)、和/或三酰基甘油(下文称为TAG)和/或胆固醇酯。更特别地,该术语是指MAG、DAG、TAG和/或胆固醇酯。甚至更特别地,该术语是指TAG。

[0128] 本文所用的术语“MAG”是指其中一个OH基团与脂肪酸形成酯键的甘油分子。特别地,本文所用的术语“MAG”是指式(X)化合物



[0130] 其中,

[0131] R<sup>18</sup>、R<sup>19</sup>或R<sup>20</sup>中的两个为H,并且其中R<sup>18</sup>、R<sup>19</sup>或R<sup>20</sup>中的一个为C4至C44饱和或不饱和酰基基团。

[0132] 更特别地,R<sup>18</sup>、R<sup>19</sup>或R<sup>20</sup>中的两个为H并且R<sup>18</sup>、R<sup>19</sup>或R<sup>20</sup>中的一个为C10至C24饱和或

不饱和酰基基团,并且甚至更特别是C14至C24饱和或不饱和酰基基团。

[0133] 如本文所用,术语“DAG”是指其中OH基团中的两个与两个脂肪酸形成酯键的甘油分子。特别地,本文所用的术语“DAG”是指式(X)化合物

[0134] 其中,

[0135]  $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 或 $R^{20}$ 中的一个为H,并且其中 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 或 $R^{20}$ 中的两个为C4至C44饱和或不饱和酰基基团。更特别是C10至C24饱和或不饱和酰基基团,并且甚至更特别是C14至C24饱和或不饱和酰基基团。两个C4至C44饱和或不饱和酰基基团可以相同或不同。

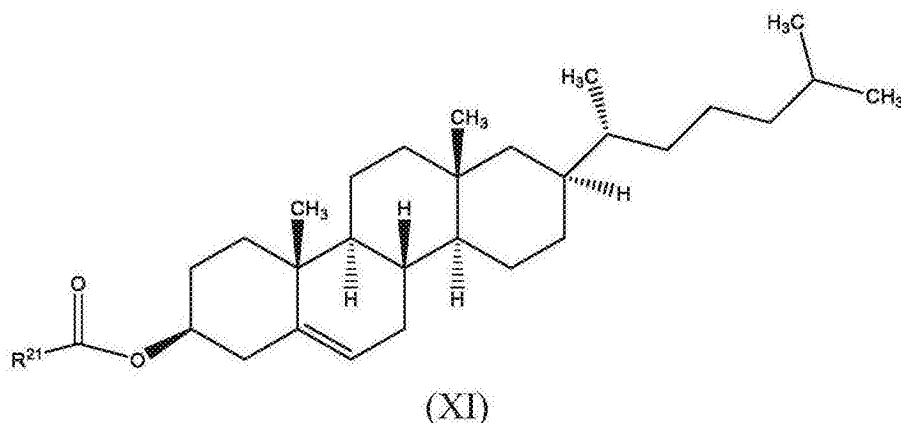
[0136] 如本文所用,术语“TAG”是指其中OH基团中的三个与三个脂肪酸形成酯键的甘油分子。特别地,本文所用的术语“TAG”是指式(X)化合物

[0137] 其中,

[0138] 其中 $R^{18}$ 、 $R^{19}$ 或 $R^{20}$ 全部为C4至C44饱和或不饱和酰基基团,更特别是C10至C24饱和或不饱和酰基基团,并且甚至更特别是C14至C24饱和或不饱和酰基基团。三个C4至C44饱和或不饱和酰基基团可以全部相同、全部不同,或者两个可以相同而一个不同。

[0139] 本文所用的术语“胆固醇酯”是指式(XI)化合物

[0140]



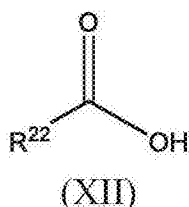
[0141] 其中,

[0142]  $R^{21}$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0143] 更特别地, $R^{21}$ 为C9至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与相邻的羰基基团合在一起对应于C10至C44饱和或不饱和脂肪酸残基,并且甚至更特别是C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基。

[0144] 本文所用的术语“脂肪酸”是指式(XII)化合物

[0145]



[0146] 其中

[0147]  $R^{22}$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0148] 更特别地, $R^{22}$ 为C9至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,并且甚至更特别是C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0149] 在本发明的语境中,术语“DHA”指二十二碳六烯酸。在本发明的语境中,术语“DHA”

应旨在指存在于本发明营养组合物中的所有DHA,DHA为游离形式(作为脂肪酸或其生理上可接受的盐)或包含在脂肪酸衍生物结构中的形式。

[0150] 在本发明的语境中,术语“ARA”或“AA”指花生四烯酸。在本发明的语境中,术语“ARA”应旨在指存在于本发明营养组合物中的所有ARA,ARA为游离形式(作为脂肪酸或其生理上可接受的盐)或包含在脂肪酸衍生物结构中的形式。

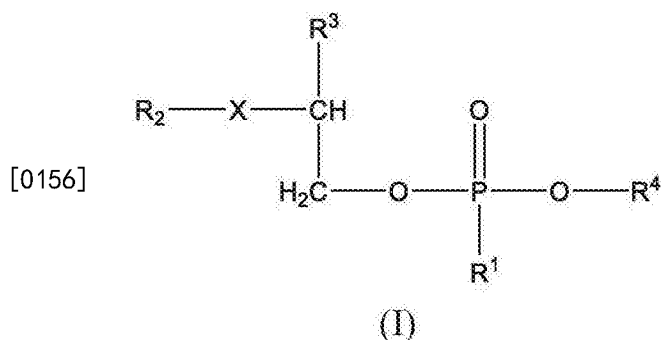
[0151] 本文使用的术语“维生素”是指任何维生素。维生素的非限制性示例包括:维生素A、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素K、维生素C、维生素D、烟酸、生物素、泛酸、叶酸、维生素B12以及它们的组合。

[0152] 在本发明的语境中,术语“叶酸”旨在指存在于本发明营养组合物中的所有叶酸,叶酸为其本身或是其一种生理学上可接受的盐(叶酸盐)及其混合物的形式。

[0153] 在本发明的语境中,本文所使用的术语“矿物质”是指任何矿物质。矿物质的非限制性示例包括:铁、锌、钙、磷、铜、碘化镁、锰、氯化物、钾、钠、硒、铬以及它们的组合。矿物质通常以盐的形式添加。

[0154] 在本发明的语境中,术语“铁”旨在指存在于本发明营养组合物中的所有铁,铁为游离形式,或者生理学上可接受的盐(诸如例如:柠檬酸铁、磷酸铁、焦磷酸铁、抗坏血酸亚铁、碳酸亚铁、柠檬酸亚铁、富马酸亚铁、葡糖酸亚铁、乳酸亚铁、硫酸亚铁或它们的混合物)的形式,或者一种生理上可接受的铁络合物(诸如例如EDTA铁钠盐)及其混合物的形式。

[0155] 在本发明的语境中,本文所用的术语“磷脂”是指任何磷脂,并且特别是式(I)化合物



[0157] 其中,

[0158]  $\text{R}^1$ 为0;

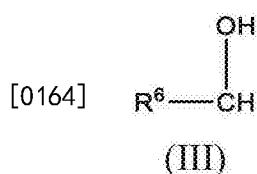
[0159] X为NH或O;

[0160]  $\text{R}^2$ 为C2-C44饱和或不饱和的直链或支链酰基基团;

[0161]  $\text{R}^3$ 为式(II)或式(III)的取代基:

[0162]  $\text{R}^5 - \text{O} - \text{CH}_2$

[0163] (II)

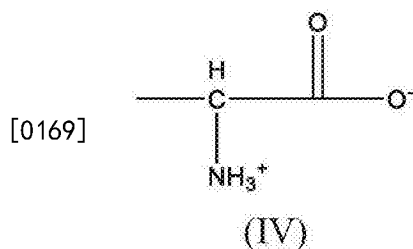


[0165] 其中, $\text{R}^5$ 为C2-C44饱和或不饱和的、直链或支链酰基基团,并且

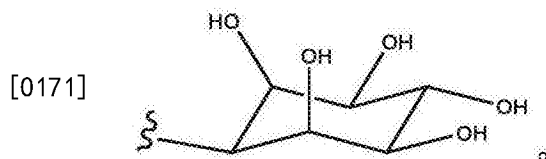
[0166]  $\text{R}^3$ 为C2-C44饱和烷基或烯基基团;并且

[0167]  $R^4$ 选自:C5或C6取代或未取代的环烷基或环烯基基团,或者

[0168]  $-(CH_2)_n-R^7$ , 其中n为1至4、特别是1至2范围内的整数, 并且 $R^7$ 为 $-N(CH_3)_3^+$ 、 $NH_3^+$ 或式(IV)的取代基, 并且

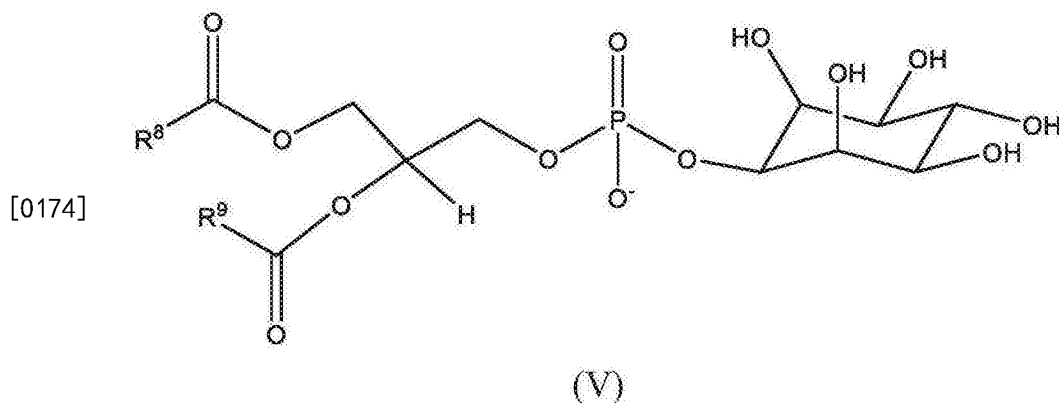


[0170] 特别地 $R^4$ 是被一个或多个羟基基团取代的C6环烷基或烷基或烯基基团, 更特别地 $R^4$ 衍生自肌醇(C6H12O6), 并且甚至更特别是源于肌-肌醇, 即 $R^4$ 为:



[0172] 如本文所用, 术语“无环”是指不是环状的基团, 即不含闭合的原子链。

[0173] 在本发明的语境中, 术语“磷脂酰肌醇”表示式(V)化合物



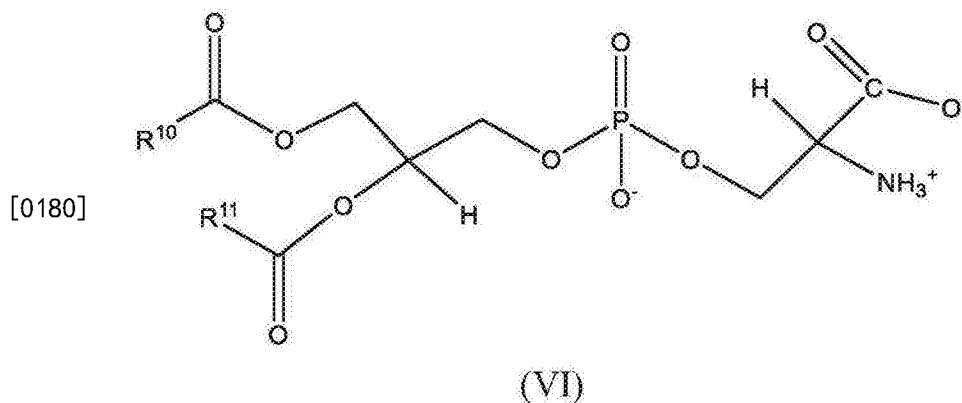
[0175] 其中 $R^8$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团, 并且

[0176]  $R^9$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0177] 更特别地,  $R^8$ 和 $R^9$ 彼此独立地为C13至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团, 其与它们的相邻羰基基团合在一起对应于C14至C44饱和或不饱和脂肪酸残基, 甚至更特别地,  $R^8$ 和 $R^9$ 彼此独立地为C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团, 其与它们的相邻羰基基团合在一起对应于C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基。

[0178] 更特别地,  $R^8$ 和 $R^9$ 为C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团, 其与它们的相邻羰基合在一起为C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基, 其中衍生脂肪酸残基的脂肪酸选自:C14:0、C15:0、C16:0、C18:0、C20:0、C20:3、C20:4、C21:0、C22:0、C23:0、C24:0、C18:1n-9、C18:2n-6和C24:1n-9。甚至更特别地, 选自C18:0、C18:1n-9、C18:2、C20:3和C20:4。

[0179] 在本发明的语境中, 术语“磷脂酰丝氨酸”表示式(VI)化合物



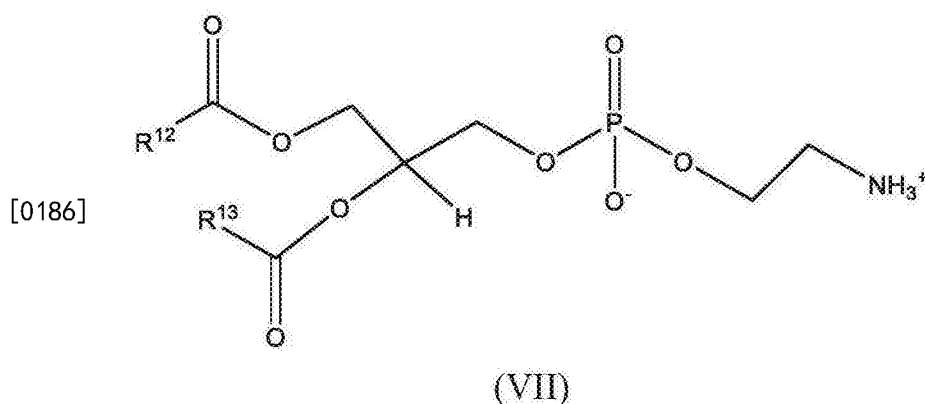
[0181] 其中 $R^{10}$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,并且

[0182]  $R^{11}$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0183] 更特别地, $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 彼此独立地为C13至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与它们的相邻羰基基团合在一起对应于C14至C44饱和或不饱和脂肪酸残基,甚至更特别地, $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 彼此独立地为C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与它们的相邻羰基基团合在一起对应于C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基。

[0184] 更特别地, $R^{10}$ 和 $R^{11}$ 为C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与它们的相邻羰基基团合在一起为C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基,其中衍生脂肪酸残基的脂肪酸选自:C14:0、C15:0、C16:0、C18:0、C20:0、C20:3、C20:4、C21:0、C22:0、C23:0、C24:0、C18:1n-9、C18:2n-6和C24:1n-9。甚至更特别地,选自C18:0、C18:1n-9、C20:4和C22:6。

[0185] 在本发明的语境中,术语“磷脂酰乙醇胺”表示式(VII)化合物

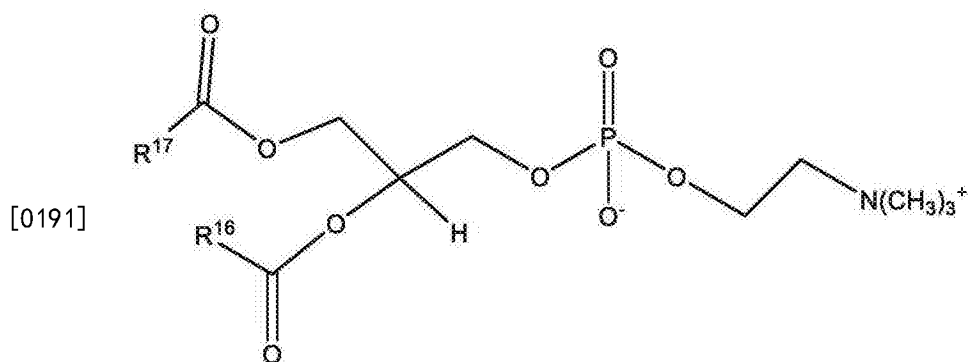


[0187] 其中 $R^{12}$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,并且

[0188]  $R^{13}$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0189] 更特别地, $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 彼此独立地为C13至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与它们的相邻羰基基团合在一起对应于C14至C44饱和或不饱和脂肪酸残基,甚至更特别地, $R^{12}$ 和 $R^{13}$ 彼此独立地为C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与它们的相邻羰基基团合在一起对应于C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基。

[0190] 在本发明的语境中,术语“磷脂酰胆碱”表示式(IX)化合物



(IX)

[0192] 其中 $R^{16}$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,并且

[0193]  $R^{17}$ 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0194] 更特别地, $R^{16}$ 和 $R^{17}$ 彼此独立地为C13至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与它们的相邻羰基基团合在一起对应于C14至C44饱和或不饱和脂肪酸残基,甚至更特别地, $R^{16}$ 和 $R^{17}$ 彼此独立地为C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与它们的相邻羰基基团合在一起对应于C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基。

[0195] 更特别地, $R^{16}$ 和 $R^{17}$ 为C13至C23支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,其与它们的相邻羰基基团合在一起为C14至C24饱和或不饱和脂肪酸残基,其中衍生脂肪酸残基的脂肪酸选自:C14:0、C15:0、C16:0、C16:1、C18:0、C20:0、C20:1、C20:3、C20:4、C21:0、C22:0、C22:6、C23:0、C24:0、C18:1n-9、C18:2n-6和C24:1n-9。甚至更特别地,选自C14:0、C16:0、C18:0、C18:1n-9、C18:2n-6、C20:1、C20:3、C20:4和C22:6。

[0196] 术语“cfu”应理解为菌落形成单位。

[0197] 纯母乳喂养的婴儿或幼儿/仅用母乳喂养的婴儿或幼儿:具有通常的含义,指绝大部分营养物质和/或能量源于人类母乳的婴儿(“绝大部分”可以是至少90%或至少95%,或至少99%)。

[0198] 主要用婴儿配方食品喂养的婴儿/幼儿:具有通常的含义,指营养物质和/或能量的营养源主要源于合成的婴儿配方食品、较大婴儿乳或成长奶。“主要”是指至少50%的那些营养物质和/或能量,或至少75%。

[0199] 除非另外指明,否则所有百分比均按重量计。

[0200] 现在开始更详细描述本发明。应当注意,本申请描述的多个方面、特征、实施例和实施方案可以相容和/或可以组合在一起。

[0201] 另外,在本发明的上下文中,术语“包含”或“包括”不排除其它可能的要素。本发明(包括本文所述的多个实施方案)提到的组合物可包含下列要素、由或基本上由下列要素组成:本文所述的基本要素和必要限制,以及本文所述的任何其它或可选(或者说视需求来定)的成分、组分或限制。

[0202] 这里所用的术语“特别地(是)”或“更特别地(是)”不应被认为是限制性的,而应被解释为与“例如”或“尤其”同义。

## 具体实施方式

[0203]

[0204] 为了清楚起见,下文所报告的所有实施方案和方面将适用于加以必要的变更对于本发明所描述的不同实施方案和方面。

[0205] 除非另外指明,否则所有针对营养物质所指示的量均表示为每营养组合物干重的量。

[0206] 其中营养物质可以以不同形式(以其本身或以包含该营养物质的盐、络合物或更复杂的结构的形式)包含在组合物中时,下文报道的量应旨在指营养物质本身的量。

[0207] 根据本发明的营养组合物包含矿物质或其混合物。

[0208] 特别有效的矿物质可以是铁、锌、钙、磷、铜和镁,特别是铁。

[0209] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含铁和/或锌和/或钙和/或磷和/或铜和/或镁,特别是铁和锌,更特别是铁。

[0210] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于5mg/100g的量包含铁。

[0211] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于9mg/100g的量包含铁。

[0212] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为5mg/100g至40mg/100g或9mg/100g至40mg/100g的量包含铁。

[0213] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为5mg/100g至20mg/100g或9mg/100g至20mg/100g的量包含铁。

[0214] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为5mg/100g至15mg/100g或9mg/100g至15mg/100g范围内的量包含铁。

[0215] 铁可以以一种生理上可接受的盐的形式诸如例如:柠檬酸铁、磷酸铁、焦磷酸铁、抗坏血酸亚铁、碳酸亚铁、柠檬酸亚铁、富马酸亚铁、葡萄糖酸亚铁、乳酸亚铁、硫酸亚铁或它们的混合物掺入本发明的营养组合物中。

[0216] 铁可以以一种生理上可接受的铁络合物(诸如例如EDTA铁钠盐)或其混合物的形式掺入本发明的营养组合物中。

[0217] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含一定水平的铁,该水平的铁使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过40mg。

[0218] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含锌。

[0219] 锌可以以占组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0220] 特别是,锌可以以高于0.08mg、高于0.3mg、高于0.5mg的量包含在组合物中,其中所有重量均按每100g干组合物计。

[0221] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物以选自范围为0.5mg至8mg、2mg至5.5mg、2.5mg至4.5mg、3mg至4mg、4mg至7.5mg的量包含锌,其中所有重量均按每100g干组合物计。

[0222] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定水平的锌,该水平的锌使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过302.4mg/天,或将不会超过245mg/天,或将不超过166mg/天,或将不超过98.9mg/天,或将不超过95.6mg/天。

[0223] 锌可以以生理学上可接受的盐的形式诸如例如:硝酸锌、硫酸锌、葡萄糖酸锌、乙酸锌或其混合物,或以生理学上可接受的锌络合物(诸如例如吡啶甲酸锌)或其混合物的形式掺入本发明的组合物中。

[0224] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含钙。



[0225] 钙可以以组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0226] 特别是,钙可以以高于0.84mg、高于2.52mg、高于4.62mg的量包含在组合物中,其中所有重量均按每100g组合物干重计。

[0227] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物以范围为84mg至760mg、范围为200mg至550mg、范围为250mg至450mg、范围为280mg至520mg、350mg至650mg的量包含钙,其中所有重量均按每100g干组合物计。

[0228] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定水平的钙,该水平的钙使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过482mg/天,或将不超过477mg/天。

[0229] 钙可以按原样或以其生理学上可接受的盐的形式和/或经由包含钙的任何来源而掺入本发明的组合物中。例如碳酸钙、氯化钙、柠檬酸的钙盐、葡萄糖酸钙、甘油磷酸钙、乳酸钙、氢氧化钙、正磷酸的钙盐。

[0230] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含镁。

[0231] 镁可以以组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0232] 特别是,镁可以以高于0.2mg、高于0.35mg、高于0.5mg的量包含在组合物中,其中所有重量均按每100g组合物干重计。

[0233] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物以选自以下的量包含镁:范围为0.35mg至90mg、范围为25mg至70mg、30mg至65mg、35mg至60mg、40mg至50mg、35mg至55mg,其中所有重量均按每100g干组合物计。

[0234] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定水平的镁,该水平的镁使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过110mg/天,或将不超过65mg/天。

[0235] 镁可以按原样或以其生理学上可接受的盐的形式和/或经由包含镁的任何来源而掺入本发明的组合物中。例如碳酸镁、氯化镁、氧化镁、硫酸镁、葡萄糖酸镁、氢氧化镁、柠檬酸的镁盐、正磷酸的镁盐。

[0236] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含磷。

[0237] 磷可以以组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0238] 特别是,磷可以以高于1.7mg/100g组合物干重、高于14.3mg/100g组合物干重、高于27.3mg/100g组合物干重的量包含在组合物中。

[0239] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物以选自以下的量包含磷:范围为17mg至516mg、范围为129mg至400mg、范围为140mg至390mg、范围为150mg至370mg、160mg至365mg、范围为270mg至350mg、200mg至360mg,其中所有重量均按每100g干组合物计。

[0240] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定水平的磷,该水平的磷使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过863mg/天,或将不超过787mg/天。

[0241] 磷可以按原样或以其生理学上可接受的盐的形式和/或经由包含磷的任何来源例如:磷酸钙、磷酸氢钙而掺入本发明的组合物中。

[0242] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铜。

[0243] 铜可以以组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0244] 特别是,铜可以以高于10mcg、高于40mcg、高于60mcg的量包含在组合物中,其中所有重量均按每100g组合物干重计。

[0245] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物以选自以下的量包含铜:高于100mcg、范

围为100mcg至850mcg、180mcg至650mcg、200mcg至400mcg、210mcg至300mcg、210mcg至240mcg、450mcg至850mcg,其中所有重量均按每100g组合物干重计。

[0246] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定水平的铜,该水平的铜使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过1426mcg/天,或将不超过488mcg/天。

[0247] 铜可以按原样或以其生理学上可接受的盐的形式和/或经由包含铜的任何来源而掺入本发明的组合物中。例如,铜可以以如下形式掺入组合物中:硫酸铜和/或葡萄糖酸铜和/或碳酸铜、和/或柠檬酸铜、和/或铜-赖氨酸络合物。

[0248] 如果本发明的组合物还包含以下成分中的一者或多者:维生素和/或磷脂和/或脂肪酸衍生物和/或胆碱,则可能是特别有利的。

[0249] 在一个实施方案中,除矿物质或其混合物之外,根据本发明的营养组合物还包含磷脂、其代谢前体和/或其代谢物(例如鞘磷脂、磷脂酰胆碱和/或磷脂酰肌醇)。

[0250] 磷脂、其代谢前体和/或其代谢物可以以至多组合物的99.999%的量包含在组合物中。

[0251] 特别是,鞘磷脂、其代谢前体和/或其代谢物可以以至多组合物的99.999%的量包含在组合物中。

[0252] 更特别是,该组合物将以高于200mg/kg组合物干重、更特别是范围为200mg至2.5g/kg组合物干重的量包含鞘磷脂。

[0253] 在一个实施方案中,该组合物以选自以下的量包含鞘磷脂:高于200mg/kg、高于300mg/kg、范围为200mg/kg至2.5g/kg、范围为200mg/kg至2g/kg、范围为300mg/kg至1.5g/kg或400mg/kg至1g/Kg的量。所有重量均按组合物的干重计。

[0254] 在一个实施方案中,磷脂酰胆碱、其代谢前体和/或其代谢物可以以至多组合物的99.999%的量包含在组合物中。

[0255] 更特别是,该组合物将以高于200mg/kg组合物干重、更特别是范围为200mg/kg至2.5g/kg组合物干重的量包含磷脂酰胆碱。

[0256] 在一个实施方案中,该组合物以选自以下的量包含磷脂酰胆碱:高于200mg/kg、高于300mg/kg、范围为200mg/kg至2.5g/kg、范围为200mg/kg至2g/kg、范围为300mg/kg至1.5g/kg或400mg/kg至1g/Kg的量。所有重量均按组合物的干重计。

[0257] 特别是,磷脂酰肌醇、其代谢前体和/或其代谢物可以以至多组合物的99.999%的量包含在组合物中。

[0258] 更特别是,该组合物将以高于200mg/kg组合物干重、更特别是范围为200mg/kg至1.5g/kg组合物干重的量包含磷脂酰肌醇。

[0259] 在一个实施方案中,该组合物以选自以下的量包含磷脂酰肌醇:高于200mg/kg、高于300mg/kg、范围为200mg/kg至2.5g/kg、范围为200mg/kg至2g/kg、范围为250mg/kg至800mg/kg或400mg/kg至1.5g/Kg的量。所有重量均按组合物的干重计。

[0260] 特别是,磷脂酰丝氨酸、其代谢前体和/或其代谢物可以以至多组合物的99.999%的量包含在组合物中。

[0261] 更特别是,该组合物将以高于150mg/kg组合物干重、更特别是范围为200mg/kg至1.5g/kg组合物干重的量包含磷脂酰丝氨酸。

[0262] 在一个实施方案中,该组合物以选自以下的量包含磷脂酰丝氨酸:高于150mg/kg、

高于200mg/kg、高于300mg/kg、范围为200mg/kg至2.5g/kg、范围为200mg/kg至2g/kg、范围为250mg/kg至1000mg/kg或400mg/kg至1g/Kg的量。所有重量均按组合物的干重计。

[0263] 特别地,磷脂酰乙醇胺、其代谢前体和/或其代谢物可以以至多组合物的99.999%的量包含在组合物中。

[0264] 更特别地,该组合物将以高于150mg/kg组合物干重、更特别是范围为150mg/kg至1.5g/kg组合物干重的量包含磷脂酰乙醇胺。

[0265] 在一个实施方案中,该组合物以选自以下的量包含磷脂酰乙醇胺:高于170mg/kg、高于180mg/kg、高于200mg/kg、范围为200mg/kg至2.5g/kg、范围为200mg/kg至2g/kg、范围为250mg/kg至800mg/kg或200mg/kg至1g/Kg的量。所有重量均按组合物的干重计。

[0266] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含磷脂(该磷脂包括磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂和磷脂酰胆碱)使得总浓度不超过15.4g/kg。

[0267] 如果在组合物中使用一种或多种磷脂的代谢前体和/或代谢物来代替磷脂或与磷脂组合,则所述化合物可以以使得由所述组合物生理递送的磷脂水平与上文列出的水平一致的量使用。确定合适的量在技术人员的能力范围内。

[0268] 本文所用的术语“一种或多种磷脂的代谢前体和/或代谢物”不包括胆碱。

[0269] 磷脂,特别是鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸和/或磷脂酰乙醇胺的代谢前体和/或代谢物的非限制性示例是:半乳糖神经酰胺、葡萄糖神经酰胺、鞘氨醇、鞘氨醇-1-磷酸、神经酰胺、D-赤式-二氢神经酰胺和神经酰胺-1-磷酸以及神经节苷脂。

[0270] 特别有效的磷脂可以是磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇和/或鞘磷脂,特别是鞘磷脂。

[0271] 在本发明的一个实施方案中,磷脂是磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂和/或任何前述物质的代谢前体和/或代谢物和/或任何前述物质的组合。特别地,磷脂是鞘磷脂、其代谢前体和/或其代谢物。

