



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119896332 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 29

(21) 申请号 202510014752.1

(22) 申请日 2016.12.13

(30) 优先权数据

15199752.5 2015.12.14 EP
15199757.4 2015.12.14 EP
15199758.2 2015.12.14 EP
15199764.0 2015.12.14 EP
15199769.9 2015.12.14 EP
62/315,187 2016.03.30 US
62/315,198 2016.03.30 US
62/315,224 2016.03.30 US
62/315,238 2016.03.30 US
62/315,249 2016.03.30 US
62/328,070 2016.04.27 US

(62) 分案原申请数据

201680072954.0 2016.12.13

(71) 申请人 雀巢产品有限公司

地址 瑞士

(72) 发明人 N·施耐德 J·豪泽 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

专利代理师 贾士聪 黄革生

(51) Int.Cl.

A23L 33/15 (2016.01)
A23L 33/16 (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01)
A23L 33/12 (2016.01)
A23C 9/152 (2006.01)
A23C 9/158 (2006.01)

权利要求书4页 说明书50页 附图81页

(54) 发明名称

组合物以及它们的用途

(57) 摘要

本发明涉及组合物以及它们的用途。更具体而言,本发明涉及用于促进、支持或优化个体的重新髓鞘形成、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或认知潜能、学习潜能、和智力潜能中的一种或多种、和/或认知功能的组合物。

1. 一种合成营养组合物, 所述组合物包含维生素, 用于促进、支持或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或智力潜能、和/或认知潜能、和/或学习潜能和/或认知功能, 其中脑结构是指整个脑的、和/或特定脑区域中的有髓鞘物质的量和/或空间分布, 并且其中如果在标准化的神经发育测试中所述个体的分数与营养良好的母亲的完全母乳喂养的个体的分数的差异小于一个标准偏差, 则所述认知功能被优化。

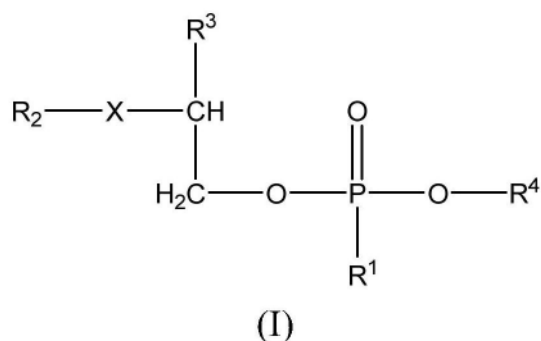
2. 根据权利要求1所述的合成营养组合物, 其中所述个体为人类婴儿或儿童, 并且优选地为配方食品喂养的人类婴儿或儿童。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的合成营养组合物, 其中所述维生素为维生素B12和/或叶酸。

4. 根据权利要求3所述的合成营养组合物, 其中所述组合物包含高于50mcg/100g所述组合物干重的量的叶酸和/或高于0.01mcg/100g所述组合物干重的量的维生素B12。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的合成营养组合物, 其中所述组合物还包含以下成分中的一种或多种: 矿物质、和/或胆碱、和/或磷脂、和/或脂肪酸衍生物, 其中所述脂肪酸衍生物为除磷脂以外的包含脂肪酸的化合物。

6. 根据权利要求5所述的合成营养组合物, 其中所述矿物质选自铁、锌、钙、磷、铜以及它们的组合; 其中所述脂肪酸衍生物包含二十二碳六烯酸和/或花生四烯酸和/或硬脂酸和/或神经酸, 并且其中所述磷脂为式 (I) 的化合物或式 (I) 的化合物的混合物



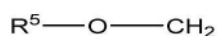
其中,

R^1 为 0;

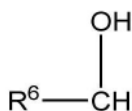
X 为 NH 或 O;

R^2 为 C2-C44 饱和或不饱和的、直链或支链的酰基基团;

R^3 为式 (II) 或式 (III) 的取代基:



(II)

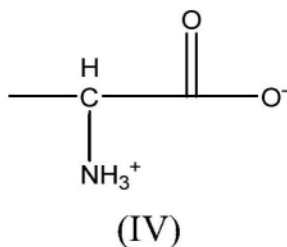


(III)

其中, R^5 为 C2-C44 饱和或不饱和的、直链或支链的酰基基团; 并且

R^6 为C2-C44饱和烷基或烯基基团;并且

R^4 选自:C5或C6取代的或未取代的环状烷基或烯基基团,或者 $-(CH_2)_n-R^7$,其中n为在1至4、特别是1至2的范围内的整数,并且 R^7 为一 $N(CH_3)_3^+$ 、 NH_3^+ 或式(IV)的取代基,并且



特别地, R^4 为被一个或多个羟基基团取代的C6环状烷基或烷基或烯基基团。

7. 根据权利要求6所述的合成营养组合物,其中所述磷脂为鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、以及前述物质的任何混合物。

8. 根据权利要求6或7所述的合成营养组合物,其中如果铁存在于所述所述组合物中,则所述铁以高于5mg/100g所述组合物干重的量被包含,其中如果鞘磷脂包含于所述组合物中,则所述鞘磷脂以高于300mg/kg所述组合物干重的量被包含,其中如果包含DHA的脂肪酸衍生物包含于所述组合物中,则所述包含DHA的脂肪酸衍生物以60mg/100g至350mg/100g所述组合物干重的量被包含,并且其中如果包含花生四烯酸的脂肪酸衍生物包含于所述组合物中,则所述包含花生四烯酸的脂肪酸衍生物以60mg/100g至350mg/100g所述组合物干重的量被包含。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的合成营养组合物,其中所述组合物为选自以下的组合物:婴儿配方食品、成长乳、旨在添加人类母乳或用人类母乳稀释的用于婴儿的组合物、以及旨在供婴儿和/或儿童单独食用或与人类母乳组合食用的食料。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的合成营养组合物用于促进、支持或优化人类婴儿或儿童、特别是配方食品喂养的婴儿或儿童的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或智力潜能、和/或认知潜能、和/或学习潜能和/或认知功能的用途,其中脑结构是指整个脑的、和/或特定脑区域中的有髓鞘物质的量和/或空间分布,并且其中如果在标准化的神经发育测试中所述个体的分数与营养良好的母亲的完全母乳喂养的个体的分数的差异小于一个标准偏差,则所述认知功能被优化。

11. 一种维生素,所述维生素用于促进、支持或优化人类婴儿或儿童、特别是配方食品喂养的婴儿或儿童的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或智力潜能、和/或认知潜能、和/或学习潜能、和/或认知功能,其中特别地,所述维生素为维生素B12和/或叶酸,并且其中脑结构是指整个脑的、和/或特定脑区域中的有髓鞘物质的量和/或空间分布,并且其中如果在标准化的神经发育测试中所述个体的分数与营养良好的母亲的完全母乳喂养的个体的分数的差异小于一个标准偏差,则所述认知功能被优化。

12. 根据权利要求11所述的维生素,其中所述维生素与以下成分中的一种或多种分别、相继和/或同时施用于个体:胆碱;矿物质,特别是铁和/或锌和/或钙和/或磷和/或镁和/或铜;包含二十二碳六烯酸和/或花生四烯酸和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物;和/或磷脂,其中所述磷脂为权利要求6中所定义的式(I)的化合物。

13. 一种促进、支持或优化个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或智力潜能、和/或认知潜能、和/或学习潜能和/或认知功能的方法, 所述方法包括将权利要求1至10中任一项所定义的合成营养组合物或权利要求12或13所定义的维生素喂予所述个体, 其中所述个体为人类婴儿或儿童, 并且更优选地为配方食品喂养的人类婴儿或儿童, 并且其中脑结构是指整个脑的、和/或特定脑区域中的有髓鞘物质的量和/或空间分布, 并且其中如果在标准化的神经发育测试中所述个体的分数与营养良好的母亲的完全母乳喂养的个体的分数的差异小于一个标准偏差, 则所述认知功能被优化。

14. 根据权利要求1至9中任一项所述的合成营养组合物, 或根据权利要求11或12所述的维生素, 用于制备促进、支持或优化人类婴儿或儿童、特别是配方食品喂养的人类婴儿或儿童的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或智力潜能和/或认知潜能和/或学习潜能、和/或认知功能的合成营养组合物, 其中脑结构是指整个脑的、和/或特定脑区域中的有髓鞘物质的量和/或空间分布, 并且其中如果在标准化的神经发育测试中所述个体的分数与营养良好的母亲的完全母乳喂养的个体的分数的差异小于一个标准偏差, 则所述认知功能被优化。

15. 一种合成营养组合物, 所述组合物包含: 维生素, 特别是叶酸和/或维生素B12; 和胆碱; 和/或矿物质, 特别是铁和/或锌和/或铜和/或镁和/或钙和/或磷; 和/或除磷脂以外的包含二十二碳六烯酸和/或花生四烯酸和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物; 和/或磷脂代谢前体或其代谢物, 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; 其中如果鞘磷脂存在于所述组合物中, 则所述鞘磷脂以至少420mg/kg的量存在, 其中如果磷脂酰胆碱存在于所述组合物中, 则所述磷脂酰胆碱以至少1000mg/kg的量存在, 其中如果磷脂酰丝氨酸存在于所述组合物中, 则所述磷脂酰丝氨酸以至少900mg/kg的量存在, 其中如果磷脂酰肌醇存在于所述组合物中, 则所述磷脂酰肌醇以至少700mg/kg的量存在, 其中如果叶酸存在于所述组合物中, 则所述叶酸以至少160mg/kg的量存在, 其中如果维生素B12存在于所述组合物中, 则所述维生素B12以至少7mcg/100g的量存在, 其中如果铁存在于所述组合物中, 则所述铁以至少11.5mg/100g的量存在, 其中如果胆碱存在于所述组合物中, 则所述胆碱以至少140mg/kg的量存在, 其中如果包含DHA的脂肪酸衍生物存在于所述组合物中, 则所述包含DHA的脂肪酸衍生物以至少89mg/100g的量存在, 其中如果包含AA的脂肪酸衍生物存在于所述组合物中, 则所述包含AA的脂肪酸衍生物以至少175mg/100g的量存在, 其中如果锌存在于所述组合物中, 则所述锌以至少7mg/100g的量存在, 其中所有重量均按所述组合物的干重计, 并且其中所述组合物为选自以下的组合物: 婴儿配方食品、成长乳、旨在添加人类母乳或用人类母乳稀释的用于婴儿的组合物、以及旨在供婴儿和/或儿童单独食用或与人类母乳组合食用的食料。

16. 一种合成营养组合物, 所述组合物包含: 矿物质, 特别是铁和/或锌和/或铜和/或镁和/或钙和/或磷; 和胆碱; 和/或维生素, 特别是叶酸和/或维生素B12; 和/或除磷脂以外的包含二十二碳六烯酸和/或花生四烯酸和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物; 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/或前述任一者的代谢前体或代谢物; 其中如果鞘磷脂存在于所述组合物中, 则所述鞘磷脂以至少300mg/kg的量存在, 其中如果叶酸存在于所述组合物中, 则所述叶酸以至少100mcg/kg的量存在, 其中如果维生素B12存在于所述组合物中, 则所述维生素B12以至少5mcg/100g的量存在, 其

中如果铁存在于所述组合物中,则所述铁以至少5mg/100g的量存在,其中如果包含DHA的脂肪酸衍生物存在于所述组合物中,则所述包含DHA的脂肪酸衍生物以至少60mg/100g至350mg/100g的量存在,其中如果包含AA的脂肪酸衍生物存在于所述组合物中,则所述包含AA的脂肪酸衍生物以至少60mg/100g至350mg/100g的量存在,其中所有重量均按所述组合物的干重计,并且其中所述组合物为选自以下的组合物:婴儿配方食品、成长乳、旨在添加人类母乳或用人类母乳稀释的用于婴儿的组合物、以及旨在供婴儿和/或儿童单独食用或与人类母乳组合食用的食料。

17. 根据权利要求15所述的合成营养组合物,其中所述组合物包含浓度为1023mg/kg的包含DHA的脂肪酸衍生物、浓度为1023mg/kg的包含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。

18. 一种组合物,所述组合物包含维生素,用于改善个体的视力、包括运动的协调和执行在内的运动功能、和/或精神运动功能,其中所述维生素为维生素B12和/或叶酸。

组合物以及它们的用途

[0001] 本申请是分案申请,母案是申请日为2016年12月13日、申请号为201680072954.0、发明名称为“组合物以及它们的用途”的申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及用于促进、支持或优化个体的重新髓鞘形成、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或认知潜能、学习潜能、和智力潜能中的一种或多种、和/或认知功能的组合物。

背景技术

[0003] 建议所有婴儿采用母乳喂养。然而,在一些情况下,出于医学原因,母乳喂养不足或不可能。在这些情况下,婴儿配方食品可用作母乳的替代物。然而,研究表明,婴儿配方食品并不总是像母乳那样对身体产生相同的效应。

[0004] 在最近的研究中,已经展示,完全母乳喂养的婴儿整个脑的脑结构、特别是有髓鞘物质的量和/或时空分布可不同于喂予婴儿配方食品的婴儿,并且这些差异可与母乳喂养婴儿的增强智力、学习、和/或认知功能相关,特别是在以后的生活中,即使在考虑到混杂因素时也是如此(“Breastfeeding and early white matter development:a cross sectional study”,Deoni et al,NeuroImage 82,(2013),77-86(母乳喂养和早期白质发育:横断面研究,Deoni等人,《神经影像》,第82期,2013年,第77-86页))。所述研究还清楚地展示,在重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹和脑结构之间存在关联、特别是时间关联。

[0005] 先前对母乳喂养婴儿和配方食品喂养婴儿的脑的纵向结构研究不可用,并且认知功能和能力的识别出的差异常常仅归因于诸如社会经济地位和母亲教育程度之类的因素。由于婴儿脑部MRI已经成为Deoni等人的实践,因此母乳喂养和配方食品喂养婴儿的脑结构的可能差异既没有以现在可能的方式来考虑,也不可以现在可能的方式测量。

[0006] 脑结构的相关性、特别是整个脑的有髓鞘物质的量和/或空间分布,对于认知功能和智力有很好的记载。本质上,脑中的髓磷脂沿着神经元提供绝缘片,从而允许神经脉冲更快地传导。然而,脑结构、特别是整个脑的髓磷脂的量和/或空间分布影响脑连接,例如,通过什么途径以及如何快速且有效地以神经脉冲的形式在脑内、特别是在不同的脑区域之间传送消息。这种间脑通信可以在认知功能和学习中发挥作用,并且可能影响并且甚至可能用于生理限制、智力、认知和/或学习潜能并且调节认知功能。

[0007] 因此,需要找到用于促进、支持或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、特别是整个脑的有髓鞘物质的量和/或空间分布、以及/或者脑连接的方式。

[0008] 另外,需要找到优化个体、特别是配方食品喂养的个体的智力潜能和/或认知潜能和/或学习潜能和/或认知功能的方式。

[0009] 令人惊讶的是,本发明人现在已经发现一种组合物,该组合物包含维生素,可促进、支持或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨

迹、和/或脑结构、特别是整个脑的有髓鞘物质的量和/或空间分布。

[0010] 更特别地本发明人已经发现一种组合物,该组合物包含维生素,可促进、支持或优化喂予婴儿配方食品的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、特别是整个脑的有髓鞘物质的量和/或空间分布,并且可使上述一项或多项更符合或更接近于在母乳喂养的、更特别是完全母乳喂养的个体中观察到的那些。

[0011] 该发现源于纵向认知和脑成像研究的结果的营养分析,其中母乳喂养和婴儿配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、特别是整个脑的有髓鞘物质的量和/或空间分布、特别是如通过重新髓鞘形成和重新髓鞘形成轨迹所确定的被检查和比较。该研究的另外细节和结果在本文所包括的示例中给出。

发明内容

[0012] 本发明在权利要求书中进行了陈述,并且在本文所包括的具体实施方式中进行了详细描述。

[0013] 本发明涵盖包含一种合成营养组合物,该组合物包含维生素,可用于促进、支持或优化以下各项中的一项或多项:

[0014] ●个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹,

[0015] ●脑结构、特别是整个脑的、和/或特定脑区域中的有髓鞘物质的量和空间分布。

[0016] ●脑连接,

[0017] ●智力潜能,

[0018] ●认知潜能,

[0019] ●学习潜能,

[0020] ●认知功能。

[0021] 更特别地所述个体可为人类婴儿或儿童、并且甚至更特别是配方食品喂养的人类婴儿或儿童。

[0022] 所述合成营养组合物可为选自以下的组合物:婴儿配方食品、成长乳、旨在添加人类母乳或用人类母乳稀释的用于婴儿的组合物、以及旨在供婴儿和/或儿童单独食用或与人类母乳组合食用的食料。

[0023] 所述组合物可优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接,并且当与其中除了一种或多种维生素的含量之外所有其它组分相同的组合物相比时,在脑整体中或在一个或多个脑区域中使它们以任何量更接近于对于母乳喂养的个体、特别是完全母乳喂养的个体所观察或测量的那些。

[0024] 维生素可为任何维生素。特别有效的维生素可为叶酸和/或维生素B12。

[0025] 所述组合物可另外包含以下成分中的一种或多种:

[0026] ●磷脂,特别是如本文中所定义的式(I)的磷脂或式(I)的化合物的混合物,更特别是磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂、或它们的混合物,

[0027] ●矿物质,特别是铁和/或锌和/或铜和/或钙和/或磷和/或镁,

[0028] ●胆碱,

[0029] ●脂肪酸衍生物,其中所述脂肪酸衍生物为除磷脂以外的包含脂肪酸的化合物,其中所述脂肪酸衍生物可选自游离脂肪酸、单酰基甘油、二酰基甘油、三酰基甘油、胆固醇

酯以及它们的组合,并且其中所述脂肪酸可包含二十二碳六烯酸和/或花生四烯酸和/或硬脂酸和/或神经酸。

[0030] 如果组合物另外包含这些成分中的一种或多种,则其可为更有效的。

[0031] 上述成分的特别有益浓度在权利要求书中和本文所包括的详细描述中陈述。

附图说明

[0032] 图1-示出了母乳喂养的婴儿和幼儿的平均全脑(全白质)髓鞘形成轨迹与用包含不同水平的叶酸的两种商业配方食品喂养的婴儿和幼儿的平均全脑(全白质)髓鞘形成轨迹的关系图。

[0033] 图1a-示出了母乳喂养的婴儿和幼儿的平均区域髓鞘形成轨迹与用包含不同水平的叶酸的两种商业配方食品喂养的婴儿和幼儿的平均区域髓鞘形成轨迹的关系图。

[0034] 图1b-是示出与叶酸相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0035] 图2-是示出与维生素B12相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0036] 图2a-是示出与铁相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0037] 图2b-是示出与锌相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0038] 图2c-是示出与钙相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0039] 图2d-是示出与磷相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0040] 图2e-是示出与镁相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0041] 图2f-是示出与鞘磷脂相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0042] 图2g-是示出与磷脂酰肌醇相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0043] 图2h-是示出与磷脂酰胆碱相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0044] 图2i-是示出与胆碱相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0045] 图2j-是示出与二十二碳六烯酸相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0046] 图2k-是示出与花生四烯酸相关联的有髓鞘脑区域的脑图像。

[0047] 图3:示出了神经酸对神经元细胞密度和星形胶质细胞密度的影响。

[0048] 图4:示出了硬脂酸对神经元细胞密度和星形胶质细胞密度的影响。

[0049] 图5:示出了辛酸对神经元细胞密度和星形胶质细胞密度的影响。

[0050] 图6:示出了鞘磷脂对神经球的数量和神经元增殖的影响。

[0051] 图7:示出了成分、婴儿配方食品、牛乳和人乳中主要SM物质的相对丰度。(误差条表示n=3时的标准偏差)。

[0052] 图8:示出了来自成分、婴儿配方食品、牛乳和人乳的SM级分的相对脂肪酸丰度。(误差条表示n=3时的标准偏差)。

[0053] 图9:3号配方食品(绿色)或6号(蓝色)配方食品喂养的5岁以上儿童的不同脑区域的髓鞘形成轨迹。

[0054] 图10:6号配方食品(蓝色)或母乳喂养(母乳喂养至少90天)(紫色)的5岁以上儿童的不同脑区域的髓鞘形成轨迹。

[0055] 图11:3号配方食品(绿色)或母乳喂养(母乳喂养至少90天)(紫色)的5岁以上儿童的不同脑区域的髓鞘形成轨迹。

[0056] 图12:示出了DHA在第18天和/或第30天对MBP、NF和/或MBP/NF的影响。

[0057] 图13:示出了硬脂酸在第14天、第18天和/或第30天对A2B5、MBP、MAG、NF、MBP/NF和/或MAG/NF的影响。

[0058] 图14: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。

[0059] 图15: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。

[0060] 图16: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。

[0061] 图17: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。

[0062] 图18: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。

[0063] 图19: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。

[0064] 图20:示出了镁在第22天、第18天和/或第30天对A2B5、MBP、NF、MAG、MBP/NF和/或MAG/NF的影响。

[0065] 图21:示出了铜在第12天和/或第18天对A2BF、MAG和/或MAG/NF的影响。

[0066] 图22:示出了磷脂酰胆碱在第12天对A2B5的影响以及在第18天对MAG的影响。

[0067] 图23: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。

[0068] 图24: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。

[0069] 图25: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。

[0070] 图26:示出了神经酰胺在第12天对A2B5以及在第18天对MAG的影响。

[0071] 图27: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。

[0072] 图28:示出了糖基化神经酰胺在第12天对A2B5的影响以及在第12天和第18天对NF的影响。

[0073] 图29:示出了D-赤型神经酰胺在第12天对A2B5的影响以及在第18天对MAG的影响。

[0074] 图30:示出了神经酰胺-1-磷酸在第12天对A2B5的影响以及在第18天对NF和MAG的影响。

[0075] 图31: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。

[0076] 图32: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。

[0077] 图33:示出了实施例7中所用的磷脂酰肌醇 (PI)、磷脂酰胆碱、磷脂酰 (PC)、磷脂酰丝氨酸 (PS) 和鞘磷脂的脂肪酸概况。

[0078] 图34: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。

[0079] 图35:示出了ARA对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。

[0080] 图36: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。

[0081] 图37:示出了锌对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。

[0082] 图38:示出了磷脂酰肌醇对MAG和MBP mRNA表达的影响。

- [0083] 图39:示出了GD3对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0084] 图40:示出了DHA对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0085] 图41: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。
- [0086] 图42:示出了铁对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0087] 图43: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。
- [0088] 图44: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。
- [0089] 图45:示出了叶酸对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0090] 图46:示出了胆碱对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0091] 图47: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。
- [0092] 图48: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。
- [0093] 图49:示出了糖基化神经酰胺对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0094] 图50: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。
- [0095] 图51:示出了D-赤型神经酰胺对MAG和MBP mRNA表达以及对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0096] 图52:示出了鞘磷脂对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0097] 图53:示出了GM3对MBP和BetaIII共表达的影响。
- [0098] 图54:示出了成熟实验的实验程序。
- [0099] 图55:示出了髓鞘形成实验的实验程序。

具体实施方式

[0100] 在本发明的一方面,提供了包含一种合成组合物,该组合物包含维生素,该组合物可用于促进、支持或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或智力潜能和/或认知潜能和/或学习潜能和/或认知功能。

[0101] 通过促进、支持和/或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或智力潜能和/或认知潜能和/或学习潜能和/或认知功能。本发明的组合物可预防、降低风险和/或减轻所述个体的次优的重新髓鞘形成、特别是次优的重新髓鞘形成轨迹、和/或次优的脑结构、和/或次优的脑连接、和/或次优的智力潜能和/或次优的认知潜能和/或次优的学习潜能、和/或次优的认知功能。这可以是非治疗性或治疗性的。

[0102] 如本文所用,术语“促进”是指导致某个过程发生的因素或多个因素。

[0103] 如本文所用,术语“支持”是指一旦某个过程开始发生便维持该过程的因素或多个因素。

[0104] 如本文所用,术语个体是指哺乳动物、特别是猫、狗或人类,更特别地该术语是指

人类、甚至更特别是人类婴儿或儿童、并且甚至更特别是喂予婴儿配方食品和/或成长乳的人类婴儿或儿童。

[0105] 如本文所用,术语“婴儿”是指至多12月龄的人类婴儿,并且包括早产婴儿和极早产出生的婴儿,具有低出生体重的婴儿(即,无论是因为早产还是胎儿生长受限,体重低于2500g (5.5磅)的新生儿),以及小于胎龄(SGA)的婴儿(即,出生体重低于相同胎龄的婴儿的第10百分位的婴儿)。

[0106] 如本文所用,术语“儿童”是指1至18岁的人,更具体地讲是1至10岁的人,甚至更具体地讲是1至5岁的人,并且甚至更具体地讲是1至2岁的人。

[0107] 如本文所用,术语“配方食品喂养的婴儿或儿童”是指喂予婴儿配方食品和/或成长乳的婴儿或儿童。

[0108] 如本文所用,术语“母乳喂养的个体”是指哺乳动物、特别是猫、狗或人类,更特别地该术语是指人类、甚至更特别是人类婴儿或儿童、并且甚至更特别是喂予人类母乳、特别是来自营养丰富的母亲的人类婴儿或儿童。

[0109] 如本文所用,术语“重新髓鞘形成”是指发育髓鞘形成、特别是在生长和发育期间个体脑中的裸露轴突有髓鞘形成的过程。它是这样的过程,该过程特别是在特定的脑区域中,在子宫中开始而且在出生后期继续,并且该过程在人类个体生命的前5年、特别是人类生命的前2或3年、更特别是人类生命的第一年中是最丰富的。

[0110] 如本文所用,术语“重新髓鞘形成轨迹”是指作为时间的函数的重新髓鞘形成的程度或新髓磷脂的积聚(如例如通过髓磷脂水级分所测量的),特别是处于经过婴儿期和儿童期、特别是幼儿期、更特别是在人类个体生命的前5年、更特别是人类生命的前2或3年、甚至更特别是当婴儿配方食品可能是某些婴儿的唯一营养形式时的人类生命的第一年或前6个月。

[0111] 如本文所用,术语“脑结构”是指脑的、和特定脑区域内的灰质和白质的结构、特别是指如通过重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹(即,通过髓磷脂的重新结构沉积)所确定的脑的、和特定脑区域内的有髓鞘白质。更特别地该术语是指整个脑的、和/或特定脑区域中的有髓鞘物质的量和/或空间分布、并且甚至更特别是整个脑的、和/或特定脑区域中的有髓鞘物质的量和/或时空分布。

[0112] 如本文所用,术语“智力潜能”是指如由生理因素所决定的个体可获得的可能的智能和智力。特别地智力潜能可以指流体智力。

[0113] 如本文所用,术语“流体智力”是指如由生理因素所决定的个体的神经潜能和/或个体的新型或抽象问题解决能力。这与至少部分地由学习或适应文化的知识决定的晶态智力不同。

[0114] 如本文所用,术语“认知潜能”是指如由生理因素所决定的个体可能获得的可能的认知和/或心智能力或心智容量。特别地术语可以是指以下一个或多个;信息处理潜能、感知潜能、注意力潜能、思维潜能、推理潜能、理解和记忆潜能、精神运动潜能(包括粗大运动和精细运动潜能)、视觉潜能(包括视觉接收潜能)、听觉潜能、语言潜能(包括表达性和接收性语言潜能)、记忆和回忆潜能、集中潜能、执行功能潜能(包括解决问题、决策和抑制潜能)。

[0115] 如本文所用,术语“学习潜能”是指如由生理因素所决定的个体必须学习(例如通

过经验、研究或被教导,个体能够如何轻松和/或快速获得知识或技能)的可能能力或能耐。以及如由生理因素所决定的个体必须适应环境因素的可能能力。

[0116] 如本文所用,术语“学习”是指通过经验、学习或通过被教导来获得知识或技能。

[0117] 如本文所用,术语“认知”是指一个人知道、感知或理解想法的智力过程;因此,是思考和理解的能力。认知包括信息处理、感知、注意力、思维、推理、理解和记忆以及精神运动、语言、记忆、集中、执行功能和解决问题能力的所有方面。

[0118] 由于人类母乳在婴儿营养方面是黄金标准,所以在母乳喂养、更特别是完全母乳喂养的个体、特别是营养良好或营养丰富的母亲的母乳中测量或观察到的重新髓鞘形成轨迹可能被认为是最佳的。因此,如果本发明的组合物使得个体的、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成轨迹符合或更接近于在母乳喂养的、更特别是完全母乳喂养的个体、特别是营养良好或营养丰富的母亲的母乳中测量或观察到的重新髓鞘形成轨迹,则可以认为该组合物优化个体的髓鞘形成轨迹。

[0119] 如果个体的轨迹与所述母乳喂养的个体的轨迹上的任何等同/相同测量点之间的距离至多50%、特别是至多25%、更特别是至多20%,则个体的重新髓鞘形成轨迹可以被认为符合或更接近于在母乳喂养的、更特别是完全母乳喂养的个体、特别是营养良好或营养丰富的母亲的母乳中测量或观察到的重新髓鞘形成轨迹。在至多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%。特别地轨迹将被视为生物等效的。

[0120] 可在时间点的任意组合处测量髓鞘形成轨迹。特别是时间点是人类生命的前5年内、更特别是人类生命的前2或3年、甚至更特别是在人类生命的第一年或前6个月中。

[0121] 重新髓鞘形成轨迹可通过随时间推移反复测量个体的髓鞘形成的任何标记来确定。特别地可通过以下方式来测量重新髓鞘形成轨迹:在不同的时间点处,特别是在经过人类个体生命的前5年、更特别是人类生命的前2或3年、甚至更特别是人类生命的第1年或前6个月的不同时间点处测量个体的髓磷脂相关的水级分(髓磷脂水级分)和/或髓磷脂相关的水池(髓磷脂水池)。可使用多组分弛豫(MCR)磁共振成像(MRI)技术、特别是使用mcDESPOT技术(Deoni等人,2008年)来测量个体的髓磷脂相关的水级分和/或髓磷脂相关的水池。特别地可通过使用mcDESPOT技术测量髓磷脂相关的水池来确定重新髓鞘形成轨迹(Magn. Reson. Med. 200860:1372-1387(《磁共振医学》,2008年,第60卷:第1372-1387页),其主题据此以引用方式并入)。

[0122] 如果本发明的组合物使一个或多个个体、特别是配方食品喂养的个体在标准化的认知测试(包括智力测试、学校成绩测试和/或神经发育测试)中,例如在Mullen早期学习量表上的分数符合或更接近于在母乳喂养的、更特别是完全母乳喂养的个体、特别是营养良好或营养丰富的母亲的母乳中测量或观察到的分数,则该组合物可被认为是优化个体的认知功能和/智力。如果所述个体的标准化的神经发育测试分数中的一个或多个(例如Mullen的T分数)与所述母乳喂养的个体的标准化的神经发育测试分数中的一个或多个之间的差异小于一个标准偏差、更特别是小于标准化的测试分数的标准偏差的一半,例如小于10分、更特别是小于Mullen的T分数的5分、特别是小于2分,则个体的认知和神经发育功能可被认为是符合或更接近于在所述母乳喂养的个体中测量的认知和神经发育功能。所述标准化的神经发育测试分数(例如Mullen的T分数),在所述个体和所述母乳喂养的个体中在相同时

间点处测量。

[0123] 所述Mullen分数可在任何适当的时间点处、特别是在人类生命的前5年、3年内、更特别是人类生命的前2年、甚至更特别是在人类生命的第一年或前6个月中测量。

[0124] 在促进、支持或优化认知潜能、学习潜能和/或智力潜能方面,本发明的组合物可对认知功能(包括认知功能的发育,和/或学习)以及对预防或最小化任何神经认知缺陷、损害或延迟具有短期或长期的效应。

[0125] 所述短期效应可仅在几天,几周或几个月内变得明显。

[0126] 所述长期效应可仅在几年(例如,1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、20年、30年、40年、50年、60年、70年、80年、90年)内变得明显。

[0127] 一种组合物,该组合物包含维生素,例如维生素B12和/或叶酸,可特别有效地支持、促进或优化在以下脑区域中的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构:小脑、视觉皮质、运动和体感皮质。因此,维生素可特别有效地促进、支持或优化视力潜能、运动功能(包括运动潜能的协调和执行在内)、和精神运动潜能。

[0128] 在本发明的一个实施方案中,认知潜能选自视力潜能、运动功能(包括运动的协调和执行在内)、和精神运动潜能。

[0129] 在促进、支持或优化视力潜能、运动功能(包括运动潜能的协调和执行在内)、和精神运动潜能方面,本发明的组合物可具有短期或长期效果,例如对于视力、运动功能(包括运动的协调和执行在内)、和精神运动功能的增强效果。所述短期效应可仅在几天,几周或几个月内变得明显。

[0130] 所述长期效应可仅在几年(例如,1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年、20年、30年、40年、50年、60年、70年、80年、90年)内变得明显。

[0131] 在本发明的实施方案中,一种组合物,该组合物包含维生素,增强个体的视力和/或运动功能(包括运动的协调和执行在内)、和精神运动功能。

[0132] 如本文所用,术语维生素可指任何维生素。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。

[0133] 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。

[0134] 在本发明的实施方案中,维生素为维生素B12、叶酸和/或它们的组合。

[0135] 维生素可以组合物的0.001%最高至99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0136] 叶酸可以占组合物的0.001%最高至99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0137] 特别地可以高于50mcg/100g干组合物、更特别地50mcg/100g至500mcg/100g干组合物的量包含叶酸。

[0138] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含叶酸,其量选自:高于50mcg,高于65mcg,高于70mcg,高于100mcg,高于110mcg,高于160mcg,在50mcg至500mcg的范围内,在50mcg至400mcg的范围内,在110mcg至500mcg的范围内,在70mcg至170mcg的范围内,在110mcg至400mcg的范围内,在110mcg至400mcg的范围内,在110mcg至350mcg的范围内,其中所有重量均按100g干组合物计。

[0139] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定量的叶酸,使得来源于本发明

的营养组合物的总日摄入量将不超过400mcg。

[0140] 叶酸可以原样或以其生理上可接受的盐(叶酸盐)或其混合物的形式掺入本发明的营养组合物中。

[0141] 维生素B12可以占组合物的0.001%最高至99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0142] 特别地维生素B12可包含在组合物中,其量选自: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100g干组合物计。

[0143] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含维生素B12,其量选自:高于0.01mcg,高于0.5mcg,高于0.7,高于5,在0.1mcg至10mcg、0.4mcg至5mcg、0.5mcg至2mcg、1mcg至1.5mcg、4mcg至8.5mcg、5mcg至8mcg的范围内,其中所有重量均按100g干组合物计。

[0144] 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,该量使得来源于本发明营养组合物的总日摄入量将不超过7.6mcg/100g干组合物(77.6mcg/Kg干组合物)。

[0145] 维生素B12可以原样或以其生理上可接受的盐或其混合物的形式,或通过包含维生素B12的任何来源掺入本发明的营养组合物中。特别地维生素B12可以其纯的形式掺入组合物中,如氰钴胺素、羟钴胺素、以及它们的任何组合。

[0146] 如果本发明的组合物还包含以下成分中的一者或多者:矿物质和/或磷脂和/或脂肪酸衍生物和/或胆碱,则可能是特别有利的。

[0147] 当本发明的组合物包含维生素,特别是叶酸和/或维生素B12,以及这些成分中的一种或多种时,其在促进支持和/或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或认知潜能和/或智力潜能和/或学习潜能和/或认知功能方面可具有改善的效应。例如,这可能是由于所述成分在相同和/或单独的互补脑区域中实现重新髓鞘形成。改善的效应可以是协同的。

[0148] 在一个实施方案中,本发明的组合物还包含矿物质和/或胆碱和/或磷脂和/或脂肪酸的衍生物。

[0149] 如本文所用,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、镁、碘、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。

[0150] 特别有效的矿物质可为铁、锌、钙、磷、铜和镁,特别是铁。

[0151] 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。

[0152] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含铁。铁可以占组合物的至多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0153] 特别地铁可以高于5mg/100g干组合物的量包含在组合物中。

[0154] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含铁,其量选自:高于4mg,高于9mg,在5mg至40mg的范围内,在9mg至40mg的范围内,在5mg和20mg的范围内,在9mg至20mg的范围内,在5mg至15mg的范围内,在9mg至15mg的范围内,在3.5mg至7mg的范围内,其中所有重量均按100g干组合物计。

[0155] 铁可以一种生理上可接受的盐的形式掺入本发明的组合物中,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。

[0156] 铁可以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组合物中。

[0157] 如果将铁以亚铁盐或络合物(例如,上文列出的亚铁盐)的形式添加到组合物中,则Fe²⁺更具生物可用性,并且因此可能更有益。

[0158] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定水平的铁,使得来源于本发明的营养组合物的总日摄入量将不超过40mg。

[0159] 在一个实施方案中,根据本发明的营养组合物包含锌。锌可以占组合物的至多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0160] 特别地锌可以高于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100g干组合物计。

[0161] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含锌,其量选自:在0.5mg至8mg、2mg至5.5mg、2.5mg至4.5mg、3mg至4mg、4mg至7.5mg、6mg至7.5mg的范围内,其中所有重量均按100g干组合物计。

[0162] 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,该水平的锌使得来源于本发明营养组合物的总日摄入量将不超过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。

[0163] 锌可以生理上可接受的盐的形式,和/或通过包含锌、更具体地讲为Zn²⁺,诸如,例如:硝酸锌、硫酸锌、葡萄糖酸锌、乙酸锌或它们的混合物的任何来源,或以生理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。

[0164] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含铜。铜可以组合物的至多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0165] 特别地铜可以高于10mcg、高于40mcg、高于60mcg的量包含在组合物中,其中所有重量均按100g组合物干重计。

[0166] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含铜,其量选自:高于100mcg、范围为100mcg至850mcg、180mcg至650mcg、200mcg至400mcg、210mcg至300mcg、210mcg至240mcg、450mcg至850mcg、800mcg至840mcg,其中所有重量均按100g组合物干重计。

[0167] 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,该水平的铜使得来源于本发明营养组合物的总日摄入量将不超过1426mcg/天,或将不超过488mcg/天。

[0168] 铜可以原样或以生理上可接受的盐的形式,和/或通过包含铜、更具体地讲为Cu²⁺的任何来源掺入本发明的组合物中。例如,可将铜掺入到组合物中作为: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。

[0169] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含镁。镁可以组合物的至多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0170] 特别地镁可以高于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100g组合物干重计。

[0171] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含镁,其量选自: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100g干组合物计。

[0172] 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,该水平的镁使得来源于本发明营养组合物的总日摄入量将不超过110mg/天,或将不超过65mg/天。

[0173] 镁可以原样或以生理上可接受的盐的形式,和/或通过包含镁、更具体地讲为 Mg^{2+} 的任何来源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、柠檬酸镁盐、正磷酸镁盐。

[0174] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含钙。钙可以组合物的至多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0175] 特别地钙可以高于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100g组合物干重计。

[0176] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含钙,其量选自:在84mg至760mg的范围内,在200mg至550mg的范围内,在250mg至450mg的范围内,在280mg至520mg、350mg至650mg、400mg至600mg的范围内,其中所有重量均按100g干组合物计。

[0177] 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,该水平的钙使得来源于本发明营养组合物的总日摄入量将不超过482mg/天,或将不超过477mg/天。

[0178] 钙可以原样或以生理上可接受的盐的形式,和/或通过包含钙、更具体地讲为 Ca^{2+} 的任何来源掺入本发明的组合物中。例如,碳酸钙、氯化钙、柠檬酸钙盐、葡萄糖酸钙,甘油磷酸钙、乳酸钙、氢氧化钙、正磷酸钙盐。

[0179] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含磷。磷可以组合物的至多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0180] 特别地磷可以高于1.7mg/100g,高于14.3mg/100g,高于27.3mg/100g组合物干重的量包含在组合物中。

[0181] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含磷,其量选自: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100g干组合物计。

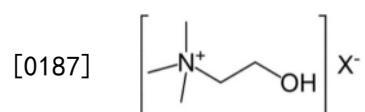
[0182] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定水平的磷,该水平的磷使得来源于本发明营养组合物的总日摄入量将不超过863mg/天,或将不超过787mg/天。

[0183] 磷可以原样或以生理上可接受的盐的形式,和/或通过包含磷(例如:磷酸钙、磷酸氢钙)的任何来源掺入本发明的组合物中。

[0184] 一种组合物,该组合物包含矿物质,特别是铁、锌、铜、钙、镁和磷中的一种或多种,可特别有效地支持、促进或优化在以下脑区域中的一个或多个中的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构:小脑、视觉皮质、运动和体感皮质、胼胝体、额叶皮质、颞叶白质、内囊、前额皮质、运动皮质。这些脑区域与运动功能(包括运动的协调和执行在内)、视觉功能、半球形交互、执行功能、工作记忆、问题解决、社交情绪功能、语言、听觉功能、问题解决和/或工作记忆相关联。

[0185] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含胆碱。

[0186] 术语“胆碱”标识含有具有以下所示结构的N,N,N-三甲基乙醇铵阳离子的季铵盐:



[0188] 胆碱

[0189] 除非另外指明,否则在本发明的上下文中,术语“胆碱”应旨在标识以游离形式(或作为其盐)存在于本发明营养组合物中的所有胆碱。

[0190] 胆碱可以组合物的至多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0191] 特别地胆碱可以高于30mg/100g干组合物的量包含在组合物中。

[0192] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含胆碱,其量选自:高于10mg,高于50mg,高于100mg,高于111mg,高于170mg,在30mg和1000mg的范围内,在30mg至700mg的范围内,在50mg和1000mg的范围内,在50mg至700mg的范围内,在50mg和500mg的范围内,在100mg至400mg的范围内,在170mg至300mg的范围内,在120mg至200mg的范围内,其中所有重量均按100g干组合物计。

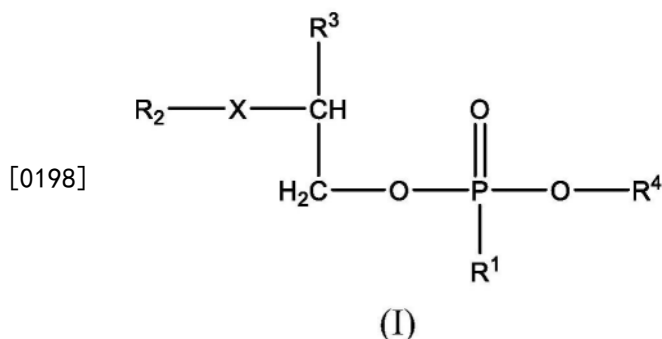
[0193] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含一定水平的游离形式(或作为其盐)或来源于包含其的结构胆碱,使得来源于本发明的营养组合物的总日摄入量将不超过1g。

[0194] 胆碱可以原样或以一种生理上可接受的盐(诸如:氯化胆碱、柠檬酸胆碱、酒石酸氢胆碱或其混合物)的形式掺入本发明的组合物中。

[0195] 一种组合物,该组合物包含胆碱,可特别有效地支持、促进或优化在以下脑区域中的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构:小脑、视觉皮质、丘脑、顶叶皮质、和额叶。这些脑区域与运动功能(包括运动的协调和执行在内)、视力、工作记忆和/或执行功能和/或社交情绪推理和/或空间推理相关联。

[0196] 在一个实施方案中,本发明的组合物包含磷脂代谢前体或其代谢物。

[0197] 如本文所用,术语“磷脂”是指任何磷脂、特别是式(I)的化合物



[0199] 其中,

[0200] R^1 为0;

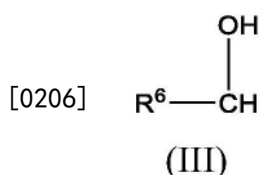
[0201] X为NH或O;

[0202] R^2 为C2-C44饱和或不饱和的、直链或支链的酰基基团;

[0203] R^3 为式(II)或式(III)的取代基:

[0204] $\text{R}^5 - \text{O} - \text{CH}_2$

[0205] (II)

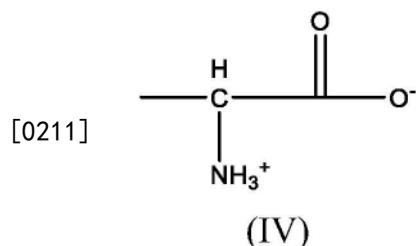


[0207] 其中, R^5 为 C2-C44 饱和或不饱和的、直链或支链的酰基基团; 并且

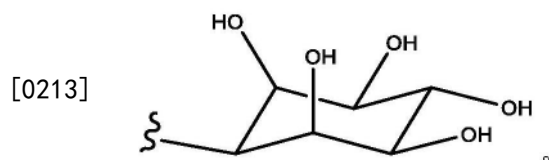
[0208] R^6 为 C2-C44 饱和烷基或烯基基团; 并且

[0209] R^4 选自: C5 或 C6 取代的或未取代的环状烷基或烯基基团, 或者

[0210] $-(CH_2)_n-R^7$, 其中 n 为在 1 至 4、特别是 1 至 2 的范围内的整数, 并且 R^7 是 $-N(CH_3)_3^+$ 、 NH_3^+ 或式 (IV) 的取代基, 并且



[0212] 特别地 R^4 为被一个或多个羟基基团取代的 C6 环状烷基或烷基或烯基基团, 更特别地 R^4 衍生自肌糖 (C6H12O6), 并且甚至更特别是肌醇, 即 R^4 为:

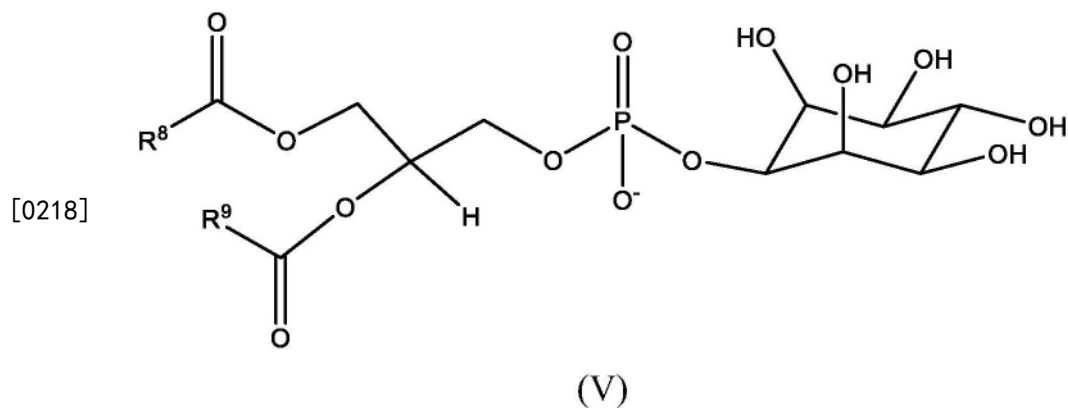


[0214] 如本文所用, 术语“无环”是指不是环状, 即不包含闭链原子的基团。

[0215] 磷脂的非限制性示例包括磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂和磷脂酰胆碱。

[0216] 在本发明的实施方案中, 磷脂选自: 磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘磷脂和/或它们的组合。

[0217] 磷脂酰肌醇是式 (V) 的化合物



[0219] 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 R^9 为 C2 至 C43 支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

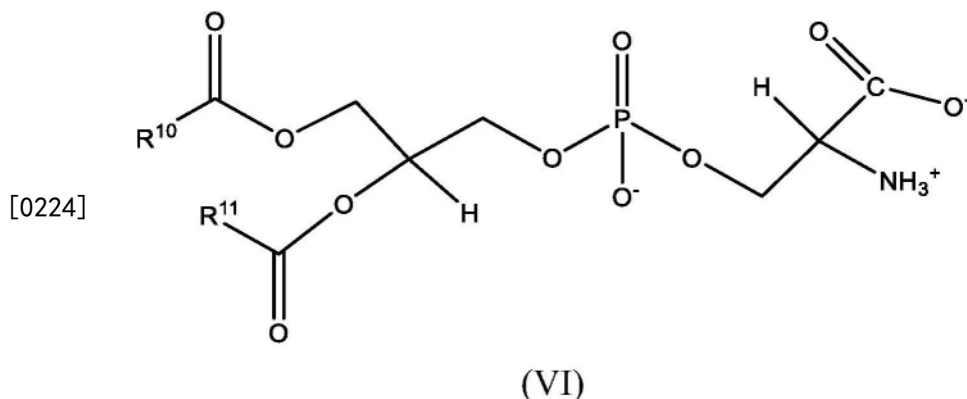
[0220] 更特别地 R^8 和 R^9 彼此独立地为 C13 至 C43 支链或非支链的无环烷基、或无环烯基基团, 其与其相邻羰基基团一起对应于 C14 至 C44 饱和或不饱和的脂肪酸残基, 并且甚至更特别地 R^8 和 R^9 彼此独立地为 C13 至 C23 支链或非支链的无环烷基、或无环烯基基团, 其与其相邻羰基基团一起对应于 C14 至 C24 饱和或不饱和的脂肪酸残基。

[0221] 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, 其与其相邻羰基基团一起为 C14 至 C24 饱和或不饱和的脂肪酸残基, 其中脂肪酸残基源于其的脂肪酸

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。甚至更特别是C18:0、C18:1n-9、C18:2、C20:3和C20:4。

[0222] 正如技术人员将会理解的那样。如本文所用,术语磷脂酰丝氨酸是指磷脂酰-L-丝氨酸。

[0223] 磷脂酰丝氨酸是式(VI)的化合物

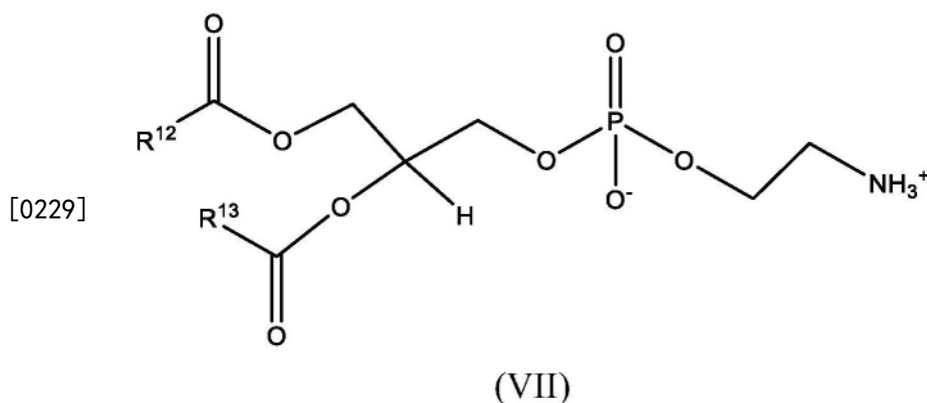


[0225] 其中R¹⁰为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,并且R¹¹为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0226] 更特别地R¹⁰和R¹¹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,其与其相邻羰基基团一起对应于C14至C44饱和或不饱和的脂肪酸残基,并且甚至更特别地R¹⁰和R¹¹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,其与其相邻羰基基团一起对应于C14至C24饱和或不饱和的脂肪酸残基。

[0227] 更特别地R¹⁰和R¹¹为C13至C23支链或非支链的无环烷基、或无环烯基基团,其与其相邻羰基基团一起为C14至C24饱和或不饱和的脂肪酸残基,其中脂肪酸残基源于其的脂肪酸选自: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。甚至更特别是C18:0、C18:1n-9、C20:4和C22:6。

[0228] 磷脂酰乙醇胺为式(VII)的化合物



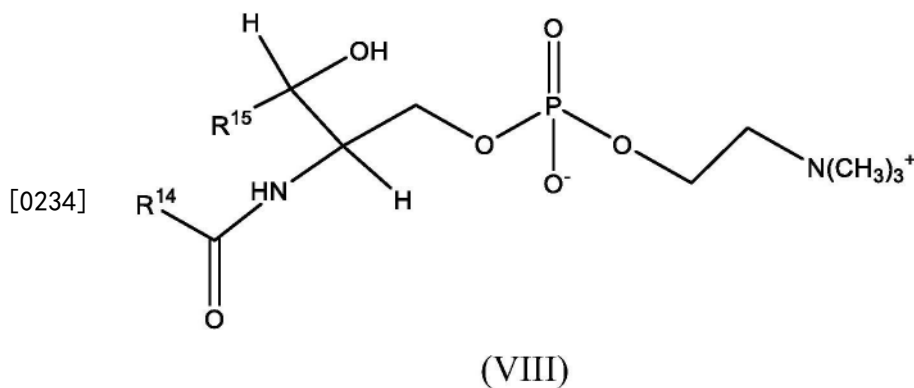
[0230] 其中R¹²为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,并且R¹³为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0231] 更特别地R¹²和R¹³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,其与其相邻羰基基团一起对应于C14至C44饱和或不饱和的脂肪酸残基,并且甚至更特别地R¹²和R¹³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,其与其

相邻羰基基团一起对应于C14至C24饱和或不饱和的脂肪酸残基。

[0232] 如本文所用,术语“鞘磷脂”是指脂质分子,或脂质分子的混合物,其中鞘氨醇或鞘氨醇主链通过酰胺键用脂肪酸残基在氨基基团(-NH₂)处酯化,并且其中鞘氨醇主链的位置1处的羟基基团与磷酸胆碱部分连接。

[0233] 特别地鞘磷脂为式(VIII)的化合物或式(VIII)的化合物的混合物



[0235] 其中

[0236] R¹⁴为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团,R¹⁵为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

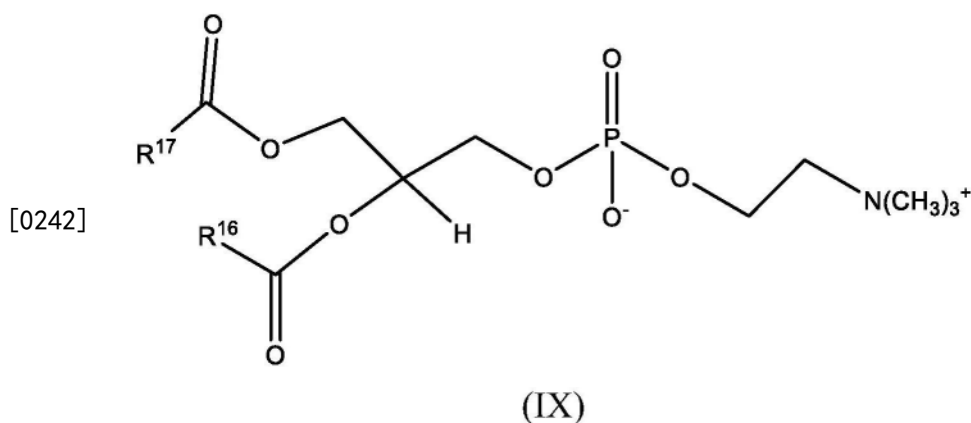
[0237] 更特别地,R¹⁴为C13至C43支链或非支链的无环烷基,或无环烯基基团,其与相邻羰基基团一起对应于C14至C44饱和或不饱和的脂肪酸残基。

[0238] 脂肪酸残基可源于其的C14至C44饱和或不饱和的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。

[0239] 甚至更特别地,R¹⁴为C13至C23支链或非支链的无环烷基、或无环烯基基团,其与相邻羰基基团一起对应于C14至C24饱和或不饱和的脂肪酸残基,其中脂肪酸残基源于其的脂肪酸选自: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。

[0240] 甚至更特别地,鞘磷脂为式(VIII)的化合物的混合物,其中混合物使得包含在混合物中的脂肪酸残基(R¹⁴与相邻羰基基团一起)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。

[0241] 磷脂酰胆碱是式(IX)的化合物



[0243] 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 R^{17} 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0244] 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,其与其相邻羰基基团一起对应于C14至C44饱和或不饱和的脂肪酸残基,并且甚至更特别地, 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,其与其相邻羰基基团一起对应于C14至C24饱和或不饱和的脂肪酸残基。

[0245] 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,其与其相邻羰基基团一起为C14至C24饱和或不饱和的脂肪酸残基,其中脂肪酸残基源于其的脂肪酸选自: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。甚至更特别是C14:0、C16:0、C18:0、C18:1n-9、C18:2n-6、C20:1、C20:3、C20:4和C22:6。

[0246] 磷脂、其代谢前体和/或其代谢物可以以组合物的至多99.999%的量包含在本发明组合物中。

[0247] 特别地鞘磷脂、其代谢前体和/或代谢物可以组合物的至多99.999%的量包含在组合物中。

[0248] 更特别地该组合物将以高于200mg/kg组合物干重、更特别是在200mg/kg至2.5g/kg的范围内的组合物干重的量包含鞘磷脂。

[0249] 在一个实施方案中,组合物包含鞘磷脂,其量选自:高于200mg/kg,高于300mg/kg,在200mg/kg至2.5g/kg的范围内,在200mg/kg至2g/kg的范围内,量在300mg/kg至1.5g/kg或400mg/Kg至1g/Kg的范围内,在200mg/kg至850mg/kg、或300mg/kg至820mg/kg的范围内。所有重量均按组合物的干重计。

[0250] 特别地磷脂酰胆碱、其代谢前体和/或代谢物可以组合物的至多99.999%的量包含在组合物中。

[0251] 更特别地该组合物将以高于200mg/kg组合物干重、更特别是在200mg/kg至2.5g/kg的范围内的组合物干重的量包含磷脂酰胆碱。

[0252] 在一个实施方案中,组合物包含磷脂酰胆碱,其量选自:高于200mg/kg,高于300mg/kg,高于400mg/kg,在200mg/kg至2.5g/kg的范围内,在200mg/kg至2g/kg的范围内,量在300mg/kg至1.5g/kg或400mg/Kg至1g/Kg、500mg/Kg至1.3g/Kg的范围内。所有重量均按组合物的干重计。

[0253] 特别地磷脂酰肌醇、其代谢前体和/或代谢物可以组合物的至多99.999%的量包

含在组合物中。

[0254] 更特别地该组合物将以高于50mg/kg的组合物干重、更特别是在200mg/kg至1.5g/kg的范围内的组合物干重的量包含磷脂酰肌醇。

[0255] 在一个实施方案中,组合物包含磷脂酰肌醇,其量选自:高于200mg/kg、高于300mg/kg、在200mg/kg至2.5g/kg的范围内、在200mg/kg至2g/kg的范围内、在250mg/kg至800mg/kg或400mg/Kg至1.5g/Kg或400mg/kg至800mg/kg的范围内的量。所有重量均按组合物的干重计。

[0256] 特别地磷脂酰丝氨酸、其代谢前体和/或代谢物可以组合物的至多99.999%的量包含在组合物中。

[0257] 更特别地组合物将包含磷脂酰丝氨酸,其量高于50mg/kg组合物干重,高于200mg/kg组合物干重,更特别是在150mg/kg至1.5g/kg组合物干重、200mg/kg至1g/kg组合物干重的范围内。

[0258] 在一个实施方案中,组合物包含磷脂酰丝氨酸,其量选自:高于150mg/kg、高于200mg/kg、高于300mg/kg、在200mg/kg至2.5g/kg的范围内、在200mg/kg至2g/kg的范围内、在250mg/kg至1000mg/kg或400mg/Kg至1g/Kg的范围内的量。所有重量均按组合物的干重计。

[0259] 特别地磷脂酰乙醇胺、其代谢前体和/或代谢物可以组合物的至多99.999%的量包含在组合物中。

[0260] 更特别地组合物将包含磷脂酰乙醇胺,其量高于150mg/kg组合物干重,高于200mg/kg组合物干重,更特别是在150mg/kg至1.5g/kg组合物干重的范围内。