[0272] 磷脂、特别是鞘磷脂的特别有效的代谢前体和/或代谢物包括神经酰胺和神经节苷脂以及神经酰胺-1-磷酸和d-赤式-二氢神经酰胺。

[0273] 特别有效的神经节苷脂可以是单唾液酸神经节苷脂-3 (GM3) 神经节苷脂和/或二唾液酸神经节苷脂3 (GD3) 神经节苷脂。

[0274] 神经酰胺-1-磷酸和d-赤式-二氢神经酰胺将包含如本文所定义的式IXa神经酰胺的残基。

[0275] 神经节苷脂和/或神经酰胺和/或神经酰胺-1-磷酸和/或d-赤式-二氢神经酰胺可以以任何量包含在组合物中。

[0276] 在2mg-11.5mg/100g的GD3和/或GM3范围内的浓度可能是特别有效的。

[0277] 鞘磷脂可由神经酰胺和/或一种或多种神经节苷脂和磷脂酰胆碱合成,因此,如果神经酰胺和/或一种或多种神经节苷脂与磷脂酰胆碱、其代谢前体或其代谢物联合使用,则可能是特别有利的。

[0278] 包含在本发明组合物中的磷脂、其代谢前体和/或其代谢物可以是天然的、合成的或它们的混合物。所述代谢前体和/或代谢物可以以其纯的形式或基本上纯的形式用于本发明的组合物中。作为另一种选择,它们可以以包含它们的来源的形式添加。

[0279] 适于旨在消费所述组合物的受试者摄取的磷脂、其代谢前体和/或其代谢物的任

何来源均可用于本发明。

[0280] 特别地,磷脂、其代谢前体或其代谢物将来自天然来源,该天然来源的非限制性示例包括蛋、大豆、牛脑和/或哺乳动物乳或它们的提取物。大豆来源的非限制性示例包括大豆卵磷脂-食品添加剂,哺乳动物乳的非限制性示例包括牛乳、骆驼乳、绵羊乳、山羊乳,包括脱脂乳。乳的非限制性提取物包括蛋白质提取物(如乳清蛋白和酪蛋白)、乳脂球膜(MFGM)和包含它们的提取物。

[0281] 可用于本发明的磷脂、其代谢前体或其代谢物(特别是鞘磷脂)的特别有用的来源可以是富含 $\alpha$ -乳白蛋白的牛奶乳清蛋白浓缩物,和/或已从乳清蛋白(特别是牛奶乳清蛋白)中提取的非纯 $\alpha$ -乳白蛋白。

[0282]  $\alpha$ -乳白蛋白是一种高质量、易于消化的乳清蛋白,并且是人乳中存在的主要蛋白质。由于 $\alpha$ -乳白蛋白和/或富含 $\alpha$ -乳白蛋白的乳级分具有高含量的必需氨基酸(特别是色氨酸),所以其对于用于低蛋白婴儿配方食品而言是理想的。虽然 $\alpha$ -乳白蛋白本身是一种蛋白质,但非纯的来源可能包含鞘磷脂。

[0283] 在一个实施方案中,磷脂、其代谢前体或其代谢物(特别是鞘磷脂)以富含 $\alpha$ -乳白蛋白的乳清蛋白浓缩物的形式或以 $\alpha$ -乳白蛋白使用。

[0284] 在更具体的实施方案中,使用磷脂含量、特别是鞘磷脂含量高于500mg/100g组合物干重的富含 $\alpha$ -乳白蛋白的乳清蛋白浓缩物或 $\alpha$ -乳白蛋白。

[0285] 磷脂、其代谢前体或其代谢物的另一特别有用的来源可以是MFGM或包含它们的提取物,特别是来自牛奶的MFGM或包含它们的提取物。如果MFGM或包含它们的提取物包含至少1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%的磷脂和/或至少0.1%、0.2%、0.5%至5%、0.8%至3%、1%至2%、1.6%、1.9%、1.8%的磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺和/或鞘磷脂,则可能是特别有利的。MFGM可还进一步包含镁、磷和或钙,特别是浓度范围为0.05%至2%、0.1%至0.4%。

[0286] 本领域技术人员可基于组合物的性质、目的、目标受试者和剂量来确定上述营养物质、其代谢前体或其代谢物的适当量,如受试者每天要摄入该组合物多少次。典型地,有效剂量将取决于受试者的年龄、大小和健康状况、受试者的生活方式、组合物中营养物质的量以及可能取决于受试者的性别。

[0287] 在一个实施方案中,除铁之外根据本发明的营养组合物还包含鞘磷脂。

[0288] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于200mg/kg的量包含鞘磷脂。

[0289] 在另一个实施方案中,本发明的营养组合物以高于300mg/kg的量包含鞘磷脂。

[0290] 在又一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为200mg/kg至2.5g/kg的量包含鞘磷脂。

[0291] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为200至2g/kg,例如300mg/kg至1.5g/kg或400mg/kg至1g/kg的量包含鞘磷脂。

[0292] 在本发明的语境中,鞘磷脂可以原样施用或以其代谢前体和/或其代谢物的形式施用。不希望受理论束缚,据认为与直接施用鞘磷脂剂量相比,这种代谢前体和/或代谢物在促进和/或支持脑中的最佳髓鞘形成轨迹或防止脑中未达最佳的髓鞘形成轨迹方面引起相同的有益效果。该方面的非限制性示例性物质是:半乳糖神经酰胺、葡萄糖神经酰胺、鞘氨醇、鞘氨醇-1-磷酸、神经酰胺、D-赤式-二氢神经酰胺和神经酰胺-1-磷酸以及神经节苷脂。

[0293] 本发明的营养组合物包含鞘磷脂和/或其代谢前体或其代谢物。

[0294] 鞘磷脂存在于天然来源诸如： $\alpha$ -乳白蛋白、蛋、牛脑或牛奶等中。

[0295] 鞘磷脂和/或其代谢前体或其代谢物可作为单一物质、作为由不同鞘磷脂物质的混合物组成的成分或通过添加包含一种或多种鞘磷脂物质的天然或合成成分而掺入本发明的营养组合物中。

[0296] 在一个实施方案中，可以将鞘磷脂以包含在脱脂奶粉、 $\alpha$ -乳白蛋白、乳清蛋白浓缩物和/或富含 $\alpha$ -乳白蛋白的乳清蛋白浓缩物的形式掺入本发明的营养组合物中。在一个实施方案中，富含 $\alpha$ -乳白蛋白的乳清蛋白浓缩物可具有高于500mg/100g的鞘磷脂含量。

[0297] 在一个实施方案中，可将鞘磷脂作为单一成分掺入本发明的营养组合物中。

[0298] 在一个实施方案中，根据本发明的营养组合物含有一定量的鞘磷脂的代谢前体和/或代谢物，该量使得它们在生理学上递送与包含200mg/kg至2.5g/kg的鞘磷脂的营养组合物所递送的鞘磷脂水平相同的鞘磷脂水平。

[0299] 在另一个实施方案中，根据本发明的营养组合物含有一定量的鞘磷脂的代谢前体和/或代谢物，该量使得它们在生理学上递送与包含400mg/kg至1.5g/kg的鞘磷脂的营养组合物所递送的鞘磷脂水平相同的鞘磷脂水平。

[0300] 技术人员将根据其在该领域的知识得出这种量。

[0301] 除了矿物质或其混合物，例如铁、锌、钙、磷和/或镁之外，本发明的营养组合物可还包含维生素或其混合物。

[0302] 特别有效的维生素可以是叶酸、维生素B12和维生素B6，特别是叶酸和维生素B12，特别是叶酸。

[0303] 维生素可以以组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0304] 在一个实施方案中，本发明的组合物包含维生素B12和/或叶酸。

[0305] 叶酸可以以占组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0306] 特别是可以以高于50mcg/100g干组合物，更特别是50mcg/100g至500mcg/100g干组合物的量包含叶酸。

[0307] 除了矿物质或其混合物外，例如铁、锌、钙、磷和/或镁外，根据本发明的营养组合物还包含叶酸。

[0308] 叶酸可以以占组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0309] 除了铁之外，根据本发明的营养组合物还包含叶酸。

[0310] 在一个实施方案中，根据本发明的营养组合物以高于50mcg/100g的量包含叶酸。

[0311] 在一个实施方案中，根据本发明的营养组合物以高于110mcg/100g的量包含叶酸。

[0312] 在一个实施方案中，根据本发明的营养组合物以范围为50mcg/100g至500mcg/100g或50mcg/100g至400mcg/100g的量包含叶酸。

[0313] 在另一个实施方案中，根据本发明的营养组合物以范围为110mcg/100g至500mcg/100g或110mcg/100g至400mcg/100g的量包含叶酸。

[0314] 在另一个实施方案中，根据本发明的营养组合物以范围为110mcg/100g至400mcg/100g或110mcg/100g至350mcg/100g的量包含叶酸。

[0315] 在一个实施方案中，根据本发明的营养组合物含有一定水平的叶酸，该叶酸水平使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过400mcg。

[0316] 叶酸可以以原样或以其一种生理学上可接受的盐(叶酸盐)或其混合物的形式掺入本发明的营养组合物中。

[0317] 在另一个实施方案中,除了磷脂、其代谢前体和/或其代谢物或者它们的混合物之外,根据本发明的营养组合物还包含维生素B12。

[0318] 维生素B12可以以占组合物的0.001%至最多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0319] 特别地,维生素B12可以以选自以下的量包含在组合物中:高于0.01mcg、特别是高于0.04mcg、特别是高于0.05mcg,其中所有重量均按每100g干组合物计。

[0320] 在一个实施方案中,本发明的组合物以选自以下的量包含维生素B12:高于0.5mcg、范围为0.1mcg至10mcg、0.4mcg至5mcg、0.5mcg至2mcg、1mcg至1.5mcg、4mcg至8.5mcg,其中所有重量均按每100g干组合物计。

[0321] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定量的维生素B12,该量使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过7.6mcg/100g干组合物(77.6mcg/Kg干组合物)。

[0322] 维生素B12可以按原样或以其生理学上可接受的盐或其混合物的形式或者经由包含维生素B12的任何来源而掺入本发明的营养组合物中。特别地,维生素B12可以以其纯的形式、以氰钴胺素、羟钴胺素以及它们的任何组合掺入组合物中。

[0323] 在一个实施方案中,除了其矿物混合物之外,例如除了鞘磷脂之外,根据本发明的营养组合物还包含一种或多种以下成分:维生素和/或磷脂和/或脂肪酸和/或胆碱。

[0324] 除了矿物质或其混合物之外,本发明的营养组合物可包含胆碱和/或其代谢前体或其代谢物。

[0325] 在另一个实施方案中,除了铁之外,根据本发明的营养组合物还包含胆碱。

[0326] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于30mg/100g的量包含胆碱。

[0327] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于50mg/100g或高于100mg/100g的量包含胆碱。

[0328] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为30mg/100g至1000mg/100g或30mg/100g至700mg/100g的量包含胆碱。

[0329] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为50mg/100g至1000mg/100g或50mg/100g至700mg/100g的量包含胆碱。

[0330] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为50mg/100g至500mg/100g或100mg/100g至400mg/100g的量包含胆碱。

[0331] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含一定水平的胆碱,该胆碱水平使得源自本发明营养组合物的每日总摄入量将不超过1g。

[0332] 胆碱可以按原样或以一种生理学上可接受的盐诸如例如:氯化胆碱、柠檬酸胆碱、重酒石酸胆碱或其混合物的形式掺入本发明的营养组合物中。在本发明的语境中,胆碱可以按原样或以其代谢前体和/或其代谢物诸如例如磷脂酰胆碱的形式与鞘磷脂组合施用。

[0333] 胆碱和/或其代谢前体或其代谢物可作为单一物质、作为由不同胆碱物质的混合物组成的成分或通过添加包含一种或多种胆碱物质的天然或合成成分而掺入本发明的营养组合物中。

[0334] 除了铁之外,本发明的营养组合物还可包含胆碱和/或其代谢前体或其代谢物。

[0335] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物还包含脂肪酸衍生物或其混合物。

[0336] 可包含在脂肪酸衍生物中,即可以是游离脂肪酸或可衍生MAG、DAG、TAG和/或胆固醇酯的脂肪酸残基的脂肪酸的C10至C44饱和或不饱和脂肪酸的非限制性示例包括:C10:0、C12:0、C14:0、C15:0、C16:0、C16:1n-7、C18:0、C18:1n-7、C18:1n-9、C18:2n-6、18:3n-3、C20:0、C20:1n-9、C20:2n-6、C20:3n-6、C20:4n-6、20:5n-3、C21:0、C22:0、C22:1n-9、C22:6n-3、C23:0、C24:1,特别是24:1n-9、C25:0、C28:1、C30:2、C30:1、C30:0、C32:3、C32:2、C32:1、C32:0、C33:1、C34:3、C34:2、C34:1、C34:0、C35:2、C35:0、C36:4、C36:3、C36:2、C36:1、C36:0、C37:1、C37:0、C38:4、C38:3、C38:1、C38:0、C39:1、C39:0、C40:2、C40:1、C40:0、C41:2、C41:1、C41:0、C42:4、C42:3、C42:2、C42:1、C42:0、C44:3、C44:1。特别地,所述脂肪酸将选自:C10:0、C12:0、C14:0、C16:0、C16:1n-7、C18:0、C18:1n-7、C18:1n-9、C18:2n-6、18:3n-3、C20:0、C20:1n-9、C20:2n-6、C20:3n-6、C20:4n-6、20:5n-3、C22:0、C22:1n-9、C22:6n-3、C24:1、24:1n-9,特别是24:1n-9。

[0337] 如果脂肪酸衍生物包含选自C20:4n-6、C22:6n-3、C24:1n-9、C16:0、C18:1n-9和C18:0的饱和或不饱和脂肪酸,则可能是特别有利的。特别是C20:4n-6和/或C22:6n-3和/或C18:0。更特别是22:6n-3和/或C18:0。

[0338] 适于旨在消费所述组合物的受试者摄取的任何脂肪酸衍生物均可用于本发明。

[0339] 特别地,脂肪酸衍生物将来自天然来源,其非限制性示例包括蛋、藻类、鱼油、霉菌、酵母、种子、植物如大豆以及动物来源如牛脑、和/或哺乳动物乳或其提取物。大豆来源的非限制性示例包括大豆卵磷脂-食品添加剂,哺乳动物乳的非限制性示例包括牛乳、骆驼乳、绵羊乳、山羊乳,包括脱脂乳。乳的非限制性提取物包括蛋白质提取物、乳脂球膜(MFGM)以及包含它们的提取物。脂肪酸衍生物也可来自棕榈油、牛油、猪油、棉籽油、花生油。

[0340] 如果脂肪酸衍生物包含选自C20:4n-6、C22:6n-3、C24:1n-9、C16:0、C18:1n-9和C18:0的饱和或不饱和脂肪酸,则可能是特别有利的。特别是C20:4n-6和/或C22:6n-3和/或C18:0。更特别是22:6n-3和/或C18:0。

[0341] C20:4n-6为花生四烯酸(下文称为ARA或AA)。C22:6n-3是二十二碳六烯酸(下文称为DHA)。24:1n-9为神经酸。C18:0为硬脂酸。C16:0为棕榈酸。C18:1n-9为油酸。

[0342] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物含有包含DHA和/或ARA和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物、特别是包含DHA和/或ARA和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物。最特别是包含DHA和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物。

[0343] 包含DHA和/或ARA和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物可以以最高占组合物的99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0344] 特别地,包含DHA和/或ARA和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物可以15mg/100g至350mg/100g组合物干重、更特别是30mg/100g至300mg/100g组合物干重的量包含在本发明的组合物中。

[0345] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物以选自以下的量含有包含DHA和/或ARA和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物:高于15mg/100g组合物干重、高于30mg/100g组合物干重、高于50mg/100g组合物干重、范围为30mg/100g至300mg/100g组合物干重、范围为30mg/100g至200mg/100g组合物干重或者30mg/100g至150mg/100g组合物干重、范围为

50mg/100g至300mg/100g组合物干重、范围为50mg/100g至200mg/100g组合物干重、范围为50mg/100g至150mg/100g组合物干重。

[0346] 包含硬脂酸的脂肪酸衍生物存在于天然来源例如棕榈油、牛油、猪油、棉籽油、花生油中。

[0347] 包含神经酸的脂肪酸衍生物存在于天然来源例如Cardamine gracea、假蓝亚麻(Heliphila longifolia)、全叶蒜蓼(Thlaspi perfoliatum)、美丽旱金莲(Tropaeolum speciosum)、Lunaria biennis、银扇草(Lunaria annua)和蒜头果(Malania oleifera)的种子油;霉菌Neocallismastix frontalis、白粉菌(Erysiphe graminis)和律草单囊壳(Sphaerotheca humuli);细菌大西洋假单孢菌(Pseudomonas atlantica);酵母酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)和海洋硅藻筒状菱形藻(Nitzschia cylindrus)中。

[0348] 包含DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物存在于天然来源诸如例如蛋、藻类、真菌或鱼油中。

[0349] 含有包含DHA和/或ARA以及通常其它多不饱和脂肪酸(PUFA)(特别是EPA(二十碳五烯酸))的脂肪酸衍生物的油可具有各种来源。优选地,包含DHA的脂肪酸衍生物以含有包含DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物的鱼油形式提供。鱼油通常含有5重量%或更多、优选10重量%或更多的包含DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物。从藻类或微生物获得的含有大量包含DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物的油通常也可供使用。例如,可使用从藻类收获的含有10重量%或更多,例如20重量%或更多的脂肪酸衍生物的油。

[0350] 如果根据本发明的营养组合物含有包含ARA和DHA的脂肪酸衍生物。所述成分可以例如以使得DHA:ARA的重量比在4:1至1:4,例如3:1至1:3,例如2:1至1:2,例如1.5:1至1:1.5,特别是1.1:1至1:1.1的范围内的量包含在本发明的组合物中。

[0351] 如果本发明的组合物包含脂肪酸衍生物的混合物,其中该混合物使得本发明的组合物中不饱和脂肪酸与饱和脂肪酸和/或脂肪酸残基的重量比在1:1至1:2、1:1.2至1:1.9、1:1.25至1:1.5、1:3至1:4的范围内,则也可能有利的。

[0352] 此外,当大量包含DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物包含在本发明的组合物中时,如果包含饱和长链脂肪酸、特别是C20/24的脂肪酸衍生物的总量增加则可能是特别有利的。这些饱和长链脂肪酸可能是髓鞘的重要组分,从而使其能够包裹并封包轴突。本发明组合物中DHA和/或AA与这些不饱和长链脂肪酸的重量比例如可以在1:1至1:10、1:2至1:9、1:3至1:4.5、1:3.5至1:4.5的范围内。

[0353] 根据本发明的营养组合物包含ARA。

[0354] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于30mg/100g的量包含ARA。

[0355] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于50mg/100g的量包含ARA。

[0356] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以30mg/100g至300mg/100g或30mg/100g至200mg/100g或30mg/100g至150mg/100g的量包含ARA。

[0357] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以50mg/100g至300mg/100g或50mg/100g至200mg/100g或50mg/100g至150mg/100g的量包含ARA。

[0358] ARA存在于天然来源诸如蛋、真菌、藻类或鱼油中。

[0359] 根据一个实施方案,ARA以包含ARA的甘油三酯的形式提供。

[0360] 包含ARA和通常其它多不饱和脂肪酸(PUFA)、特别是EPA(二十碳五烯酸)的油可具



有各种来源。优选地,ARA以包含ARA的鱼油的形式提供。鱼油通常包含5重量%或更多、优选10重量%或更多的ARA。从藻类或微生物获得的包含大量ARA的油也可供使用。例如,可使用从真菌收获的含有10重量%或更多,例如20重量%或更多的ARA的油。

[0361] ARA可作为单一物质(作为脂肪酸,以其生理学上可接受的盐的形式或以包含其的甘油三酯的形式)、作为由不同ARA物质的混合物组成的成分或通过添加包含一种或多种ARA物质的天然或合成成分而掺入本发明的营养组合物中。

[0362] 在一个实施方案中,除ARA之外,本发明的营养组合物还包含:磷脂(特别是鞘磷脂)、矿物质(特别是铁、镁、磷、钙和/或锌)、胆碱、DHA、维生素B12和/或叶酸。

[0363] 在另一个实施方案中,除矿物质例如铁或其混合物之外,根据本发明的营养组合物还包含DHA。

[0364] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于30mg/100g的量包含DHA。

[0365] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以高于50mg/100g的量包含DHA。

[0366] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以范围为30mg/100g至300mg/100g或30mg/100g至200mg/100g或介于30mg/100g至150mg/100g之间的量包含DHA。

[0367] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物以50mg/100g至300mg/100g或50mg/100g至200mg/100g或50mg/100g至150mg/100g的量包含DHA。

[0368] 本发明的营养组合物包含DHA。

[0369] DHA存在于天然来源诸如蛋、藻类或鱼油中。

[0370] 根据一个实施方案,DHA以包含DHA的甘油三酯的形式提供。

[0371] 包含DHA和通常其它多不饱和脂肪酸(PUFA)、特别是EPA(二十碳五烯酸)的油可具有各种来源。优选地,DHA以包含DHA的鱼油的形式提供。鱼油通常包含5重量%或更多、优选10重量%或更多的DHA。从藻类或微生物获得的包含大量DHA的油也可供使用。例如,可使用从藻类收获的含有10重量%或更多,例如20重量%或更多的DHA的油。

[0372] DHA可作为单一物质(作为脂肪酸,以其生理学上可接受的盐的形式或以包含其的甘油三酯的形式)、作为由不同DHA物质的混合物组成的成分或通过添加包含一种或多种DHA物质的天然或合成成分而掺入本发明的营养组合物中。

[0373] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含花生四烯酸(ARA)和DHA。

[0374] 根据一个实施方案,该营养组合物包含约相同量的DHA和ARA。例如,DHA:ARA的重量比在4:1至1:4,例如3:1至1:3,例如2:1至1:2,例如1.5:1至1:1.5,特别是1.1:1至1:1.1的范围内。

[0375] 在一个实施方案中,当营养组合物中包含大量DHA时,不饱和长链脂肪酸c20/22/24增加。

[0376] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含鞘磷脂、铁和胆碱。

[0377] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含鞘磷脂、铁和DHA。

[0378] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含鞘磷脂、铁和叶酸。

[0379] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、DHA和胆碱。

[0380] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含鞘磷脂、DHA和铁。

[0381] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、DHA和叶酸。

[0382] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、胆碱和DHA。

- [0383] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含鞘磷脂、胆碱和铁。
- [0384] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、胆碱和叶酸。
- [0385] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、叶酸和DHA。
- [0386] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含鞘磷脂、叶酸和铁。
- [0387] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、叶酸和胆碱。
- [0388] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、叶酸、鞘磷脂和DHA。
- [0389] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、叶酸、胆碱和鞘磷脂。
- [0390] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、叶酸、DHA和胆碱。
- [0391] 在另一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁、鞘磷脂、DHA和胆碱。
- [0392] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含鞘磷脂、叶酸、铁、胆碱和DHA。
- [0393] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含:脂肪酸衍生物,特别是包含DHA和/或ARA和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物;以及维生素,特别是B12和/或叶酸;和/或磷脂,特别是磷脂酰胆碱、和/或磷脂酰丝氨酸、和/或磷脂酰肌醇、和/或鞘磷脂、和/或任何前述物质的代谢前体或代谢物;和/或矿物质,特别是铁、和/或锌、和/或钙、和/或磷、和/或镁;和/或胆碱。
- [0394] 所述组合物中特别有益的浓度/量的所述成分可以是量为至少420mg/kg的鞘磷脂、量为至少1000mg/kg的磷脂酰胆碱、量为至少900mg/kg的磷脂酰丝氨酸、量为至少700mg/kg的磷脂酰肌醇、量为至少160mg/kg的叶酸、量为至少7mcg/100g的维生素B12、量为至少11.5mg/100g的铁、量为至少140mg/kg的胆碱、量为至少89mg/100g的包含DHA的脂肪酸衍生物、量为至少175mg/100g的包含AA的脂肪酸衍生物、量为至少7mg/100g的锌、量为至少500mg/100g的钙、量为至少350mg/100g的磷、量为至少600mcg/100g的铜、量为至少50mg/100g的镁。其中所有重量均以组合物的干重计。
- [0395] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物含有磷脂和/或其代谢前体或其代谢物(例如,鞘磷脂、磷脂酰胆碱和/或磷脂酰肌醇)、脂肪酸衍生物(例如,包含DHA和/或ARA)、维生素B12和/或叶酸、铁和胆碱。
- [0396] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物含有包含DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物、维生素B12和/或叶酸、鞘磷脂和铁。
- [0397] 在一个更具体的实施方案中,根据本发明的组合物含有包含浓度为1023mg/kg的DHA、浓度为1023mg/kg的ARA的脂肪酸衍生物、浓度为54mcg/kg的维生素B12、浓度为1698mcg/kg的叶酸、浓度为814mg/kg的鞘磷脂和浓度为67mg/kg的铁。
- [0398] 本发明的组合物可以是适合直接施用给受试者的任何类型的组合物。
- [0399] 特别地,该组合物将是合成营养组合物。
- [0400] 本领域技术人员将会确定适当量的上述营养物质、其代谢前体或其代谢物以在施用后在营养组合物中实现它们的最高允许水平。
- [0401] 优选的营养组合物基质:
- [0402] 根据本发明的组合物可为合成营养组合物。其可以是婴儿配方食品、1段婴儿配方食品、较大婴儿配方食品、成长奶、婴孩食物、早产儿配方食品或强化剂诸如人乳强化剂或补充剂。优选地,本发明的组合物是专用于不满4个月或不满6个月婴儿的婴儿配方食品或强化剂或补充剂。

[0403] 在本发明的一个典型实施方案中,该组合物将含有蛋白质源、脂质源和碳水化合物源。

[0404] 例如,这种组合物可包含约2g/100kcal至6g/100kcal范围内的蛋白质、约1.5g/100kcal至3g/100kcal范围内的脂质和/或约1.7g/100kcal至12g/100kcal范围内的碳水化合物。

[0405] 如果该组合物是液体,则其能量密度可在60kcal/100ml和75kcal/100ml之间。

[0406] 如果该组合物是固体,则其能量密度可在60kcal/100g和75kcal/100g之间。

[0407] 蛋白质的类型被认为对本发明无关紧要。因此,可使用例如基于乳清、酪蛋白及其混合物的蛋白质源。就乳清蛋白而言,可使用酸乳清或甜乳清或其混合物,以及以任何所需比例混合的 $\alpha$ -乳白蛋白和 $\beta$ -乳球蛋白。乳清蛋白可为经改性的甜乳清。甜乳清是较易获得的奶酪制作过程的副产品,常用于制造基于牛乳的婴儿配方食品。然而,甜乳清中含有一种名为酪蛋白糖巨肽(CGMP)的组分,该组分不期望地富含苏氨酸,而色氨酸含量很少。将CGMP从甜乳清中去除可使得蛋白质中苏氨酸的含量更接近于人乳中苏氨酸的含量。然后可在这种经改性的甜乳清中补充那些有关的含量低的氨基酸(主要是组氨酸和色氨酸)。EP 880902中描述了将CGMP从甜乳清中除去的方法,WO 01/11990中描述了基于此类经改性的甜乳清的婴儿配方食品。该蛋白质可为完整的或水解的,或为完整蛋白质和水解蛋白质的混合物。例如对于被认为处于发生牛奶变态反应风险的受试者而言,提供部分水解的蛋白质(水解程度在2%与20%之间)可能是可取的。如果需要水解的蛋白质,则可根据需要并且如本领域已知的那样进行水解过程。例如,可通过如在EP 322589中所述的两个步骤对乳清级分进行酶法水解,以制备乳清蛋白水解物。对于充分水解的蛋白质,可在55℃下先使用Alcalase 2.4L(EC 940459),再使用Neutrase 0.5L(可得自诺和诺德发酵物公司(Novo Nordisk Ferment AG)),然后使用胰酶,来对乳清蛋白进行三重水解。如果用作原料的乳清级分基本上不含乳糖,则发现该蛋白质在水解过程中经受少得多的赖氨酸封闭(lysine blockage)。这使得能够将赖氨酸封闭的程度从约15重量%的总赖氨酸降至低于约10重量%的赖氨酸;例如约7重量%的赖氨酸,这大大地提高了蛋白质源的营养质量。

[0408] 本发明的组合物可含有碳水化合物源。可以使用任何碳水化合物源,诸如乳糖、蔗糖、麦芽糖糊精、淀粉、蜂蜜以及它们的混合物。

[0409] 本发明的组合物可含有脂质源。脂质源可以是任何脂质。优选的脂肪源包括乳脂和植物油(包括但不限于棕榈油、高油酸葵花油和高油酸红花油)。也可加入必需脂肪酸,即亚油酸和 $\alpha$ -亚麻酸。在一个实施方案中,可以加入少量含有丰富初加工的花生四烯酸(AA)和二十二碳六烯酸(DHA)的油,诸如鱼油或微生物油。脂质源的n-6和n-3脂肪酸的比率优选地为约5:1至约15:1;例如约8:1至约10:1。

[0410] 本发明的组合物也可包含据悉为日常饮食所必不可少并且在营养上大量需求的所有维生素和矿物质。已确定某些维生素和矿物质的最低需求量。矿物质、维生素和任选地存在于婴儿配方食品中的其他营养物质的示例包括维生素A、维生素B1、维生素B2、维生素B6、维生素B12、维生素E、维生素K、维生素C、维生素D、叶酸、肌醇、烟酸、生物素、泛酸、胆碱、钙、磷、碘、铁、镁、铜、锌、锰、氯化物、钾、钠、硒、铬、钼、牛磺酸和左旋肉碱。矿物质通常以盐的形式添加。在一个实施方案中,该组合物包含一定量的维生素B12和/或叶酸。特定矿物质和其他维生素的存在及其量将根据许多因素而变化,诸如待施用组合物的人或动物的年