[0261] 在一个实施方案中,组合物包含磷脂酰乙醇胺,其量选自:高于170mg/kg、高于180mg/kg、高于200mg/kg、在200mg/kg至2.5g/kg的范围内、在200mg/kg至2g/kg的范围内、在250mg/kg至800mg/kg或200mg/Kg至1g/Kg的范围内的量。所有重量均按组合物的干重计。

[0262] 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。

[0263] 如果代替磷脂或与磷脂组合将一种或多种磷脂的代谢前体和/或代谢物用于组合物中,则所述化合物的用量使得由所述组合物生理递送的磷脂的水平符合上文列出的那些。确定适当量完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0264] 如本文所用,术语一种或多种磷脂的代谢前体和/或代谢物不包括胆碱。

[0265] 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为:半乳糖神经酰胺、糖基化神经酰胺、鞘氨醇、鞘氨醇-1-磷酸、神经酰胺、D-赤型-二氢神经酰胺和神经酰胺-1-磷酸,以及神经节苷脂。

[0266] 特别有效的磷脂可为磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇和/或鞘磷脂,特别是鞘磷脂。

[0267] 在本发明的实施方案中,磷脂为磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂和/或上述任一者的和/或前述任一者的组合的代谢前体和/或代谢物。特别地磷脂为鞘磷脂,其代谢前体和/或代谢物。

[0268] 磷脂,特别是鞘磷脂的特别有效的代谢前体和/或代谢物可为神经酰胺和神经节苷脂和神经节苷脂以及神经酰胺-1-磷酸和d-赤型-二氢神经酰胺。

[0282] 神经节苷脂和/或神经酰胺和/或神经酰胺-1-磷酸和/或d-赤型-二氢神经酰胺可以任何量包含在组合物中。

[0283] 在2mg/100g-11.5mg/100g GD3和/或GM3范围内的浓度可能是特别有效的。

[0284] 鞘磷脂可由神经酰胺和磷脂酰胆碱合成,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代谢前体或其代谢物组合使用,则可能是特别有益的。

[0285] 包含于本发明组合物中的磷脂、其代谢前体和/或代谢物可为天然的,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。作为另外一种选择,它们可以包含它们的来源的形式添加。

[0286] 适于被旨在食用的组合物的个体摄取的磷脂代谢前体和/或其代谢物的任何来源可用于本发明中。

[0287] 特别地磷脂代谢前体或其代谢物将来自天然来源,其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。乳质的非限制性提取物包括蛋白质提取物(例如,乳清蛋白和酪蛋白)、乳脂肪球膜(MFGM)和包含它们的提取物。

[0288] 可用于本发明的磷脂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 α -乳白蛋白和/或非纯 α -乳白蛋白的牛乳乳清蛋白浓缩物,其已从乳质乳清蛋白、特别是牛乳乳清蛋白中提取。

[0289] α -乳白蛋白是高品质的,易于例如由人类婴儿消化的乳清蛋白,并且是在HM中发现的主要蛋白质。由于 α -乳白蛋白和/或富含乳级分的 α -乳白蛋白具有高含量的必需氨基酸、特别是色氨酸,所以其理想地用于低蛋白婴儿配方食品中。虽然 α -乳白蛋白本身为蛋白质,但非纯来源可包含鞘磷脂。

[0290] 在一个实施方案中,磷脂代谢前体或其代谢产物,特别是鞘磷脂以富含 α -乳白蛋白的乳清蛋白浓缩物的形式或作为 α -乳白蛋白使用。

[0291] 在更特别地实施方案中,使用富含 α -乳白蛋白的牛乳乳清蛋白浓缩物或具有一定的磷脂含量、特别是鞘磷脂含量的 α -乳白蛋白,该含量高于500mg/100g、900mg/100g、1000mg/100g组合物干重。

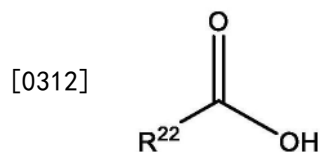
[0292] 磷脂代谢前体或其代谢物的另一个特别有用的来源可以是乳脂肪球膜(下文称为MFGM)或包含它们的提取物、特别是MFGM或来自牛乳的包含它们的提取物。如果MFGM或包含它们的提取物包含至少1%、2%、5%、10%、20%、30%、40%磷脂和/或至少0.1%、0.2%、0.5%至5%、0.8%至3%、1%至2%、1.6%、1.9%、1.8%的磷脂酰胆碱、磷脂酰肌醇、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺和/或鞘磷脂,则可能是特别有益的。MFGM可还进一步包含镁、磷和/或钙,特别地浓度在0.05%至2%、0.1%至0.4%的范围内。

[0293] 一种组合物,该组合物包含磷脂和/或其代谢前体和/或代谢物,特别是鞘磷脂、磷脂酰胆碱和/或磷脂酰肌醇,可特别有效地支持、促进或优化在以下脑区域中的一个或多个中的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构:小脑、视觉皮质、胼胝体、内囊、额叶、顶叶、颞叶、运动皮质、额叶皮质。这些脑区域与以下一个或多个相关联:视力、运动功能(包括运动的协调和执行在内)、半球形交互、语言功能、听觉功能(包括倾听和注意)、工作记忆、执行功能(包括解决问题、社交处理、和行为交互、空间推理、和语言)。

[0309] R^{21} 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0310] 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饱和或不饱和的脂肪酸残基、并且甚至更特别是C14至C24饱和或不饱和的脂肪酸残基。

[0311] 如本文所用, 术语“脂肪酸”是指式 (XII) 的化合物



[0313] (XII)

[0314] 其中

[0315] R^{22} 为C2至C43支链或非支链的无环烷基或无环烯基基团。

[0316] 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。

[0317] 可包含在脂肪酸衍生物(即, 该脂肪酸衍生物可为游离脂肪酸或MAG、DAG、TAG和/或胆固醇酯, 所述MAG、DAG、TAG和/或胆固醇酯的脂肪酸残基源于脂肪酸) 中的C10至C44饱和或不饱和的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-。

[0318] 适于被旨在食用的组合物的个体摄取的任何脂肪酸衍生物可用于本发明中。

[0319] 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、植物例如大豆以及动物来源例如牛脑、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。乳汁的非限制性提取物包括蛋白质提取物、乳脂肪球膜(MFGM)和包含它们的提取物。脂肪酸衍生物也可来自棕榈油、牛油、猪油、棉籽油、花生油。

[0320] 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的饱和或不饱和的脂肪酸, 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的饱和或不饱和的脂肪酸, 则可能是特别有益的。

[0321] 一种组合物, 该组合物包含磷脂, 特别是鞘磷脂、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇, 更特别是鞘磷脂, 在结合这些脂肪酸中的一种或多种使用时可能特别有效。

[0322] 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是神经酸。C18:0是硬脂酸。C16:0是棕榈酸。C18:1n-9是油酸。

[0323] 在一个实施方案中, 根据本发明的组合物包含含有DHA和/或ARA和/或神经酸和/

或硬脂酸的脂肪酸衍生物、特别是含有DHA和/或ARA和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物。最特别是含有DHA和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物。

[0324] 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占组合物至多99.999%的量包含在本发明的组合物中。

[0325] 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。

[0326] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含含有DHA和/或ARA和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物,其量选自:高于15mg/100g,高于30mg/100g,高于50mg/100g,高于55mg/100g,在30mg/100g和300mg/100g的范围内,在30mg/100g至200mg/100g或30mg/100g至150mg/100g的范围内,在50mg/100g至300mg/100g的范围内,在50mg/100g至200mg/100g的范围内,在50mg/100g至150mg/100g的范围内,在150mg/100g至350mg/100g的范围内,在60mg/100g至350mg/100g的范围内,在60mg/100g至120mg/100g的范围内,在100mg/100g至110mg/100g的范围内。所有浓度均按组合物的干重计。

[0327] 包含硬脂酸的脂肪酸衍生物存在于天然来源中,例如棕榈油、牛油、猪油、棉籽油、花生油。

[0328] 包含神经酸的脂肪酸衍生物存在于天然来源中,例如碎叶锦麦(*Cardamine gracea*)、长叶茉莉(*Heliphila longifolia*)、遏蓝菜(*Thlaspi perfoliatum*)、旱金莲(*Tropaeolum speciosum*)、钱币草(*Lunaria biennis*)、银扇草(*Lunaria annua*)和蒜头果(*Malania oleifera*)的种子油;霉菌瘤胃厌氧真菌(*Neocallismastix frontalis*)、禾白粉菌(*Erysiphe graminis*)和白粉病(*Sphaerotheca humuli*);大西洋假单胞菌(*bacterium Pseudomonas atlantica*);酵母酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)和海洋硅藻圆柱菱形藻(*marine diatom Nitzschia cylindrus*)。

[0329] 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、真菌或鱼油和植物中。

[0330] 包含脂肪酸衍生物的油可具有各种来源,该脂肪酸衍生物包含DHA和/或ARA,并且通常包含其它多不饱和脂肪酸(PUFA)、特别是EPA(二十碳五烯酸)。优选地,包含DHA的脂肪酸衍生物以包含含有DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物的鱼油的形式提供。鱼油通常包含5重量%或更多,优选地为10重量%或更多的包含DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物。通常也可获得含有大量从藻类或微生物获得的包含DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物的油。例如,可使用从包含10重量%或更多,例如20重量%或更多的脂肪酸衍生物的藻类收获的油。

[0331] 如果根据本发明的营养组合物包含含有ARA和DHA的脂肪酸衍生物。所述成分可例如以以下量包含在本发明的组合物中:该量使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。

[0332] 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和/或脂肪酸残基与饱和脂肪酸和/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,则也可能是有益的。

[0333] 此外,当包含DHA和/或ARA的大量脂肪酸酯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,则可能是特别有益的。

这些饱和和长链脂肪酸可以是髓磷脂的重要组分,使得其能够环绕并包覆轴突。在本发明的组合物中DHA和/或AA与这些不饱和和长链脂肪酸的重量比可例如在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。

[0334] 本发明包含脂肪酸衍生物(例如包含DHA和/或AA的脂肪酸衍生物)的组合物可在以下脑区域中的一个或多个中特别有效地支持、促进或优化重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构:小脑、内囊、顶叶、运动和感觉皮质(包括运动的协调和执行在内)、视觉皮质、额叶皮质。该脑区域与视觉功能、运动功能和精神运动功能(包括运动功能的协调和执行在内)、和/或执行功能、以及社交情绪功能相关联。

[0335] 本领域的技术人员可根据组合物的性质、目的、目标个体和剂量(例如每天组合物将被个体摄取多少次)来识别适当量的上述营养物质、其代谢前体或代谢物。通常,有效剂量将取决于个体的年龄、体型和健康状态,取决于个体的生活方式,组合物中营养物质的量,并且可能取决于个体的性别。

[0336] 有效剂量可以是促进、支持或优化个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接、和/或智力潜能和/或认知潜能和/或学习潜能和/或认知功能的任何剂量。

[0337] 对于婴儿配方食品或成长乳,技术人员可将本文所公开的化合物或营养物质(例如,维生素)的量或比例基于特别是由营养丰富的母亲对于相同年龄的婴儿或儿童产生的人类母乳中发现的那些量。

[0338] 基于本文的信息和本领域的知识确定有效剂量完全在本领域技术人员的能力范围内。

[0339] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含:维生素,特别是维生素B12和/或叶酸;磷脂,特别是磷脂酰胆碱、和/或和/或磷脂酰丝氨酸、和/或磷脂酰肌醇、和/或鞘磷脂和/或前述任一者的代谢前体或代谢物;矿物质,特别是铁和/或锌和/或钙和/或镁和/或磷和/或铜;和胆碱;以及脂肪酸衍生物,特别是包含DHA和/或AA和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物。

[0340] 所述组合物中所述成分的特别有益的浓度/量可以是鞘磷脂的量至少300mg/kg或420mg/kg、特别是多于800mg/kg、更特别是多于900mg/kg;磷脂酰胆碱的量至少1000mg/kg;磷脂酰丝氨酸的量至少900mg/kg;磷脂酰肌醇的量至少700mg/kg;叶酸的量为至少140mg/kg、更特别是至少160mg/kg;维生素B12的量至少2.34mcg/100g、特别是多于5mcg/100g、更特别是7mcg/100g;铁的量至少6mg/100g或至少8.6mg/100g、更特别是11.5mg/100g、甚至更特别是多于16mg/kg;胆碱的量至少124mg/kg、更特别是140mg/kg;包含DHA的脂肪酸衍生物的量至少89mg/100g;包含AA的脂肪酸衍生物的量至少89mg/100g或至少175mg/100g;锌的量至少4mg/100g或至少4.7mg/100g、更特别是7mg/100g;钙的量至少200mg/100g或至少500mg/100g;磷的量至少140mg/100g或至少350mg/100g;铜的量至少250mcg/100g或至少600mcg/100g;镁的量至少30mg/100g或至少50mg/100g。其中所有重量均按组合物的干重计。

[0341] 对于用于测量上述成分中的一种或多种的浓度的任何分析技术而言,落入已确定的误差范围内的浓度应被视为落入本文列出的浓度范围内。

[0342] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含:维生素B12和/或叶酸;鞘磷脂和/

或其代谢前体或代谢物；铁、锌；胆碱以及包含DHA和/或AA的脂肪酸衍生物。

[0343] 在一个实施方案中,根据本发明的组合物包含含有DHA和/或ARA的脂肪酸衍生物；维生素B12和/或叶酸；鞘磷脂和铁。

[0344] 在一个更特定的实施方案中,根据本发明的组合物包含浓度为102mg/100g的包含DHA的脂肪酸衍生物、浓度为102mg/100g的包含ARA的脂肪酸衍生物、浓度为5.4mcg/100g的维生素B12、浓度为169mcg/100g的叶酸、浓度为81.4mg/100g的鞘磷脂和浓度为6.7mg/100g的铁。

[0345] 本发明的组合物可为适用于直接施用给个体的任何类型的组合物。

[0346] 特别地组合物将为合成营养组合物。

[0347] 如本文所用,术语“合成营养组合物”是指滋养个体的合成组合物。该营养组合物可以经胃肠内、胃肠外或静脉内服用。特别地组合物将经胃肠内、更特别是口服服用。

[0348] 在本发明的实施方案中,所述组合物将为选自以下的合成营养组合物:成长乳、婴儿配方食品、或旨在添加人类母乳或用人类母乳(下文称为“HM”)稀释的用于婴儿的组合物(例如, HM强化剂)、或旨在供婴儿和/或儿童单独食用或与HM组合食用的食料(例如,辅食)。

[0349] 本发明的组合物还可包含已知用于所涉及的组合物类型(例如,婴儿配方食品)的任何其它成分或赋形剂。

[0350] 这种成分的非限制性示例包括:蛋白质、氨基酸、碳水化合物、低聚糖、脂质、益生元或益生菌、核苷酸、核苷、其它维生素、矿物质和其它微量营养素。

[0351] 在本发明的一个典型的实施方案中,该组合物将包含蛋白质来源、脂质来源和碳水化合物来源。

[0352] 例如,此类组合物可包含在约2g/100kcal至6g/100kcal的范围内的蛋白质,在约1.5g/100kcal至3g/100kcal的范围内的脂质和/或在约1.7g/100kcal至12g/100kcal的范围内的碳水化合物。

[0353] 如果该组合物是液体,则其能量密度可在60kcal/100ml和75kcal/100ml之间。

[0354] 如果该组合物是固体,则其能量密度可在60kcal/100g和75kcal/100g之间。

[0355] 蛋白质的类型被认为对本发明无关紧要。然而,就用于婴儿和/或儿童的合成组合物(例如,婴儿配方食品或成长乳)而言,所述蛋白质应支持婴儿和/或儿童的生长,使得所述婴儿和/或儿童可遵循其遗传背景、出生体重和健康状态的典型的生长曲线。

[0356] 蛋白质的非限制性示例包括:酪蛋白、 α -乳白蛋白、乳清、 β -乳球蛋白、大豆蛋白、大米蛋白、玉米蛋白、燕麦蛋白、大麦蛋白、小麦蛋白、黑麦蛋白、豌豆蛋白、卵蛋白、葵花籽蛋白、马铃薯蛋白、鱼蛋白、肉蛋白、乳铁蛋白、血清白蛋白、免疫球蛋白、以及它们的组合。

[0357] 氨基酸的非限制性示例包括亮氨酸、苏氨酸、酪氨酸、异亮氨酸、精氨酸、丙氨酸、组氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、缬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、丝氨酸、精氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、以及它们的组合。

[0358] 碳水化合物的非限制性示例包括乳糖、蔗糖、麦芽糖糊精、淀粉以及它们的组合。

[0359] 脂质的非限制性示例包括棕榈油精、高油酸葵花油、高油酸红花油、芥花油、鱼油、椰子油、牛乳脂以及它们的组合。

[0360] 如果组合物以25g/100g至30g/100g组合物干重的量包含脂肪,则可能是特别有益的。

[0361] 必需脂肪酸的非限制性示例包括:亚油酸(LA)、 α -亚麻酸(ALA)。本发明的组合物还可包含神经节苷脂(单唾液酸神经节苷脂-3(GM3)和双唾液酸神经节苷脂3(GD3),以及它们的组合)。

[0362] 益生元的非限制性示例包括:任选地含有果糖、半乳糖、甘露糖的低聚糖;膳食纤维,特别是可溶性纤维、大豆纤维;菊粉;以及它们的组合。优选的益生元为低聚果糖(FOS)、低聚半乳糖(GOS)、异麦芽低聚糖(IMO)、低聚木糖(XOS)、低聚阿拉伯木糖(AXOS)、低聚甘露糖(MOS)、大豆低聚糖、糖基蔗糖(GS)、乳蔗糖(LS)、乳酮糖(LA)、低聚帕拉金糖(PAO)、低聚麦芽糖、树胶和/或其水解产物、果胶和/或其水解产物以及前述物质的组合。

[0363] 低聚糖的进一步示例描述于Wrodnigg, T.M.; Stutz, A.E. (1999) Angew. Chem. Int. Ed. 38:827-828和WO 2012/069416(以引用方式并入本文)中。

[0364] 益生菌的非限制性示例包括:双歧杆菌属(*Bifidobacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococcus*)、肠球菌属(*Enterococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces*)、酵母属(*Saccharomyces*)、假丝酵母属(*Candida*),特别是选自长双歧杆菌(*Bifidobacterium longum*)、乳酸双歧杆菌(*Bifidobacterium lactis*)、动物双歧杆菌(*Bifidobacterium animalis*)、短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*)、婴儿双歧杆菌(*Bifidobacterium infantis*)、青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)、嗜酸乳杆菌(*Lactobacillus acidophilus*)、干酪乳杆菌(*Lactobacillus casei*)、副干酪乳杆菌(*Lactobacillus paracasei*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、乳酸乳杆菌(*Lactobacillus lactis*)、鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosus*)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus johnsonii*)、植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)、唾液乳杆菌(*Lactobacillus salivarius*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、屎肠球菌(*Enterococcus faecium*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、布拉酵母(*Saccharomyces boulardii*)或它们的混合物,优选地为选自长双歧杆菌NCC3001(ATCC BAA-999)、长双歧杆菌NCC2705(CNCM I-2618)、长双歧杆菌NCC490(CNCM I-2170)、乳酸双歧杆菌NCC2818(CNCM I-3446)、短双歧杆菌菌株A、副干酪乳杆菌NCC2461(CNCM I-2116)、约氏乳杆菌NCC533(CNCM I-1225)、鼠李糖乳杆菌GG(ATCC53103)、鼠李糖乳杆菌NCC4007(CGMCC 1.3724)、屎肠球菌SF 68(NCC2768;NCIMB10415),以及它们的组合。

[0365] 核苷酸的非限制性示例包括单磷酸胞苷(CMP)、单磷酸尿苷(UMP)、单磷酸腺苷(AMP)、单磷酸鸟苷(GMP)以及它们的组合。

[0366] 可用于本发明的营养组合物中的营养组合物的其它合适和所需成分可在食品法典委员会(Codex Alimentarius)颁发的有关所涉及的营养组合物类型(例如婴儿配方食品、HM强化剂、较大婴儿配方食品或用来供婴儿食用的食料(例如辅食))的指南中有所描述。

[0367] 在甚至更特定的实施方案中,本发明的组合物是具有在实施例5并且具体地讲在表11a中列出的组合物的婴儿配方食品。

[0368] 本发明所用的合成营养组合物例如婴儿配方食品,可以通过任何合适的方式制备得到。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共混在一起制备。如果使用乳化剂,则可将其包含在共混物中。此时可添加维生素和任何矿物质,

但为了避免热降解,通常在稍晚一点的时候添加。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,再共混。然后可混入水(优选地为经过反渗透的水),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在约80℃至约110℃的范围内的温度,持续约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质化;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。然后可进一步冷却均质化混合物,以添加任何热敏感组分;例如维生素和矿物质。此刻顺便将匀质化的混合物的pH和固形物含量标准化。将经匀质化的混合物转移至合适的干燥装置(例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。

[0369] 如上述公开中显而易见的,本发明的组合物可用于促进、支持或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接和/或智力潜能、和/或认知潜能和/或学习潜能和/或认知功能。

[0370] 在本发明的另一个方面,提供了促进、支持或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接和/或智力潜能、和/或认知潜能和/或学习潜能和/或认知功能的方法,所述方法包括对所述个体喂予一种组合物,该组合物包含维生素,如本文中所定义的特别是叶酸和/或维生素B12。

[0371] 在本发明的另一个方面,提供了一种组合物,该组合物包含维生素,如本文中所定义的特别是叶酸和/或维生素B12,用于制备促进、支持和/或优化个体、特别是配方食品喂养的个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构、和/或脑连接和/或智力潜能、和/或认知潜能和/或学习潜能和/或认知功能的组合物。

[0372] 如果将本发明的组合物施用于9月龄或更小、特别是6月龄或更小、更特别是3月龄或更小的婴儿,则可能是特别有益的。

[0373] 3月龄或更小的非限制性示例为至多2周龄,至多1月龄,至多2月龄,至多3月龄,1至3月龄。

[0374] 本文所述的本发明组合物的效果可具有长期健康益处。痴呆(例如阿尔茨海默病)导致个体的思考和记忆能力下降,以及情绪和语言问题。个体患有痴呆、特别是阿尔茨海默病的风险已与人的智力能力或智力相关联。因此,通过优化个体的智力、认知和/或学习潜能,个体患痴呆、特别是阿尔茨海默病的风险可能降低。所述长期效应可仅在几年(例如,40年、50年、60年、70年、80年、90年)内变得明显。

[0375] 另外,多种精神疾病和/或神经障碍(例如,焦虑、抑郁症、自闭症和精神分裂症)与脑结构有关、特别是和整个脑的白质的量和/或空间分布有关。通过促进、支持或优化个体的重新髓鞘形成、特别是重新髓鞘形成轨迹、和/或脑结构,可能预防精神疾病和/或神经障碍(例如,焦虑、抑郁症、自闭症和精神分裂症),或者降低患这些疾病的风险,或者降低所述病症的严重程度。所述效应可仅在几年(例如,1年、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10

年、20年、30年、40年、50年、60年、70年、80年、90年)内变得明显。

[0376] 除非另外指明,否则本文表达所有百分比都按重量计。

[0377] 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。

[0378] 如技术人员将显而易见的,本文所公开的相同益处可通过直接服用维生素,特别是叶酸和/或维生素B12来获得,与组合物形式相反。因此,维生素,特别是叶酸和/或维生素B12可以本文所述的任何方法或用途直接用于代替本发明的组合物。

[0379] 如对于技术人员将进一步显而易见的,如果所述维生素,特别是叶酸和/或维生素B12与以下成分中的一种或多种分别、相继和/或同时施用,即,食用:胆碱;和/或矿物质,特别是铁和/或锌和/或钙和/或磷和/或镁和/或铜;脂肪酸衍生物,特别是包含二十二碳六烯酸和/或花生四烯酸和/或神经酸和/或硬脂酸的脂肪酸衍生物;和/或磷脂,特别是磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇和/或鞘磷脂和/或鞘磷脂和/或前述中任一者的代谢前体或代谢物,则可能是特别有益的。

[0380] 本发明的所有细节同样适用于包含维生素,特别是叶酸和/或维生素B12的组合物,并且适用于直接使用维生素,特别是叶酸和/或维生素B12。

[0381] 应当理解,可自由组合本文所公开的本发明的所有特征,而且在不脱离权利要求书所定义的本发明范围的前提下,可对这些特征作出变更和修改。此外,如果特定的特征存在已知的等同物,则应将这些等同物并入本说明书中,如同在本说明书中具体地提到这些等同物。

[0382] 如本文所用,术语“特别是(特别地)”或“更特别是(更特别地)”不应视为限制性的,而是应解释为与“例如”或“尤其”同义。

[0383] 下面是用于举例说明本发明的一系列非限制性实施例。

[0384] 实验部分:

[0385] 方法、定义和材料

[0386] MRI (磁共振成像):使用白质成像技术获得0和5岁之间婴儿和儿童的MRI脑扫描。该技术提供定量测量,髓磷脂水级分(MWF),其为脑中髓磷脂含量的替代标记。当在幼儿早期映射为时间的函数时,可以产生髓鞘形成轨迹。

[0387] 婴儿配方食品组合物:向参与研究的婴儿喂予六种婴儿配方食品,分析它们的髓磷脂相关营养物质的组合物/水平。

[0388] 在不同品牌/供应商的标准市售婴儿配方食品中测试营养组合物,并显示其中所含的营养物质的不同水平。

[0389] 认知能力:粗大运动、视觉接收和语言(表达性且善于接受性)的年龄标准化的(T)分数来源于Mullen早期学习量表,这是用于婴儿和6岁或年纪更小的儿童的早期认知发育的标准化和经过验证的测量工具。

[0390] 营养物质分析

[0391] 6种婴儿配方食品组合物中的每种中的营养物质示于表1中。

[0392] 表1

[0393]

营养物质	单位	分析中包括的跨 6 种婴儿 配方食品的浓度范围
α 乳白蛋白	g/100g 蛋白质	ND-1.01
脂肪	g/100g	26.3 - 29.5
AA	mg/100g	94.2 - 180
DHA	mg/100g	42.3 - 89.8
铁	mg/100g	8.42 - 11.7
钙	mg/100g	397 - 566
磷	mg/100g	234 - 358
钠	mg/100g	135 - 189
钾	mg/100g	593 - 834
铜	mcg/100g	471 - 834
锌	mg/100g	4.23 - 7.25
镁	mg/100g	38.4 - 53.9
锰	mcg/100g	60.6 - 140.3
维生素 B12	mcg/100g	4.93 - 8.34
叶酸	mcg/100g	98.8 - 306
胆碱	mg/100g	35.7 - 170
β 乳球蛋白	g/100g	ND - 4.21
磷脂酰胆碱	mg/kg	397 - 1287
磷脂酰肌醇	mg/kg	266 - 788
磷脂酰丝氨酸	mg/kg	<LQ (144)- 977
磷脂酰乙醇胺	mg/kg	<LQ(174)
鞘磷脂	mg/kg	<LQ(100) - 480

[0394] 临床研究

[0395] 婴儿参与者

[0396] 该研究中包括的婴儿是从正常脑和行为发育的较大纵向研究中提取的：布朗大学对成熟过程中髓鞘形成和行为的评估 (BAMBAM)。为了专注于神经型发育，已知在学习、神经或精神障碍方面具有潜在风险因素的儿童在招募和登记期间被具体地排除。因此，有子宫内酒精或违禁物质暴露的儿童，早产儿 (<妊娠37周) 或多胎生产，胎儿超声异常，合并妊娠 (例如，先兆子痫)，APGAR评分<8，入住NICU，神经障碍 (例如，头部损伤、癫痫)，婴儿、父母或兄弟姐妹中的精神病或发育障碍 (包括需要药物治疗的母亲抑郁症) 被排除在外。正在进行的筛查 (诸如自闭症MCAT，或行为问题CBCL) 进一步用于移除具有临床上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。

[0397] 回顾性和前瞻性数据的组合经由以下各项从父母获得：详细的病历和父母面谈，了解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百分比、以及完全母乳喂养的时间长度。该信息在每次研究访问时更新，大约每6个月对2岁以下的儿童进行一次该研究访问，并且年龄较大的儿童则每年进行一次该研究访问。使用该信息，将儿童分类为2组：1号完全配方食品喂养；和2号完全母乳喂养至少90天 (3个月)。在3个月内喂予母乳和配方食品的组合的儿童被排除在我们的分析之外。完全配方食品喂养组中的婴儿根据在整个前3个月使用的主要婴儿配方食品的父母报告来进一步细分。主要配方食品被定义为给定90%的时间或更多 (例如，在父母在假期期间使用替代品牌的情况下)。

[0398] 使用这些标准，将94名完全配方食品喂养的婴儿选入1号组。这些儿童包括13名接

受2号配方食品的儿童;28名接受5号配方食品的儿童;8名接受3号配方食品的儿童;39名接受4号配方食品的儿童;5名接受1号配方食品的儿童和1名接受6号配方食品的儿童。关于平均年龄、妊娠持续时间、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(除英语外)的数量,也选择了52名完全母乳喂养的婴儿样本并与配方食品喂养组进行匹配。表1a中提供了每种配方食品的分组。

[0399] 表1a用于纵向和营养分析的数据明细

	配方食品 1	配方食品 2	配方食品 5	配方食品 3	配方食品 4	配方食品 6	母乳喂养
[0400] N 儿童	5	13	28	8	39	1	52
N 测量	11	27	56	14	64	3	106