龄、体重和状况。

[0411] 组合物还可包含至少一种益生菌菌株。益生菌是对宿主的健康或良好状态具有有益效果的微生物细胞制剂或微生物细胞组分。合适的益生菌菌株包括：可以商标LGG购自芬兰维利奥公司 (Valio Oy) 的鼠李糖乳杆菌 (*Lactobacillus rhamnosus*) ATCC 53103、鼠李糖乳杆菌 CGMCC 1.3724、副干酪乳杆菌 (*Lactobacillus paracasei*) CNCM I-2116, 尤其由丹麦汉森集团公司 (Christian Hansen company) 以商标Bb12销售的乳双歧杆菌 (*Bifidobacterium lactis*) CNCM I-3446, 以及由日本森永乳业株式会社 (Morigana Milk Industry Co.Ltd.) 以商标BB536销售的长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) ATCC BAA-999。如果存在益生菌的话, 它的量同样优选地根据人或动物的年龄而变化。一般来讲, 益生菌含量可随婴儿年龄增大而增加, 例如 $10^3$ cfu/g配方食品(干重)至 $10^{12}$ cfu/g配方食品(干重), 更优选介于 $10^4$ cfu/g配方(干重)和 $10^8$ cfu/g配方食品(干重)之间。

[0412] 该组合物还可包含至少一种益生元, 其含量为0.3%至10%。益生元是不可消化的食品成分, 其通过选择性地刺激结肠中一种或有限数量的细菌的生长和/或活性对宿主产生有益地影响, 从而改善宿主健康状况。这些成分不可消化是指它们在胃或小肠中不能被分解和吸收, 因而它们可以完整地通过胃和小肠到达结肠, 在结肠处通过有益细菌选择性地发酵。益生元的示例包括某些低聚糖。

[0413] 该组合物可任选地包含可具有有益效果的其他物质, 如核苷酸、核苷等。

[0414] 本发明所用的组合物例如婴儿配方食品, 可以通过任何合适的方式制备。例如, 婴儿配方食品可通过将蛋白质源、碳水化合物源和脂肪源以合适的比例混合在一起制备。如果使用乳化剂, 则可将其包含在混合物中。此时可加入维生素和矿物质, 但为了避免热降解, 通常在稍晚一点的时候加入。可先将任何亲脂性维生素、乳化剂等物质溶解于脂肪来源中, 再混合。然后可混入水(优选经过反渗透的水), 形成液体混合物。随后可对液体混合物进行热处理, 以降低细菌量。例如, 可将液体混合物迅速加热到约80℃至约110℃范围内的温度, 保持约5秒至约5分钟。这可通过蒸汽喷射或热交换器(例如板式热交换器)来进行。然后, 可例如通过急速冷却将液体混合物冷却到约60℃至约85℃。接着可将液体混合物匀化; 例如分两个阶段进行: 第一阶段在约7MPa至约40MPa下进行, 第二阶段在约2MPa至约14MPa下进行。然后可进一步冷却匀化的混合物以添加任何热敏感组分; 诸如维生素和矿物质。此刻便于将匀化的混合物的pH和固形物含量标准化。将经匀化的混合物转移至合适的干燥装置(诸如喷雾干燥器或冷冻干燥器), 并将其转化成粉末。该粉末的含水量应小于约5重量%。如果需要增加一种或多种益生菌, 可根据任何合适的方法培养所述益生菌, 然后例如通过冷冻干燥或喷雾干燥方式制成, 以供添加到婴儿配方食品中。另选地, 可从专业供应商诸如丹麦汉森公司 (Christian Hansen) 和日本森永乳业株式会社 (Morinaga) 购买已被制成合适形式的细菌制品, 以供添加到食物产品(诸如婴儿配方食品)中。此类细菌制品可通过干混方式添加到粉状的婴儿配方食品中。

[0415] 矿物质或其混合物可在该过程中的任何阶段添加, 但优选在加热步骤之后添加。

[0416] 在一个实施方案中, 该营养组合物包含具有高sn-2棕榈酸酯的甘油三酯, 优选具有超过33%的sn-2位的棕榈酸的甘油三酯。

[0417] 在一些实施方案中, 按重量计, 棕榈酸占配方食品的总脂肪酸含量的约15%至约25%, 诸如约15%至约20%, 并且总棕榈酸含量的至少约30% (例如, 约35%) 至约43%位于

sn-2位。

[0418] 由脂类营养公司出售的可商购获得的组合物是Betapol™ B-55,其为来源于植物油的甘油三酯混合物,其中至少54%的棕榈酸位于甘油分子的sn-2位。在一个实施方案中,本发明组合物的脂肪含量为约40重量%至50重量%(例如约43重量%至约45重量%)的Betapol™ B-55。本领域的技术人员将了解,在不脱离本发明的实质和范围的情况下,配方食品中所使用的高sn-2脂肪的百分比以及sn-2棕榈酸酯的总量可以有所变化,并且可使用不同的高sn-2棕榈酸酯油。

#### [0419] 健康效应

[0420] 本发明的组合物对用这种组合物喂养的婴儿或幼儿的大脑中的髓鞘形成轨迹具有积极效果。

[0421] 这种积极效果可以包括在用所述组合物喂养的受试者中促进和/或支持最佳的髓鞘形成轨迹,其决定婴儿或幼儿中认知技能和能力以及学习的恰当发育。最佳的髓鞘形成轨迹也可以防止发生认知损害或延缓。

[0422] 在使用包含矿物质例如铁和/或锌和/或钙和/或铜和/或镁和/或磷的营养组合物数天、数周或数月后可以观察到健康效果。

[0423] 本发明的效果可以是预防性的(例如避免脑中未达最佳的髓鞘形成轨迹)或治愈性的(恢复脑中最佳的髓鞘形成轨迹)。

[0424] 与所述婴儿相关的健康效应可通过如下面实施例中所示的各种方法来测量。

#### [0425] 目标婴儿

[0426] 在本发明的一个实施方案中,目标婴儿或幼儿在脑中显示未达最佳的髓鞘形成轨迹,这可导致认知缺陷、认知能力受损和/或未达最佳的认知发育。

[0427] 在一个实施方案中,这种婴儿可以是早产儿或低出生体重婴儿或小于胎龄的婴儿。

[0428] 在另一个实施方案中,婴儿或幼儿是足月出生。所有的婴儿都可以从本发明中受益,因为所有的婴儿都易于或可能易于在脑中发育出未达最佳的髓鞘形成轨迹。

[0429] 在这种婴儿或幼儿中,获得接近于母乳喂养的婴儿(优选在出生后前几个月仅用母乳喂养的婴儿)的脑中的髓鞘形成轨迹是特别引人关注的。事实上,它为他们提供了认知能力方面的健康状况,该健康状况与在母乳喂养的婴儿中所观察到的相符。

[0430] 在一个实施方案中,婴儿和幼儿为0至3个月大、0至6个月大、或0至12个月大或0至36个月大或0至60个月大。可以预见,当刚出生后(0-4周、0-8、0-12、0-24周)就施用给婴儿时,本发明的组合物可能更有益的,因为此时髓鞘形成过程已开始并明显发育。

[0431] 呈现以下实施例以说明本发明的某些实施方案和特征,但不应理解为限制本发明的范围。

#### [0432] 预期喂食方案

[0433] 在一个实施方案中,将本发明的组合物喂食给婴儿或幼儿(或打算喂食或被指导喂食)持续2周至52周。在一个实施方案中,将其喂食给婴儿或幼儿持续2周至24周,或者2周至12周。

[0434] 在一个实施方案中,将本发明的组合物喂食给婴儿或幼儿(或打算喂食或被指导喂食)持续2周至52周,并且在婴儿或幼儿出生或母乳喂养中断后不久就开始。在一个实施

方案中,将本发明的组合物喂食给婴儿或幼儿持续2周至24周,或者2周至12周,并且在婴儿或幼儿出生或母乳喂养中断后不久就开始。

[0435] 不希望受理论束缚,据信早(出生时或出生后不久)开始是优选的以诱导预期效果。

[0436] 预计当本发明的组合物用作唯一的营养来源时(除了补充母乳喂养之外),健康有益效果更突出或更快确立。在一个实施方案中,只要将本发明的组合物用于覆盖目标婴儿或幼儿的营养需求(例如能量需求)的50%或更高、或者75%或更高,就观察到所述健康效应。

[0437] 实验部分:

[0438] 方法、定义和材料

[0439] MRI (磁共振成像):

[0440] 使用白质成像技术获得0和5岁之间的婴儿及儿童的MRI脑部扫描。这种技术提供了一种定量测量,即髓鞘水分分数(MWF),其为髓鞘含量的替代标志物。当在整个幼年早期随时间推移进行作图时,可以生成髓鞘形成轨迹。

[0441] 婴儿配方食品组成:分析喂食给参与该研究的婴儿的六种婴儿配方食品的组成/髓鞘相关的营养物质的水平。

[0442] 测试的组合物是不同品牌/供应商的标准商业婴儿配方食品,并且显示出其中所含营养物质的不同水平。

[0443] 认知能力:粗大动作、视觉接受和语言(表达性和接受性)的年龄标准化(T)评分源于穆林早期学习量表(Mullen Scales of Early Learning)。

[0444] 临床研究

[0445] 婴儿参与者

[0446] 本研究纳入的婴儿取自正常大脑和行为发育的更大纵向研究:布朗大学的髓鞘形成及成熟过程中的行为的评估(Brown university Assessment of Myelination and Behavior Across Maturation,BAMBAM)。为了专注于典型神经发育,已知在学习障碍、神经障碍或精神障碍方面具有潜在风险因素的儿童在招募和入选时被明确排除。因此,有子宫内酒精或非法物质暴露、早产(<37孕周)或多胎、胎儿超声异常、并发妊娠(如先兆子痫)、APGAR评分<8、入住新生儿重症监护室、神经障碍(如头部损伤、癫痫)、婴儿、父母或兄弟姐妹中有精神障碍或发育障碍(包括需要药物治疗的母亲抑郁症)的孩子被排除在外。将持续的筛查(诸如用于自闭症的MCAT,或用于行为问题的CBCL)进一步用于剔除具有临床有关行为或明显医学病症(诸如自闭症谱系障碍)的入选儿童。

[0447] 回顾性和前瞻性数据的组合通过详细的病史以及关于所使用的婴儿配方食品的类型、母乳喂养与配方食品喂养的比例和纯母乳喂养的时间对父母进行的访谈,从父母获取。该信息在每次研究访问时都会更新,对2岁以下的孩子大约每6个月进行一次访问,对年龄较大的孩子则每年访问一次。利用该信息,将孩子分类进两组中的一组:第1组。纯配方食品喂养;以及第2组。纯母乳喂养至少90天(3个月)。在3个月内喂食母乳和配方食品的组合的孩子被排除在我们的分析之外。根据父母报告的在前三个月内使用的主要婴儿配方食品进一步对纯配方食品喂养组中的婴儿进行细分。主要配方食品被定义为90%或更多时间(例如,在假期期间父母使用替代品牌的情况)给予的配方食品。

[0448] 利用这些标准,94名纯配方食品喂养的婴儿和幼儿被选入第1组。这包括13名接受配方食品#2的儿童;28名接受配方食品#5的儿童;8名接受配方食品#3的儿童;39名接受配方食品#4的儿童;5名接受配方食品#1的儿童和1名接受配方食品#6的儿童。关于平均年龄、妊娠时间、出生体重、男女比例、种族比例、母亲教育程度、家庭规模以及家中使用的语言数目(除英语外),也选择52例纯母乳喂养的婴儿样本并与过于配方食品喂养的组相匹配。表1中提供了群体人口统计。

[0449] 表1.用于纵向分析和营养分析的数据分解

[0450]

|                 | 配方食品<br>1 | 配方食品<br>2 | 配方食品<br>5 | 配方食品<br>3 | 配方食品<br>4 | 配方食品<br>6 | 母乳喂养 |
|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------|
| N <sub>儿童</sub> | 5         | 13        | 28        | 8         | 39        | 1         | 52   |
| N <sub>测量</sub> | 11        | 27        | 56        | 14        | 64        | 3         | 106  |

[0451] 成像方法和分析

[0452] 使用Deoni等人的mcDESPOT (T1与T2多元驱动平衡单脉冲观察技术) 白质成像技术 (Magn. Reson. Med. 2008, 60:1372-1387) 扫描每个婴儿,该技术提供了整个大脑的每个成像点处的髓鞘水分分数 (MWF) 的定量测量。所有婴儿在自然 (即非镇静) 睡眠期间使用消声mcDESPOT成像方案进行扫描。总成像时间从最小学步儿的19分钟到较大的4岁孩子的24分钟不等。

[0453] 所有数据都是在配备有12通道头部RF阵列的西门子3T Tim Trio扫描仪上采集。为了尽量减少扫描期间的运动,小孩用儿童MedVac真空固定袋 (CFI Medical Solutions, 美国) 和泡沫垫束缚。通过减小峰值梯度幅度和切换速率,并使用隔音扫描仪孔插入件 (Quiet Barrier HD Composite, UltraBarrier, USA) 来降低扫描仪噪声。还使用MiniMuff儿童耳罩和电动式耳机 (MR Confon, 德国) {Dean:2014je}。用儿童脉搏血氧饱和度监测系统 and 红外摄像机不断监测小孩。所有小孩在MRI扫描期间都保持睡眠状态,分析数据中没有出现运动伪影。

[0454] 在图像对准、非脑信号去除以及校正主磁场和发射磁场 ( $B_0$ 和 $B_1$ ) 不均匀性之后,将三水库信号模型 (three-pool signal model) (包括髓鞘相关水;轴突内-外水;和非交换的自由水库) 匹配至mcDESPOT数据以推导基于体素的MWF图谱。

[0455] 然后将每个孩子的图谱研究特定的模板进行非线性比对。对应于5个双侧区域 (额区、颞区、枕区、顶区和小脑WM) 以及胼胝体的主体、膝部和压部

[0456] 的白质掩模 (mask) 由通用数据库生成,注册到通用模板,并叠加到每个孩子的MWF图谱上。然后为每个孩子确定每个区的平均值,并用于后续的发育分析和轨迹建模。

[0457] 发育差异:

[0458] 为了检查母乳喂养的婴儿与配方食品喂养的婴儿之间以及不同配方食品喂养的婴儿之间的发育差异,使用了非线性混合效应建模方法。将改良的Gompertz生长模型独立地匹配至第1组和第2组,以及每个配方食品亚组。然后使用非配对t检验比较母乳喂养组与配方食品喂养组之间的四个自由的Gompertz模型参数中的每一个,使用方差分析接着用事后Tuckey检验比较4个配方食品亚组之间的四个自由的Gompertz模型参数中的每一个,以确定哪个配方食品组不同。

[0459] 认知评估和分析

[0460] 除了MR成像之外,使用穆林早期学习量表(MSEL;Mullen:1995vd),在扫描的7天内评价每个孩子的一般认知能力和技能。MSEL在精细动作和粗大动作控制、接受性和表达性语言以及视觉接受方面的行为发育提供广泛评估。来自这些方面的年龄标准化T评分可以合并为三个综合评分:早期学习综合分数(ELC,包括精细动作、视觉接受,表达性和接受性语言);非语言发育商数(NVDQ,包含精细动作和视觉接受分数);和语言发育商数(VDQ,包括表达性和接受性语言分数)。

[0461] 与MWF MRI数据一样,检查母乳喂养的婴儿与配方食品喂养的婴儿之间以及不同配方食品亚组之间ELC、VDQ和NVDQ的潜在的组平均差异。除了平均值比较之外,还利用混合效应建模(假定线性趋势)研究这三个综合值的纵向变化。

[0462] 实施例1[0463] 由横断面分析鉴定营养驱动因素

[0464] 从上述群组,婴儿期喂养不同婴儿配方食品的最高5岁的儿童被包括进大相关分析中,以检查配方食品营养组成与髓鞘形成之间的关系。分析该组群中5种最常使用的配方食品的营养组成。构建一个单个一般线性模型(GLM),模拟所有量化的营养物质、铁和儿童年龄。计算基于体素的相关性,显著性定义为 $p < 0.05$ ,使用基于集群的校正方法校正第一类错误。

[0465] 在初始分析中,包含所有营养物质导致动力不足的模型。为了减少模型中的变量数,我们检验了变量间的相关性。使用0.9的保守阈值,我们排除了各种配方食品中彼此高度相关的变量(营养组分)。

[0466] 最后的模型表明矿物质(尤其是铁、钙、磷、锌和镁)是髓鞘形成的营养驱动因素。其它鉴定的驱动因素包括脂肪酸衍生物,尤其是ARA和/或DHA、磷脂(尤其是鞘磷脂、磷脂酰胆碱和/或磷脂酰肌醇)、叶酸、维生素B12和胆碱。

[0467] 对于矿物质,在脑中(特别是在左颞叶、视皮层和运动皮层中)随时间推移观察到与髓鞘形成(髓鞘水分分数)显着相关。

[0468] 实施例2[0469] 根据纵向研究的髓鞘形成轨迹

[0470] 根据现有数据,对于包含不同量的所鉴定的营养驱动因素,即铁(这些配方食品的组成在下面表2中报道)的两种配方食品进行纵向发展轨迹分析:

[0471] 表2:

|   | 配方食品 5<br>(低铁含量) | 配方食品 2<br>(高铁含量) |
|---|------------------|------------------|
| 铁 | 8.42mg/100g      | 11.7mg/100g      |

[0473] 结果在图1中报道。

[0474] 图显示,配方食品中铁含量越高,用该配方食品喂养的婴儿的髓鞘形成轨迹越接近于仅用人类母乳喂养所提供的轨迹。

[0475] 表3:



|        |   |                  |                  |
|--------|---|------------------|------------------|
| [0476] |   | 配方食品 5<br>(低锌含量) | 配方食品 1<br>(高锌含量) |
|        | 锌 | 4.23mg/100g      | 7.25mg/100g      |

[0477] 结果在图4中报道。

[0478] 图显示,配方食品中锌含量越高,用该配方食品喂养的婴儿的髓鞘形成轨迹越接近于仅用人类母乳喂养所提供的轨迹。

[0479] 基于实验部分中所报道的结果,已经证明,包含矿物质或其混合物的营养组合物在用这种组合物喂养的婴儿中决定脑中的髓鞘形成轨迹是最佳的(接近于通过人类母乳喂养所决定的轨迹)。如上面所论述的,据信脑髓鞘形成中的这种最佳轨迹对应于婴儿认知能力的有效改善,匹配母乳喂养的婴儿的能力以及平衡用矿物质含量低的配方食品喂养的婴儿中所显示的那些认知能力的缺乏。

[0480] 实施例3

[0481] 神经元与OL的共培养

[0482] 如先前由Charles等人,2000年所述培养神经元/少突胶质细胞。

[0483] 颈脱位法处死妊娠17天的怀孕雌性大鼠(Wistar大鼠)并从子宫中取出胎儿。取出前脑并置于含有2%青霉素-链霉素(PS)和1%牛血清白蛋白(BSA)的冰冷Leibovitz培养基(L15)中。通过在37℃下胰蛋白酶消化20分钟(胰蛋白酶EDTA 1X)解离前脑。通过添加含有DNA酶I等级II(0.1mg/ml)和10%胎牛血清(FCS)的Dulbecco改良伊格尔培养基(DMEM)来终止反应。然后通过10ml吸管吸入挤出3次将细胞机械解离。然后将细胞在4℃温度下以 $180 \times g$ 在L15培养基中的一层BSA(3.5%)上离心10分钟。弃去上清液,并将沉淀细胞重悬于含有10%FCS的DMEM中。然后将细胞在4℃下以 $515 \times g$ 离心10分钟。弃去上清液,并将沉淀细胞重悬于由补充有2%的B27、2mM的L-谷氨酰胺(L-Glu)、2%的PS溶液、1%的FCS和10ng/ml的血小板衍生生长因子(PDGF-AA)的基础培养基组成的培养基中。利用台盼蓝拒染测试在Neubauer细胞计数器中对活细胞进行计数。将细胞以20000个细胞/孔的密度接种在用聚-L-赖氨酸和层粘连蛋白预包被的96孔板中。

[0484] 接种后一天(培养的第1天),将细胞与测试化合物(选自表3中列出的那些)或雌二醇一起温育。对照细胞不与测试化合物或雌二醇一起温育。雌二醇用作阳性对照。已知雌二醇可诱导OPC增殖。雌二醇对OL分化的正面作用也已被证实,对早期髓鞘形成过程也有影响。还公布了雌二醇对神经突生长的正面影响(综述请参见Alevaro等,2010)。

[0485] 在加湿的培养箱中,在空气(95%)-CO<sub>2</sub>(5%)的气氛中将平板维持在37℃。每隔一天用新鲜培养基和测试化合物或对照化合物替换一半培养基。测试化合物或对照化合物在实验期间维持在限定的浓度。在1个培养物上测试化合物(每个条件6个孔)。然后在培养的第12、18或30天使用细胞来测量OPC增殖、OPC分化为OL以及早期髓鞘形成过程(髓鞘包裹),或者OL成熟(髓鞘成熟)和成熟髓鞘形成过程(髓鞘包裹)。

[0486] OPC的增殖-测量A2B5阳性细胞和总轴突长度(NF)

[0487] 在培养的第12天,将细胞用无水乙醇(95%)和纯乙酸(5%)的冷混合物固定5分钟。然后使细胞透化,并用含有0.1%皂角苷和1%FCS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液在室温下封闭非特异性位点15分钟。

[0488] 然后将细胞与小鼠中产生的单克隆抗-A2B5缀合的alexafluor®488(1/200稀释于

含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中)在室温下温育2小时,并与兔中产生的抗-NF (Neurofilament 200,磷酸化的和非磷酸化的)(1/500稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中),在室温下温育2小时。在室温下用Alexa Fluor 568山羊抗兔(1/400稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中)显影该抗体1小时。

[0489] 定量OPC的总数量(A2B5阳性细胞的数量)(以评价增殖),测量轴突网络(总轴突长度(NF))以评估化合物对神经元网络的作用(髓鞘形成的质量与轴突网络的质量直接相关)。

[0490] OPC分化为OL以及髓鞘形成过程(髓鞘包裹)-测量MAG阳性细胞的数量和面积、重叠MAG/NF包裹以及总轴突长度(NF)

[0491] 在培养的第18天,将细胞用无水乙醇(95%)和纯乙酸(5%)的冷混合物固定5分钟。然后使细胞透化,并用含有0.1%皂角苷和1%FCS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液在室温下封闭非特异性位点15分钟。

[0492] 然后将细胞与小鼠中产生的单克隆抗-MAG(1/400稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中),以及与兔中产生的抗-NF (Neurofilament 200,磷酸化的和非磷酸化的)(1/500稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中),在室温下温育2小时。在室温下用CF 488A山羊抗小鼠(1/800稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中)和Alexa Fluor 568山羊抗兔(1/800稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中)显影1小时。

[0493] 定量OL的总数量(MAG阳性细胞的数量和面积)(以评价分化过程),以及轴突周围的OPC包裹(重叠MAG/NF包裹)(髓鞘形成过程)。测量轴突网络(总轴突长度(NF))以评估化合物对神经元网络的作用。

[0494] OL的成熟(髓鞘成熟)-测量MBP阳性细胞的数量和面积、重叠MBP/NF包裹以及总轴突长度(NF)

[0495] 在培养的第30天,将细胞用无水乙醇(95%)和纯乙酸(5%)的冷混合物固定5分钟。然后使细胞透化,并用含有0.1%皂角苷和1%FCS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液在室温下封闭非特异性位点15分钟。

[0496] 然后将细胞与小鼠中产生的单克隆抗-MBP(1/1000稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中),以及与兔中产生的抗-NF (Neurofilament 200,磷酸化的和非磷酸化的)(1/500稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中),在室温下温育2小时。在室温下用CF 488A山羊抗小鼠(1/800稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中)和Alexa Fluor 568山羊抗兔(1/400稀释于含有1%FCS、0.1%皂角苷的PBS中)显影1小时。

[0497] 评估OL的总数量(MBP阳性细胞的数量和面积)(以评价OL成熟)以及轴突周围的髓鞘包裹(重叠MBP/NF(包裹))。测量轴突网络(总轴突长度(NF))以评估化合物对神经元网络的作用。

[0498] 对于所有测量,一旦培养完成(每个条件6个孔)。对于每个测试条件,用配有LED灯(激发波长360/480/565和发射波长460/535/620)的20倍放大倍率的ImageXpress(分子仪器公司(Molecular devices))每个孔采集30张图片(每张图片代表一个视场)并进行分析。自动获取30张照片,代表培养孔总表面的80%。

[0499] 结果以每个视场的神经突网络、或标记了给定标志物(MAG或MBP)的髓鞘的累计平均长度(单位为 $\mu\text{m}$ )表示。测量NF与MAG或MBP之间的重叠面积以评价包裹。

[0500] 为了评估OPC群体、MAG阳性细胞群体、MBP阳性细胞群体,对每个图片(=视场)的阳性细胞数量进行自动计数。结果以每个视场的平均阳性细胞数量表示。

[0501] 所有的图像都是在相同的条件下获取的。

[0502] 表3

[0503]

|                    |
|--------------------|
| 板 1 (A2B5/NF)      |
| 对照                 |
| 雌二醇(150nM)         |
| DHA (0.15 $\mu$ M) |
| DHA (1.5 $\mu$ M)  |
| 硬脂酸(50 $\mu$ M)    |
| 硬脂酸(5 $\mu$ M)     |
| 硬脂酸(0.5 $\mu$ M)   |
| B12 (100nM)        |
| B12 (10nM)         |
| B12 (1nM)          |
| 叶酸(250nM)          |
| 叶酸(50nM)           |
| 叶酸(6nM)            |
| 胆碱(20 $\mu$ M)     |
| 铁(1 $\mu$ M)       |
| 铁(0.1 $\mu$ M)     |

[0504]

|                                                 |
|-------------------------------------------------|
| 锌(5 $\mu$ M)                                    |
| 锌(0,5 $\mu$ M)                                  |
| 磷(5mM)                                          |
| 磷(1mM)                                          |
| 镁(25mM)                                         |
| 铜(0,5mM)                                        |
| 磷脂酰胆碱(100 $\mu$ M)                              |
| 磷脂酰肌醇(5 $\mu$ M)                                |
| 磷脂酰肌醇(50 $\mu$ M)                               |
| 磷脂酰丝氨酸(5 $\mu$ M)                               |
| 磷脂酰丝氨酸(10 $\mu$ M)                              |
| 磷脂酰丝氨酸(100 $\mu$ M)                             |
| 鞘磷脂(5 $\mu$ M)                                  |
| 鞘磷脂(25 $\mu$ M)                                 |
| 神经酰胺 (脑提取物) : DPPC (1:4)                        |
| 半乳糖神经酰胺(C18:1/24:1)/(C18:1/18:0):DPPC (1:4)     |
| 葡萄糖神经酰胺(C18:1/24:1)/(C18:1/18:0):DPPC (1:4)     |
| D-赤式-二氢神经酰胺(C24:1/18:0)/(C18:0/18:1):DPPC (1:4) |
| 神经酰胺-1-磷酸(C18:1/24:0):DPPC (1:4)                |
| GM3:DPPC (1:4)                                  |
| GD3:DPPC (1:4)                                  |

[0505] 结果示于图4至图24中。

[0506] 实施例4[0507] 材料和方法[0508] 1. 饲养层制备: 新生儿皮质的解离以及混合胶质细胞培养物的维持

[0509] 将新鲜解剖的脑加入37℃水浴中3分钟, 然后通过P1000吸管尖将皮质切成小块。每个脑添加75 $\mu$ L的OPC木瓜蛋白酶溶液, 然后将组织在37℃水浴中温育20分钟。然后向该组织悬浮液中添加混合神经胶质细胞培养物以让OPC木瓜蛋白酶溶液失活。

[0510] 随后使用无菌火焰抛光玻璃巴斯德吸管研磨组织, 然后每个脑添加4mL混合神经胶质细胞培养基。将细胞以1200rpm (约300g) 离心5分钟, 然后将细胞重悬于温热的混合神经胶质细胞培养基中并平板接种于PLL包被的烧瓶中。

[0511] 平板接种4小时后, 进行完全培养基更换以除去由研磨引起的大部分碎片, 并促进培养物活力。培养3天后, 进行2/3培养基更换, 并且不进行后续的培养基更换。然后将细胞维持在培养物中直至汇合。

[0512] 2. 海马神经元的制备

[0513] 从Sprague Dawley大鼠的胚胎(E18) 幼仔中分离海马神经元。简而言之, 在动物处死后, 分离脑, 从大脑半球的内侧面移除脑膜, 然后解剖出海马体并保持在4℃直至过程完成。

[0514] 然后将组织与2.5%胰蛋白酶在37℃水浴中温育15分钟, 然后轻轻洗涤并保存在

培养基中。通过用功能化的无菌巴斯德吸管反复吸取它们进行海马体解离。机械解离后,将细胞以所需密度平板接种于神经元平板培养基中,让其恢复4小时,然后放入完全神经元培养基中。

[0515] 3.从混合神经胶质细胞培养物纯化OPC以建立OL/海马神经元共培养物

[0516] 在混合神经胶质细胞培养的第9天,将烧瓶在5%CO<sub>2</sub>组织培养箱中在轨道摇床上以50rpm振摇45分钟。这种振摇的目的是从单层上移除任何松散粘附的污染细胞。