[0401] 成像方法和分析

[0402] 使用mcDESPOT (T_1 和 T_2 的多组分驱动平衡单脉冲观察)白质成像技术来扫描每个婴儿,Deoni等人(Magn. Reson. Med. 2008, 60:1372-1387(《磁共振医学》,2008年,第60卷,第1372-1387页)),其在整个脑的每个点处提供了髓磷脂水级分(MWF)的定量测量—髓磷脂含量的测量。所有婴儿在自然(即,非镇静)睡眠期间使用声学消声mcDESPOT成像方案进行扫描。总成像时间在从对于年龄最小的学步儿19分钟到对于年龄较大的4岁儿童24小时的范围内。

[0403] 所有数据都是在装有12通道头RF阵列的Siemens 3T Tim Trio扫描仪上获取的。为了最小化扫描内部运动,将儿童用小儿MedVac真空固定袋(美国CFI医疗解决方案(CFI Medical Solutions, USA))和泡沫垫包裹。通过减小峰值梯度幅度和转换速率,并且使用噪声隔离扫描仪孔插入件(安静屏障HD复合材料,美国UltraBarrier公司(UltraBarrier, USA))来降低扫描仪噪声。还使用了MiniMuff儿科耳罩和电动耳机(德国MR Confon公司(MR Confon, Germany))。用儿科脉搏血氧测量系统和红外相机连续地监测儿童。所有儿童在MRI扫描的持续时间内都保持睡眠,并且分析数据中不存在运动伪影。

[0404] 在图像对准,非脑信号移除,以及对主磁场和传输磁场(B_0 和 B_1)不均匀性的校正之后,将三池信号模型(包括髓磷脂相关联的水;轴突内-外水;和非交换的自由水池)拟合至mcDESPOT数据以得出基于体素的MWF标测图。

[0405] 然后将每个儿童的标测图与研究特定模板非线性对齐。对应于5个双侧区域(额侧、颞侧、枕侧、顶侧和小脑WM)以及胼胝体的主体、膝部和压部的白质遮罩由普通数据库创建,注册到共同模板,并且叠加到每个儿童的MWF标测图上。然后为每个儿童确定每个区域的平均值,并用于随后的发育分析和轨迹建模。

[0406] 发育差异:

[0407] 为了检查母乳喂养的婴儿和配方食品喂养的婴儿之间的发育差异,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。修改的Gompertz生长模型独立地适合于1号和2号组,以及每个配方食品子组。四个Gompertz模型参数中的每一个然后使用非配对t测试在母乳喂养组和配方食品喂养组之间,并且使用方差分析在4个配方食品子组之间进行比较,然后进行事后Tukey测试以确定配方食品组中的哪些不同。

[0408] 认知评估和分析

[0409] 除MR成像外,使用Mullen早期学习量表MSEL(Mullen EM, 1995年)在扫描后7天内

评估每个儿童的一般认知能力和技能。MSEL提供对精细运动和粗大运动控制、接收性和表达性语言以及视觉接收领域的行为发育的广泛评估。来自这些领域的年龄标准化T分数可以合并为三个综合分数:早期学习复合材料(ELC,包括精细运动、视觉接收,表达性和接收性语言);非言语发育商数(NVDQ,包括精细运动和视觉接收分数);以及语言发育商数(VDQ,包括表达性和接收性语言分数)。

[0410] 与MWF MRI数据一样,检查在母乳喂养的婴儿和配方食品喂养的婴儿之间,以及在不同配方食品子组之间ELC、VDQ和NVDQ的潜在组平均差异。除了平均值比较之外,使用假设线性趋势的混合效应建模来研究这三个综合值的纵向变化。

[0411] 实施例1

[0412] 来自横截面分析的营养驱动因素识别

[0413] 从上述组群中,在婴儿期喂予不同婴儿配方食品的至多5岁的儿童被包括在大型相关分析,以检查配方食品营养组合物与髓鞘形成之间的关系。针对其营养组合物分析该组群中6种最常使用的配方食品。构建模拟所有定量的营养物质和儿童年龄的单一通用线性模型(GLM)。

[0414] 然后在每个图像体素或脑内的点处计算营养物质含量和髓磷脂含量值(针对儿童年龄调整)之间的Spearman等级相关性。使用基于群集的校正方法,将显著性定义为针对第1类误差校正的 $p < 0.05$ 。将关联或趋势定义为 $p < 0.15$ 。在初始分析中,表1中示出的全部22种营养物质导致动力不足的模型。为了减少模型中的营养组分的数量,我们检查了营养间相关性。使用0.9的保守阈值,我们排除了在各种配方食品中彼此高度相关的营养组分。这产生了最终模型,其包括铁、鞘磷脂、叶酸、胆碱、DHA、锌和磷脂酰胆碱。

[0415] $P < 0.05$:铁、鞘磷脂、叶酸、胆碱、DHA。

[0416] $P < 0.15$:锌和磷脂酰胆碱。

[0417] 发现彼此高度相关的营养组分是:

[0418] 叶酸和维生素B12。

[0419] DHA和AA。

[0420] 锌、钙、镁、铜和磷。

[0421] 磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸和磷脂酰肌醇。

[0422] 对于叶酸,在脑中、特别是在小脑、运动皮质、视觉皮质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图1b中。

[0423] 对于维生素B12,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、运动和体感皮质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2中。

[0424] 对于铁,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、内囊、运动和体感皮质、胼胝体、额叶皮质、颞叶白质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2a中。

[0425] 对于锌,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、内囊、运动和体感皮质、胼胝体、额叶皮质、颞叶白质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2b中。

[0426] 对于钙,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、运动和体感皮质、胼胝体、额叶皮质、颞叶白质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2c中。

[0427] 对于磷,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、运动和体感皮质、前额皮质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2d中。

[0428] 对于镁,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、内囊、胼胝体、额叶皮质、运动皮质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2e中。

[0429] 对于鞘磷脂,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、内囊、额叶、顶叶、颞叶中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2f中。

[0430] 对于磷脂酰肌醇,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、运动皮质、额叶皮质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2g中。

[0431] 对于磷脂酰胆碱,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、内囊、额叶、顶叶、颞叶中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2h中。

[0432] 对于胆碱,在脑中、特别是在小脑、视觉皮质、丘脑、顶叶皮质和额叶中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2i中。

[0433] 对于DHA,在脑中随时间推移观察与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联、特别是在小脑、初级和次级运动皮质、内囊、视觉皮质、额叶皮质中。结果报告于图2j中。

[0434] 对于AA,在脑中、特别是在小脑、内囊、顶叶、运动和感觉皮质、视觉皮质、额叶皮质中随时间推移观察到与髓鞘形成(髓磷脂水级分)的关联。结果报告于图2k中。

[0435] 实施例2

[0436] a) 来自纵向研究的整个脑的髓鞘形成轨迹

[0437] 从可用数据中,使用来自其婴儿配方食品(此类配方食品的组合物报告于下表3中)含有不同量的叶酸和维生素B12的儿童的重复MWF数据来计算纵向髓磷脂发育(重新髓鞘形成)的轨迹。使用纵向非线性混合效应方法计算轨迹。将修改的Gompertz生长模型拟合至每个配方食品组的儿童的数据。结果报告于图1中。

[0438] 表3:

	(低叶酸/B12含量)	(高叶酸/B12含量)
叶酸	107mcg/100g	306mcg/100g
维生素B12	4.93mcg/100g	8.34mcg/100g

[0440] b) 来自纵向研究的平均区域脑髓鞘形成轨迹

[0441] 从可用数据中,使用来自其婴儿配方食品(此类配方食品的组合物报告于下表2a中)含有不同量的叶酸和维生素B12的儿童的重复MWF数据来计算纵向髓磷脂发育(重新髓鞘形成)的平均区域轨迹。使用纵向非线性混合效应方法计算轨迹,并且将修改的Gompertz生长模型拟合至每个配方食品组的儿童的数据。结果在图1a中报告。

[0442] 表3a

	(低叶酸/B12含量)	(高叶酸/B12含量)
叶酸	98.8mcg/100g	306mcg/100g
维生素 B12	4.66mcg/100g	8.34mcg/100g

[0445] 实施例3

[0446] 供应商和原液溶液

[0447]	化合物	公司	Cat 号	Cas 号	原液
	辛酸	西格玛公司 (sigma)	O3907	12407-2	50mM
	神经酸	Fluka	87117	50637-6	10mM
	硬脂酸	Fluka	85679	57-114	10mM
	鞘磷脂	西格玛公司 (sigma)	S0756	8518710-6	10mM

[0448] 载体和剂量

[0449]	化合物	载体/溶解于	剂量 1	剂量 2	剂量 3
	辛酸	DMSO	10 μ M	50 μ M	250 μ M
	神经酸	DMSO	10nM	100nM	1 μ m
	硬脂酸	DMSO	100nM	1 μ m	10 μ M
	鞘磷脂	溶解于 ETOH 中/稀释于 DMSO 中	10nM	100nM	1 μ m

[0450] 培养基组合和培养方法

[0451] 1) 神经基础的完整培养基

[0452] 神经基础培养基(生命技术公司(LIFE TECHNOLOGIES CORP),21103-049号)

[0453] 50X B27补充剂(生命技术公司(LIFE TECHNOLOGIES CORP),12587-010号)

[0454] 2mM L-谷氨酰胺(生命技术公司(LIFE TECHNOLOGIES CORP),25030-149号)

[0455] 1X青霉素-链霉素(生命技术公司(LIFE TECHNOLOGIES CORP),15140-122号)

[0456] 2) 具有生长因子(GF)的神经基础培养基

[0457] 具有GF混合物的上述配方

[0458] 1M Tris(分子质量121.14,Fisher SCI BP152)

[0459] 肝素(sigma H3149)

[0460] BSA(Sigma A7030)

[0461] DNA酶、RNA酶、蛋白酶游离水(Fisher SCI AC327390010)

[0462] EGF(GIBCO PHG0311)

[0463] bFGF小瓶(GIBCO PHG0021)

[0464] 3) 无胆碱的神经基础培养基(生命技术公司(Lifetechnologies),定制配制,无L-谷氨酰胺,无酚红)

[0465] 注意:完成并且用GF完成与上述相同。

[0466] 神经祖细胞(NPC)库的生成:

[0467] E14小鼠新皮质的解离

[0468] 所需试剂:

[0469] DPBS (1X)+10%青霉素/链霉素

[0470] 神经基础培养基/10%青霉素/链霉素/10X Hepes

[0471] 工序:

[0472] 收获E14幼犬脑并置于冰冷的DPBS (1X)+10%青霉素/链霉素中,然后使用解剖显微镜将其解剖。从每只幼犬中,将一个脑半球置于2ml神经基础培养基/10%P/S/10X Hepes中,并将另一个脑半球置于另一个管中。

[0473] 将来自每个管的组织无菌且手动解离成单细胞,添加神经基础的完整培养基并在130G下离心5分钟。然后将组织重新悬浮于具有GF的神经基础的完整培养基中,并且置于100mm×20mm的康宁悬浮培养皿(430591号)中。细胞使用1:3比例传代两次,在此之后将它们离心(130g,5分钟),重悬于冷冻培养基(10%DMSO和神经基础的完整培养基,无GF)中并在液氮(LN2)中冷冻。

[0474] 融化细胞以用于复合筛选

[0475] 将小瓶从LN2中移除,迅速解冻,并将细胞逐滴转移到15mL锥形瓶中。添加10ml的完整神经基础培养基。将细胞转移至悬浮培养皿中,并且置于温育箱中2小时。在1.5小时处,检查细胞。根据健康状况和人数,估计所需的平板的数量,并且将适当量的完整神经基础培养基加温。2小时后,将细胞置于15mL锥形管中并在130G下旋转5分钟。然后将细胞重悬于具有GF的完整神经基础培养基(每10mL培养基3u1的GF)中。然后使细胞生长过夜,随后在实验中使用。

[0476] 在仅用于神经球计数和直径的96孔板中平板接种细胞

[0477] Corning Costar 3474,96孔板,超薄附件

[0478] 细胞的解离和平板接种

[0479] 将3-4mL细胞从倾斜板中取出并添加至15ml锥形物。将剩余培养基中的一些用于冲洗板。将所有剩余的培养基拉出并放入到15ml锥形管中,并且在130G下旋转5分钟。移除所有培养基。将细胞轻轻地重悬于5ml温热的PBS中,再次旋转。然后移除PBS,并且随后将细胞轻轻地重悬于500μl Accutase(Corning™Accutase™细胞分离溶液,25058CI号)中。然后用1000μl尖端轻轻吸移细胞以使团块破碎,然后将它们置于振摇水浴中5-10分钟,此后经常用手涡旋它们。

[0480] 培养基如下文所指示来制备,所有培养基具有GF:

[0481]	化合物					
	辛酸	对照物/载体	低胆碱/载体	1%BSA	低	中等
	神经酸	对照物/载体	低胆碱/载体	中等胆碱/载体	低	中等
	硬脂酸	对照物/载体	低胆碱/载体	中等胆碱/载体	低	中等
	鞘磷脂	对照物/载体	低胆碱/载体	中等胆碱/载体	低	中等

[0482] 对照物和化合物培养基用2号培养基制备并且含有29uM胆碱,低(5uM)和中等(70uM)胆碱培养基用3号培养基制备。

[0483]	化合物	公司	Cat	cas 号	原液	载体/溶解	剂量 1	剂量 2
	氯化胆碱	西格玛公司(Sigma)	26978	67-48-L	7mM	PBS	5 μm	70 μm

[0484] 使用1000μl尖端轻轻吸移培养基,并且然后使用200μl尖端以进一步分散细胞。

[0485] 团块不大于约3-5个细胞。添加5-10ml的温热培养基(GF)以稀释酶。添加2mL的培养基。用1000u1移液管将此吸移,然后用血清移液管添加3ml。细胞在平板接种前滤过细胞

培养批准的40 μ M过滤器。

[0486] 取出1ml以对细胞计数。再次旋转细胞。将培养基从细胞团块中移除,添加1ml的制备培养基(无GF)。用1000ul移液管吸移细胞。在250 μ L适当的培养基中制备细胞稀释液(24,000个细胞/孔)。每天使细胞成涡旋并生长2天。

[0487] 固定和染色

[0488] 1.将细胞固定在发机罩中。为了固定和随后的免疫组织化学分析,移除100 μ l培养基并添加100ul 4%PFA的1 $\times$ PBS溶液以固定细胞,同时对神经球进行手动计数,然后用1 $\times$ PBS洗涤细胞两次,持续5分钟,并且留在1 $\times$ PBS中,包裹在箔中并在4 $^{\circ}$ C下放置过夜,或进行Dapi染色。移除100uLPBS并且在室温下添加100uL抗体(AB)染色溶液(1%山羊血清,1 $\times$ PBS,和0.1%triton X)块持续1小时。移除AB染色溶液。然后将细胞用Dapi 1:5000的AB染色溶液染色,每孔100 μ l,然后将细胞在室温下在黑暗中温育15分钟。然后将细胞在AB染色溶液中洗涤2次持续五分钟。使用GE Cytell成像器或LSM 710,Zeiss共聚焦显微镜进行成像,并用ImageJ软件(美国国立卫生研究院)分析神经球的直径。

[0489] 在用于单层分化或EdU掺入测定法的24孔板中平板接种细胞

化合物						
辛酸	对照物/载体	低胆碱/载体	中等胆碱/载体	低	中等	高
神经酸	对照物/载体	低胆碱/载体	中等胆碱/载体	低	中等	高
硬脂酸	对照物/载体	低胆碱/载体	中等胆碱/载体	低	中等	高
鞘磷脂	对照物/载体	低胆碱/载体	中等胆碱/载体	低	中等	高

[0491] 在用于以下测定之前,将24孔玻璃底板(Mat Tek P24G-1.0-13-F Case,玻璃底24孔板)用聚-L-鸟氨酸(Sigma P4957)和纤连蛋白(Sigma F1141)涂覆。

[0492] 参见上面的细胞的解离和平板接种。

[0493] 将细胞平板接种(每孔10,000个细胞)在具有GF的完整培养基中持续24小时(每孔500ul)。一旦细胞被附接,它们便被转换为缺乏胆碱的培养基,其他化合物培养基或适当的培养基。

[0494] 分化测定:神经元、神经胶质和NPC标记表达的定量

[0495] 在24小时后,确保将细胞附接到板,然后小心地移除培养基。

[0496] 添加500 μ L含有2%Nu血清(血清替代物)(CorningTMNu-血清生长培养基补充剂,CB55004号)、对照物、低胆碱或中等胆碱培养基的化合物培养基。注意:培养基不含GF。

[0497] 对照物和化合物培养基用2号培养基制备并且含有29uM胆碱,低(5uM)和中等(70uM)胆碱培养基用3号培养基制备。

[0498] 将细胞在加上2%Nu血清的培养基中培养9天,每隔2天更换一次培养基。为了固定和随后的免疫组织化学分析,移除培养基,将细胞用1 $\times$ PBS漂洗5分钟,漂洗一次,并用4%PFA的1 $\times$ PBS在4 $^{\circ}$ C下固定15分钟。然后用1 $\times$ PBS洗涤细胞两次持续5分钟,留在1 $\times$ PBS中,包裹在箔中并在4 $^{\circ}$ C下放置过夜,或立即对它们进行初级抗体染色。

[0499] 用于分化的染色

[0500] 移除PBS并添加足够的AB染色溶液(1%山羊血清,1×PBS和0.1%triton X)以覆盖底部,将块保持在室温下1小时。

[0501] 在合适量的AB染色溶液中制备初级抗体稀释液,每孔250ul(抗体仅在冰上短时间保存,鼠抗MAP2或TUJ1 1:500(神经元标记),兔抗GFAP(神经胶质标记)1:1000,鸡抗巢蛋白CFP(EGFP抗体(祖细胞标记))1:1000。移除AB染色溶液,并且将初级抗体的溶液添加到每个室中。将细胞包裹在箔中并保持在4℃下过夜。然后在400ul AB染色溶液中

[0502] 洗涤细胞一次持续5分钟以移除初级抗体。制备二抗溶液(对于每个室250ul足够)(山羊抗小鼠alexa 488 1:2000,抗兔Cy3(1:500),抗鸡alexa 647 1:500,以及1:5000Dapi)。

[0503] 将细胞在黑暗中以室温下温育1小时,并在AB染色溶液中洗涤2次持续五分钟。然后将它们保持在4℃下或使用GE Cytell成像器或LSM710,Zeiss共聚焦显微镜成像,并用ImageJ软件(美国国立卫生研究院)进行分析。

[0504] 微管相关蛋白2(MAP2),神经元β-微管蛋白III(TuJ1),神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和巢蛋白CFP(EGFP抗体)。

[0505] 每个标记表达在收集的图像上进行测量(ImageJ中的积分密度测量)并且被标准化为DAPI荧光,标记所有原子核(积分密度测量)。

[0506] 辛酸用神经元β-微管蛋白III(TuJ1)标记,随后的化合物用微管相关蛋白2(MAP2)标记。

[0507] 单层培养NPC增殖测定(掺入EdU-S相标记)

[0508] 在24小时后,确保已将细胞附接到板,然后小心地移除培养基。添加加上GF的500μL的化合物培养基。将细胞在适当培养基中培养3天。

[0509] 对照物和化合物培养基用2号培养基制备并且含有29uM胆碱,低(5uM)和中等(70uM)胆碱培养基用3号培养基制备。

[0510] 使用Click-iT® EdU Alexa Fluor® 555成像试剂盒(生命技术公司(Life technologies),c10338号)测量EDU掺入。

[0511] 在第3天结束时,在固定之前,将EdU以10μM添加至每个孔持续30分钟。为了固定和随后的免疫组织化学分析,移除培养基,用1×PBS漂洗细胞5分钟,漂洗一次,并且用4%PFA的1×PBS在4℃下固定15分钟,然后用1×PBS洗涤细胞两次持续5分钟,留在1×PBS中,包裹在箔中并在4℃下放置过夜,或进行染色。

[0512] 移除PBS并添加足够的AB染色溶液(1%山羊血清,1×PBS和0.1%triton X)以覆盖底部,将块保持在室温下1小时。针对EDU对细胞进行染色。将细胞在黑暗中以室温下温育30分钟。将细胞用1×PBS洗涤并用Dapi 1:5000ul染色15分钟。用1×PBS洗涤细胞一次,然后在4℃下放在PBS中,或立即使用GE Cytell成像器(细胞活力应用)或LSM 710,Zeiss共聚焦显微镜成像(使用ImageJ软件(美国国立卫生研究院)分析)。

[0513] 结果示于表4-8和图3至图6中。

[0514] 表4-神经酸对神经元细胞密度和星形胶质细胞密度的影响

[0515]		神经元	星形胶质细胞
	对照物	0.436189	0.642448
	低NA	0.467588	0.621784

中等NA	0.56563	0.721512
高NA	0.539448	0.70279

[0516] 表5硬脂酸对神经元细胞密度和星形胶质细胞密度的影响

	神经元	星形胶质细胞
对照物	0.44	0.64
低SA	0.54	0.68
中等SA	0.66	0.81
高SA	0.64	0.85

[0518] 表6辛酸对神经元细胞密度和星形胶质细胞密度的影响

	神经元	星形胶质细胞
对照物	1.1	4.1
低OA	1.2	3.7
中等OA	1.8	6.1
高OA	1.7	7.9

[0520] 表7鞘磷脂对神经球的数量影响

鞘磷脂	对照	低	中等	高
平均(平均值)	103	94	121	219

[0522] 表8鞘磷脂对神经元增殖的影响

	DAPI
对照物	262
低SM	280
中等SM	314
高SM	305

[0524] 实施例4

[0525] 实验部分

[0526] 样品

[0527] 成分C2:富含 α 乳白蛋白的乳清蛋白浓缩物(样品管理器ID:K2Q-00030);包含富含 α 乳白蛋白的乳清蛋白浓缩物的第一婴儿乳(样品管理器ID:K2Q-00032);牛乳(全脂乳);人类母乳(在分娩后的第4周后收集的6个单独样品的质量控制池;美国密歇根州圣路易斯的Lee生物解决方案公司(Lee Biosolutions, St Louis, MI, USA))。

[0528] 从乳制品中提取磷脂

[0529] 奶粉:将1g量的匀化粉末称量到50mL玻璃烧瓶中,并稀释到20mL纯蒸馏水中。将溶液在40℃下在水浴中加热30分钟。将体积为500 μ L的该溶液置于10mL玻璃管中。

[0530] 牛乳和人乳:将500 μ L量的匀化液体等分至10mL玻璃管。

[0531] 使用9.5mL氯仿/甲醇(2+1)的混合物,通过UPLC-MS/MS(RDLS-MP-80138-Rev01)一式三份定量人母乳中的MP后提取分析物。简而言之,将管振摇并置于40℃的超声浴中15分钟,然后以2500rpm离心10分钟。将体积为2mL的氯化钾溶液(0.88%,m/m)添加到液相中,然后振摇并以2500rpm离心10分钟。将较低的有机相转移至玻璃小瓶中,在温和的N₂流下蒸发

至干,并且在注入LC-MS之前在500 μ L氯仿/甲醇(9+1)中重构。

[0532] 通过联接到质谱(LC-MS)的液相色谱法分析磷脂

[0533] 分析在配备Thermo Scientific Dionex UltiMate 3000快速分离LC系统的Q Exactive加轨道阱(德国不来梅港市赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany))上进行。用(A)乙酸铵10mM和(B)乙腈的流动相组合物在HILIC柱(100 $\times$ 2.1(i.d.)mm;1.7 μ m)上进行分离。注射体积设定为10 μ L,并且梯度在15分钟内从95%B开始到70%B结束,在70%B处保持1分钟,在3分钟内返回到初始条件并平衡6分钟。

[0534] Q Exactive加轨道阱配备有以正离子模式运行的大气压化学电离(APCI)探针。APCI和MS参数如下:电晕放电电流4.0 μ A,鞘气体和辅助气体分别为24和5个任意单位;毛细管和汽化器温度分别为320 $^{\circ}$ C和390 $^{\circ}$ C,扫气流量为0个任意单位,并且s-透镜RF水平为80。自动增益控制(AGC)目标值被设置为 1×10^6 个电荷,并且最大注射时间为100ms,分辨率为35'000,并且每个全MS1次微扫描。AGC设置为 1×10^6 个电荷,并且最大注射时间为250ms,分辨率为17'500,在数据独立分段模式下进行1次微扫描。使用所选母离子的包含列表,其归一化碰撞能量为30%。在曲线模式下在133-2000Da的质量范围内采集数据。施加外部质量校准。系统由Xcalibur 3.0(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))控制。

[0535] 使用精确质量从总离子色谱图中提取SM物质。母离子对应于磷脂酰胆碱在神经酰胺中的源内损失。基于LipidView数据库和文献,使用包含列表对在母离子上构建的57个SM区域异构体进行特异性断裂,所述母离子对应于神经酰胺与水损失[$\text{Cer-H}_2\text{O}+\text{H}^+$](renerry V.C.,Akbaridoust G.,Plozza T.,Rochfort S.,Wales W.J.,Auldism M.,Ajilouni S.Ultra-high-performance liquid chromatography-ion trap mass spectrometry characterisation of milk polar lipids from dairy cows fed different diets.Food Chemistry 2013,141,1451-1460(renerry V.C.,Akbaridoust G.,Plozza T.,Rochfort S.,Wales W.J.,Auldism M.,Ajilouni S.,来自饲喂不同饲料的奶牛的乳极性脂质的超高效液相色谱-离子阱质谱表征,《食品化学》,2013年,第141卷,第1451-1460页);Godzien J.,Ciborowski M.,Martinez-Alcazar M.P.,Samczuk P.,Kretowski A.,Barbas C.Rapid and reliable identification of phospholipids for untargeted metabolomics with LC-ESI-QTOF-MS/MS.Journal of Proteome Research 2015,14,3204-3216(Godzien J.,Ciborowski M.,Martinez-Alcazar M.P.,Samczuk P.,Kretowski A.,Barbas C.,用LC-ESI-QTOF-MS/MS对用于非目标代谢组学的磷脂的快速且可靠的识别,《蛋白质组学研究杂志》,2015年,第14卷,第3204-3216页))。

[0536] 用火焰电离检测器(GC FID)通过气相色谱法对脂肪酸甲酯(FAME)的分析

[0537] 将SM级分在8.5和10分钟之间收集到玻璃管中,每个样品5次。在 N_2 流下溶剂蒸发后,在MP之后通过气相色谱法对人乳中的脂肪酸的定量进行一式三份的FAME分析(RDLS-MP-8980-00030-Rev01-FAME_人乳脂肪,2012年,1.0版本)。

[0538] 结果和讨论

[0539] 亲水性相互作用液相色谱(HILIC)用于分离PL类(即,磷脂酰肌醇(PI)、磷脂酰丝氨酸(PS)、磷脂酰乙醇胺(PE)、磷脂酰胆碱(PC)和SM)。基于在轨道阱质谱仪中检测到的假分子离子的准确质量来指定单独SM物质内的碳的数量和不饱和度。为了在成分、婴儿配方食品、牛乳和人乳之间进行比较,确定SM物质的相对丰度。

- [0540] 不同乳制品中的SM物质
- [0541] 在分析样品中检测到45个SM物质 (表9)。
- [0542] 表9:在成分、婴儿配方食品、牛乳和人乳样品中检测到的SM物质 (由x表示)。仅在人乳中检测到的SM物质以粗体表示。

[0543]

SM	成分	婴儿配 方食品	牛乳	人乳	SM	成分	婴儿配 方食品	牛乳	人乳
SM 24:1				X	SM 37:1	X	X	X	X
SM 25:0	X	X	X	X	SM 37:0	X	X	X	X
SM 28:1	X	X	X	X	SM 38:4				X
SM	X	X	X	X	SM				X

[0544]	28:0					38:3			
	SM 30:2	X	X	X	X	SM 38:2	X	X	X
	SM 30:1	X	X	X	X	SM 38:1	X	X	X
	SM 30:0	X	X	X	X	SM 38:0	X	X	X
	SM 32:3	X	X	X	X	SM 39:1	X	X	X
	SM 32:2	X	X	X	X	SM 39:0	X	X	X
	SM 32:1	X	X	X	X	SM 40:2	X	X	X
	SM 32:0	X	X	X	X	SM 40:1	X	X	X
	SM 33:1	X	X	X	X	SM 40:0	X	X	X
	SM 34:3	X	X	X	X	SM 41:2	X		
	SM 34:2	X	X	X	X	SM 41:1	X	X	X
	SM 34:1	X	X	X	X	SM 41:0	X	X	X
	SM 34:0	X	X	X	X	SM 42:4			X
	SM 35:2	X	X	X	X	SM 42:3	X	X	
	SM 35:0	X	X	X	X	SM 42:2	X	X	X
	SM 36:4	X	X	X	X	SM 42:1	X	X	X
	SM 36:3	X	X	X	X	SM 42:0	X	X	X
	SM 36:2	X	X	X	X	SM 44:3	X	X	
	SM 36:1	X	X	X	X	SM 44:1	X	X	X
	SM 36:0	X	X	X	X				

[0545] 物质SM 24:1、SM 38:4、SM 38:3和SM 42:4在人乳中仅以微量水平发现。

[0546] SM物质的相对丰度

[0547] 根据峰面积除以每个样品的色谱中对应于SM物质的所有峰面积的总和来估计不同乳制品内SM的相对丰度(%)。图7示出了在成分、婴儿配方食品、牛乳和人乳中主要SM物质的相对丰度。

[0548] 成分和婴儿配方食品中存在的SM物质的相对丰度与牛乳相当,并与一些物质(例如,SM 32:1、SM 32:0、SM 33:1、SM 34:1、SM 38:0、SM 39:1、SM 39:0和SM 41:1)的人乳部分有轻微差异,在人乳中比在成分、婴儿配方食品和牛乳中更低。而SM 36:2、SM 36:1、SM 36:0、SM 37:1、SM 38:2、SM 38:1、SM 40:1、SM 42:2和SM 42:1与其它乳制品相比在人乳中具有更高的相对丰度。