[0517] 然后更换培养基,并用补充有5μg/mL胰岛素的4mL新鲜混合神经胶质细胞培养基代替。然后将烧瓶重新置于摇床上,平衡大约3小时,然后以220rpm振摇大约160小时(过夜)。

[0518] 第二天早晨,收集含有小神经胶质细胞和OPC细胞的混合神经胶质细胞培养基,并将其预平板接种于P100培养皿中(未经培养处理)30分钟以纯化OPC细胞;小神经胶质细胞立即开始粘附于培养皿,而OPC细胞仍留在上清液培养基中。

[0519] 预平板接种30分钟后,收集培养基,对OL进行计数并接种于最终体积为1mL的OL培养基中的海马神经元上。

[0520] 进行完全的OL培养基(无CNTF)更换,然后将细胞维持在培养物中直至适当的实验时间。

[0521] 对于成熟实验,实验过程如下:

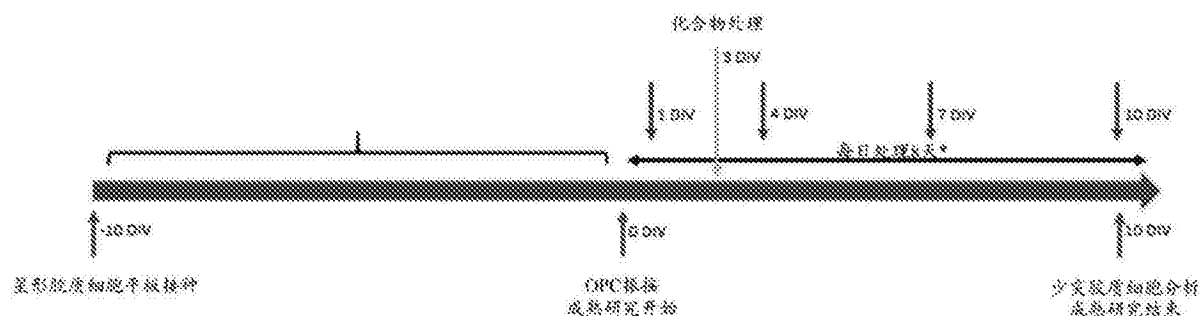
[0522] a.将OPC在星形胶质细胞饲养层上体外培养10天

[0523] b.分离OPC(第0天)

[0524] c.施用化合物(第3天)

[0525] d.在第4、7和10天定量评价成熟情况。

[0526]



[0527] 对于髓鞘形成实验,实验过程如下:

[0528] a.培养海马神经元直到神经网络完全成熟(体外培养14天)

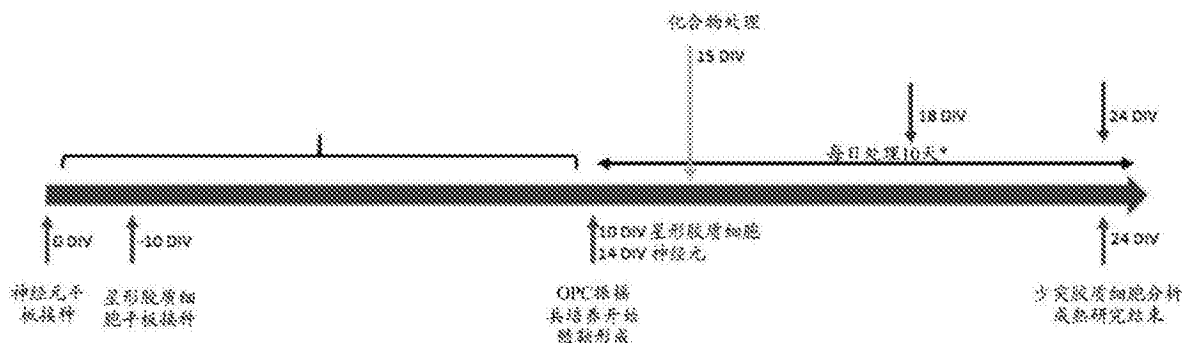
[0529] b.同期将OPC在星形胶质细胞饲养层上体外培养10天

[0530] c.分离OPC并与神经元共培养(第14天)

[0531] d.施用化合物(第15天)

[0532] e.在培养的第15天(共培养物平板接种后1天,在化合物处理前)、第18天、第21/23天和第28/29天定量评价髓鞘形成

[0533]



## [0534] 4. 图像采集

[0535] 将不同实验时间点的所有培养物在室温 (RT) 下固定于4%多聚甲醛和4%蔗糖中10分钟。在室温下将一抗和二抗施加于GDB缓冲液 (30mM磷酸盐缓冲液, pH 7.4, 含有0.2%明胶、0.5% Triton X-100和0.8M NaCl) 中2小时。将细胞用合适的标志物染色 (使用的一抗: 抗A2B5抗体 (ABCAM, 目录号为ab53521)、大鼠抗MBP (BIO-RAD, 目录号为aa82-87)、少突胶质细胞标记04抗体 (R&D Systems, 目录号为MAB1326)、抗- $\beta$ III微管蛋白mAb (Promega, 目录号为G7121); 使用的二抗: Alexa抗大鼠555 (Life Tech A-21434)、Alexa抗小鼠488 (Life Tech A-11009))。免疫细胞化学染色后, 用Array Scan XTI (ThermoScientific) 获得所有图像; 物镜为20x, 采用2x2的像素组合 (binning) 模式。对于每个条件和重复孔 (一式三份), 至少获取15张图像。

[0536] 为了分析所有获得的图像, 使用HCS Studio细胞分析软件, 特别是“Scan (扫描)”应用程序。

[0537] OPC木瓜蛋白酶溶液 (在MEM中制成)

[0538] 木瓜蛋白酶溶液1.54mg/mL

[0539] L-半胱氨酸360 $\mu$ g/mL

[0540] DNA酶I 60 $\mu$ g/mL

[0541] 混合的胶质细胞培养基 (在DMEM中制成)

[0542] FBS 10%

[0543] Pen/Strep (0.33%, 来自母液) 33个单位/mL的青霉素和33 $\mu$ g/mL的链霉素

[0544] GlutaMAX 1%

[0545] OL培养基

[0546] DMEM

[0547] 100X OL-补充剂

[0548] 牛胰岛素 (来自1mg/mL母液)

[0549] GlutaMAX

[0550] 全铁转铁蛋白 (来自33mg/mL母液)

[0551] B27补充剂

[0552] FBS

[0553] CNTF (来自50ng/ $\mu$ L母液)

[0554] 结果示于图26至图45中。

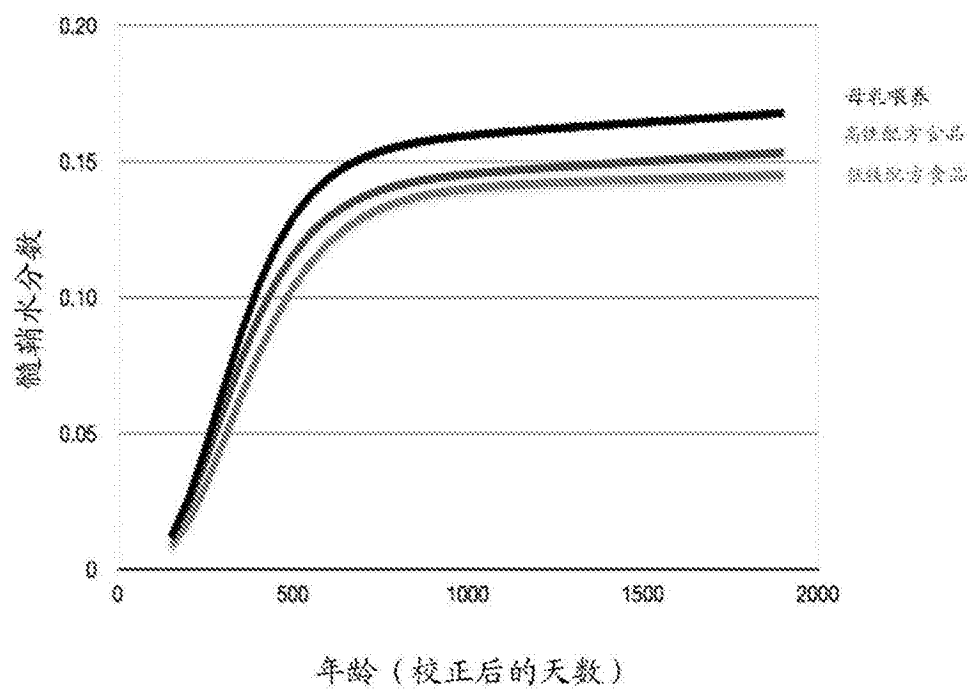


图1

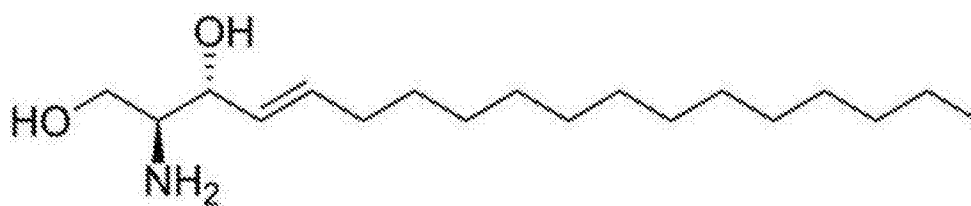


图2

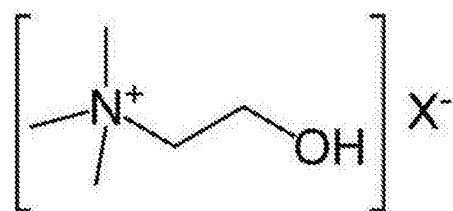


图3

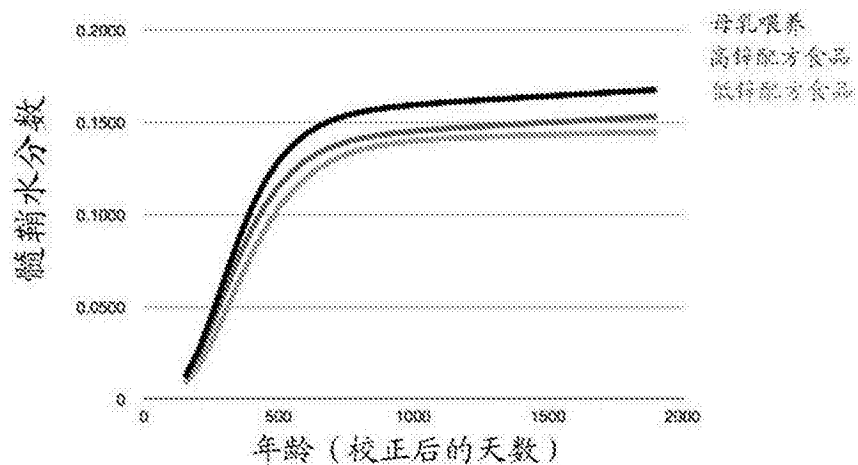


图4

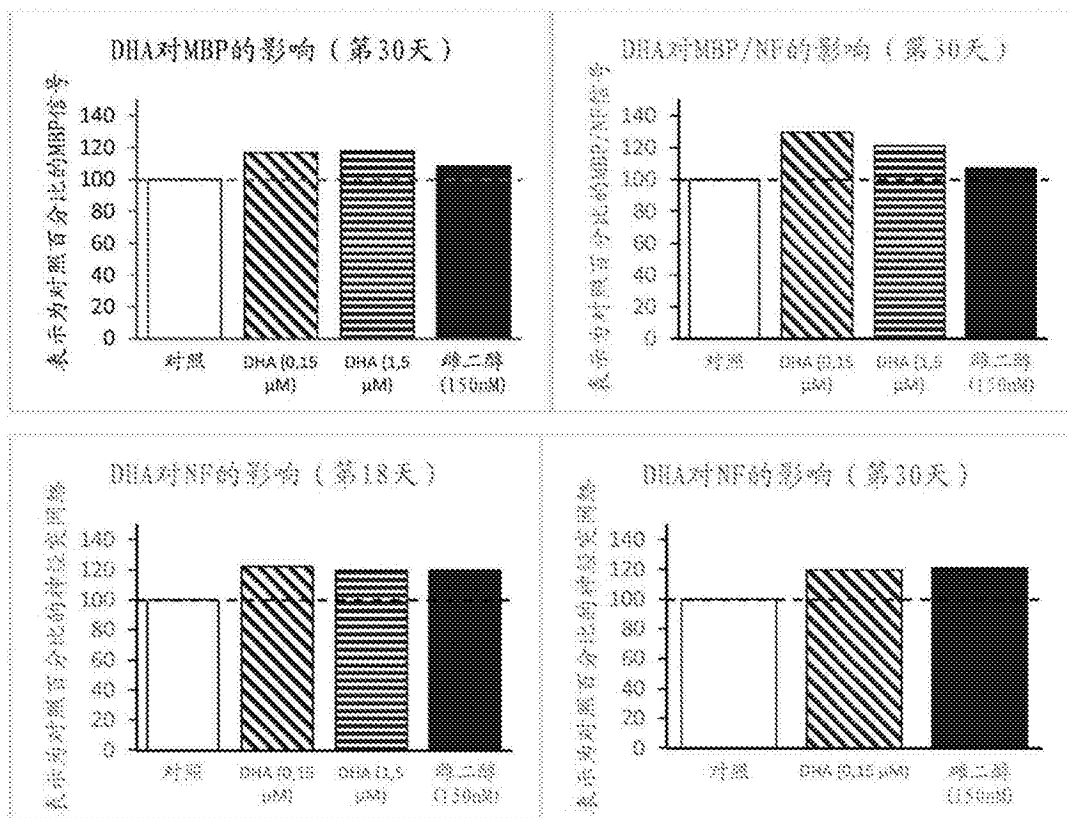


图4a



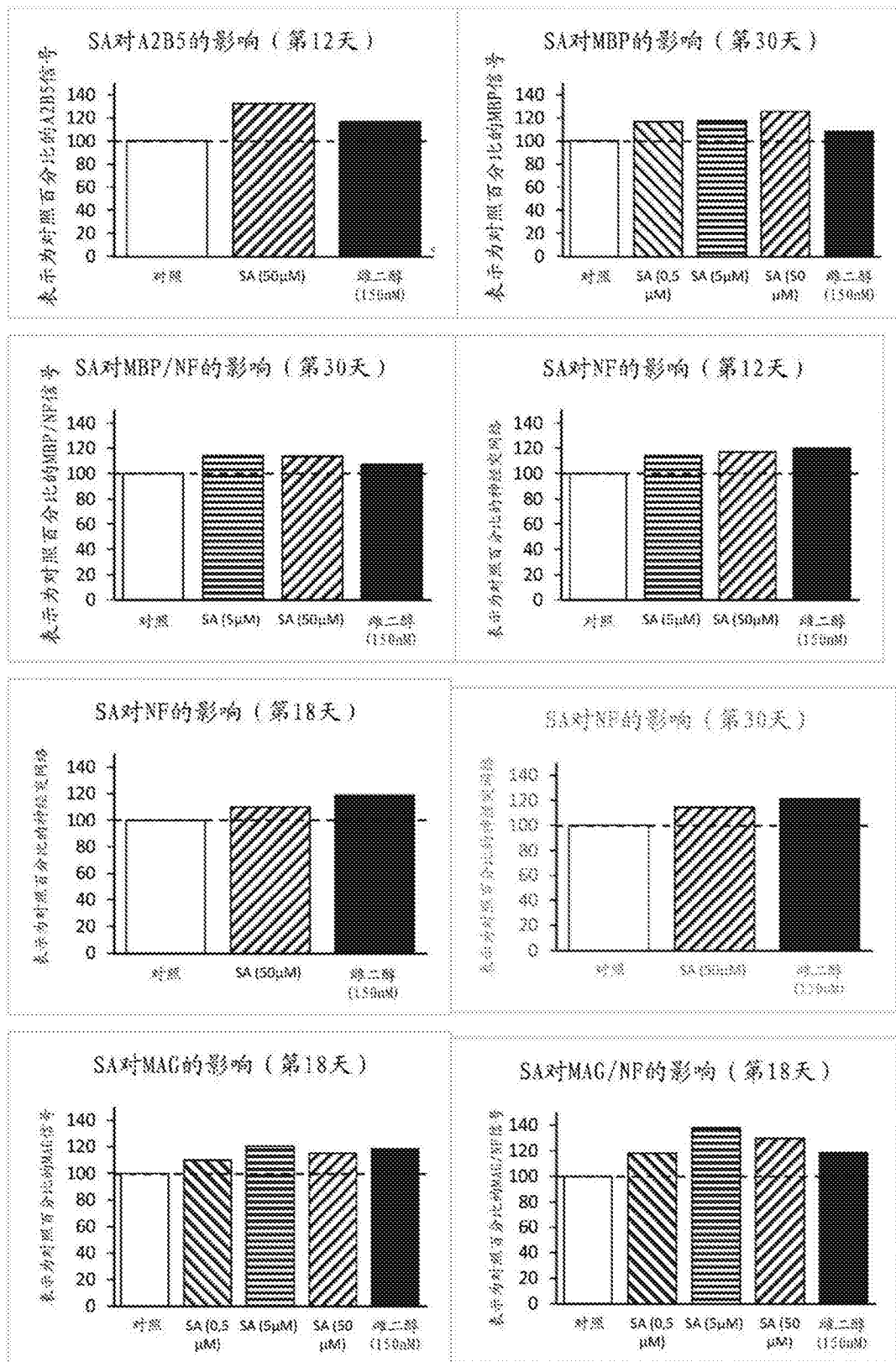


图5

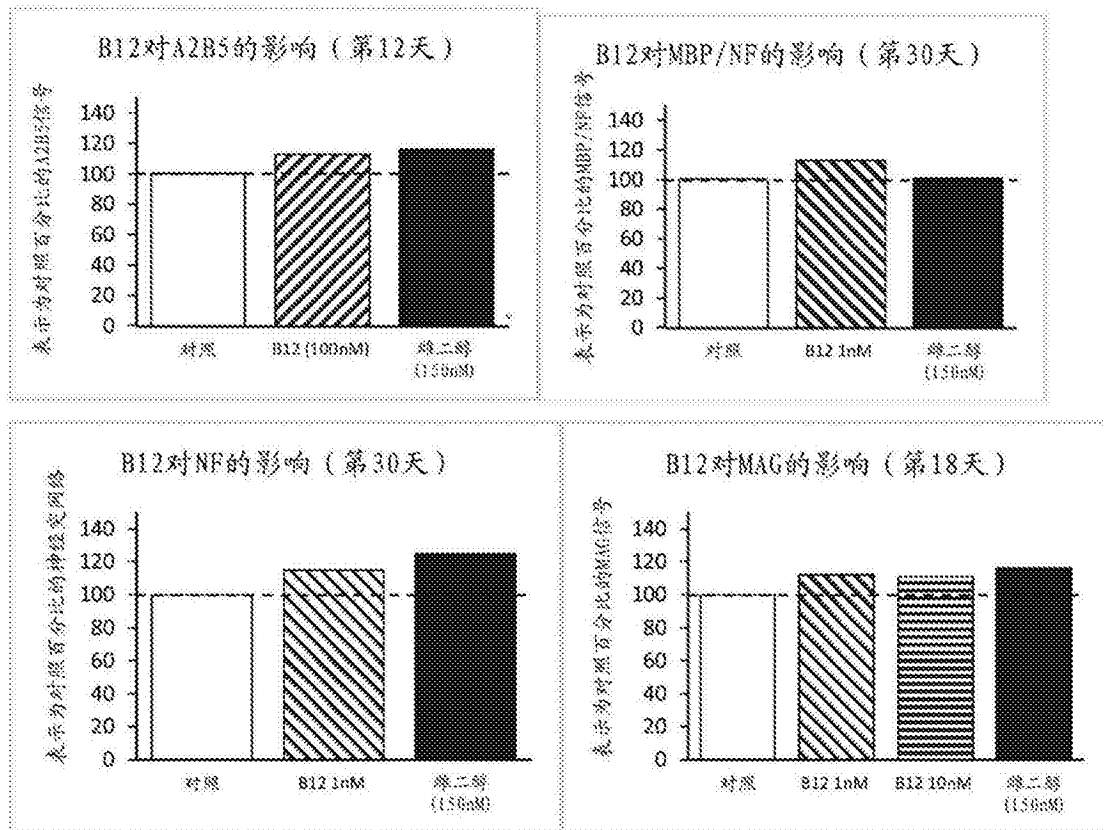


图6

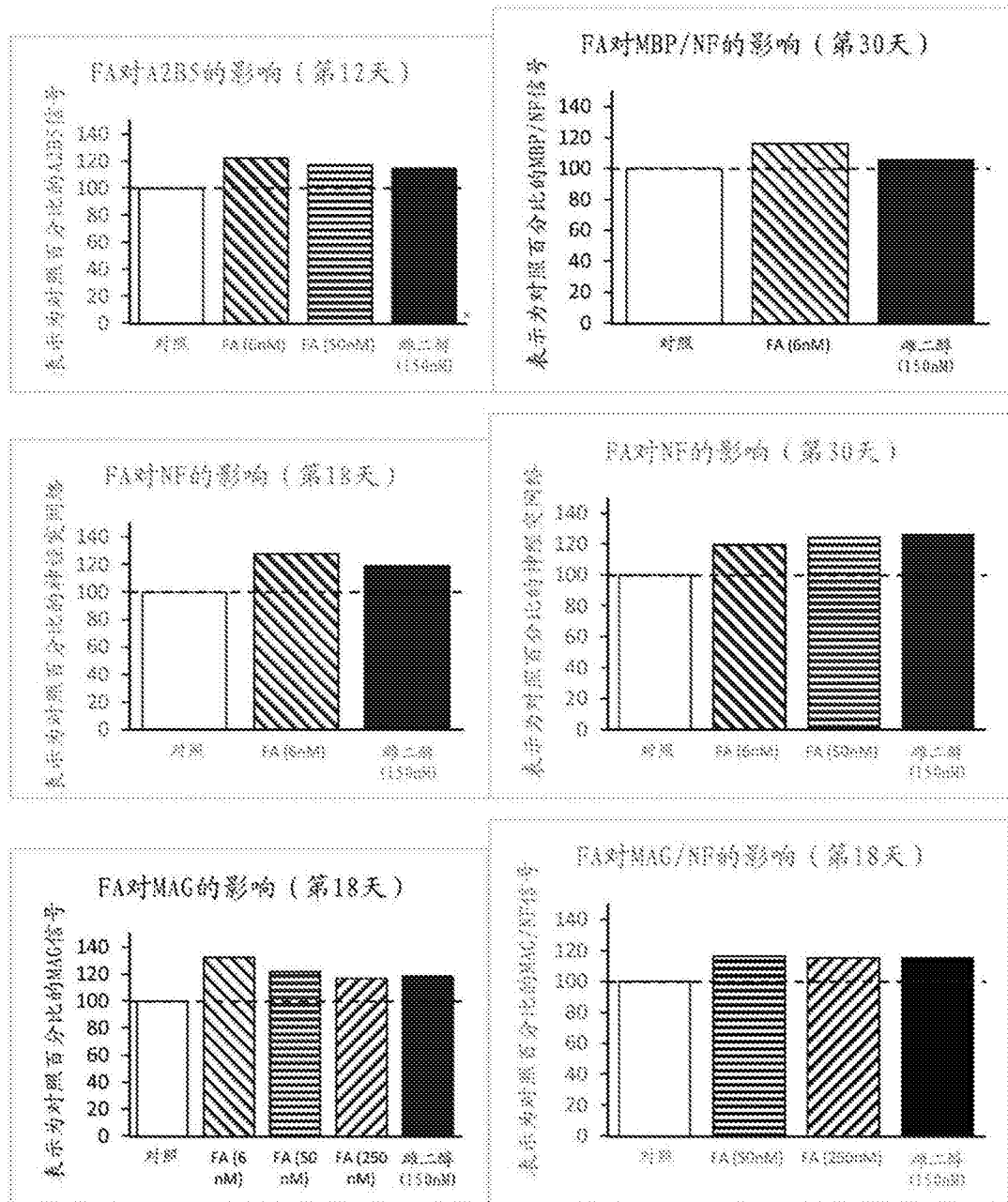


图7

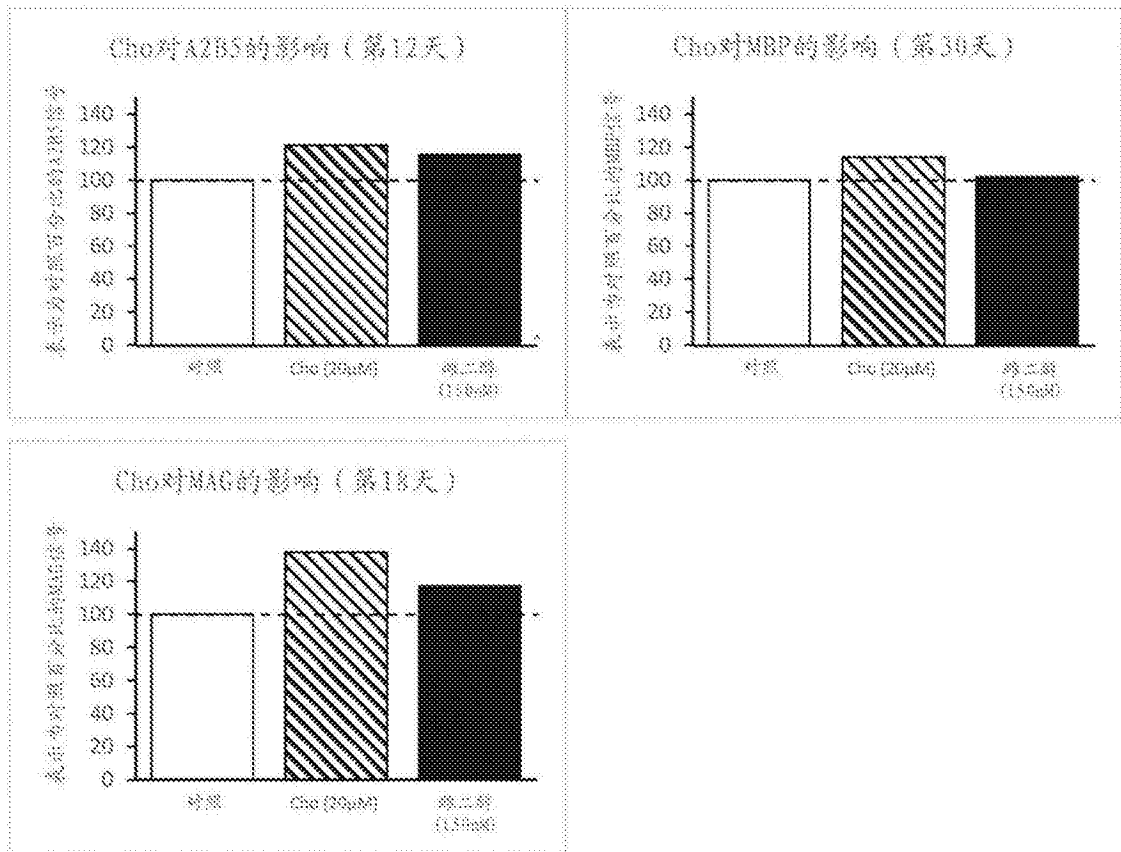


图8

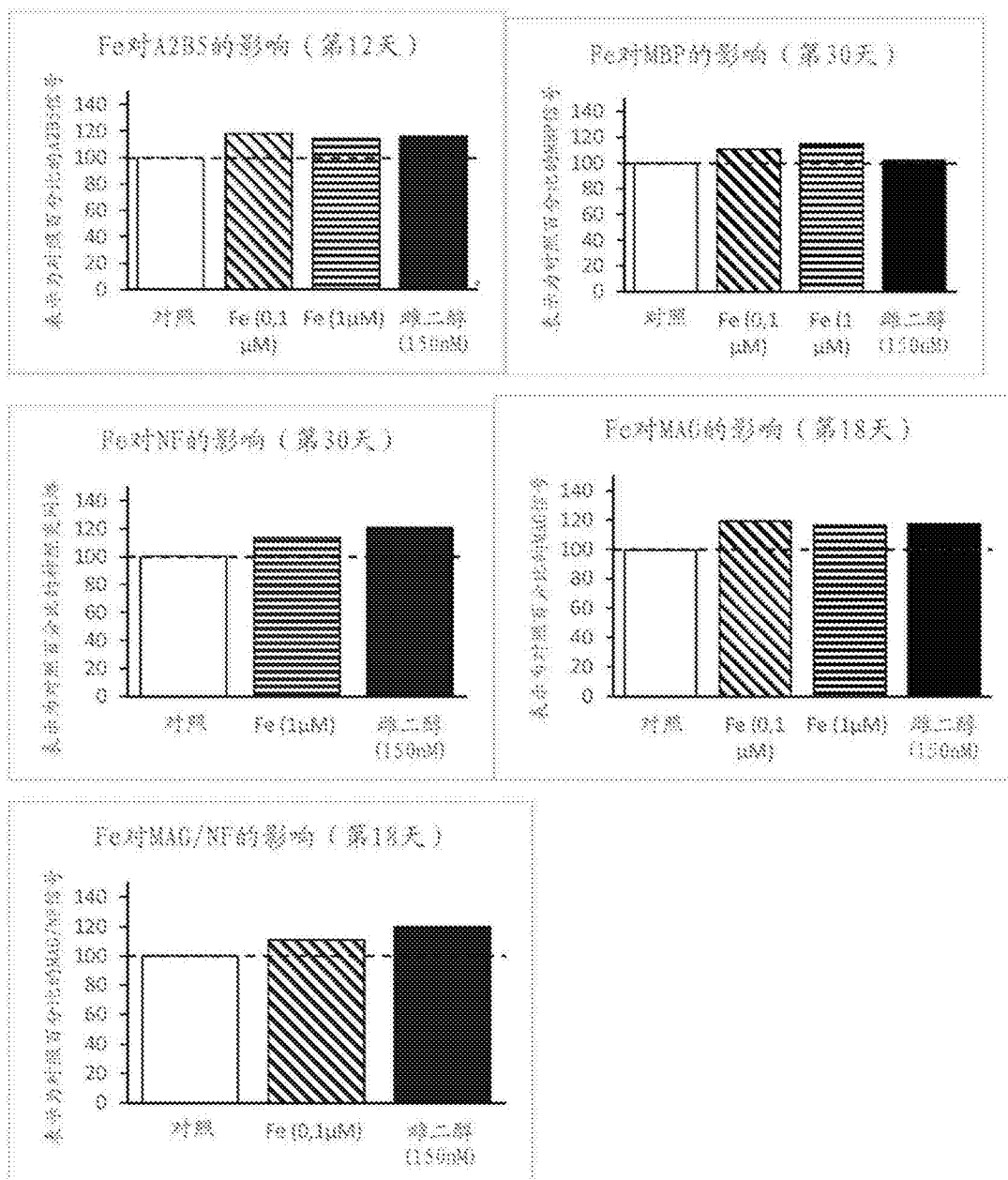


图9

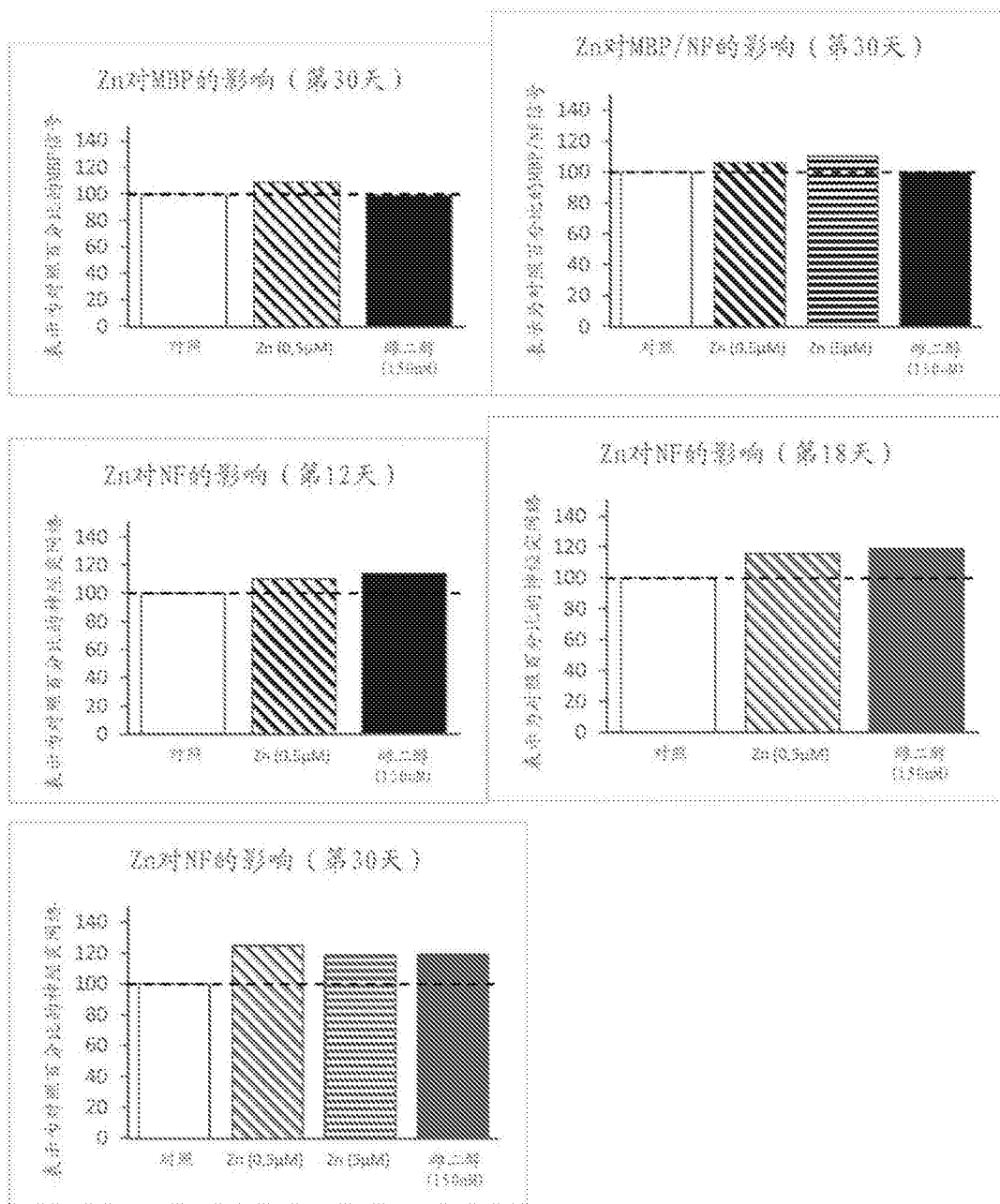


图10

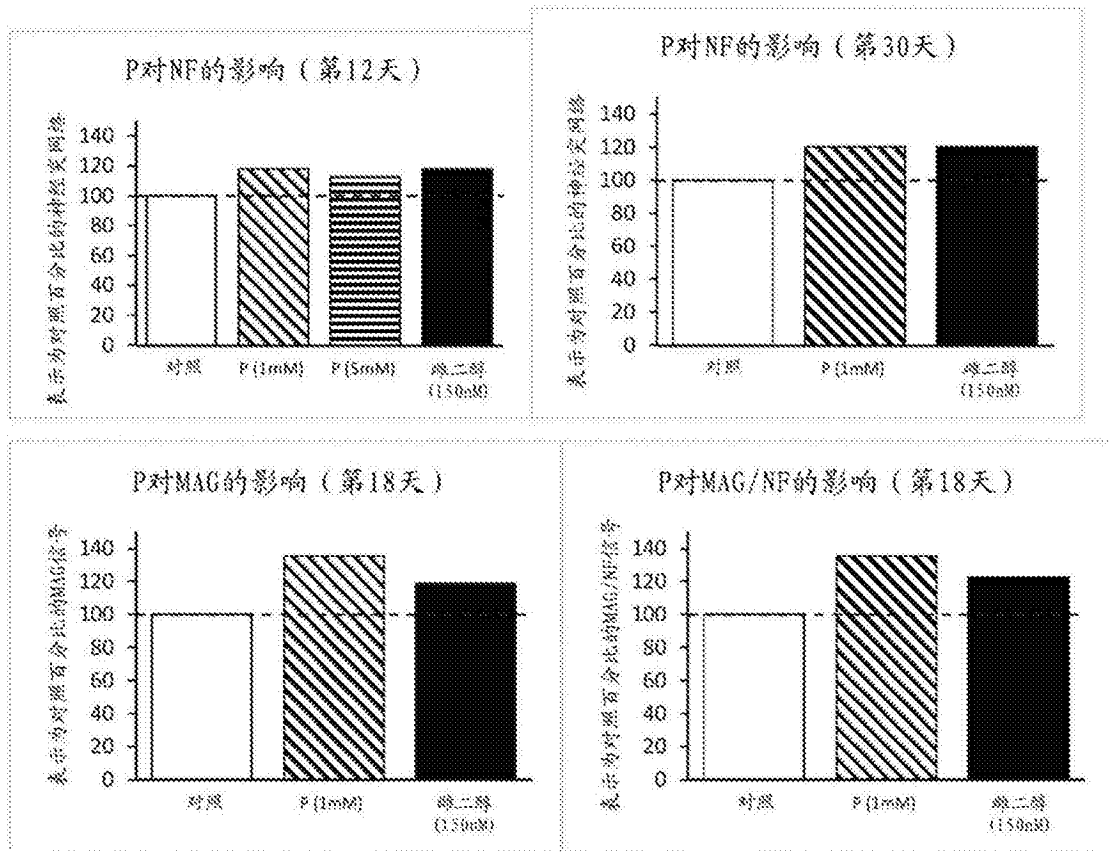