[0549] 人乳样品包括在出生后4周内或之后收集的6个单独样品的质量控制池。知道人乳中的SM丰度随饮食和哺乳时间的变化而变化,这可部分地解释观察到的差异。然而,尽管一些SM物质的相对丰度存在差异,但在婴儿配方食品和牛乳中也发现了>85%的在人乳中检测到的SM物质。

[0550] 值得注意的是,对于从MS迹线提取的给定m/z,可建议不同的LCB FA组合(例如,SM 34:1可对应于SM d18:1/16:0、d18:0/16:1、d16:1/18:0等)。因此,我们评估了GC FA曲线,以收集关于不同乳制品之间SM分子结构的更多信息。

[0551] 来自不同乳制品的SM级分中的脂肪酸曲线

[0552] 通过首先将SM分馏,然后通过GC-FID分析级分中存在的FA来研究SM的区域异构体结构。如上所述进行SM的分馏以用于LC-MS分析,但是在这种情况下,将流出物导入5mL玻璃管而不是MS。然后在随后的GC分析之前使每个级分经受甲基化工序。在SM级分内的FA的相对丰度在图8中表示。

[0553] 如图8所示,SM级分主要含有饱和FA(即,肉豆蔻酸14:0、十五酸15:0、棕榈酸16:0、硬脂酸18:0、花生酸20:0、二十二酸22:0、二十三酸23:0和二十四酸24:0)。在来自所有乳制品的SM级分中观察到更高比例的SFA(表10)。这与文献一致,揭示了在SM级分中碳链高于18的SFA的高分布。这种高量的SFA反映了SM的结构作用,即降低了乳脂肪球膜的流动性并保持了刚性。

[0554] 表10:在来自不同乳制品的SM级分中检测到的SFA、MUFA和PUFA的百分比。

[0555]	FA		成分	婴儿配方食品	牛乳	人乳
	SFA%	14:0-16:0;	95.1±2.6	92.8±3.9	93.1±8.4	87.9±2.7
		18:0; 20:0-24:0				
	MUFA%	18:1n-9	2.5±0.7	3.6±0.9	5.3±1.5	4.4±1.9
		24:1n-9	1.7±0.3	1.9±1.7	1.2±0.1	5.9±0.6
	PUFA%	18:2n-6	0.8±0.4	1.7±0.2	0.3±0.4	1.7±0.1

[0556] 单不饱和FA(MUFA)在SM级分中占FA的约4-11%。油酸18:1n-9和神经酸24:1n-9是检测到的2个MUFA。有趣的是,与其它乳制品相比,在人乳中发现24:1n-9具有相对较高比例,并且这与文献一致。与其它产品相比,在测试的婴儿配方食品和人乳中发现仅有的PUFA亚油酸18:2n-6相对较高。最后,在SM级分中未检测到 ω -3PUFA。这也符合见于文献中的数据,示出花生四烯酸(AA, 20:4n-6)、二十碳五烯酸(EPA, 20:5n-3)和二十二碳六烯酸(DHA, 22:6n-3)主要存在于PE、PI和PS中。

[0557] 实施例5

[0558] 根据本发明的合成营养组合物(婴儿配方食品)的示例列于表10和表10a中。

[0559] 表11

[0560]

营养物质信息		
营养成分	单位	每 100g
能量	kJ	2216
蛋白质	g	11
乳清蛋白	g	7.0
α -乳白蛋白	g	1.8
酪蛋白	g	3.8
脂肪	g	29
亚油酸	mg	4160
α -亚麻酸	mg	336
AA	mg	203
DHA	mg	143
碳水化合物	g	52.5
膳食纤维	g	2.4
) 可溶膳食纤维 (作为低聚果糖)	g	2.4
牛磺酸	mg	38
L-肉碱	mg	8.0
叶黄素	μ g	64

[0561]

核苷酸	mg	21
L-酪氨酸	mg	≥407.4
L-色氨酸	mg	≥176.9
维生素 A	μg 视黄醇当量	581
β-胡萝卜素	μg	120
维生素 D	μg	9.6
维生素 E	mgα-生育酚当量	5.9
维生素 K1	μg	54
维生素 B1	μg	800
维生素 B2	μg	880
维生素 B6	μg	440
维生素 B12	μg	9.5
烟酸	μg	4000
叶酸	μg	346
泛酸	μg	2800
生物素	μg	16
维生素 C	mg	72
胆碱	mg	230
肌醇	mg	36
钙	mg	288-588
磷	mg	160-336
镁	mg	36
铁	mg	13.1
锌	mg	7.1
锰	μg	40
铜	μg	266
碘	μg	80
钠	mg	128
钾	mg	520
氯化物	mg	346
硒	μg	11
鞘磷脂	mg	93.8

[0562] 组合物还可包含通常见于婴儿配方食品制剂中的任何附加成分。

[0563] 表11a

[0564]

营养物质	单位 每升	研究性配方食品
能量	kcal	662.0
能量	kJ	2768.5

[0565]

水/水分	g	902.6
灰分	g	3.4
蛋白质		
蛋白质	g	13.4
65%乳清	g	8.7
作为 α -乳白蛋白	g	2.3
35%酪蛋白	g	4.7
碳水化合物		
可用的碳水化合物	g	68.6
碳水化合物	g	73.6
其中乳糖	g	68.6
其中糖	g	68.6
可溶膳食纤维（作为低聚果糖）	g	5.0
脂质		
总脂肪	g	36.0
饱和脂肪酸	g	14.0
反式脂肪酸	g	0.3
鞘磷脂	mg	105.0
亚油酸	mg	5200.0
亚麻酸	mg	420.5
亚油酸： α 亚麻酸比值	比值	12.4
ARA	mg	132.0
DHA	mg	132.0
ARA/DHA	比值	1.0
维生素		
维生素 A（视黄醇）	mcg RE	660.1
β -胡萝卜素	mcg	150.0
维生素 D（胆钙化醇）	mcg D	12.0
维生素 E(TE)	mg	5.8
维生素 K	mcg	53.6
维生素 B1（硫胺素）	mg	0.8
维生素 B2（核黄素）	mg	0.9
维生素 B6（吡哆醇）	mg	0.6
维生素 B12（氰钴胺）	mcg	7.0
烟酸	mg	5.0
叶酸	mcg	219.0
泛酸	mg	3.5

[0566]

生物素	mcg	18.0
维生素 C (抗坏血酸)	mg	80.0
矿物质和微量元素		
钙	mg	336.7
磷	mg	190.0
钙:磷	比值	1.8
镁	mg	45.0
铁	mg	8.6
锌	mg	5.5
锰	mcg	50.0
铜	mg	0.3
碘	mcg	90.0
钠	mg	175.0
钾	mg	500.0
氯化物	mg	345.0
硒	mcg	13.5
其它物质		
胆碱	mg	160.0
肌醇	mg	45.0
牛磺酸	mg	37.6
L-肉碱	mg	8.8
叶黄素	mg	0.1
核苷酸 (总量)	mg	20.8
CMP	mg	10.4
UMP	mg	4.0
AMP	mg	3.2
GMP	mg	1.6
IMP	mg	1.6

[0567] 实施例6

[0568] 在定群研究中报告的用于婴儿喂养的两种主配方食品为3号婴儿配方食品和6号婴儿配方食品。与6号相比,3号婴儿配方食品和婴儿生命中前5年期间增加的整体髓磷脂发育相关联。比较2种配方食品(图9、10、11)。经由我们的纵向混合效应方法计算出的轨线示出,Gompertz生长曲线参数在所调查的每个脑区域中不同。在表12中给出了5号婴儿配方食品和6号婴儿配方食品的髓磷脂相关的营养物质的特定营养物质分析。

[0569] 表12-6种婴儿配方食品中髓磷脂相关的营养物质的营养物质分析。

[0570]

		3	6
α 乳白蛋白	g/100g蛋白质	ND	0.89
脂肪	g/100g	26.6	26.9

AA	mg/100g	162	172
DHA	mg/100g	79.6	81.5
铁	mg/100g	8.42	10.6
钙	mg/100g	417	430
磷	mg/100g	237	255
钠	mg/100g	161	135
钾	mg/100g	628	593
铜	mcg/100g	477	472
锌	mg/100g	4.23	5.75
镁	mg/100g	38.4	46.7
锰	mcg/100g	140.3	122
维生素B12	mcg/100g	5.15	4.66
叶酸	mcg/100g	158	98.8
胆碱	mg/100g	111	170
β乳球蛋白	g/100g	ND	3.54
磷脂酰胆碱	mg/kg	397	1287
磷脂酰肌醇	mg/kg	<LQ	788
磷脂酰丝氨酸	mg/kg	<LQ (149)	977
磷脂酰乙醇胺	mg/kg	<LQ (174)	<LQ (124)
鞘磷脂	mg/kg	421	<LQ (100)

[0571] 实施例7

[0572] 神经元与OL的共培养

[0573] 如先前由Charles等人,2000年所述来培养神经元/少突细胞。

[0574] 将妊娠17天的怀孕雌性大鼠通过颈脱位法(Wistar大鼠)处死并从子宫中取出胎儿。将前脑取出,并且置于含有2%青霉素-链霉素(PS)和1%牛血清白蛋白(BSA)的Leibovitz冰冷培养基(L15)中。通过在37℃下胰蛋白酶化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移液管使细胞机械解离3代。然后将细胞在4℃温度下以180×g在L15培养基中的一层BSA(3.5%)上离心10分钟。弃去上清液,并且将团块的细胞重悬于含有10%FCS的DMEM中。然后将细胞在4℃下以515×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)的神经基础培养基组成的培养基中。使用台盼蓝排除测试在Neubauer血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涂覆的96孔板中。

[0575] 接种后一天(培养的第1天),将细胞与测试化合物(选自表13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。使用雌二醇作为阳性对照物。已知雌二醇诱导OPC增殖。雌二醇对OL分化的积极效应也已被展示,因为其对早期髓鞘形成过程有影响。还公布了雌二醇对神经突生长的积极效应(参见Alevaro等人,2010年来查看)。

[0576] 在加湿的培养箱中,在空气(95%)-CO₂(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持续时间内保持在所定义的浓度。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到OL的分化和早期髓鞘形成过程(髓磷脂包裹),或OL的成熟(髓磷脂成熟)和成熟髓鞘形成过程(髓磷脂包裹)之一。

[0577] OPC的增殖-A2B5阳性细胞和总轴突长度(NF)的测量

[0578] 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%皂苷和1%FCS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的溶液在室温下封闭非特异性位点15分钟。

[0579] 然后将细胞与在小鼠中产生的单克隆抗-A2B5缀合alexafluor® 488在含有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/200稀释液处在室温下温育2小时,并且与在兔中产生的抗NF(磷酸化和非磷酸化的神经丝200)在含有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/500稀释液处在室温下温育2小时。用Alexa Fluor 568山羊抗兔在具有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/400稀释液处在室温下显示该抗体1小时。

[0580] 量化OPC的总数(A2B5阳性细胞的数量)(以评估增殖),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效应(髓鞘形成的质量与轴突网络的质量直接相关)。

[0581] OPC到OL的分化和髓鞘形成过程(髓磷脂包裹)-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)的测量

[0582] 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%皂苷和1%FCS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的溶液在室温下封闭非特异性位点15分钟。

[0583] 然后将细胞与在小鼠中产生的单克隆抗-MAG在含有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/400稀释液处,并且与在兔中产生的抗NF(磷酸化和非磷酸化的神经丝200)在含有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/500稀释液处在室温下温育2小时。用CF 488A山羊抗小鼠在具有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/800稀释液处,并且用Alexa Fluor 568山羊抗兔在具有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/800稀释液处在室温下显示这些抗体1小时。

[0584] 量化OL的总数(MAG阳性细胞的数量和面积)(以评估分化过程),以及围绕轴突对OPC的包裹(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效应。

[0585] OL的成熟(髓磷脂成熟)-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)的测量

[0586] 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%皂苷和1%FCS的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的溶液在室温下封闭非特异性位点15分钟。

[0587] 然后将细胞与在小鼠中产生的单克隆抗-MBP在含有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/1000稀释液处,并且与在兔中产生的抗NF(磷酸化和非磷酸化的神经丝200)在含有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/500稀释液处在室温下温育2小时。用CF 488A山羊抗小鼠在具有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/800稀释液处,并且用Alexa Fluor 568山羊抗兔在具有1%FCS、0.1%皂苷的PBS中的1/400稀释液处在室温下显示这些抗体1小时。

[0588] 评估OL的总数(MBP阳性细胞的数量和面积)(以评估OL成熟)以及围绕轴突对髓磷脂的包裹(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效应。

[0589] 对于所有测量,完成一次培养(每个条件6个孔)。对于每个测试条件,每个孔采集30张图片(每张图片代表一个场),并且使用配备有LED灯(激发360/480/565和发射460/535/620)的ImageXpress(分子装置)以20倍放大率进行分析。30张图片为自动拍摄,并且占培养孔总表面的80%。

[0590] 结果按照神经突网络的累计平均长度(以 μm 计)表示,或每个场针对给定标记(MAG或MBP)来标记髓鞘。测量NF与MAG或MBP之间的重叠面积以评估包裹。

[0591] 为了评估OPC群体、MAG阳性细胞群体、MBP阳性细胞群体,完成每个图片(=场)的阳性细胞的数量自动计数。结果以每场阳性细胞的平均数表示。

[0592] 所有图像都在相同条件下拍摄。

[0593] 表13

[0594]

平板 1 (A2B5 / NF)
对照物
雌二醇(150nM)
DHA (0.15 μM)
DHA (1.5 μM)
硬脂酸(50 μM)
硬脂酸(5 μM)
硬脂酸(0.5 μM)
B12 (100nM)
B12 (10nM)
B12 (1nM)
叶酸(250nM)
叶酸(50nM)
叶酸(6nM)
胆碱(20 μM)
铁(1 μM)
铁(0,1 μM)
锌(5 μM)
锌(0,5 μM)
磷(5mM)
磷(1mM)

[0595]	镁(25mM)
	铜(0,5μM)
	磷脂酰胆碱(100μM)
	磷脂酰肌醇(5μM)
	磷脂酰肌醇(50μM)
	磷脂酰丝氨酸(5μM)
	磷脂酰丝氨酸(10μM)
	磷脂酰丝氨酸(100μM)
	鞘磷脂(5μM)
	鞘磷脂(25μM)
	神经酰胺（脑提取物）:DPPC (1:4)
	乳糖神经酰胺(C18:1/24:1)/(C18:1/18:0):DPPC (1:4)
	糖基化神经酰胺(C18:1/24:1)/(C18:1/18:0):DPPC (1:4)
	D-赤型-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)

[0596] 结果示于图12至图32中

[0597] 实施例8

[0598] 材料和方法

[0599] 1. 喂料层制备: 新生儿皮质的解离以及混合神经胶质培养物的保持

[0600] 将新鲜解剖的脑添加到37℃水浴持续3分钟, 然后通过P1000移液管尖端切割皮质以产生较小的片段。每个脑中添加75μL OPC木瓜蛋白酶溶液, 然后将组织在37℃水浴中温育20分钟。然后向组织悬浮液中添加混合的神经胶质培养物以便使OPC木瓜蛋白酶溶液失活。

[0601] 随后使用无菌火焰抛光玻璃巴斯德移液管磨碎组织, 然后每个脑添加4mL混合的神经胶质培养基。将细胞以1200rpm (约300g) 离心5分钟, 然后将细胞重悬于温热混合的神经胶质培养基中并平板接种到PLL涂覆的烧瓶中。

[0602] 平板接种后4小时, 进行完全培养基更换以便移除由磨碎产生的大部分碎片, 并促进培养活力。培养3天后, 进行2/3培养基更换, 并且不进行随后的培养基更换。然后将细胞保持在培养物中直至融合。

[0603] 2. 海马神经元制备

[0604] 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。

[0605] 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移液管反复吸移海马体来进行海马体解离。机械解离后,将细胞以期望的密度平板接种在神经元平板接种培养基中,让其恢复4小时,然后置于竞争性神经元培养基中。

[0606] 3.从混合的神经胶质培养物纯化OPC以建立OL/海马神经元o培养物

[0607] 在混合的神经胶质培养的第9天,将烧瓶在5%CO₂组织培养物温育箱中的轨道振荡器上以50rpm振摇45分钟。这种振摇的目的是从单层移除任何松散粘附的污染细胞。

[0608] 然后更换培养基,并用补充有5μg/mL胰岛素的4mL新鲜混合的神经胶质培养基代替。然后将烧瓶重新置于振荡器上,平衡约3小时,然后以220rpm振摇约16小时(过夜)。

[0609] 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培养基,并将其预平板接种在P100培养皿中(未经培养处理)30分钟以便纯化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。

[0610] 在预接种30分钟后,收集培养基,并且对OL进行计数并接种于1mL OL培养基的最终体积中的海马神经元上。

[0611] 进行完全OL培养基(负CNTF)更换,然后将细胞保持在培养物中直到适当的实验时间。

[0612] 对于成熟实验,实验程序如下,如图54所示:

[0613] a.OPC在10DIV的星形胶质细胞的喂料层上的生长

[0614] b.OPC的隔离(第0天)

[0615] c.化合物的施用(第3天)

[0616] d.在第4天、第7天和第10天对成熟的定量评价。

[0617] 对于髓鞘形成实验,实验程序如下,如图55所示:

[0618] a.海马神经元的生长,直到完全神经元网络成熟(14DIV)

[0619] b.OPC在10DIV的星形胶质细胞的喂料层上的伴随生长

[0620] c.OPC的隔离以及与神经元的共培养(第14天)

[0621] d.化合物的施用(第15天)

[0622] e.在共培养的第15天、第18天、第21/23天和第28/29天(共培养平板接种后1天,在化合物处理前)对髓鞘形成的定量评价

4.图像的获取

[0623] 将不同实验时间点处的所有培养物在室温(RT)下固定在4%多聚甲醛和4%蔗糖中10分钟。将初级抗体和次级抗体在室温下施加在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)持续2小时。用适当的标记对细胞进行染色(初级抗体使用:抗-A2B5抗体(ABCAM cat.ab53521)、大鼠抗MBP(BIO-RAD cat.aa82-87)、少突细胞标记O4抗体(R&D Systems cat.MAB1326)、抗βIII微管蛋白mAb(Promega cat.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,所有图像用Array Scan XTI(ThermoScientific)获得;在2×2的仓中目标被放大20倍。对于每个条件和复制副本(一式三份),至少拍摄15个图像。

[0624] 为了分析所有获取的图像,使用HCS Studio细胞分析软件、特别是“扫描”应用程序。

[0625] OPC木瓜蛋白酶溶液(在MEM中制成)

- [0626] 木瓜蛋白酶溶液1.54mg/ml
- [0627] L-半胱氨酸360μg/ml
- [0628] DNA酶I 60μg/ml
- [0629] 混合的神经胶质培养基(在DMEM中制成)
- [0630] FBS10%
- [0631] 青霉素/链霉素(0.33%,来自原液)33单位/mL青霉素和33μg/mL链霉素
- [0632] GlutaMAX 1%
- [0633] OL培养基
- [0634] DMEM
- [0635] 100X O1-补充剂
- [0636] 牛胰胰岛素(来自1mg/mL原液)
- [0637] GlutaMAX
- [0638] 转铁蛋白(来自33mg/mL原液)
- [0639] B27补充剂
- [0640] FBSCNTF(来自50ng/μL原液)
- [0641] 结果示于图34至图53中。