图11

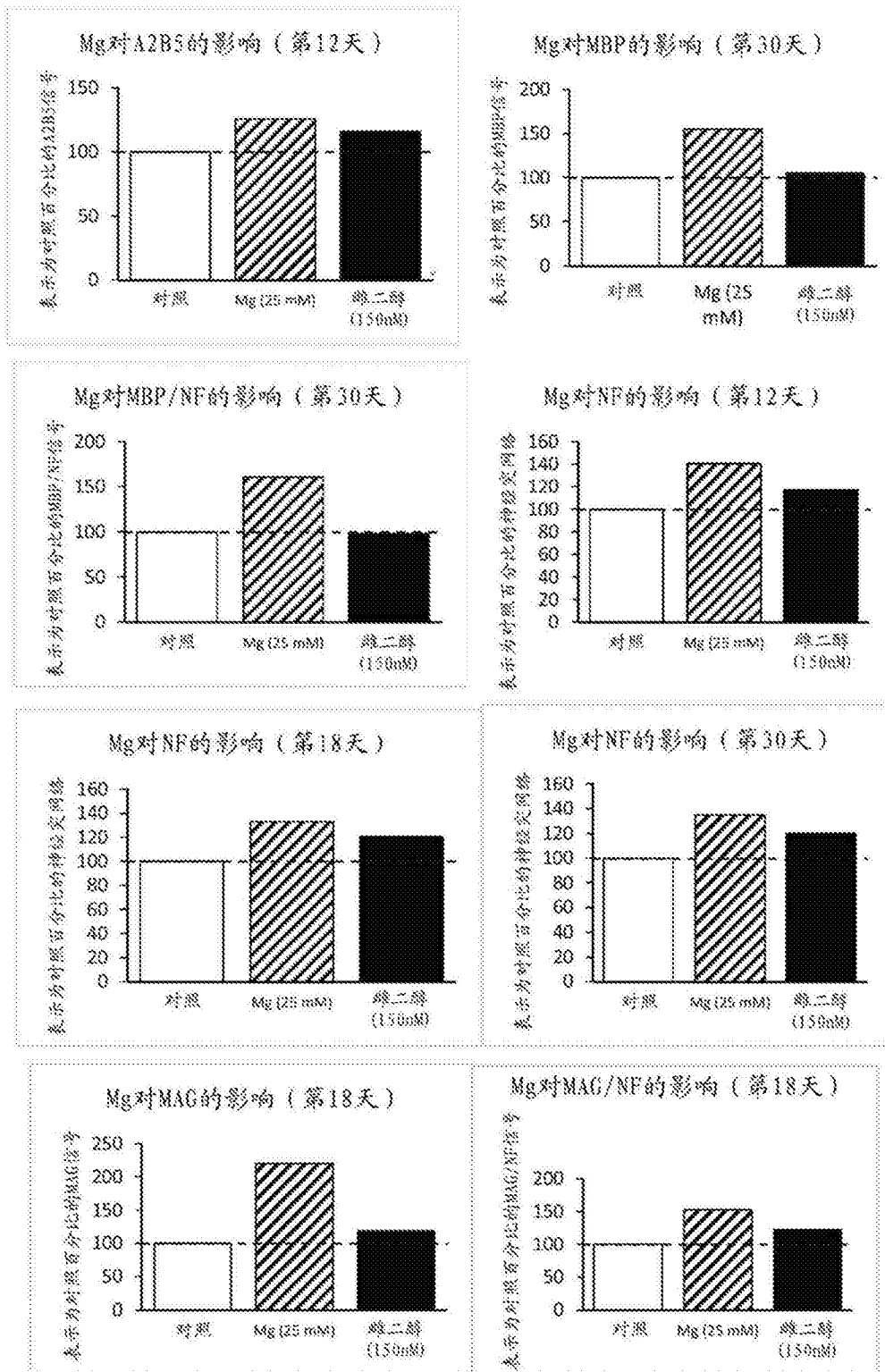


图12



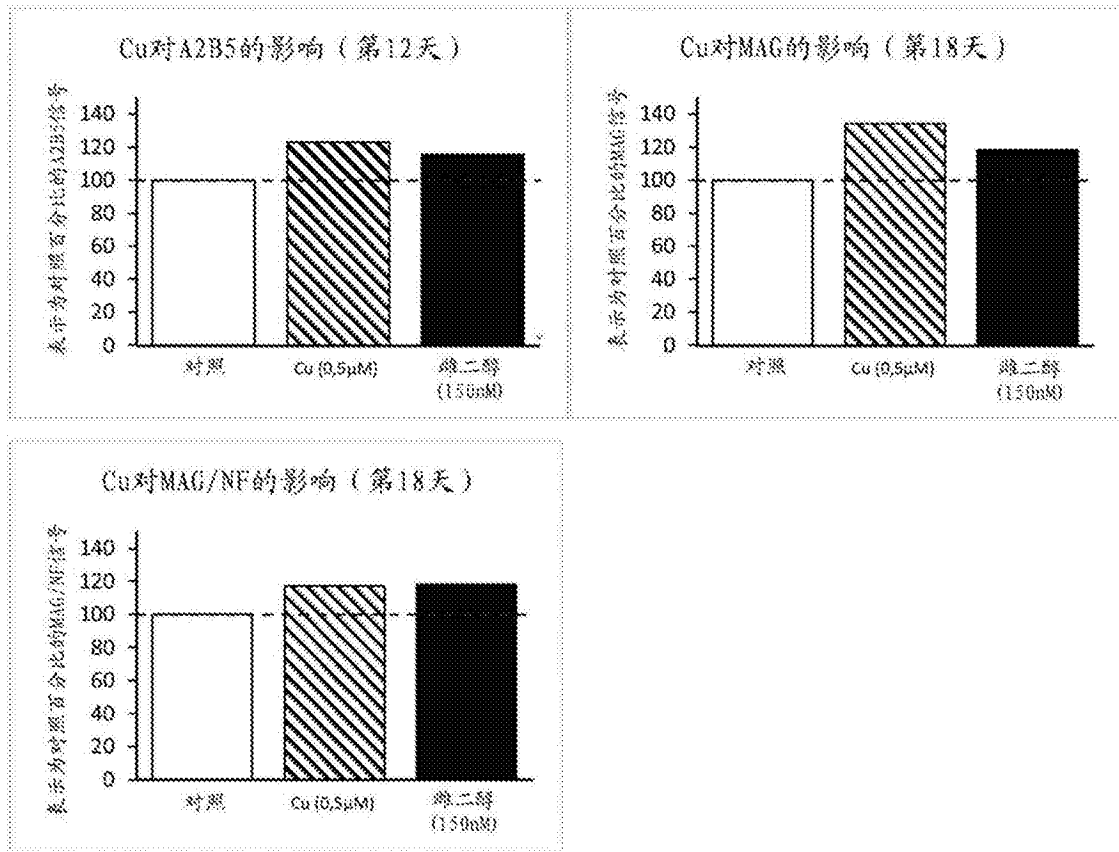


图13

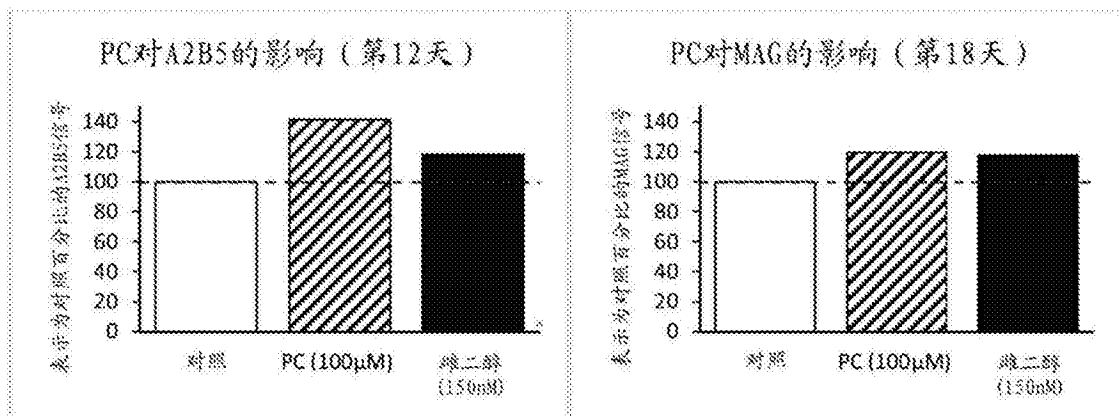


图14

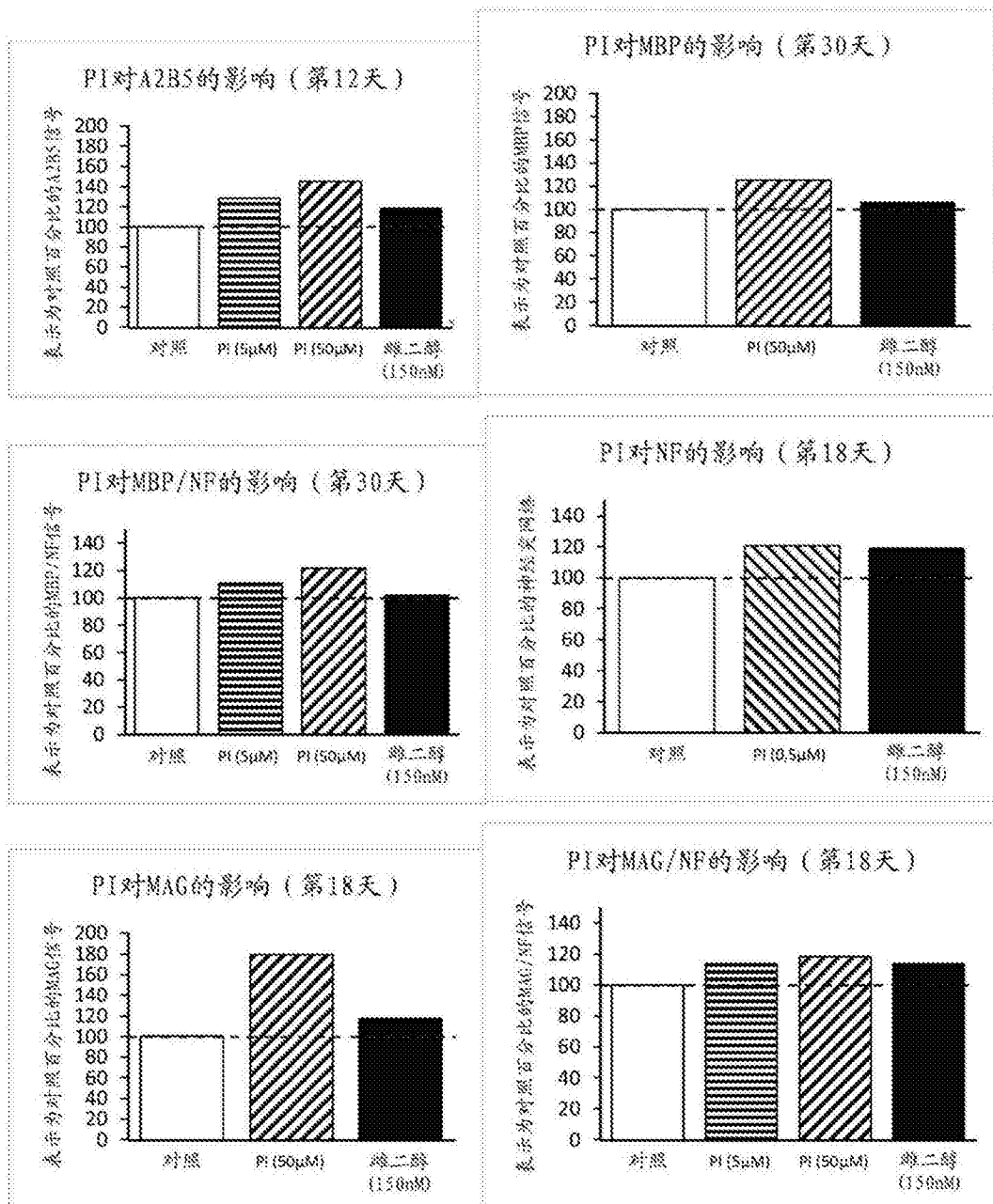


图15

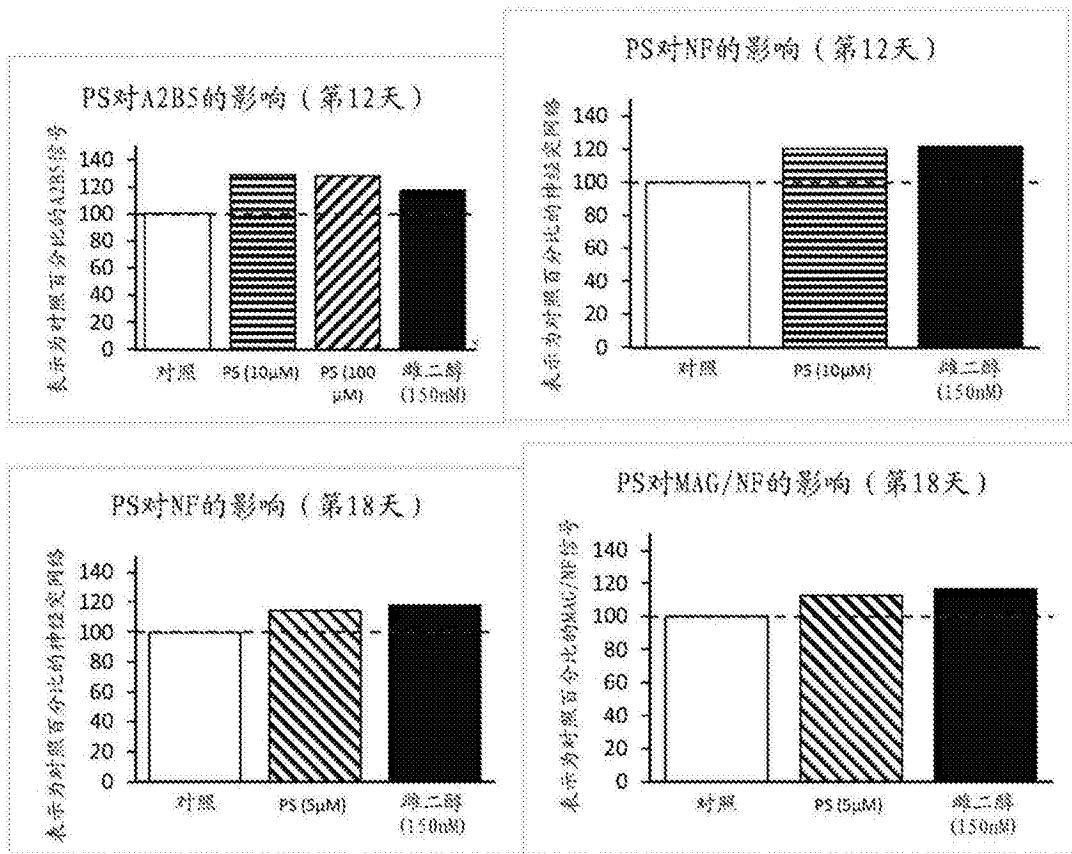


图16

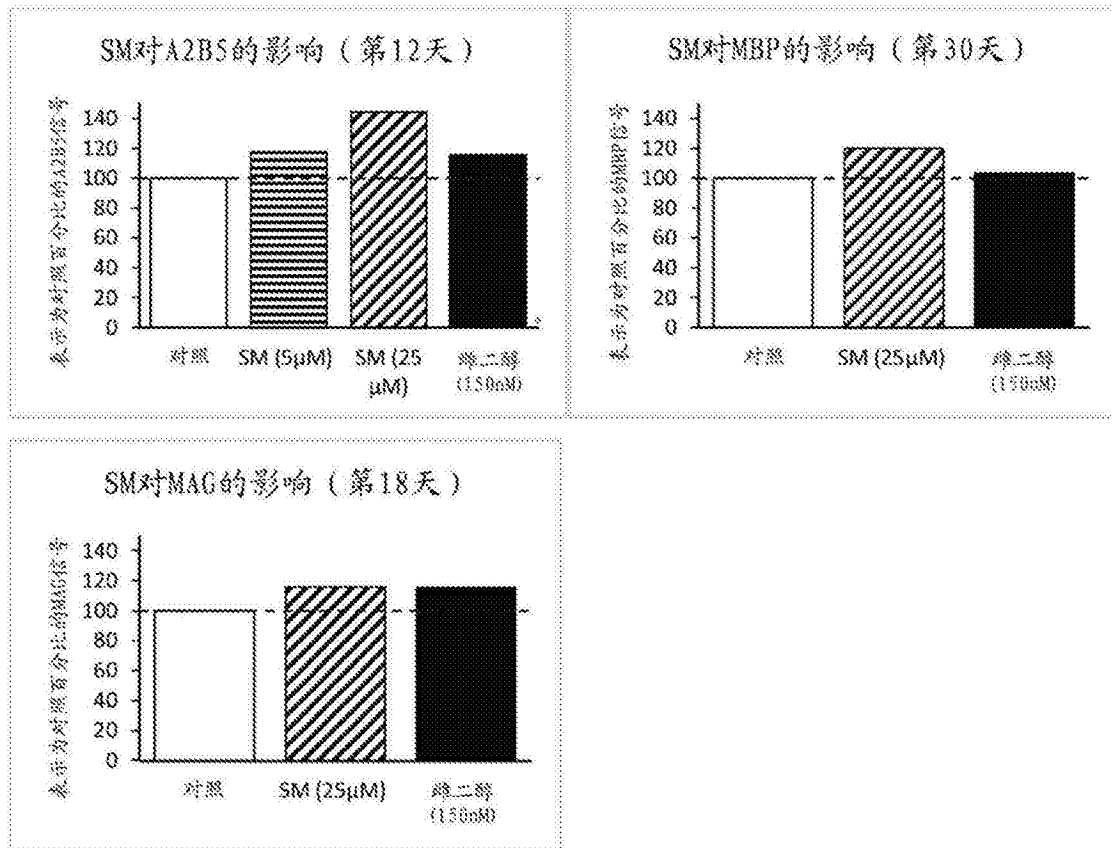


图17

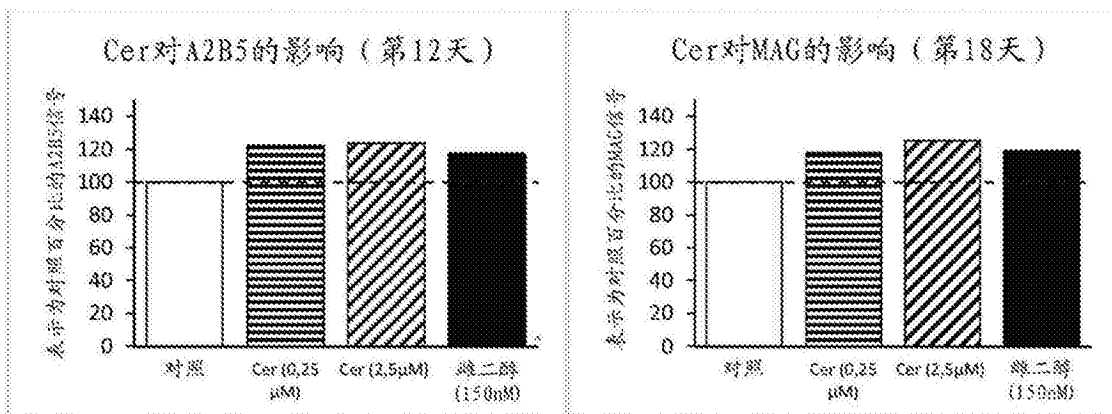


图18

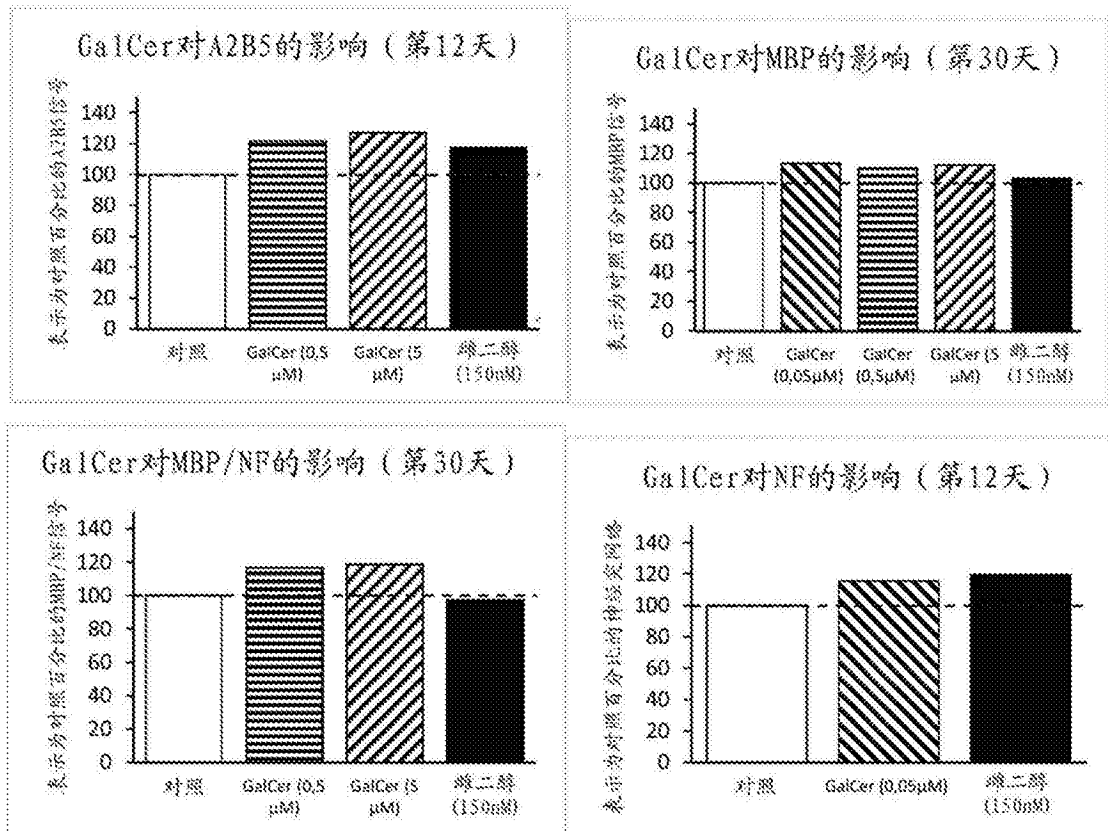


图19

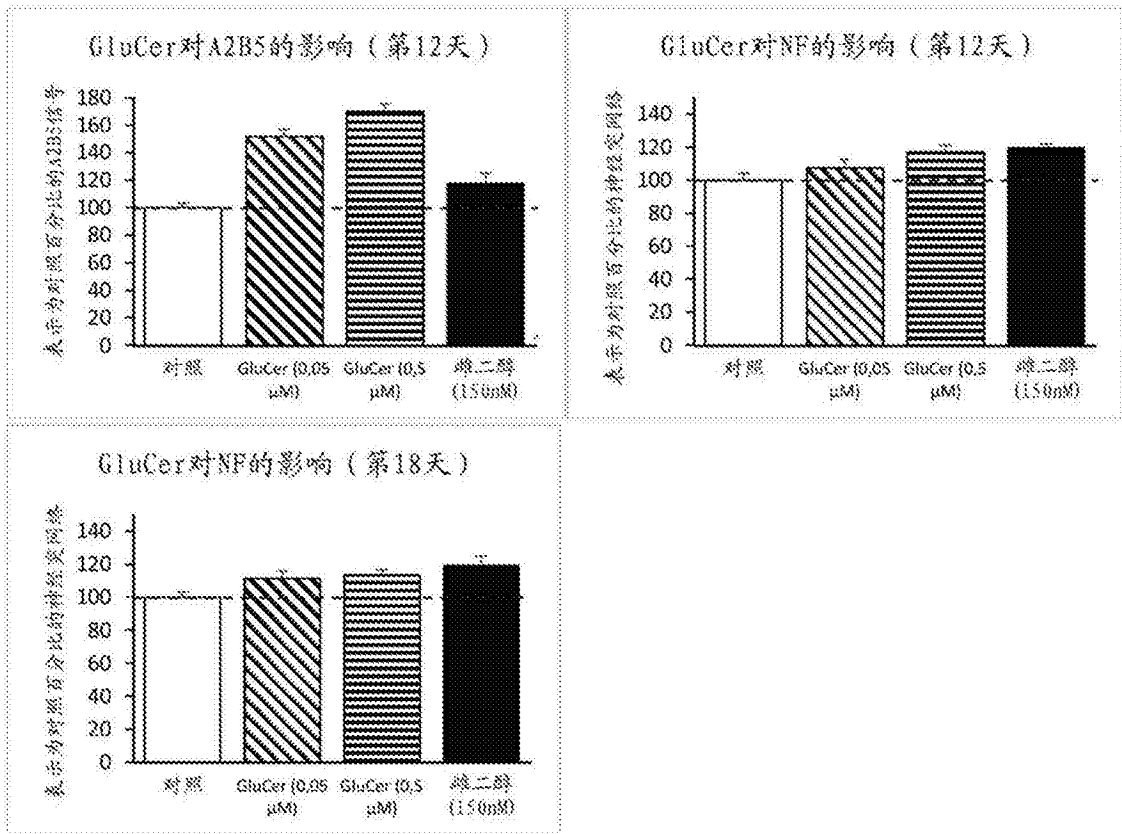


图20

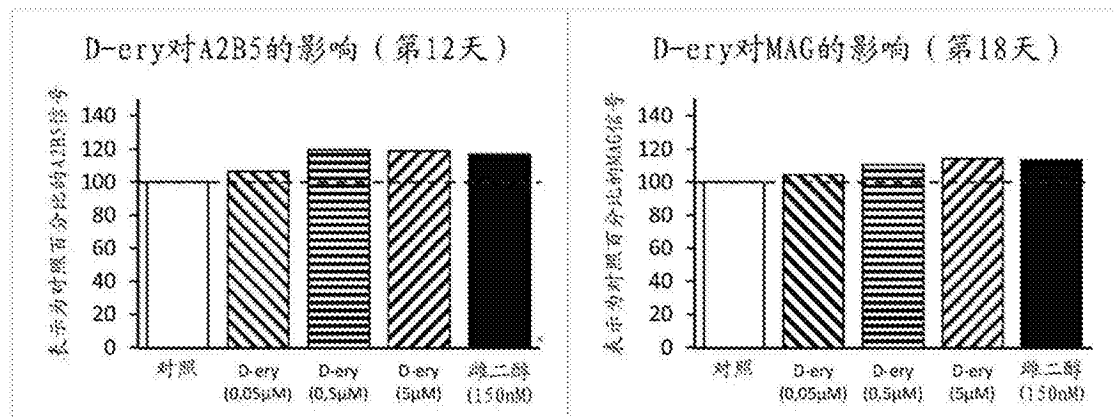


图21

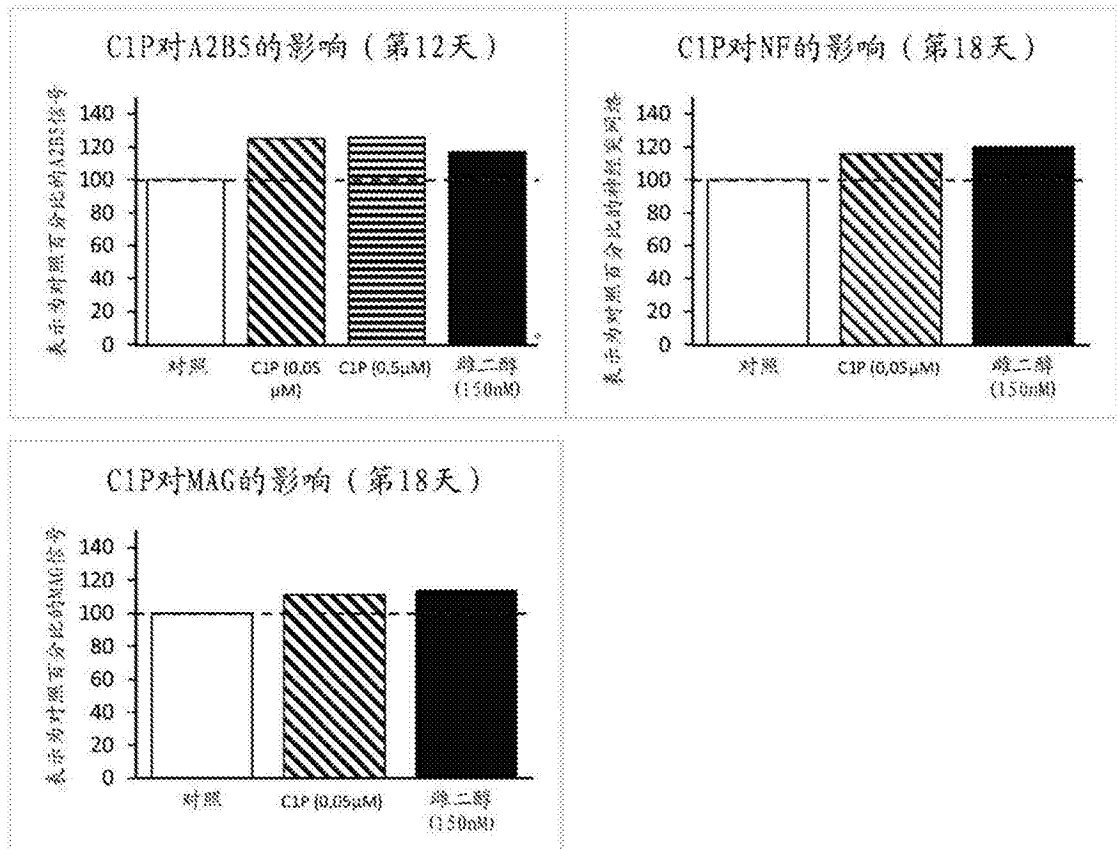


图22

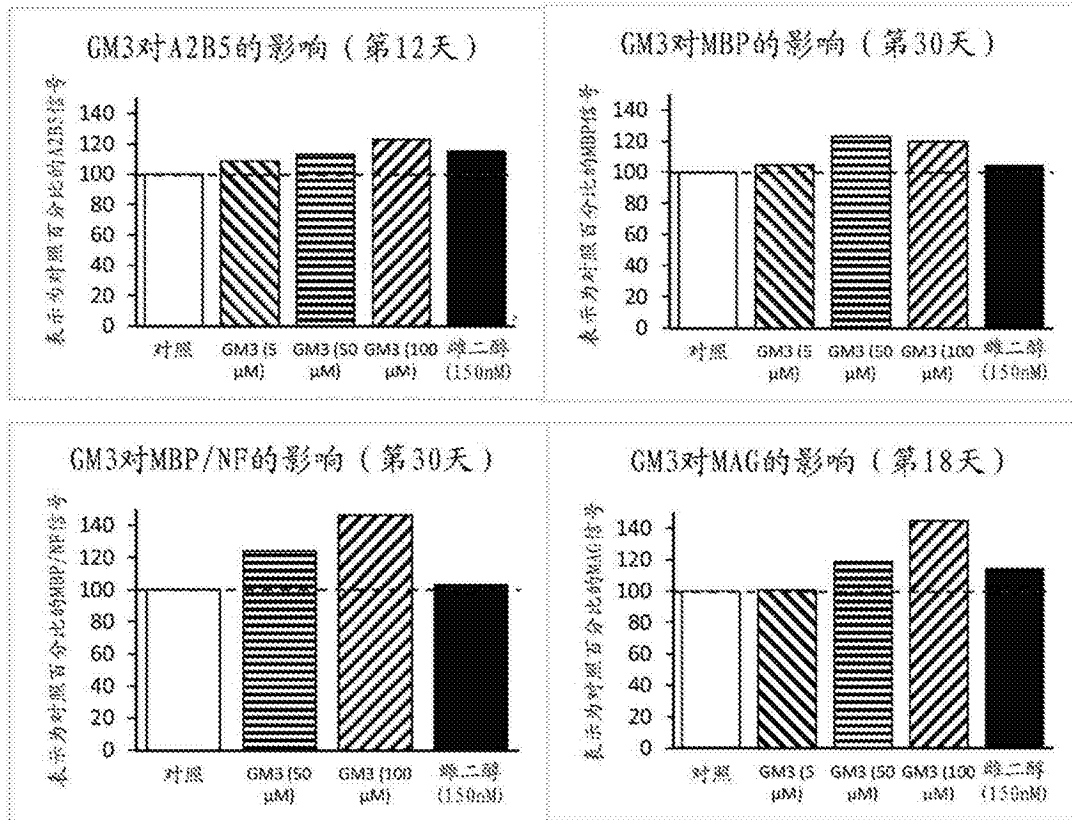


图23



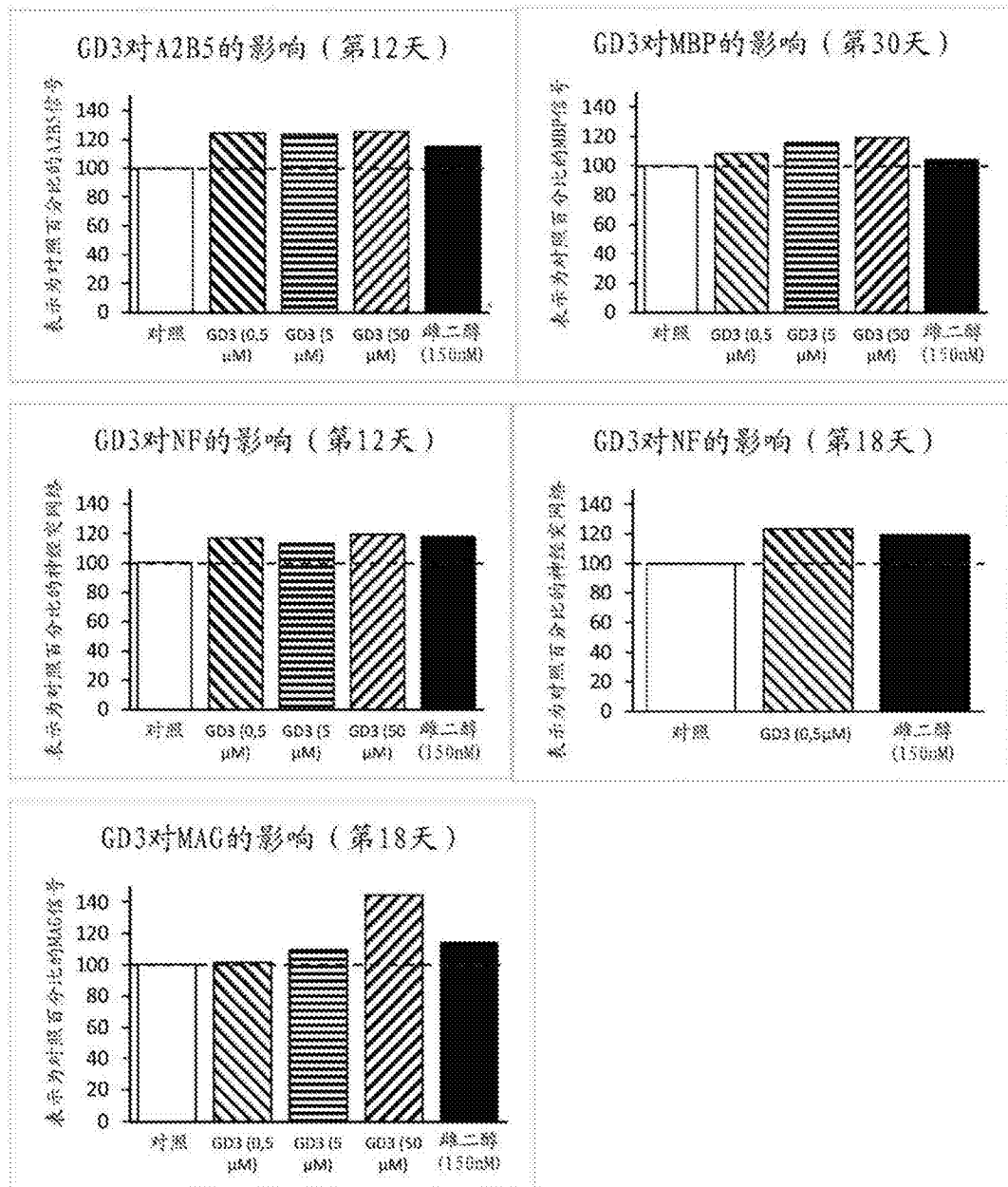


图24

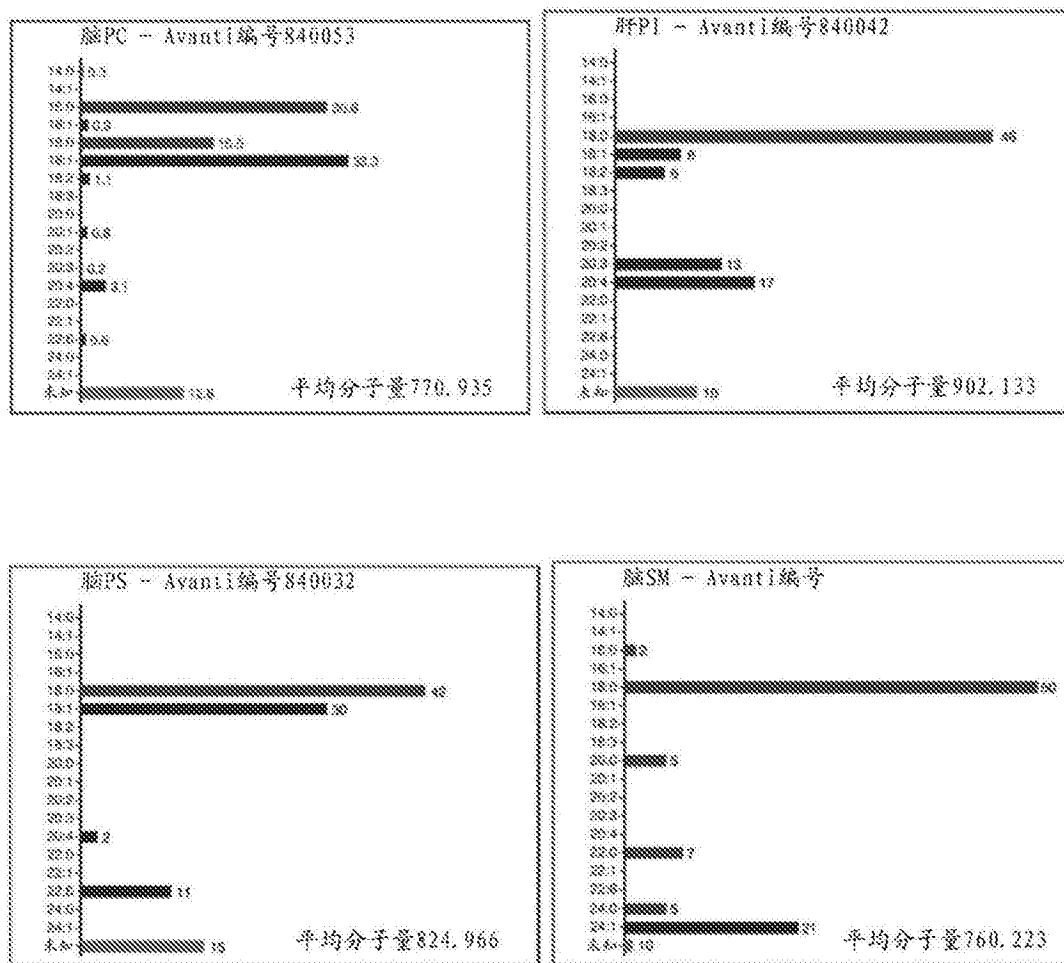


图25

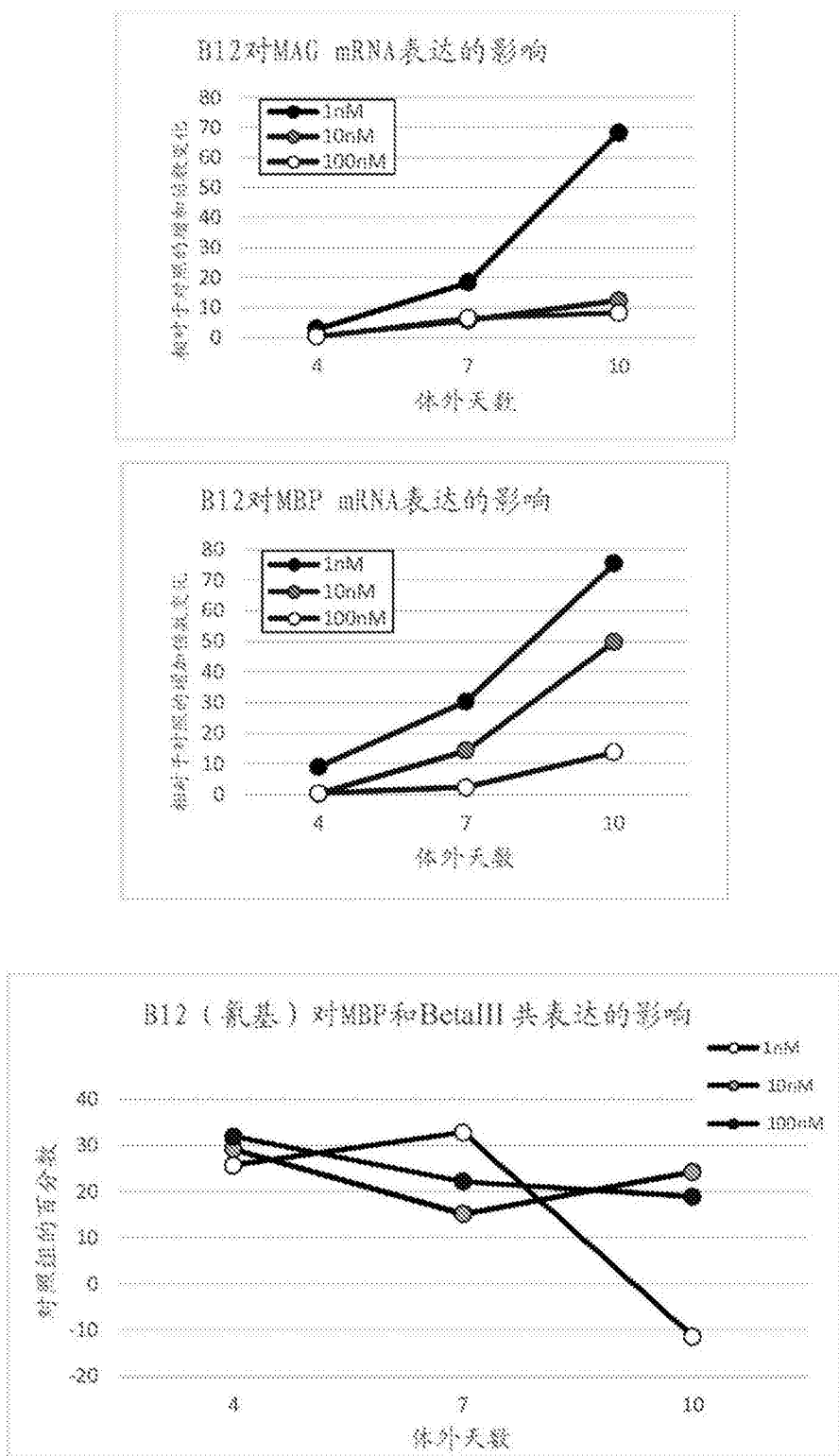


图26

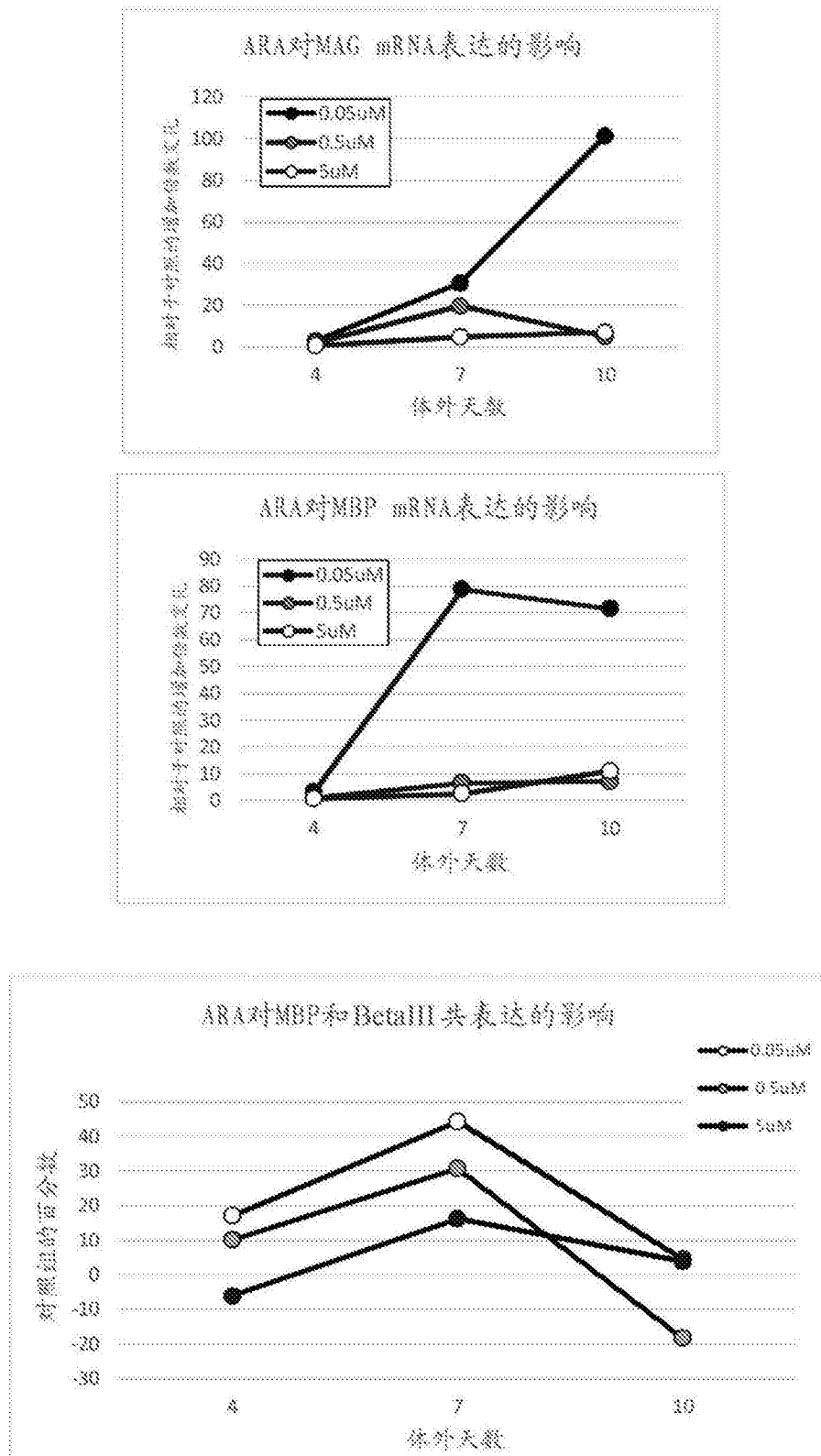


图27

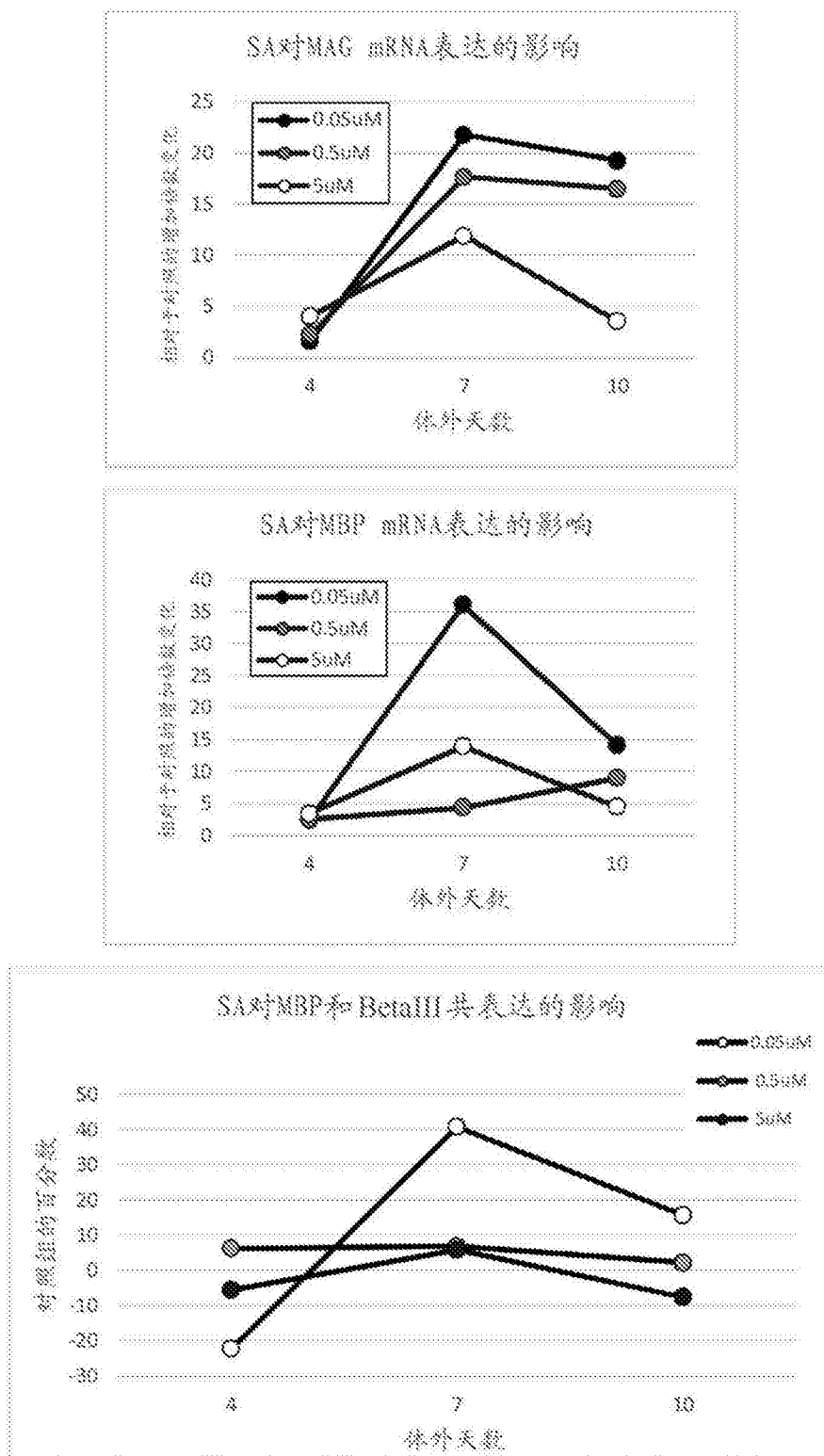


图28

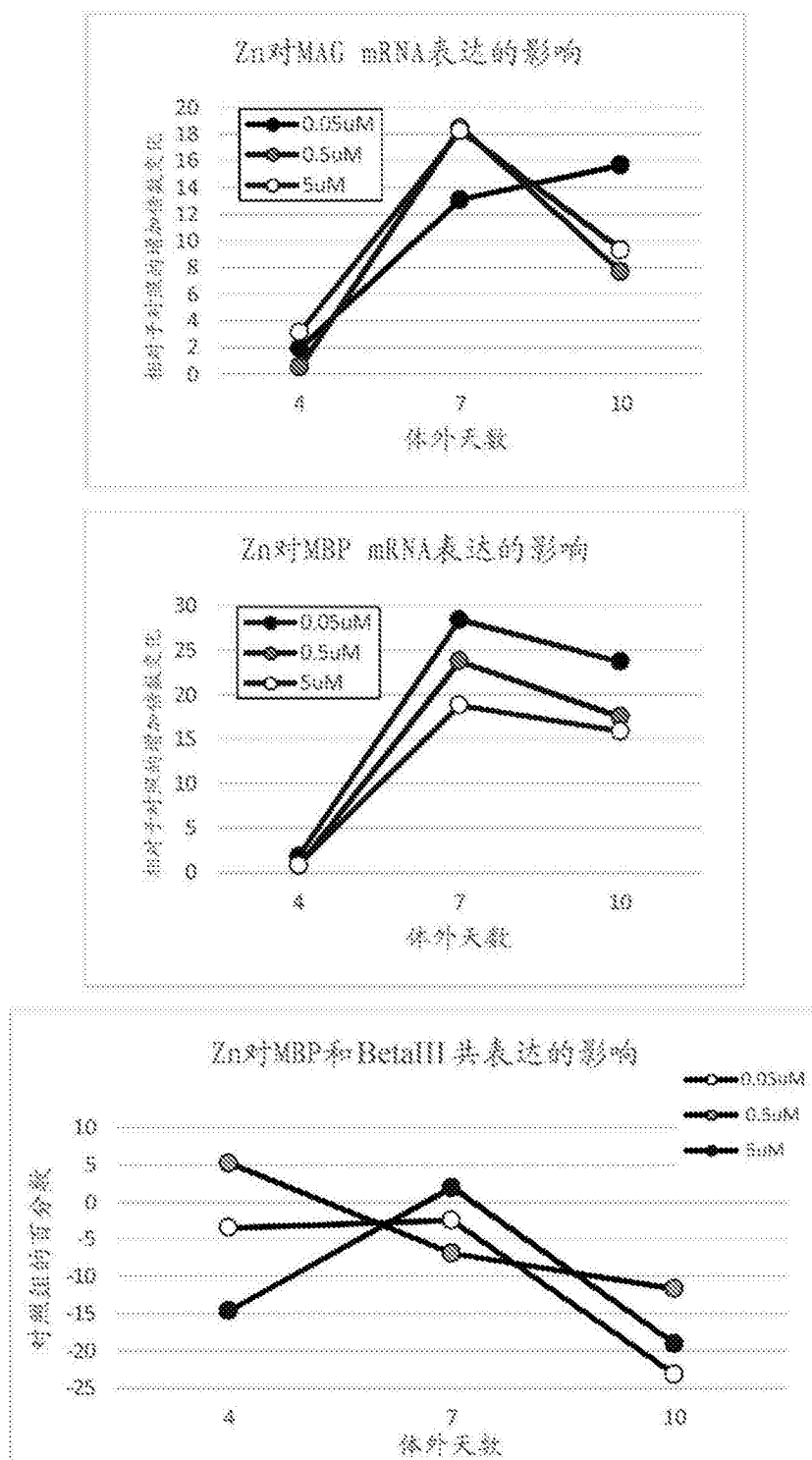


图29

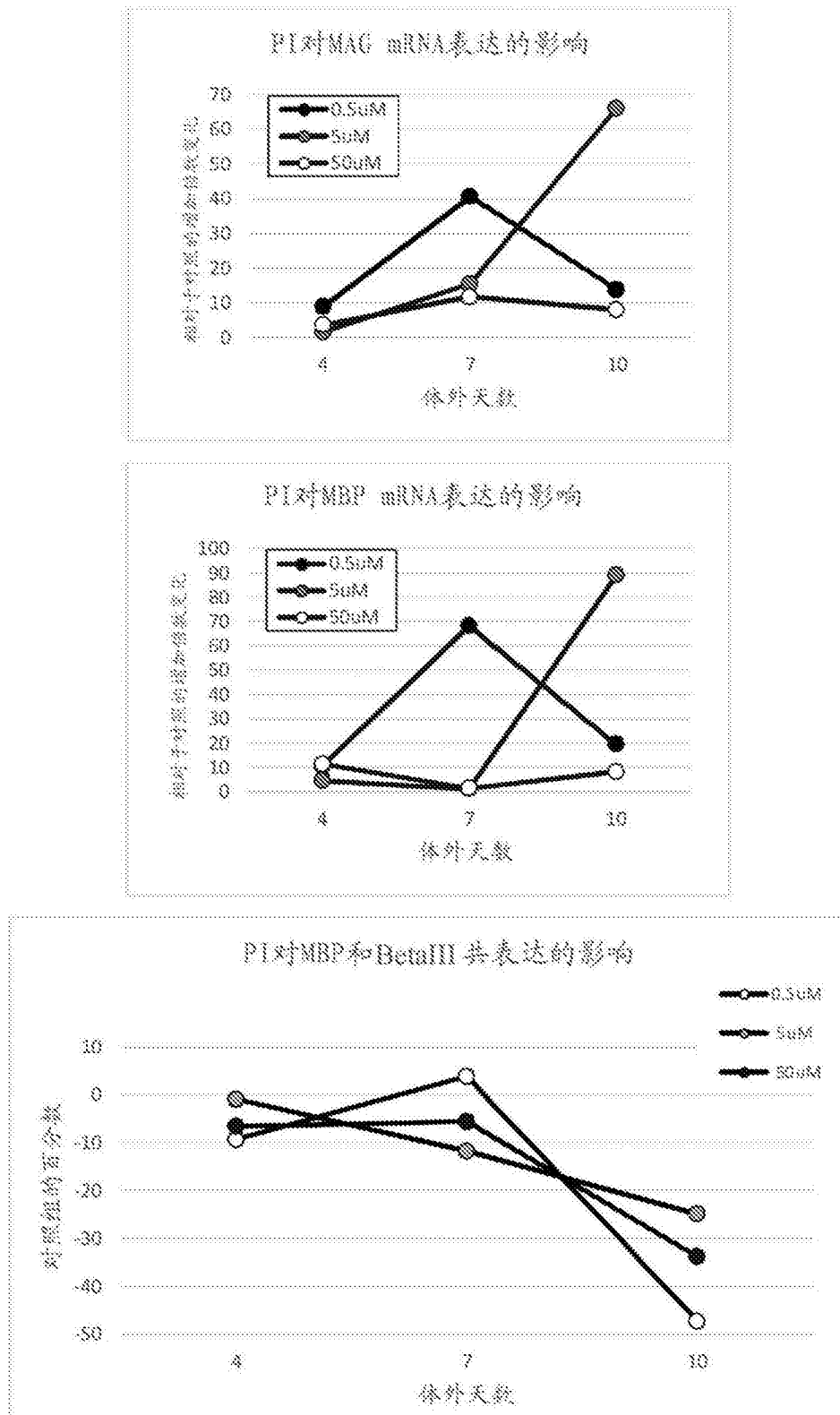


图30

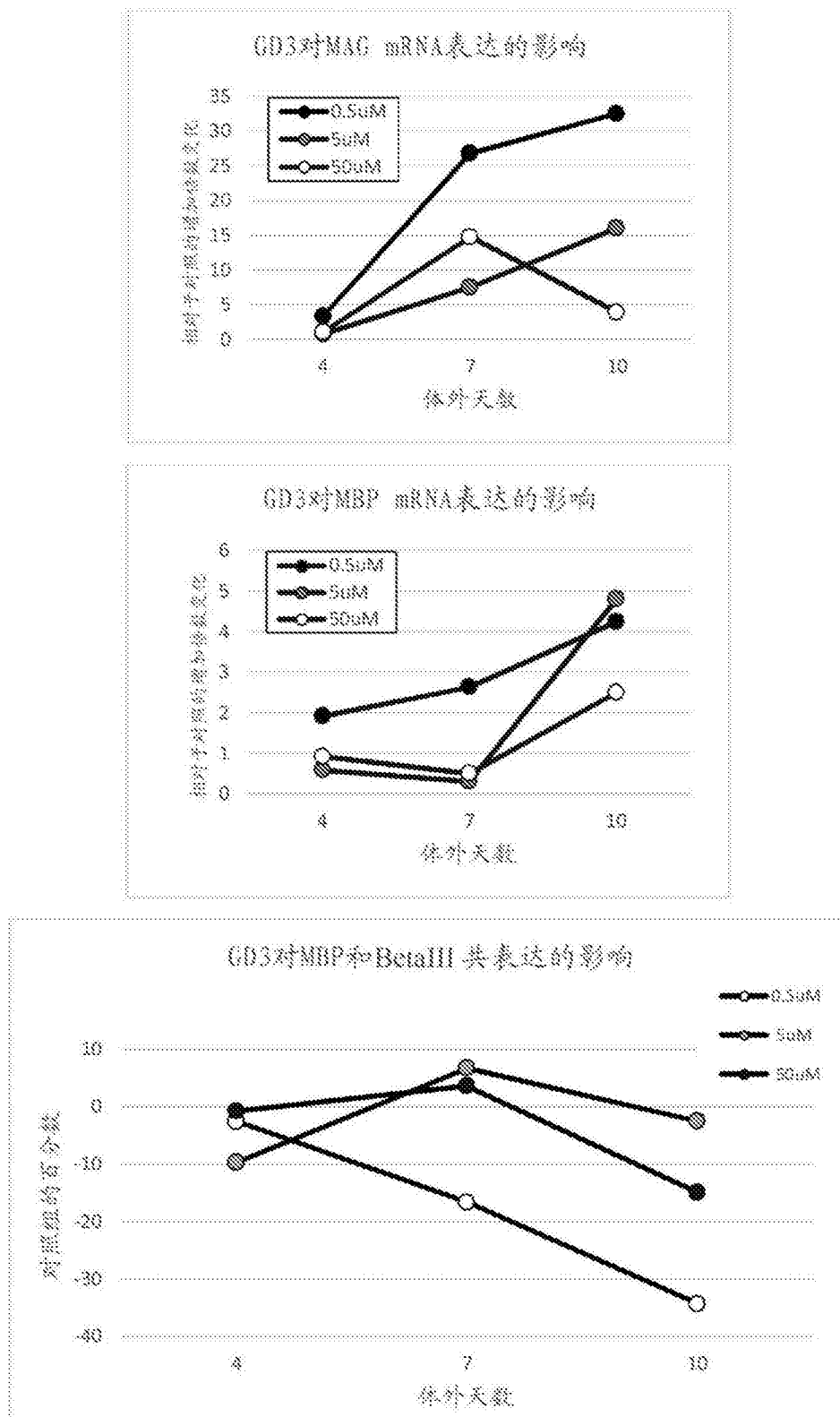


图31



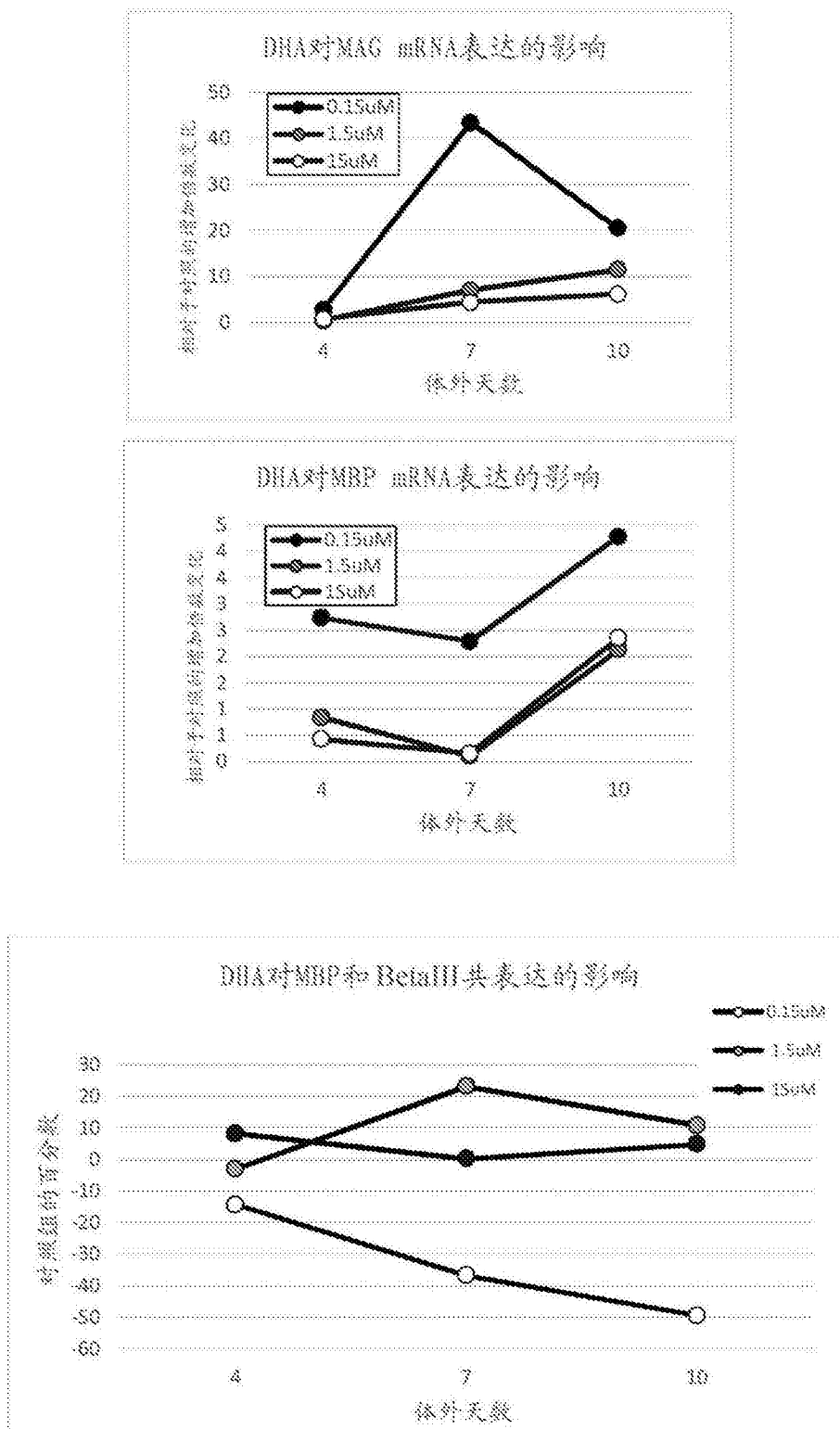


图32

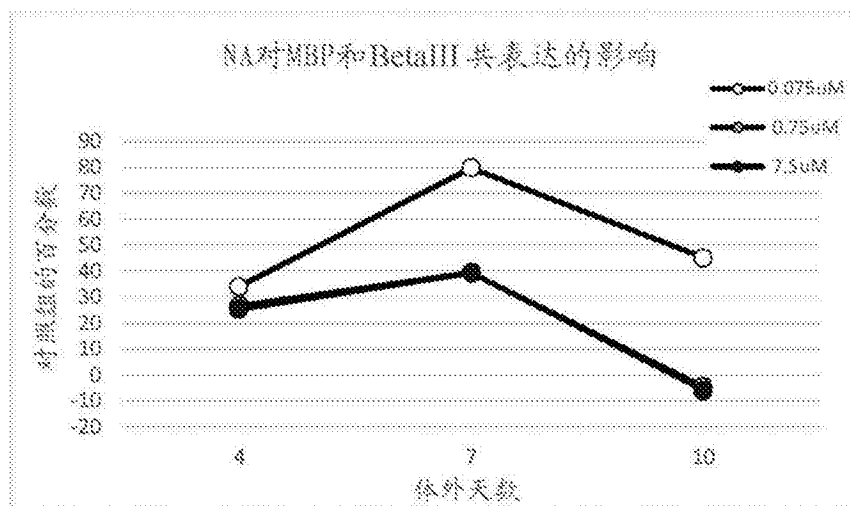
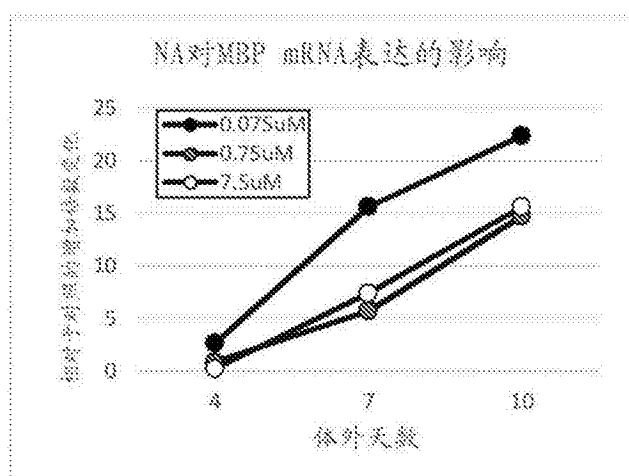
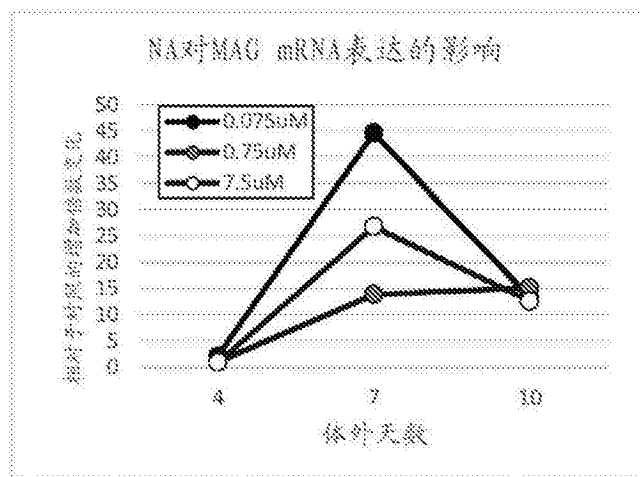