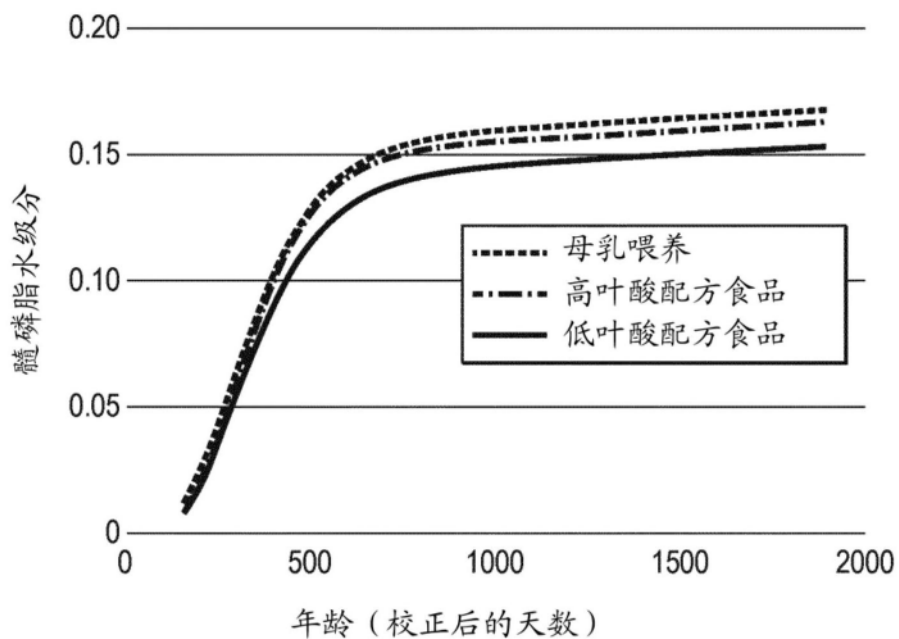


图1

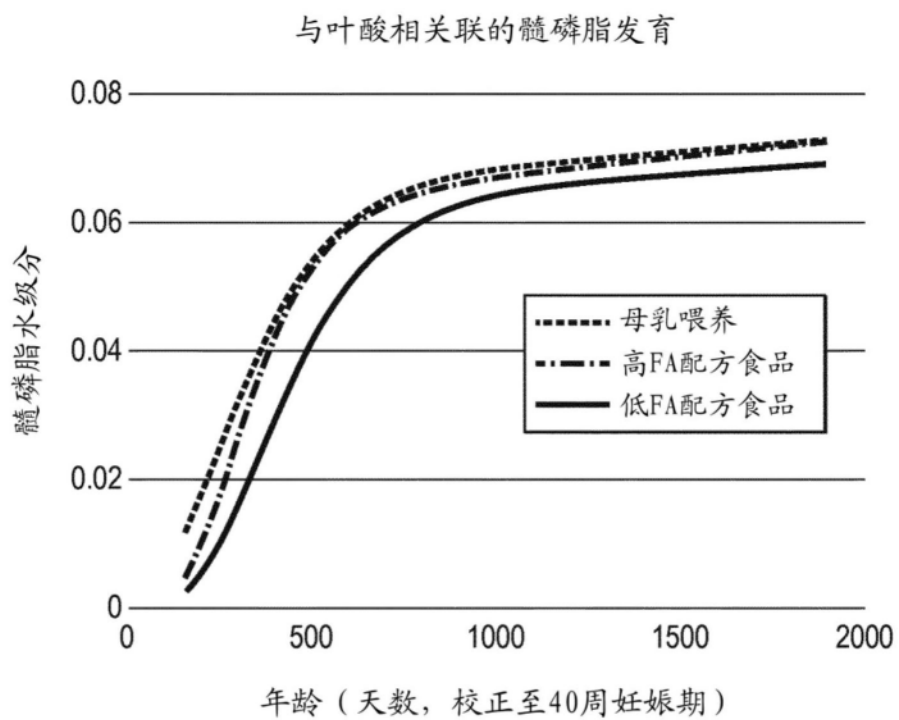


图1a

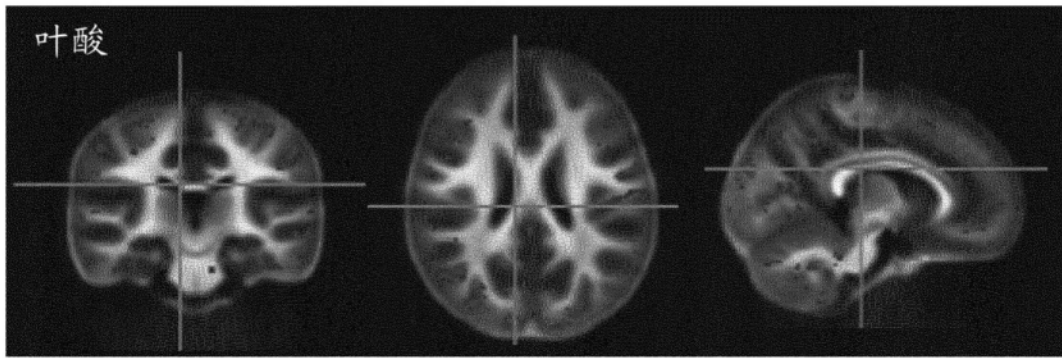


图1b

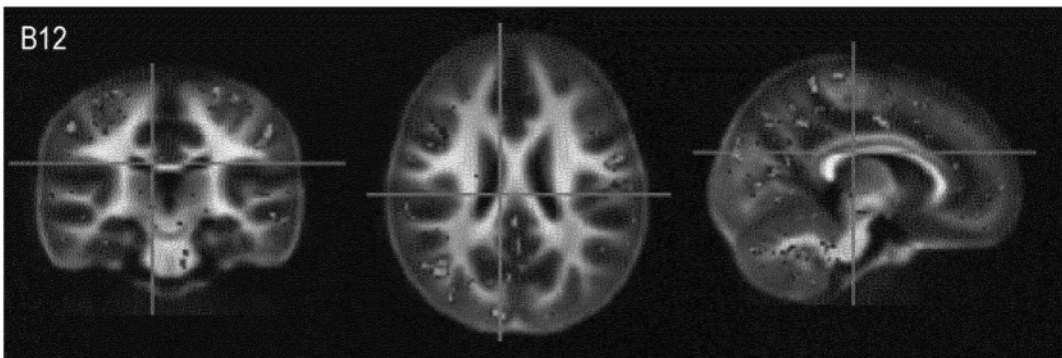


图2

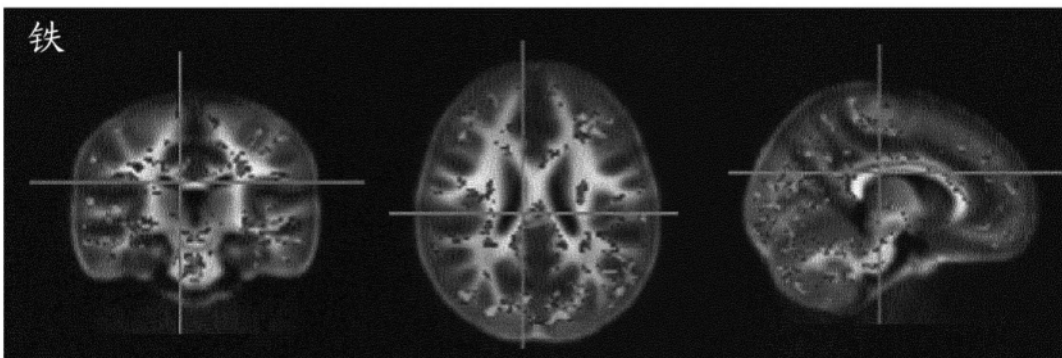


图2a

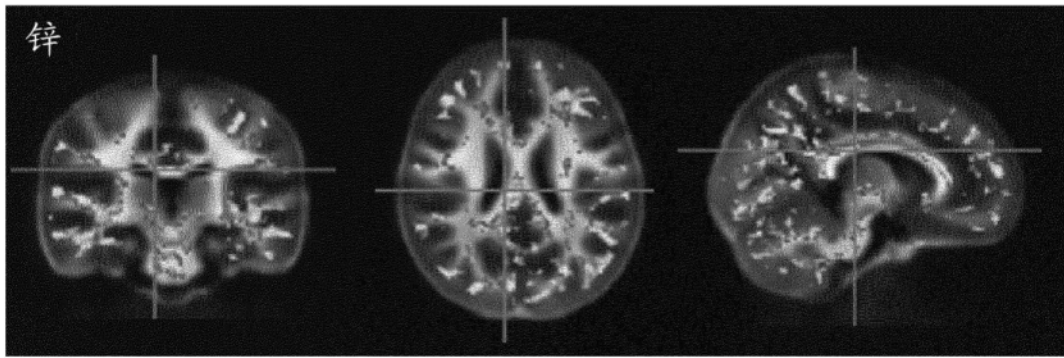


图2b

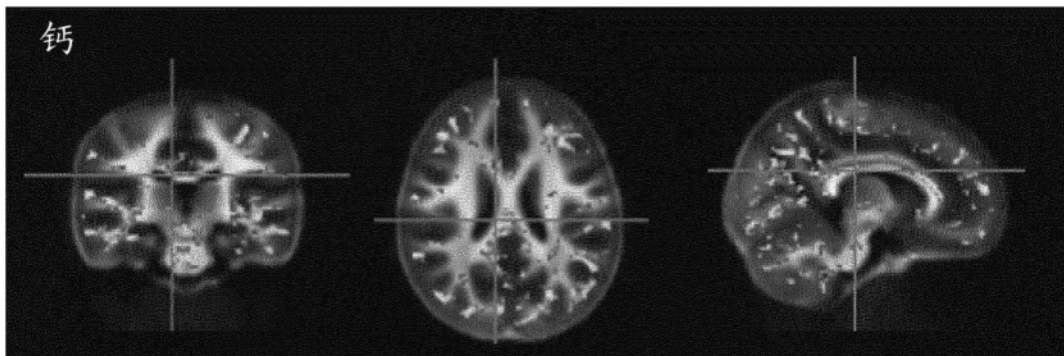


图2c

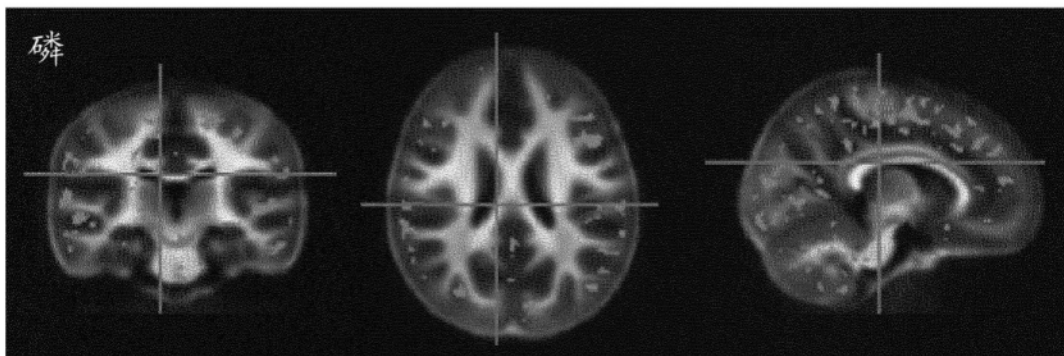


图2d

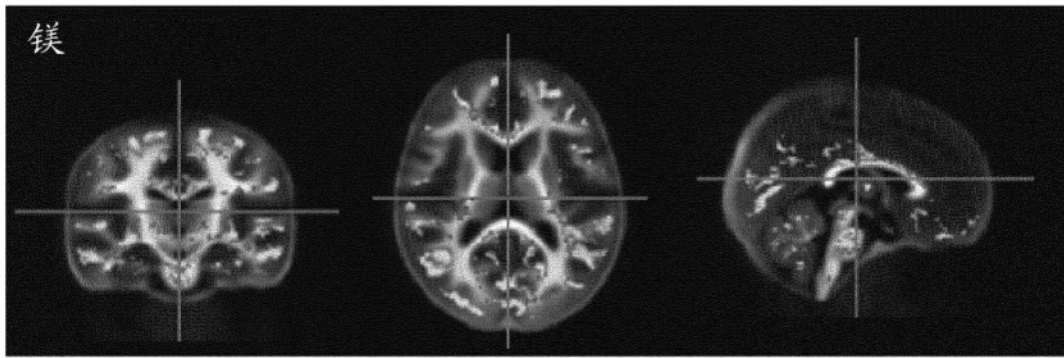


图2e

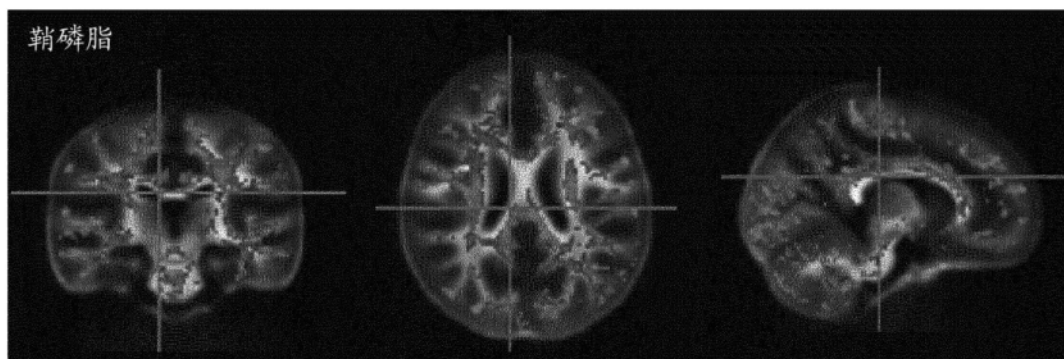


图2f

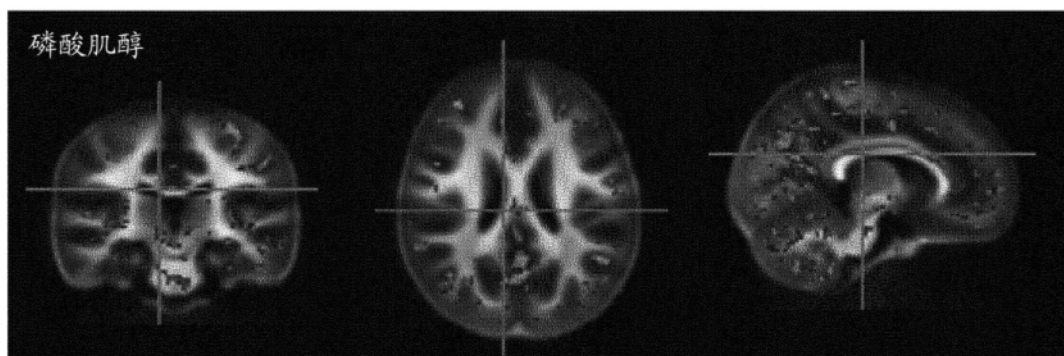


图2g

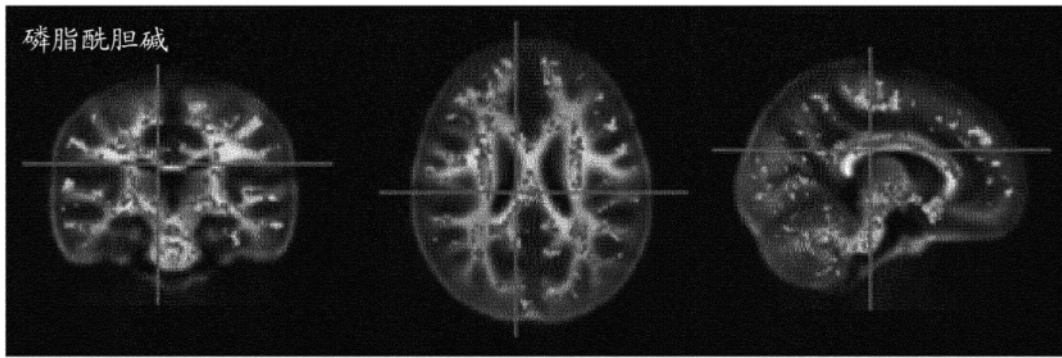


图2h

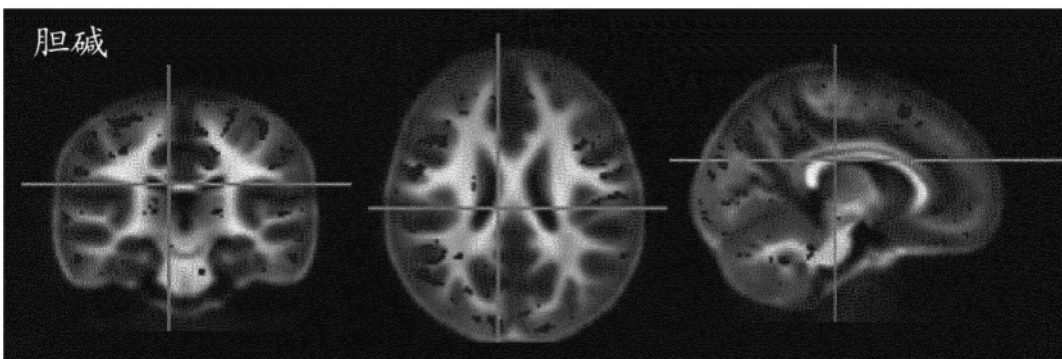


图2i

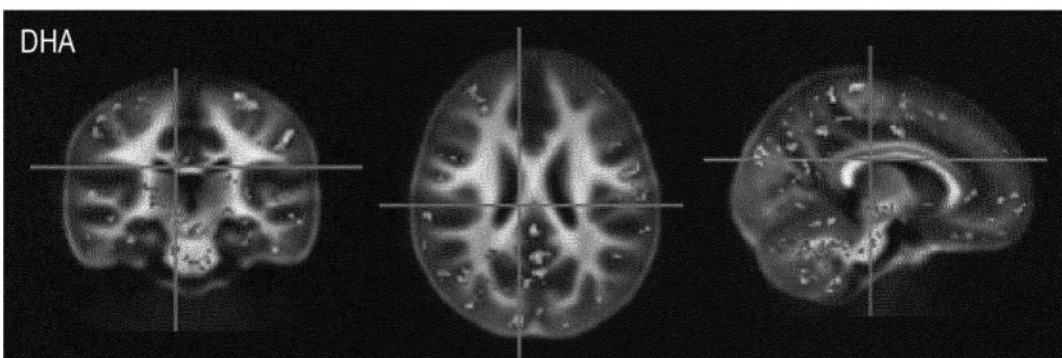


图2j

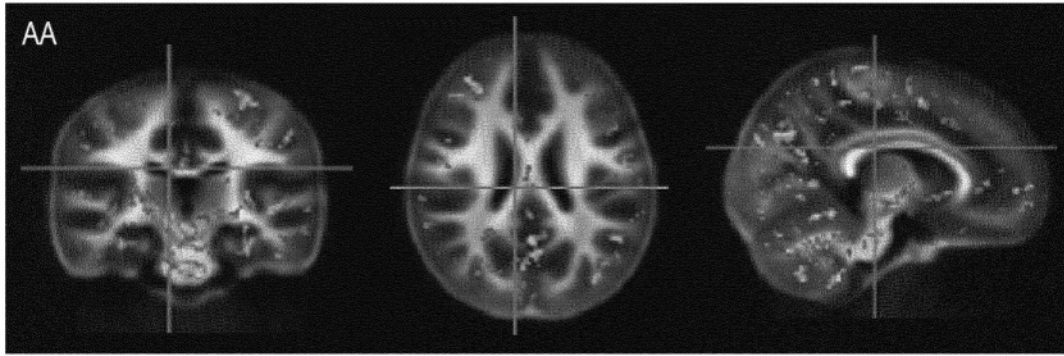


图2k

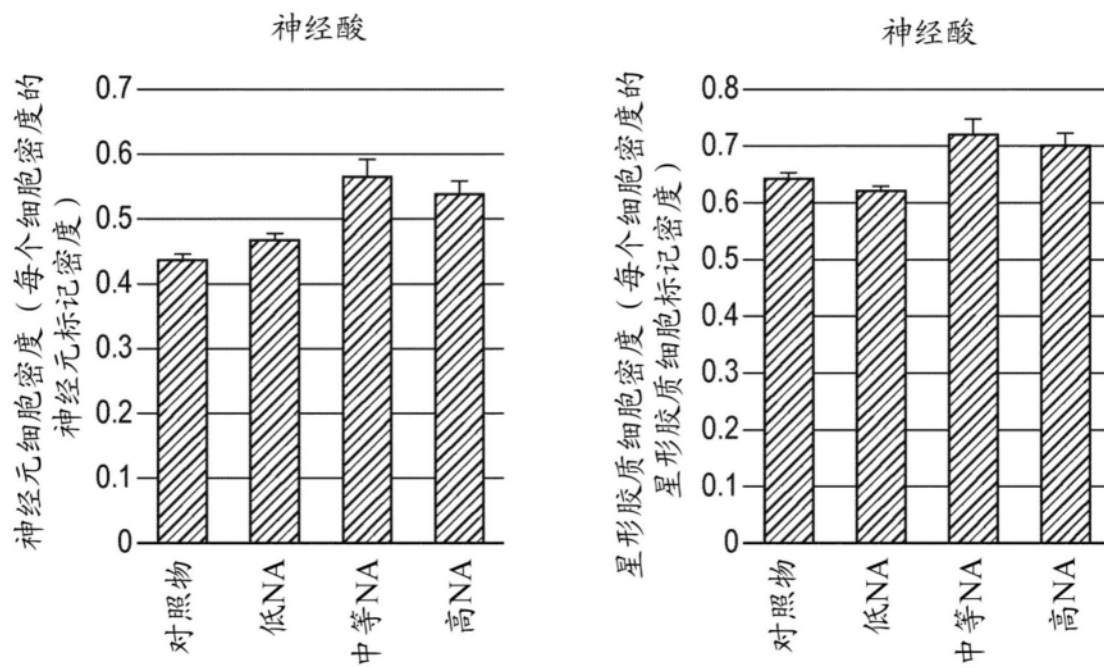


图3

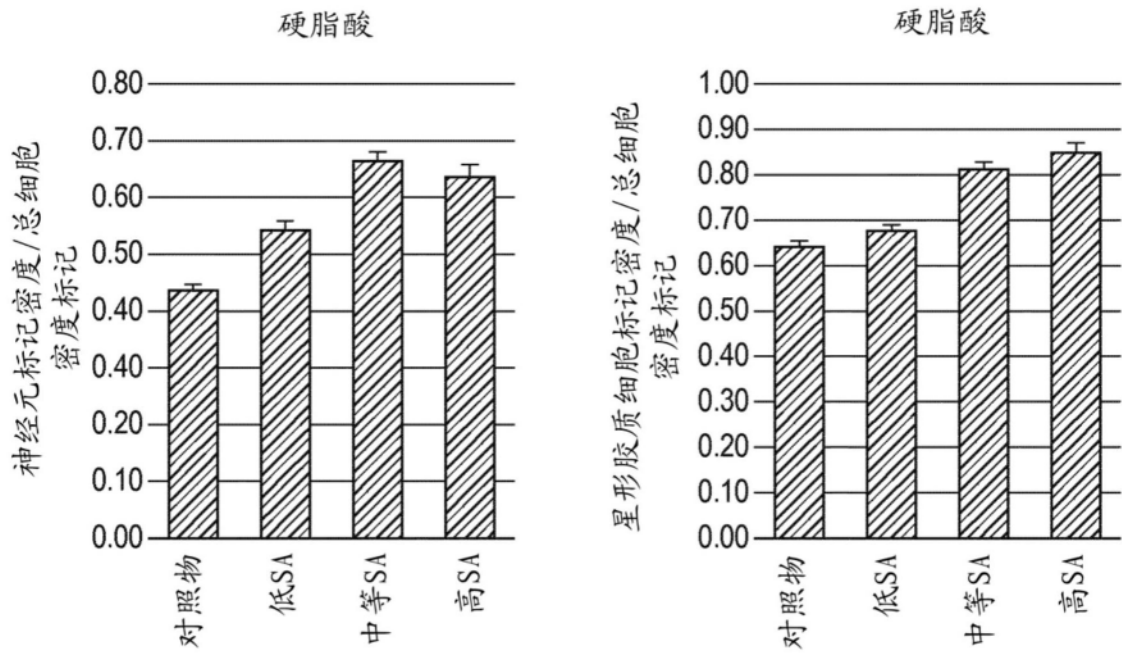


图4

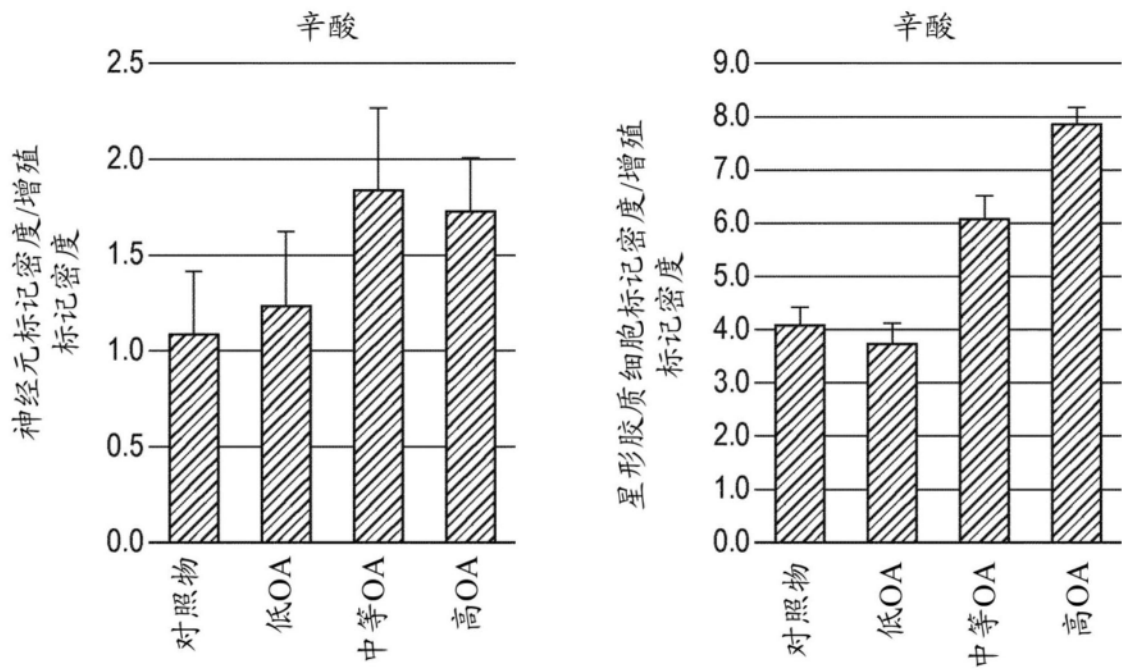


图5

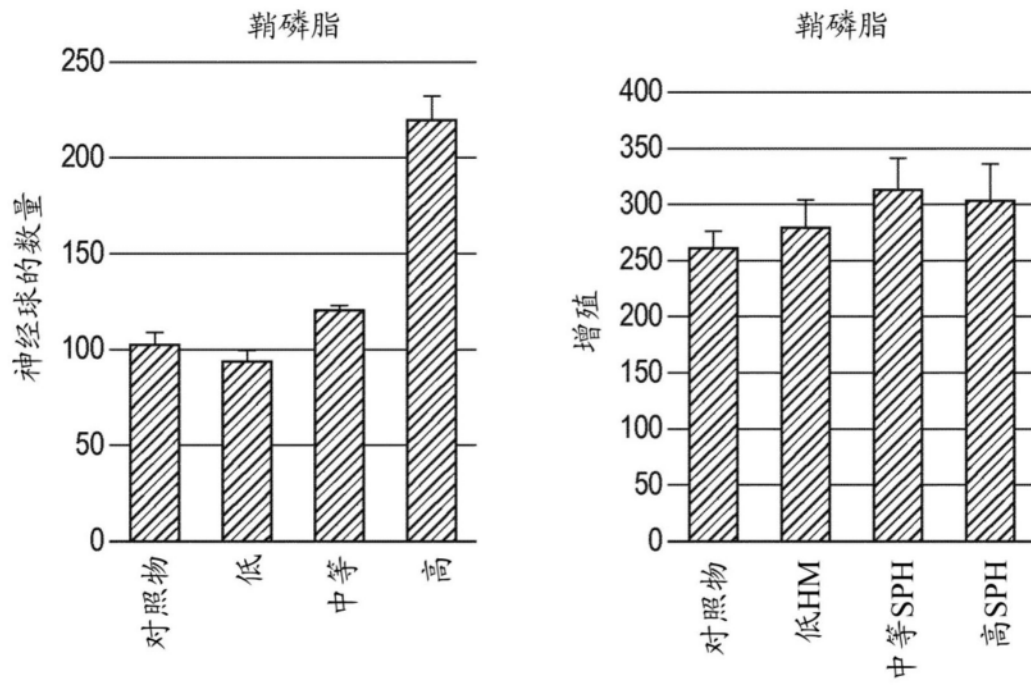


图6

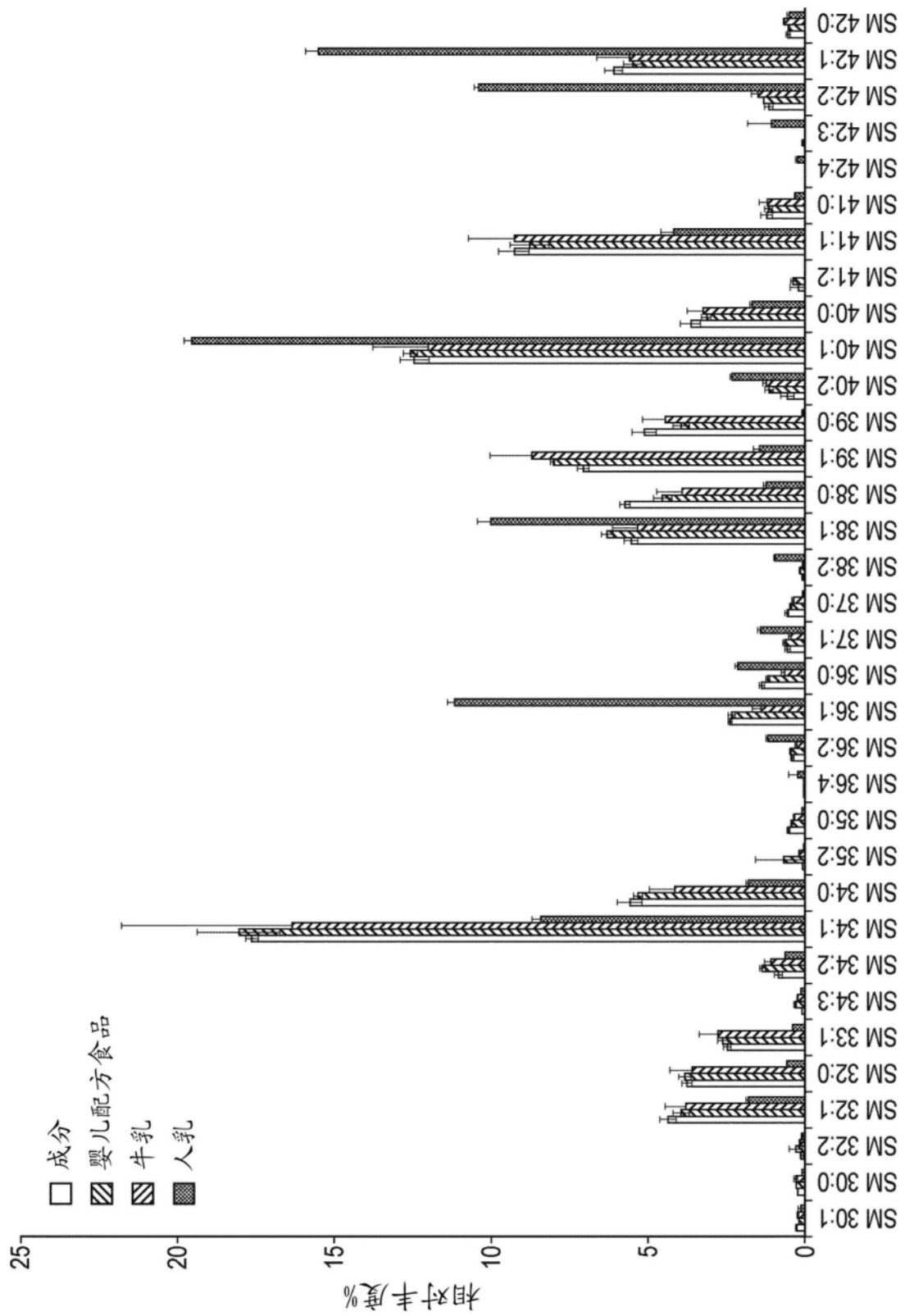


图7

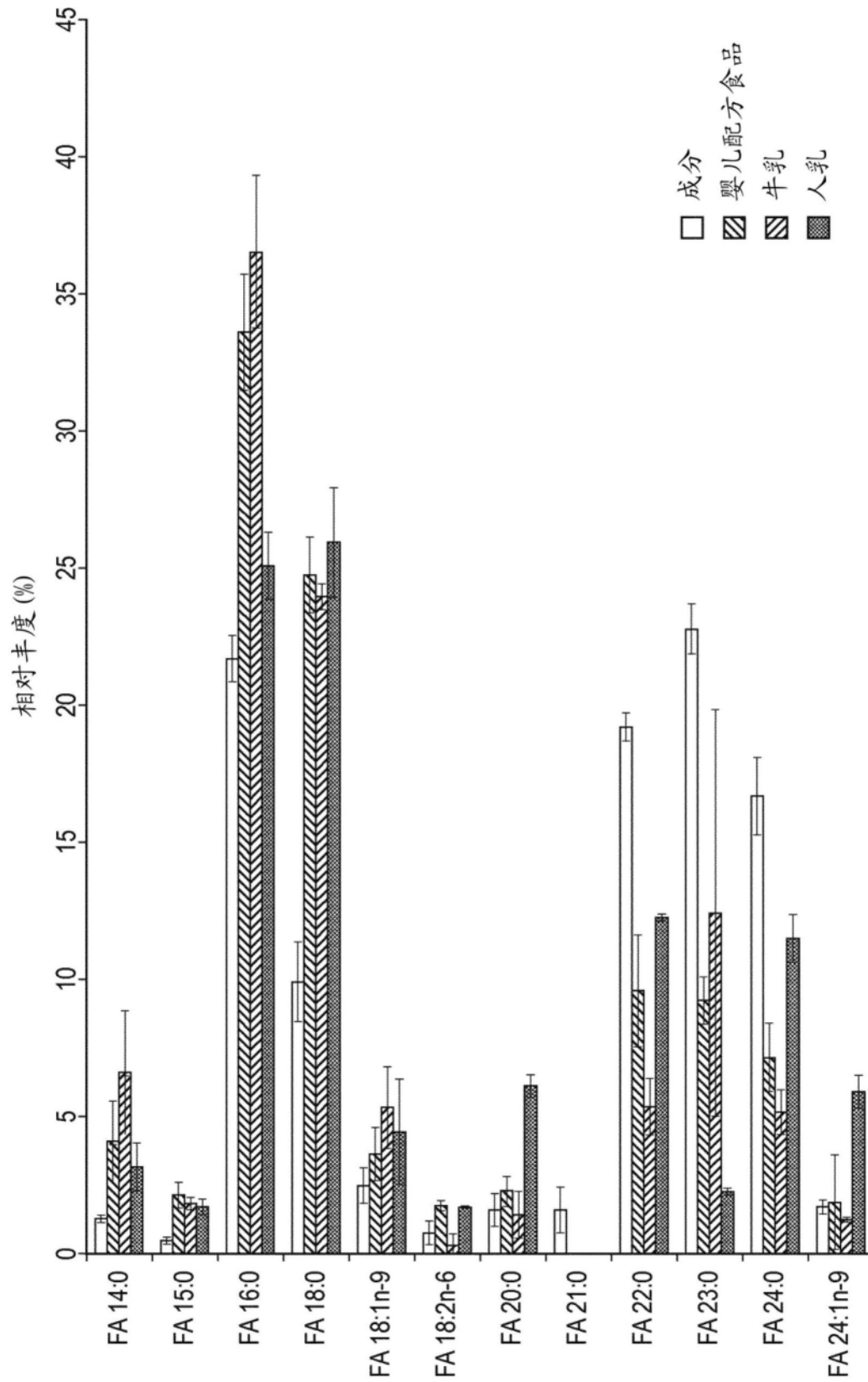


图8

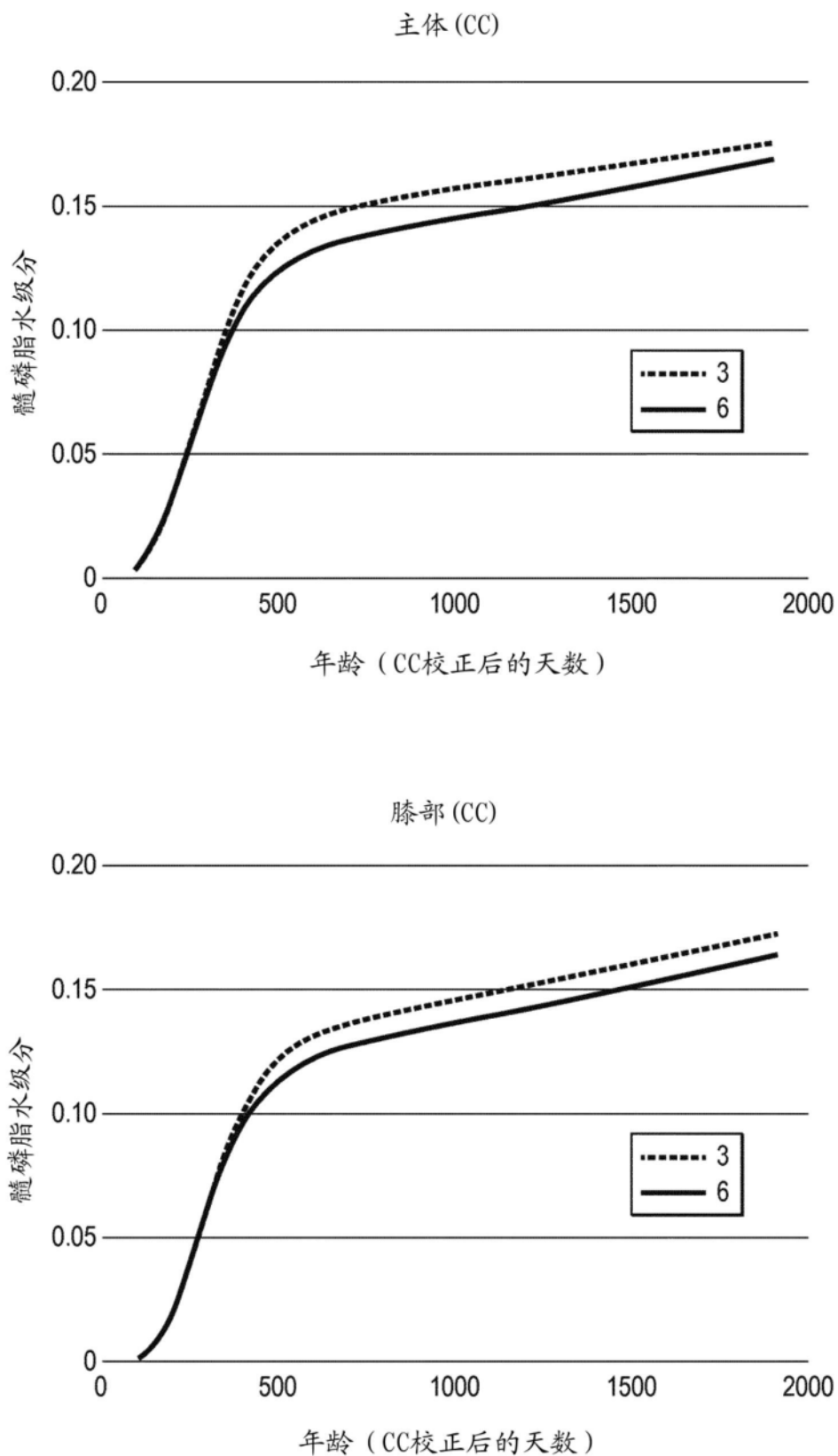


图9

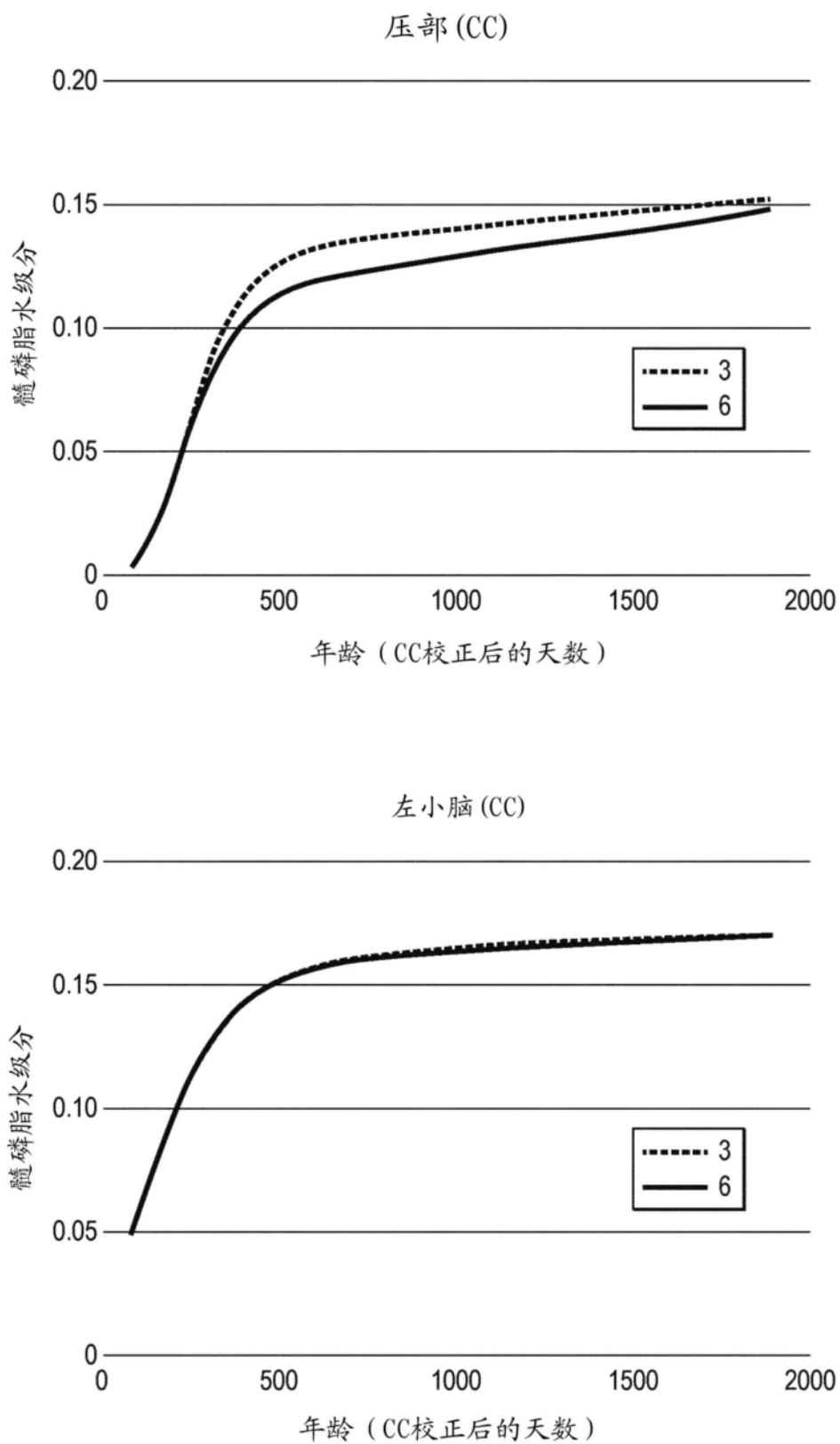


图9续

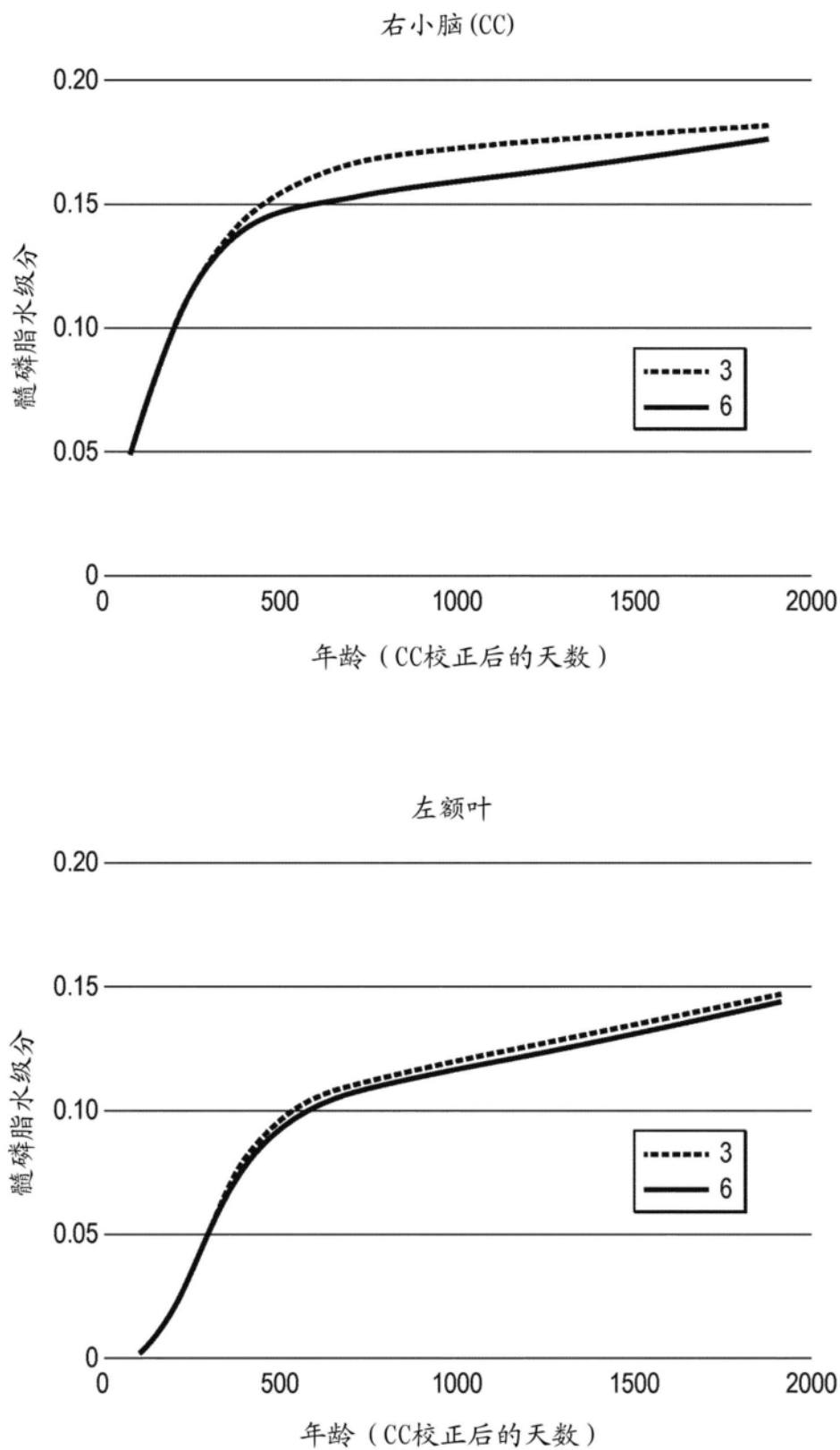


图9续

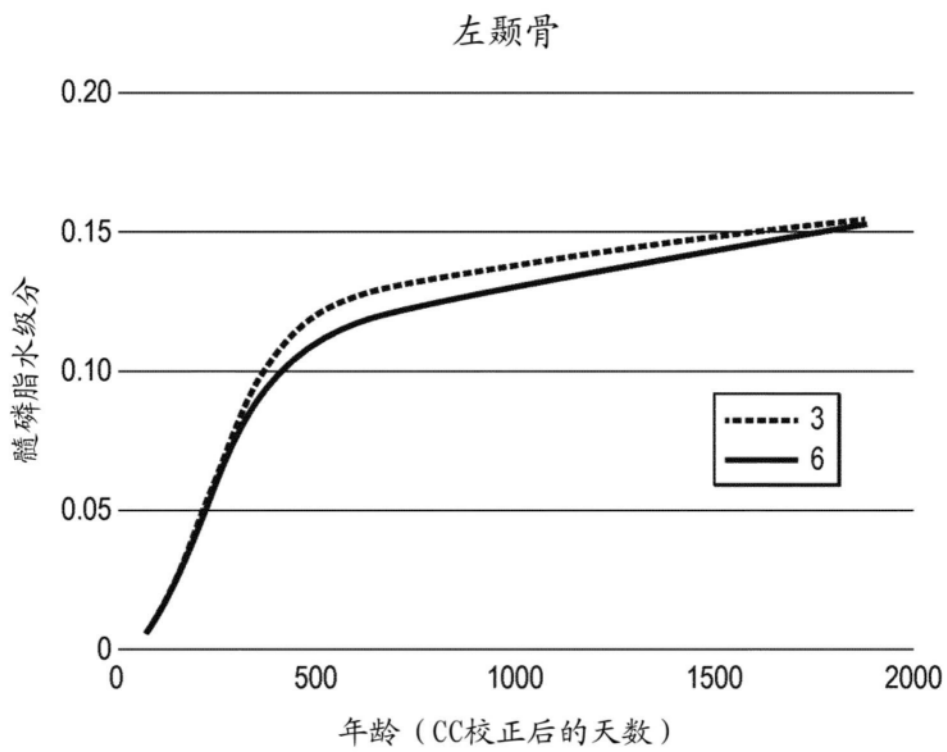
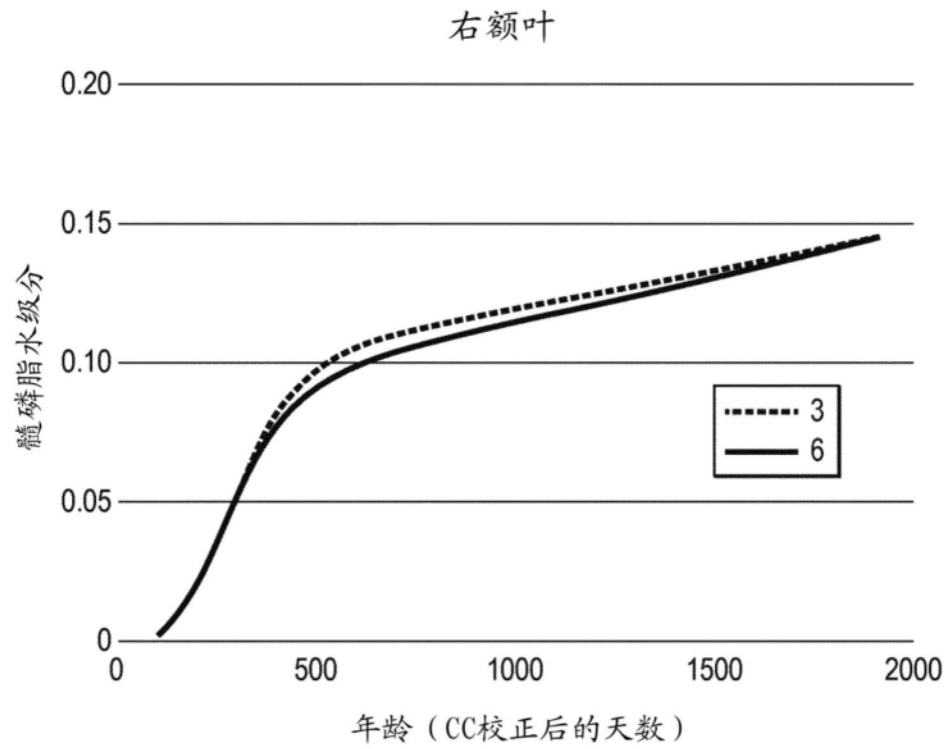


图9续

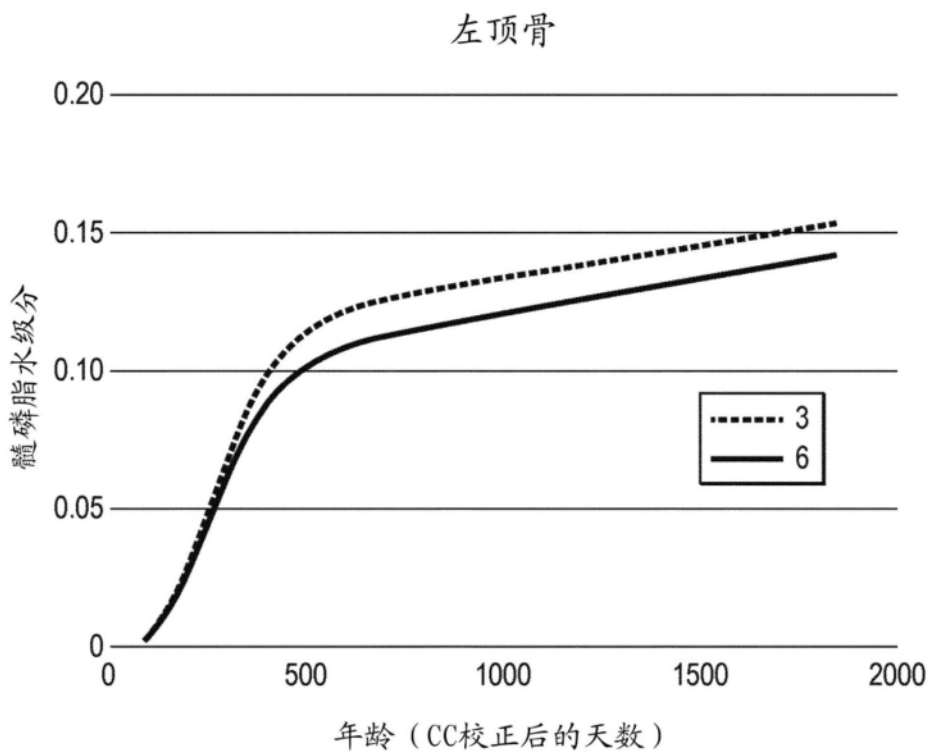
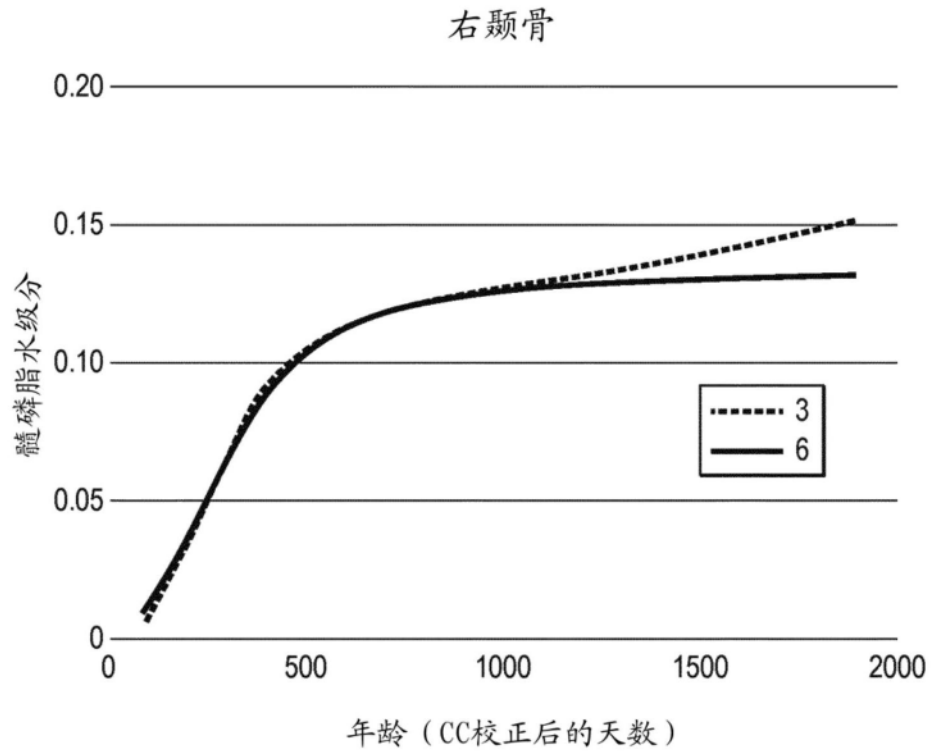


图9续

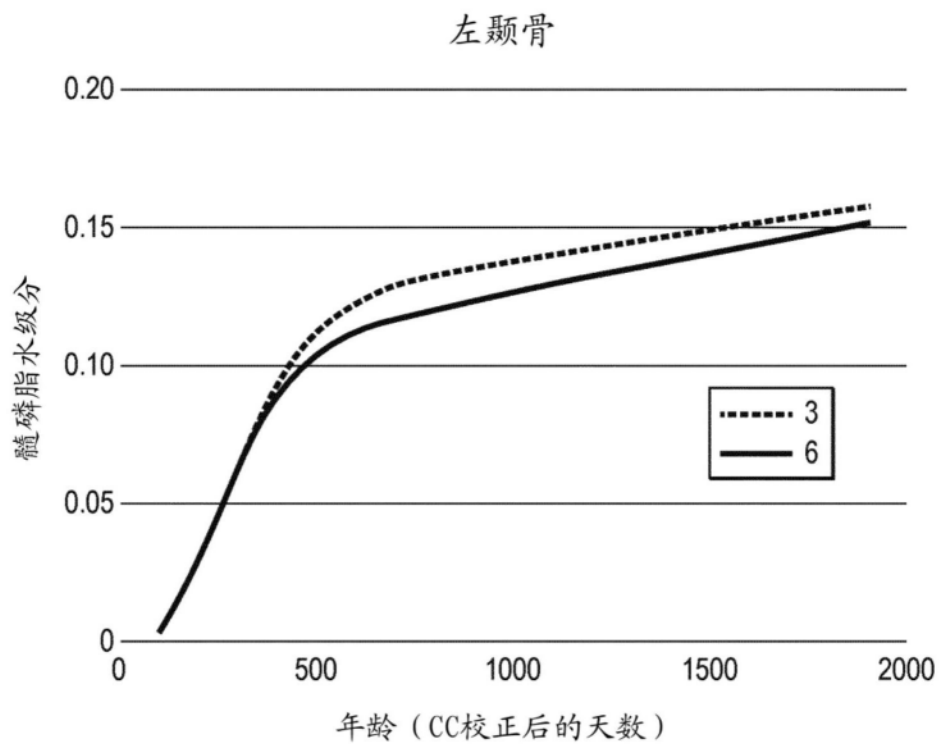
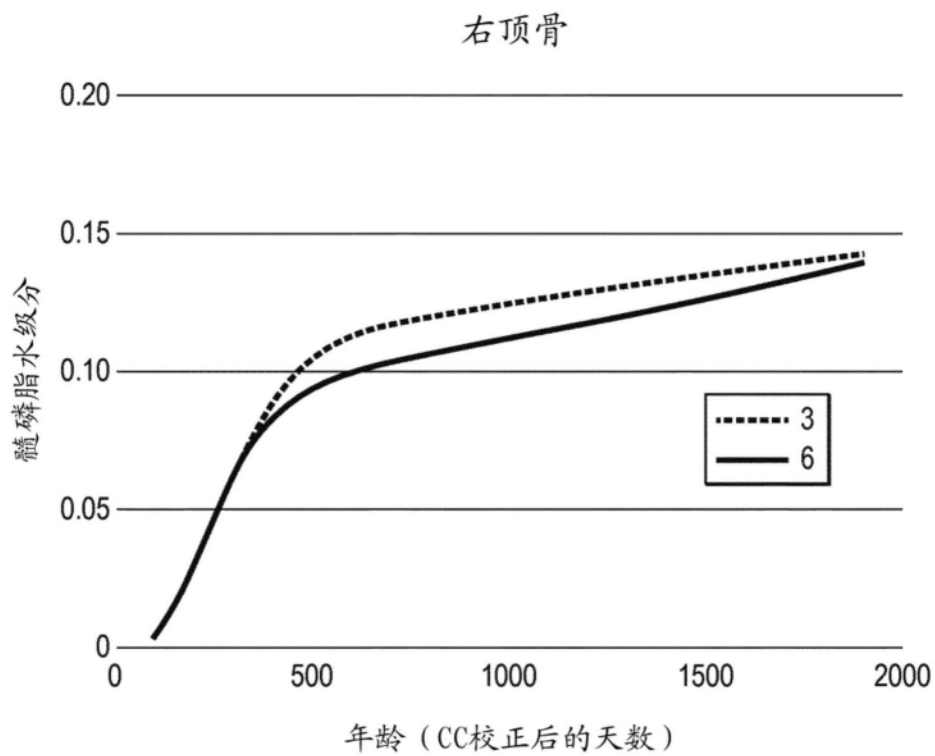


图9续

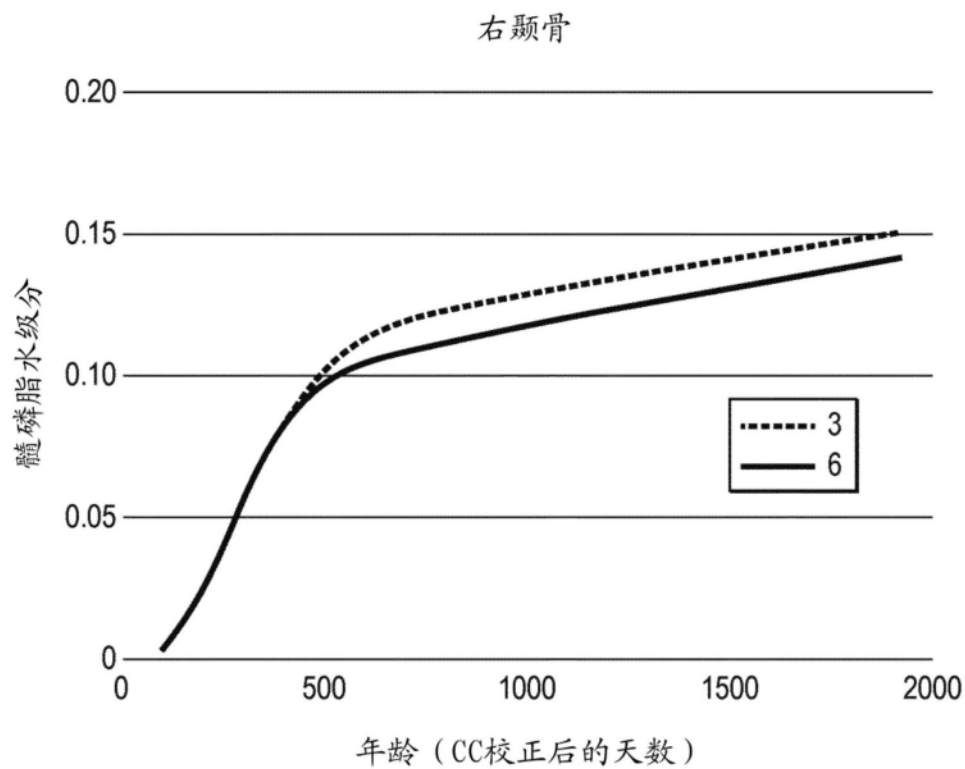


图9续

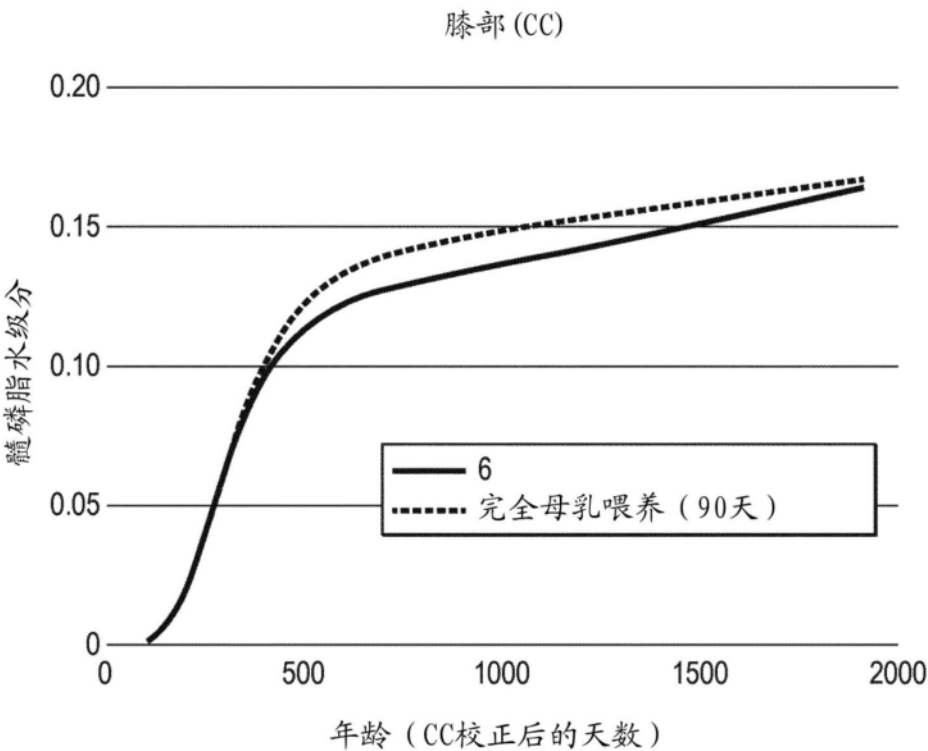
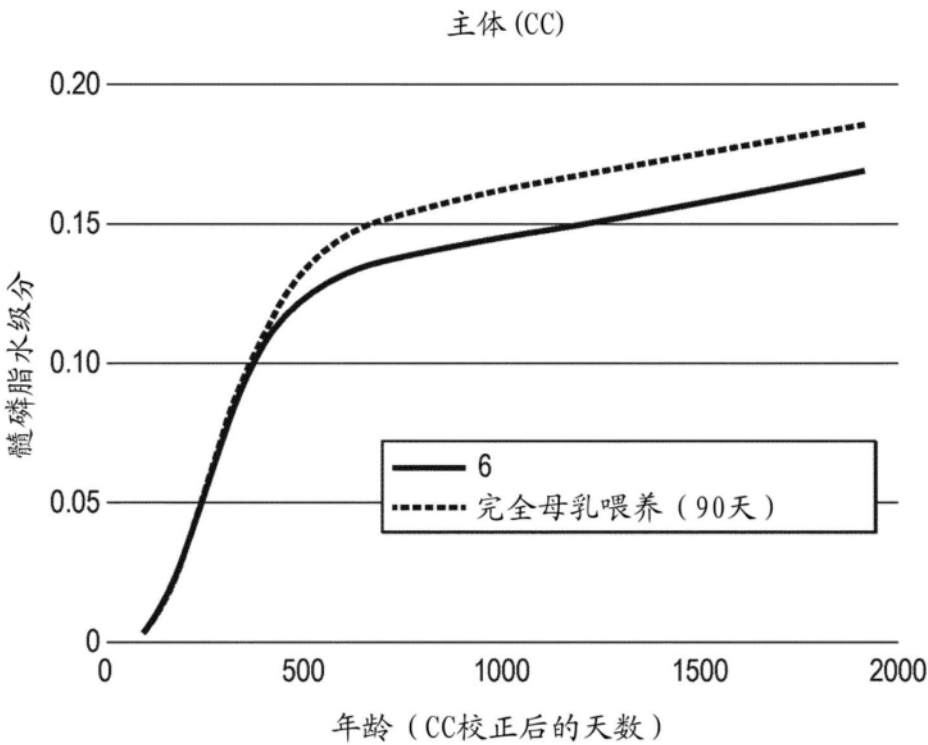