图33

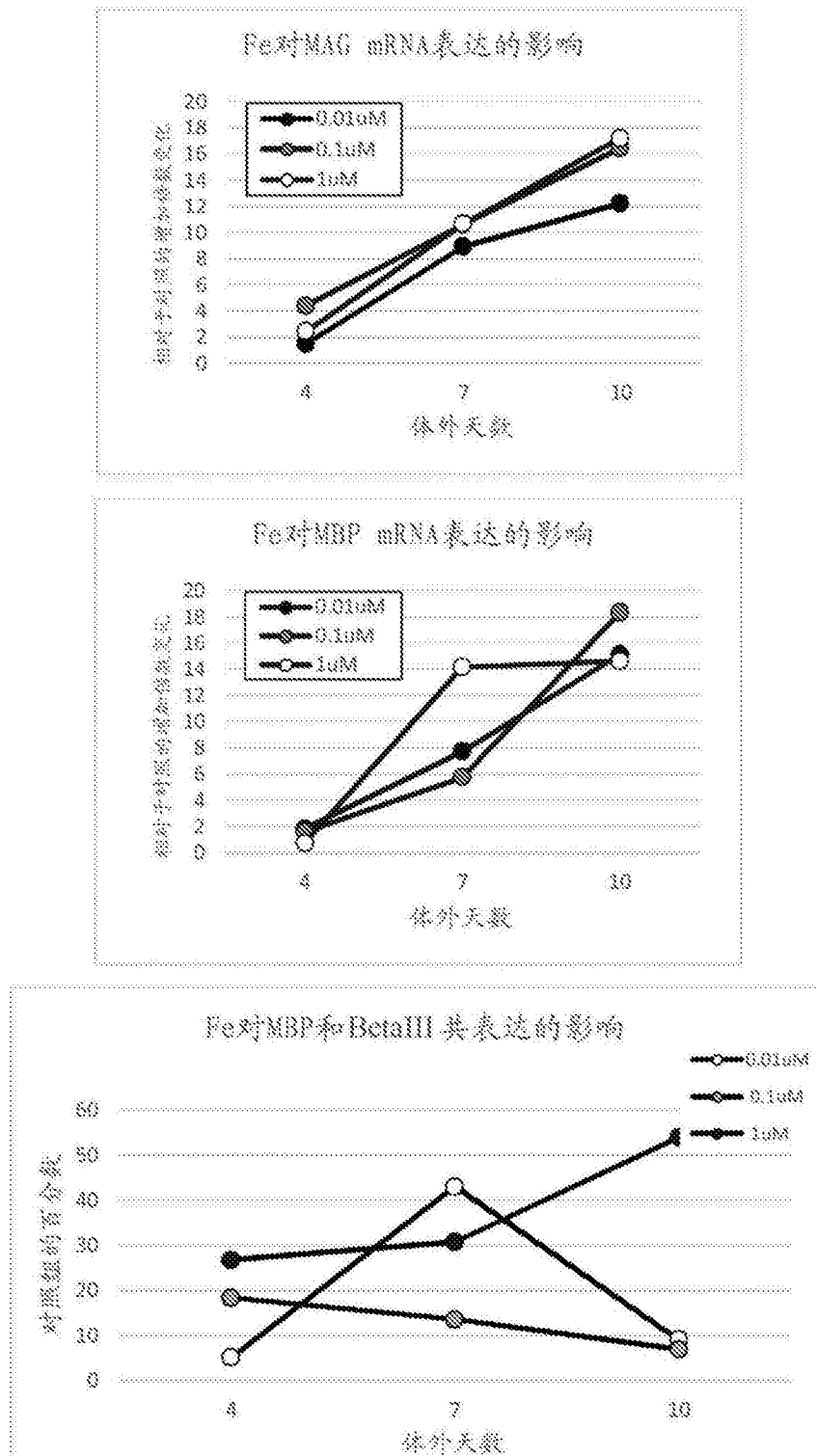


图34

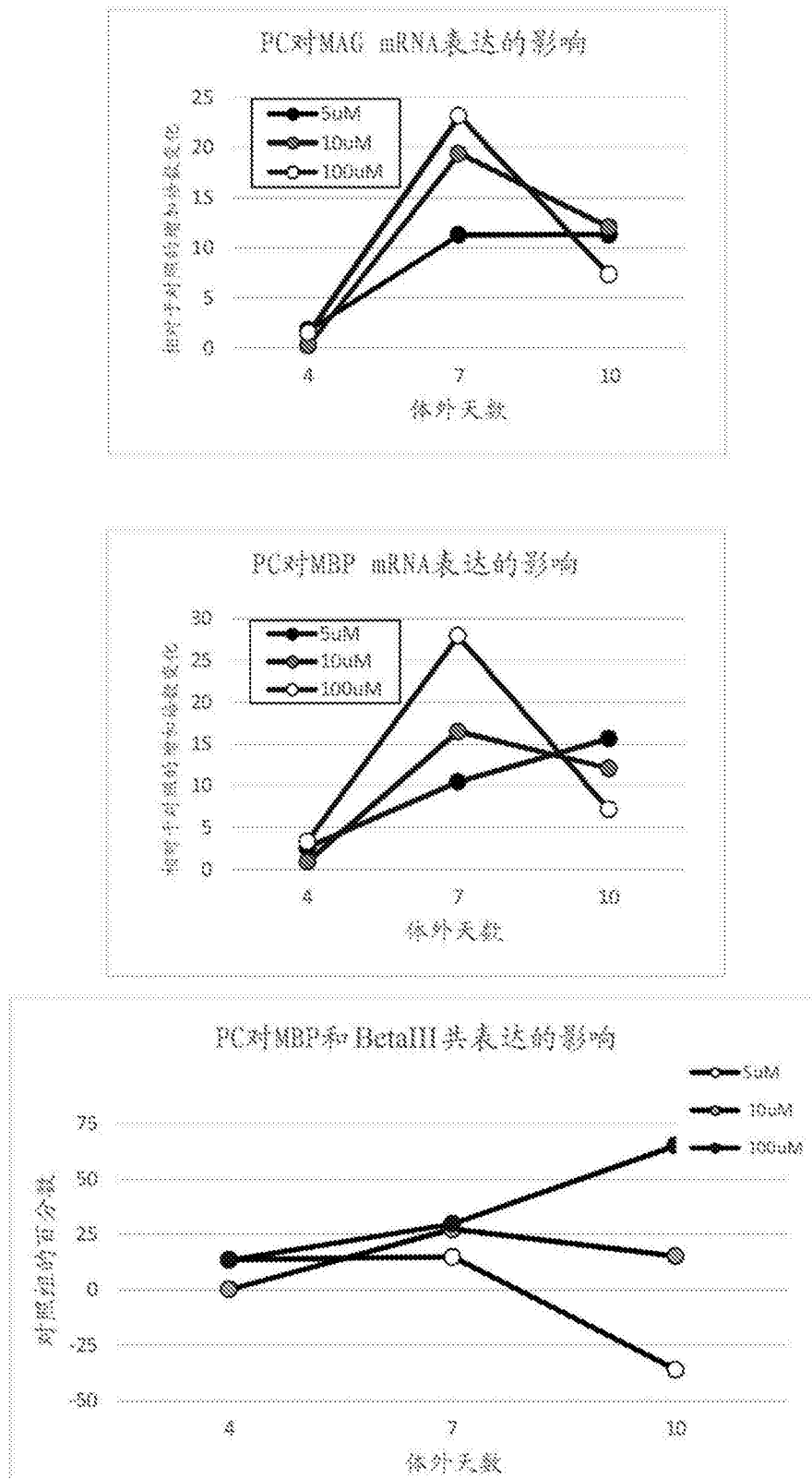


图35

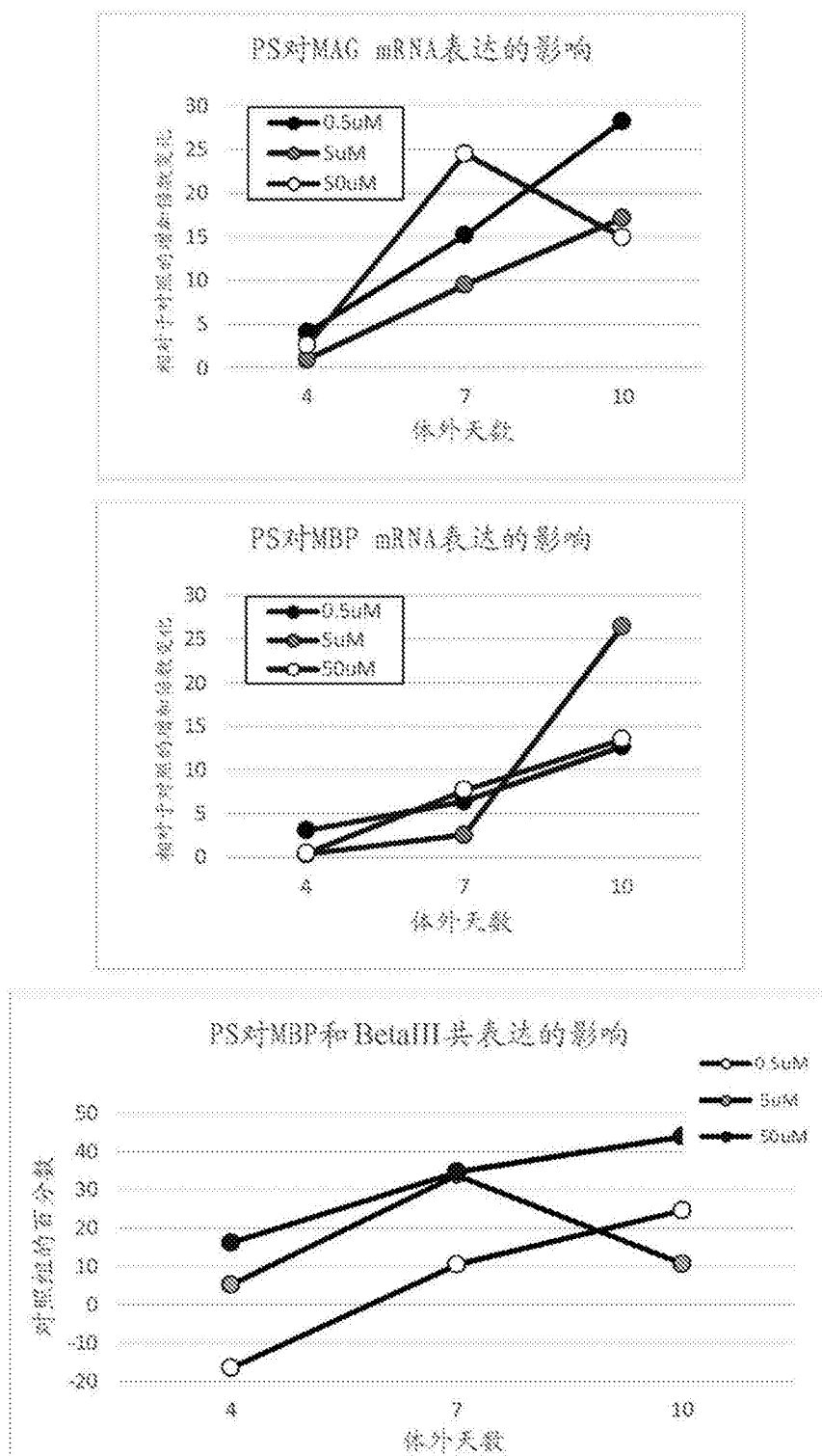


图36

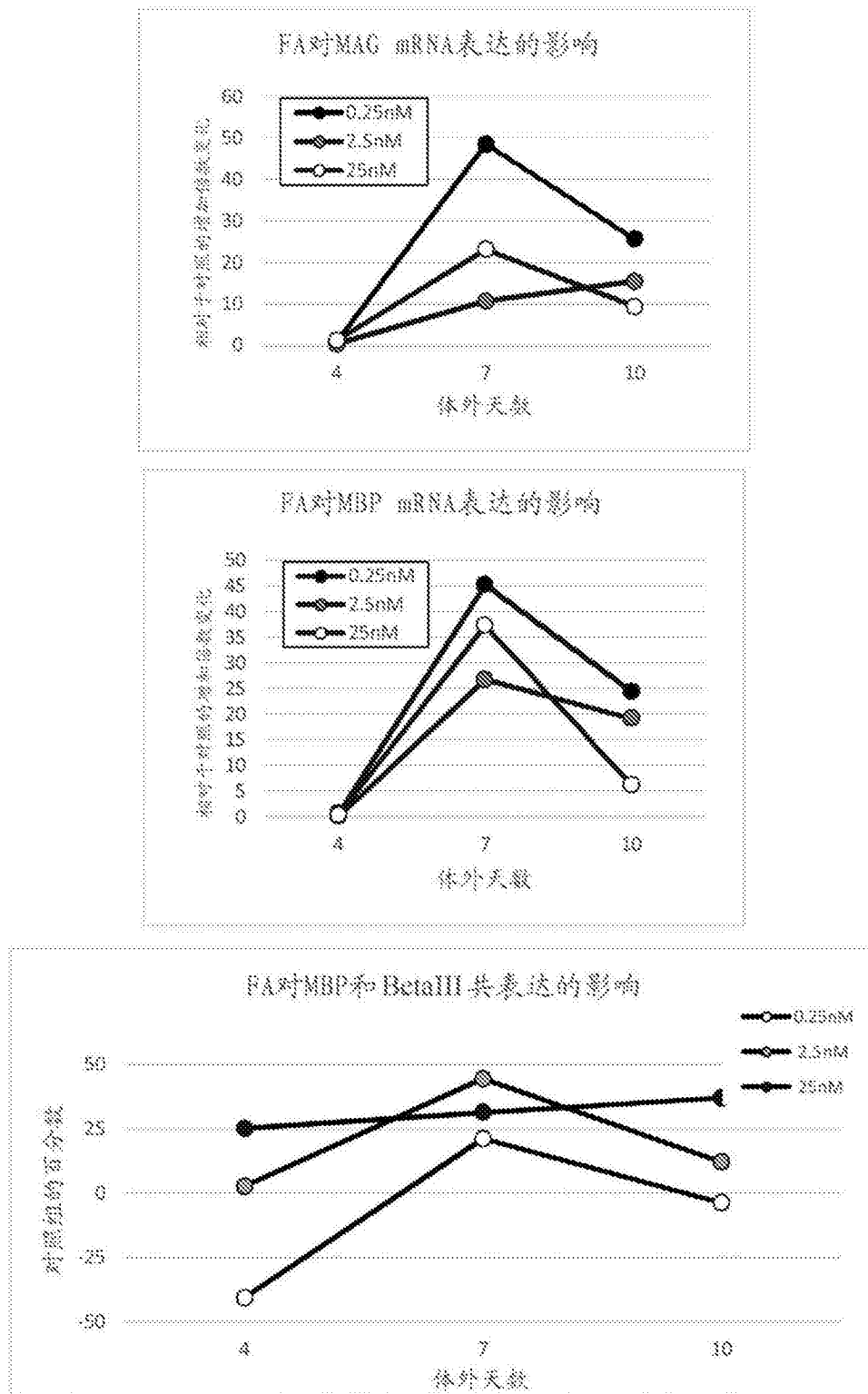


图37

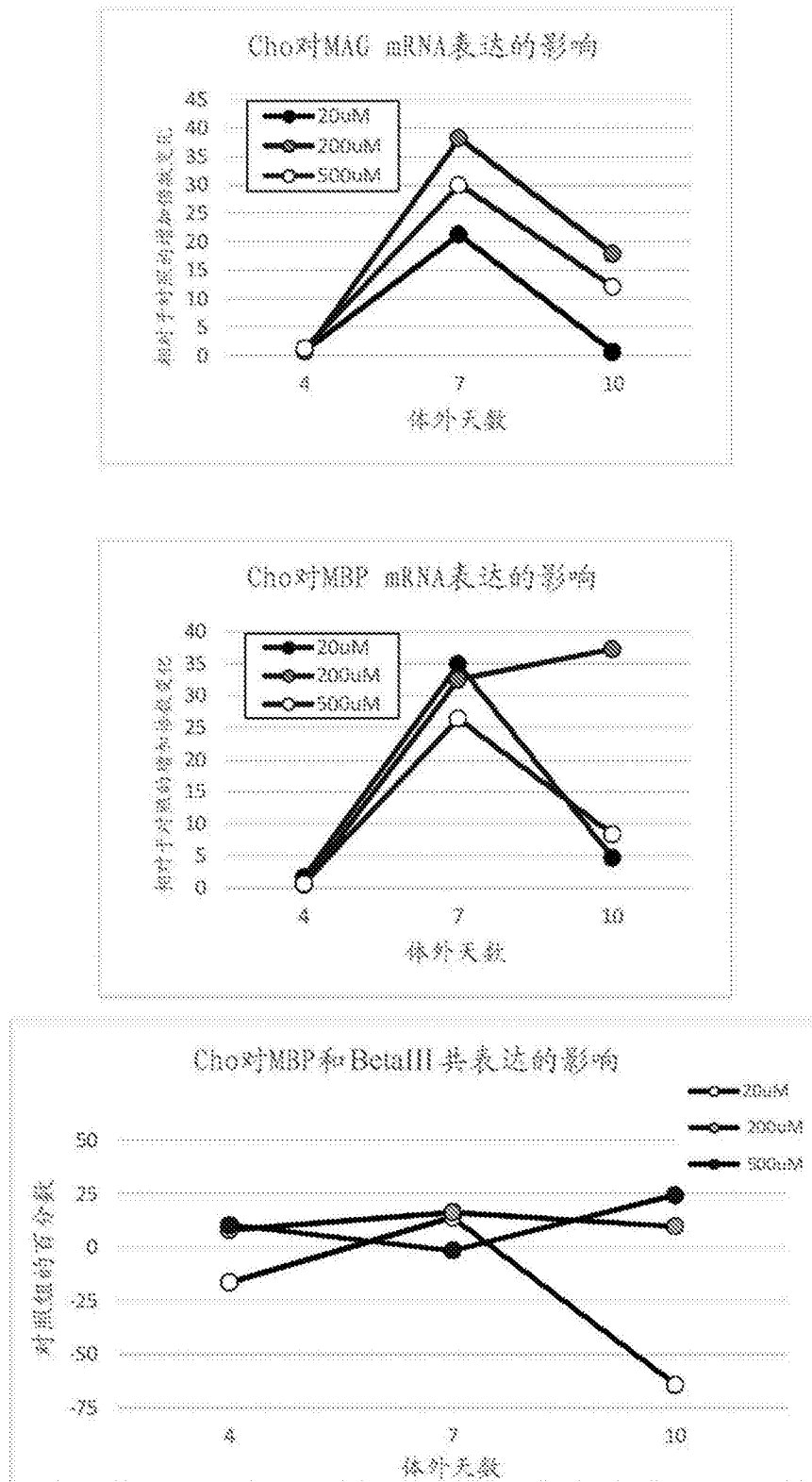


图38

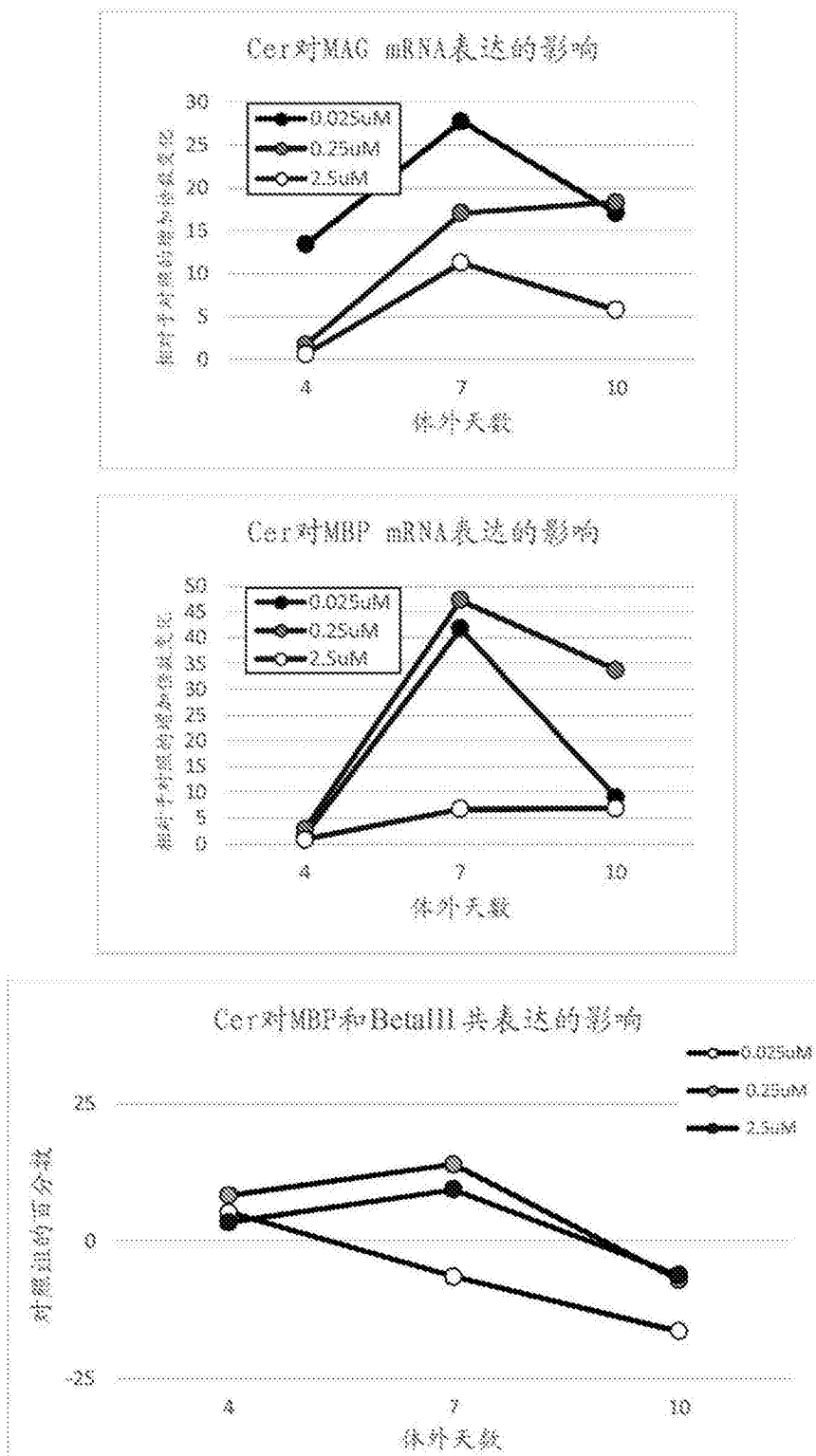


图39



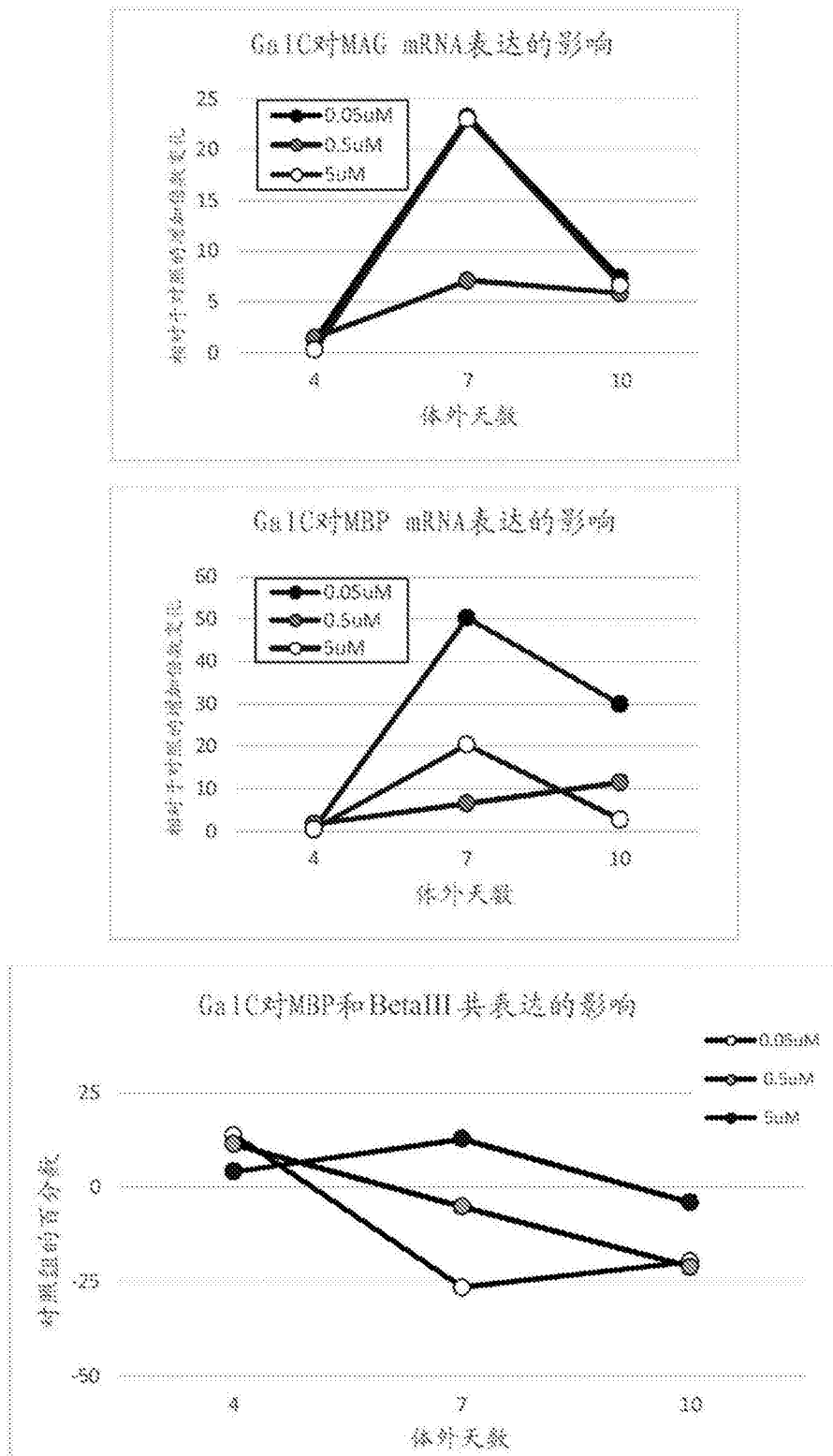


图40

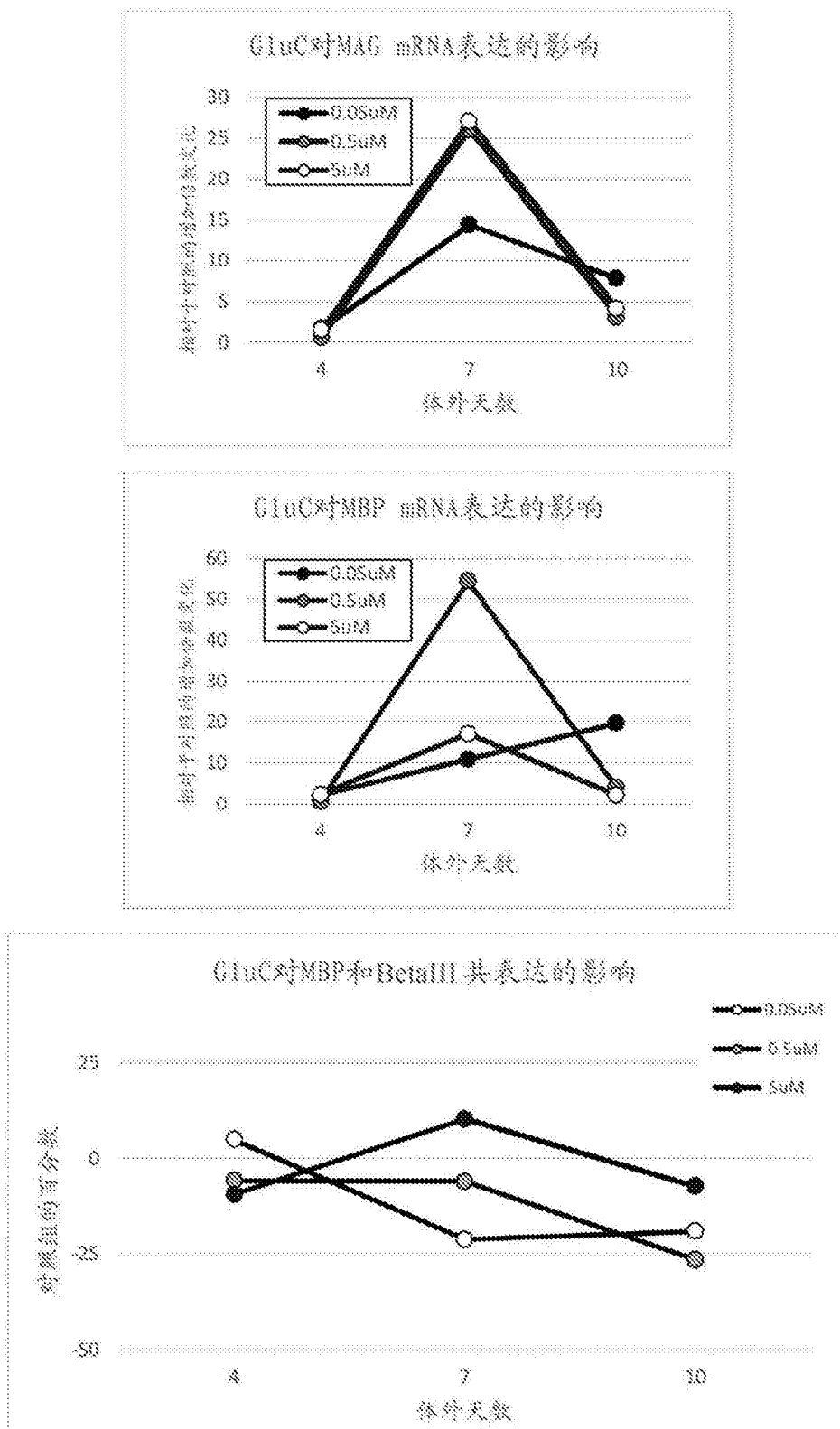


图41

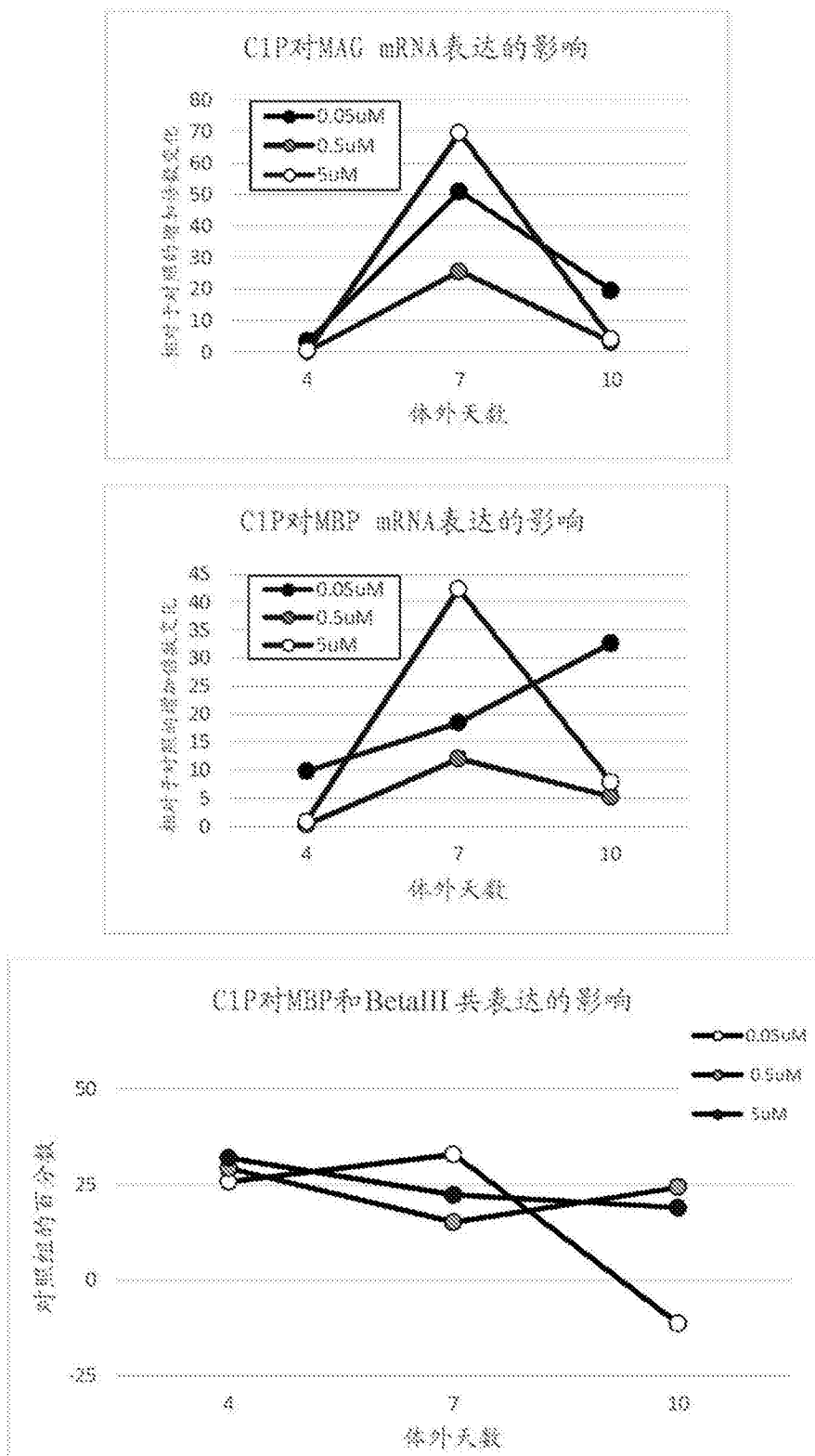


图42

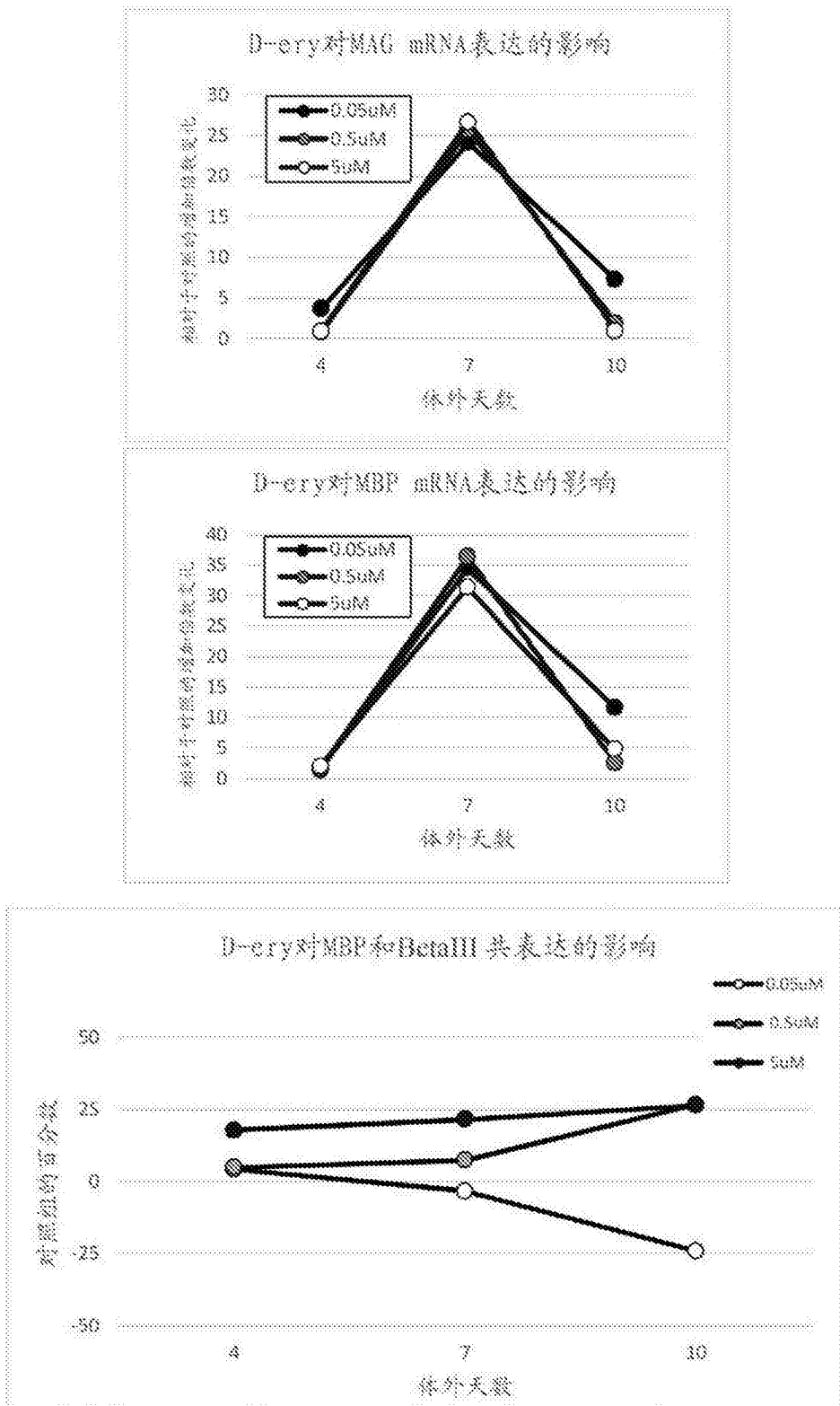


图43

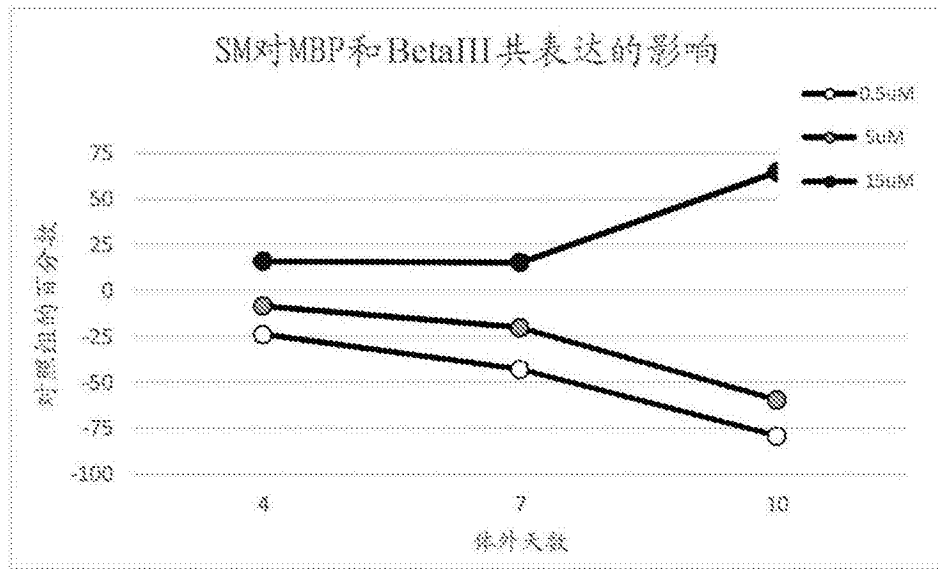


图44

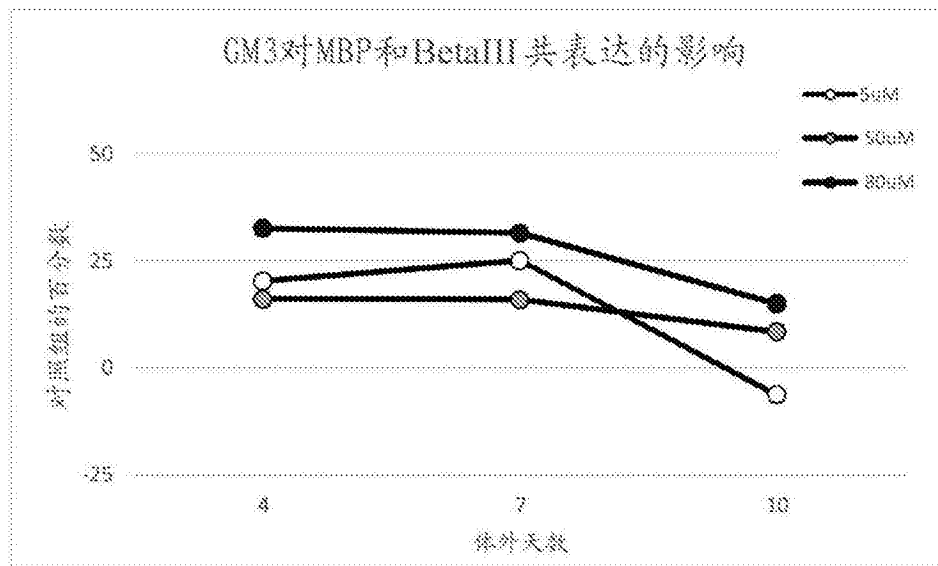


图45