图10

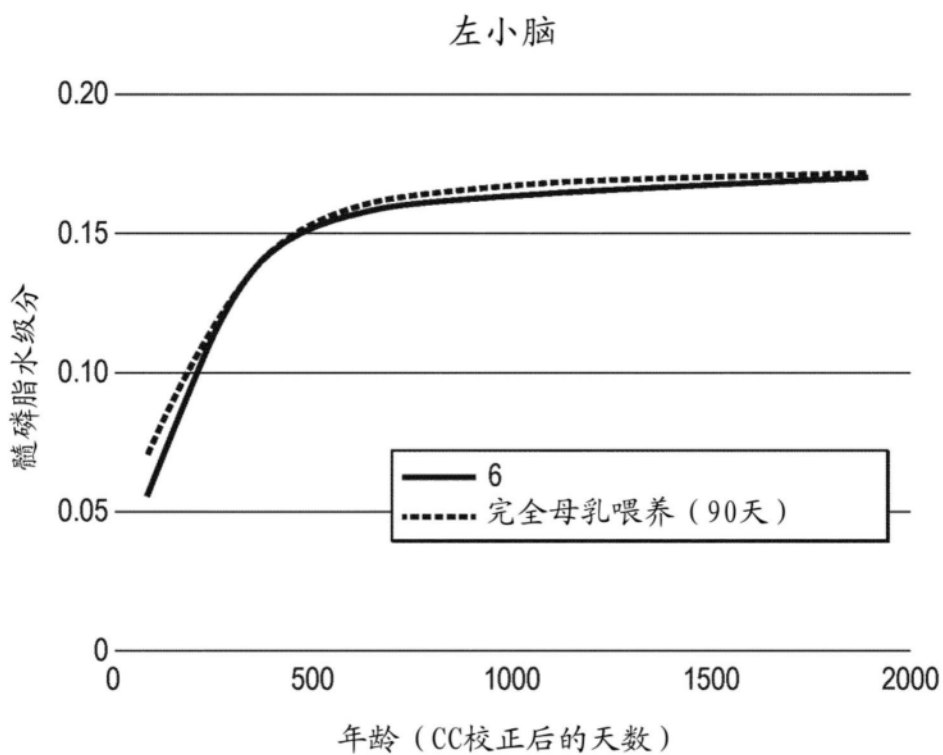
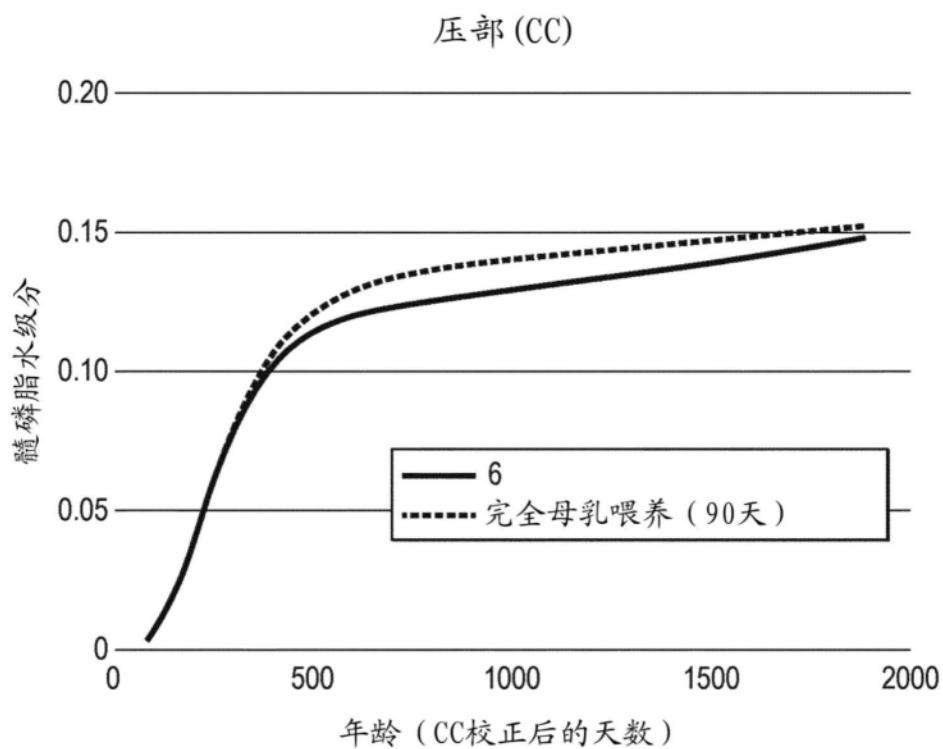


图10续

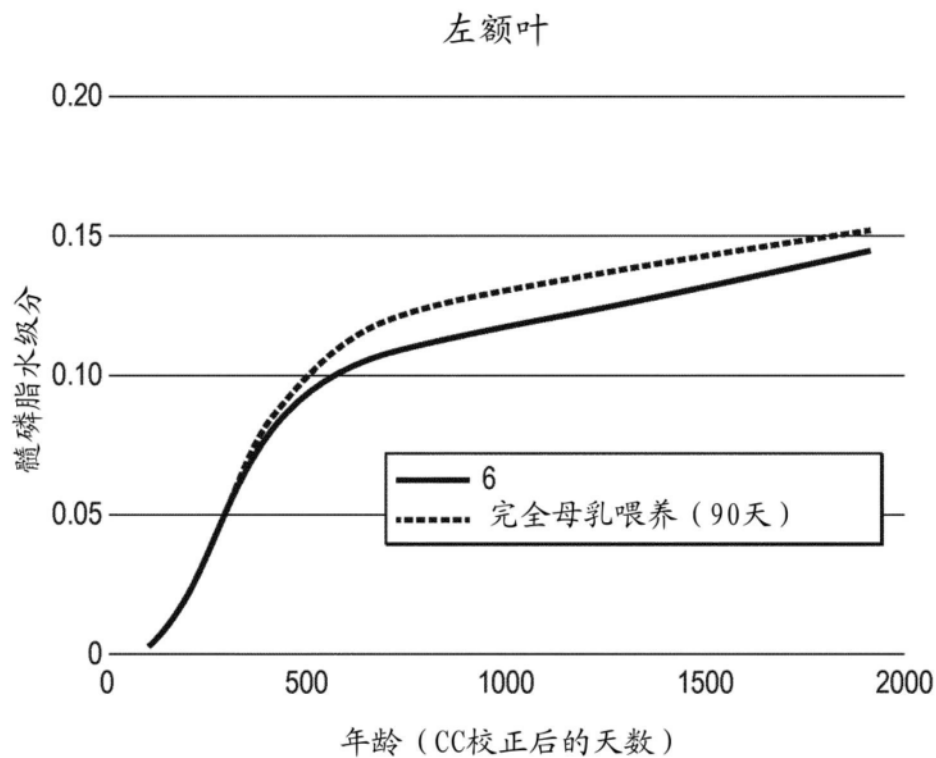
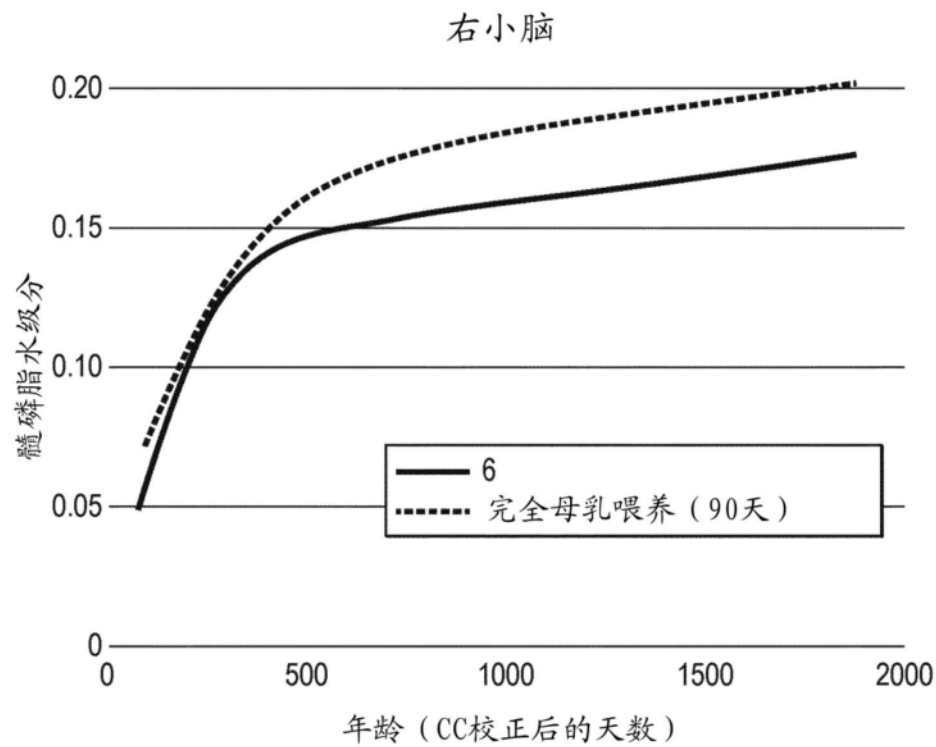


图10续

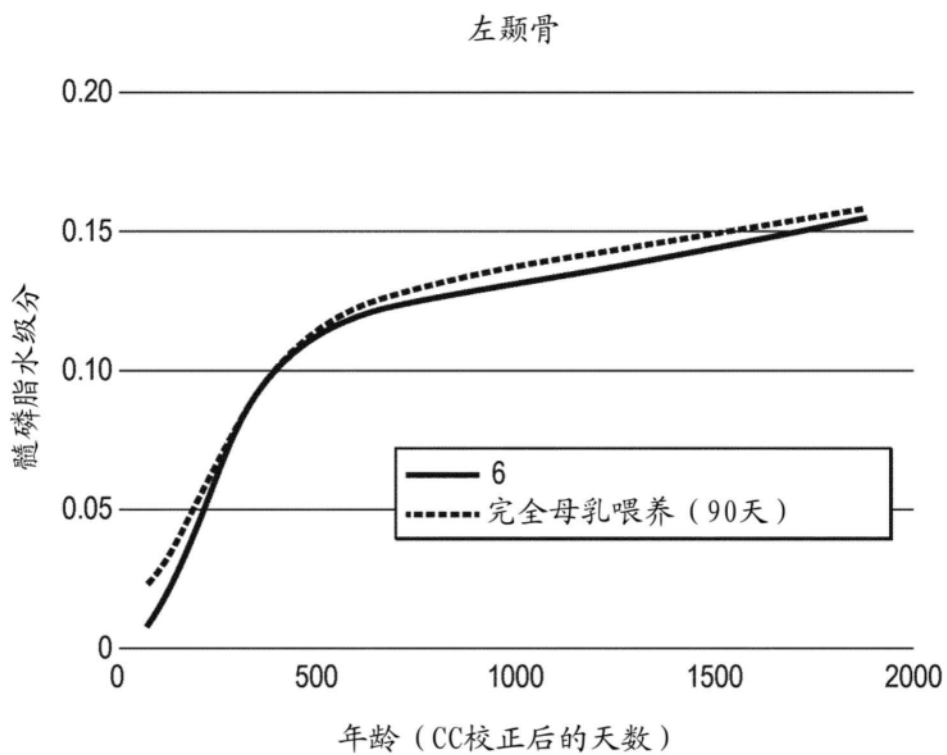
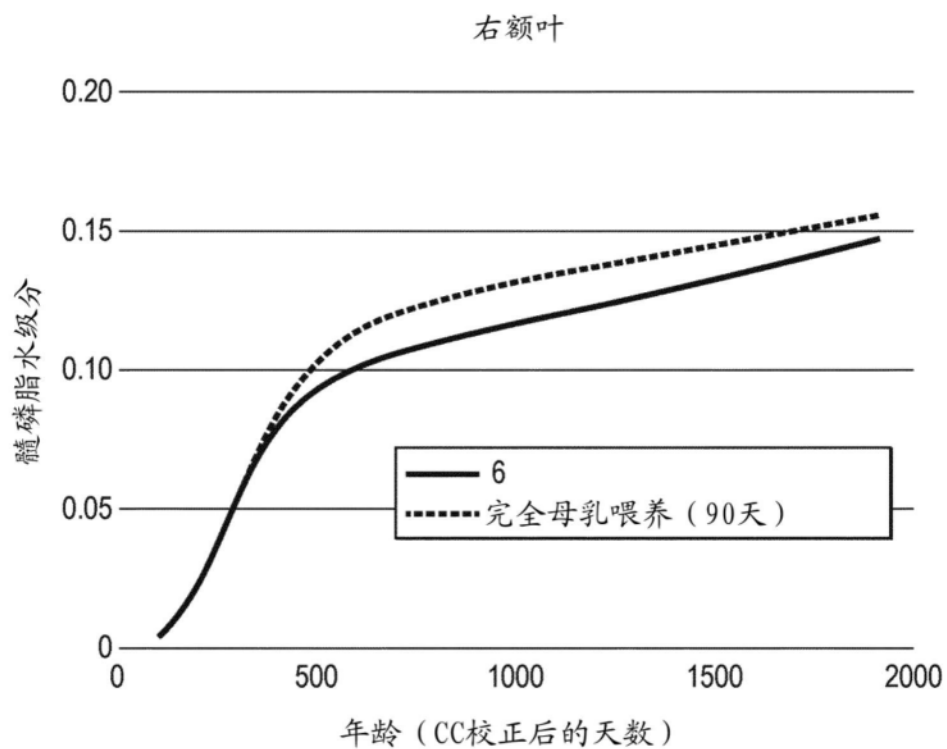


图10续

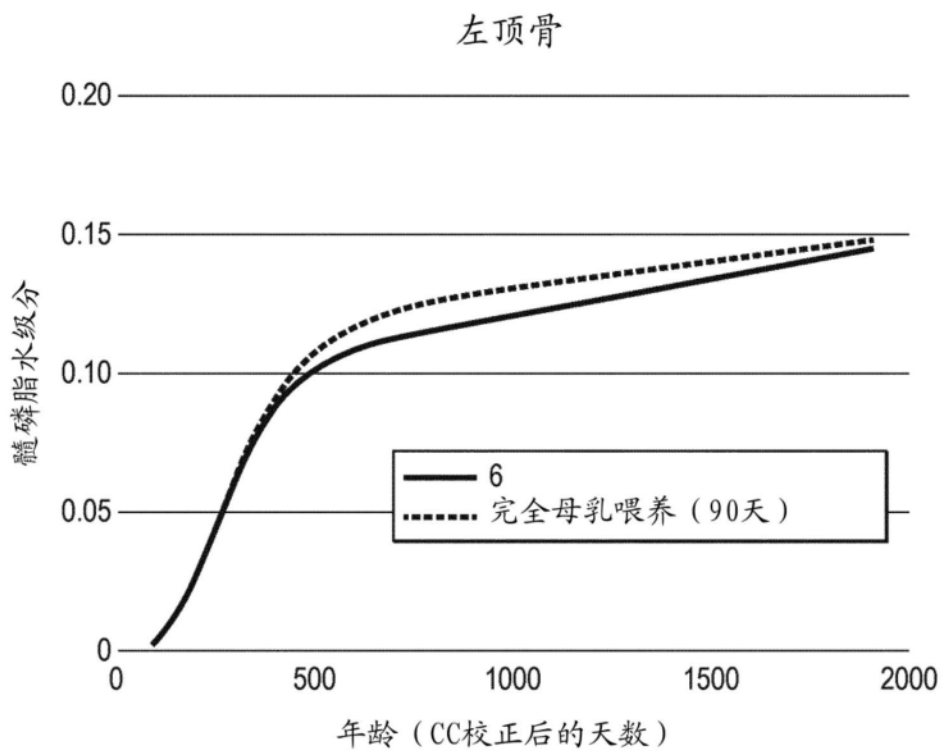
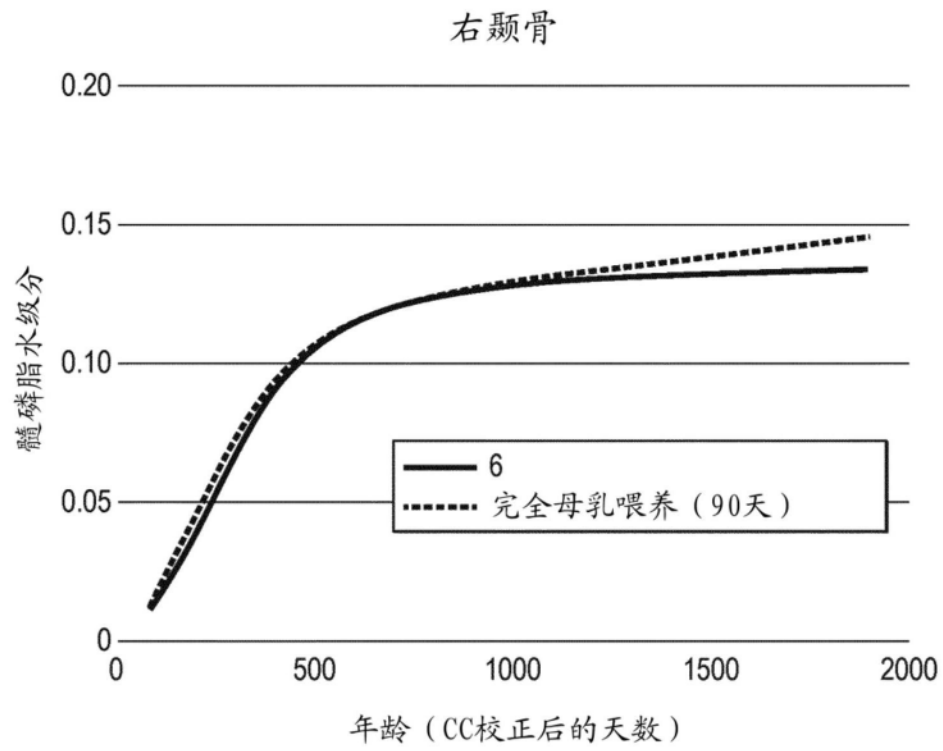


图10续

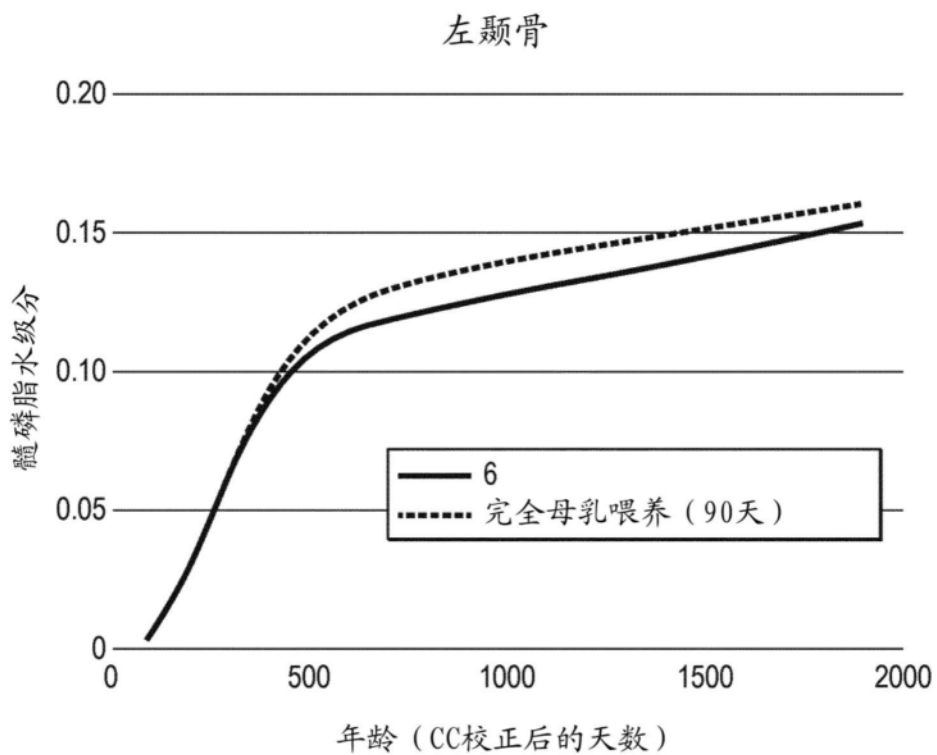
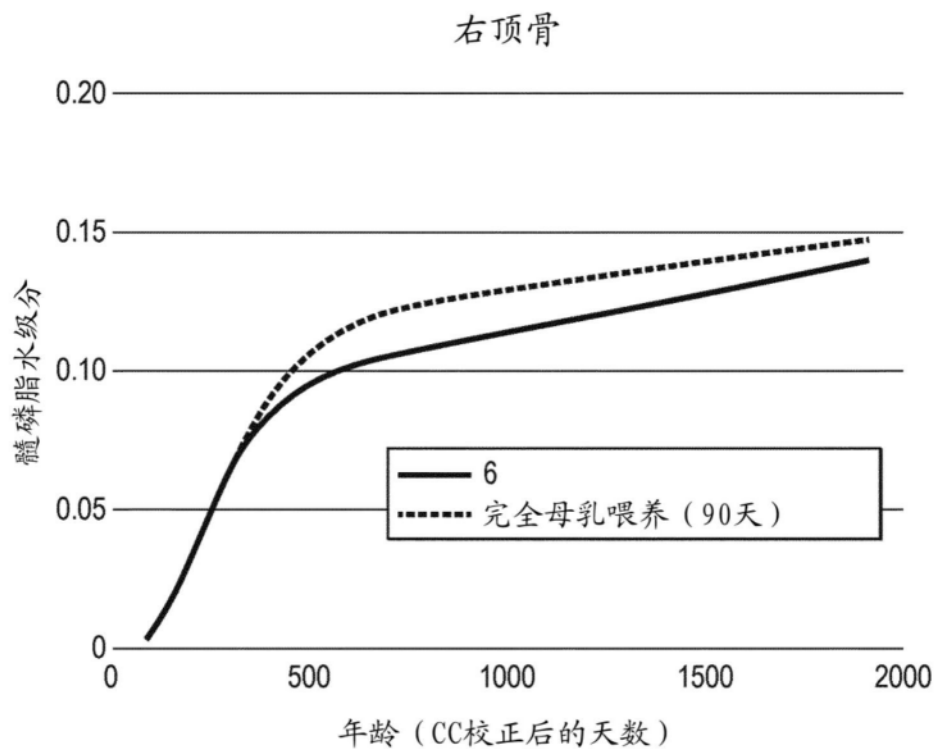


图10续

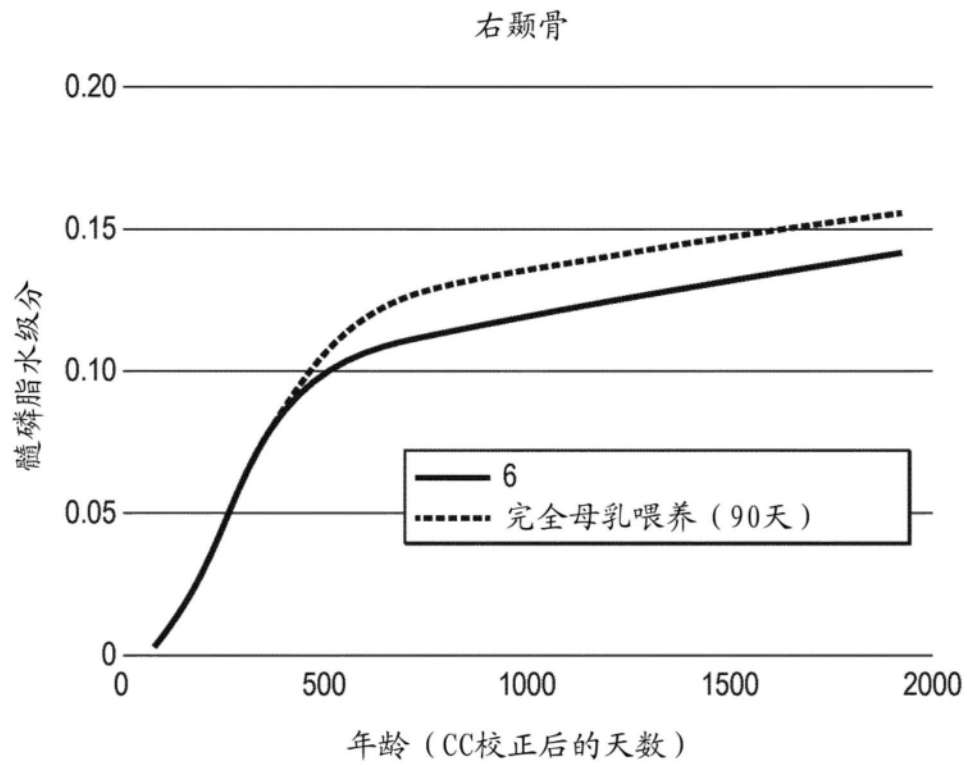


图10续

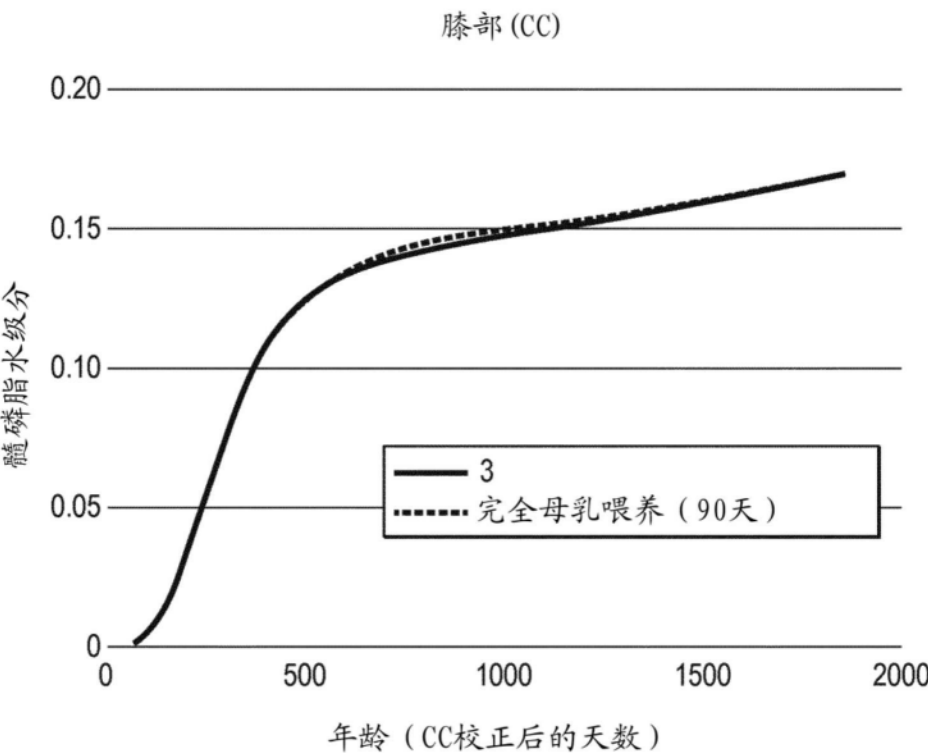
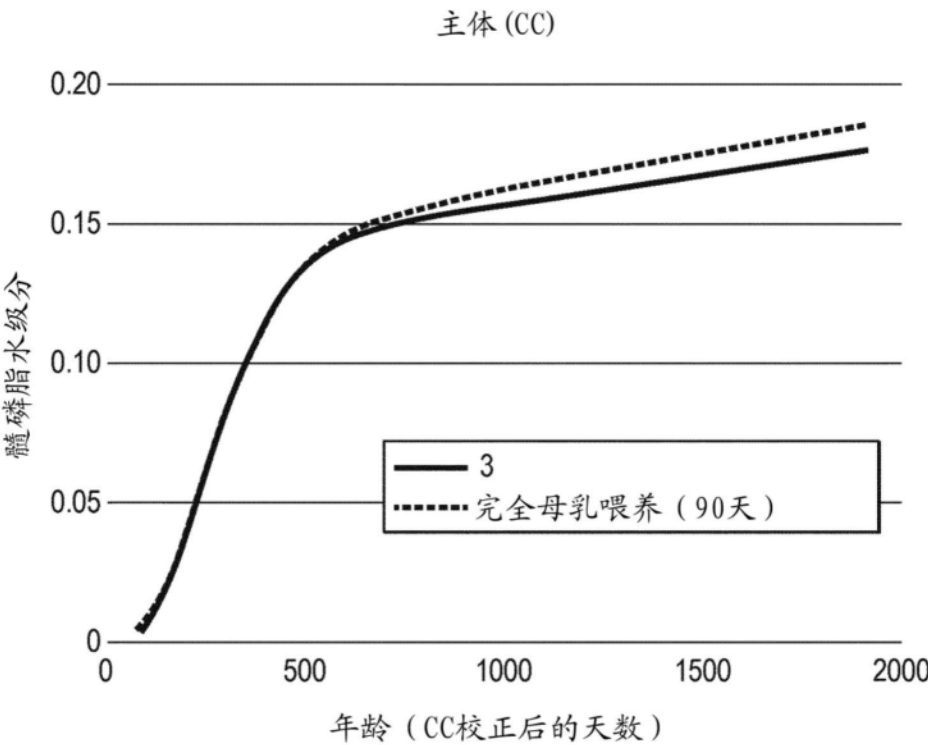


图11

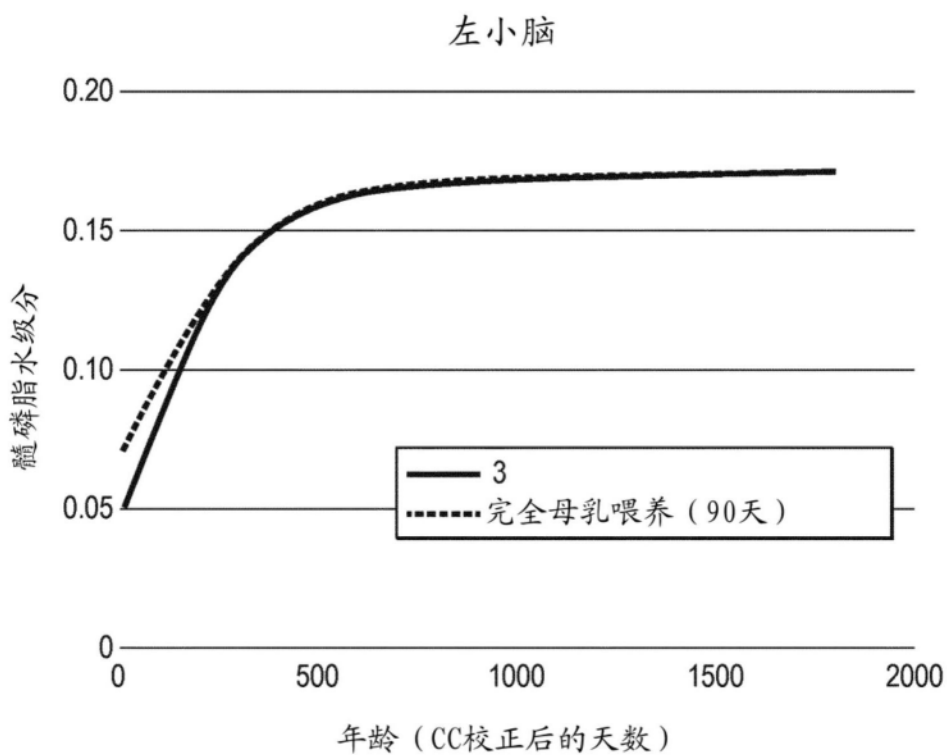
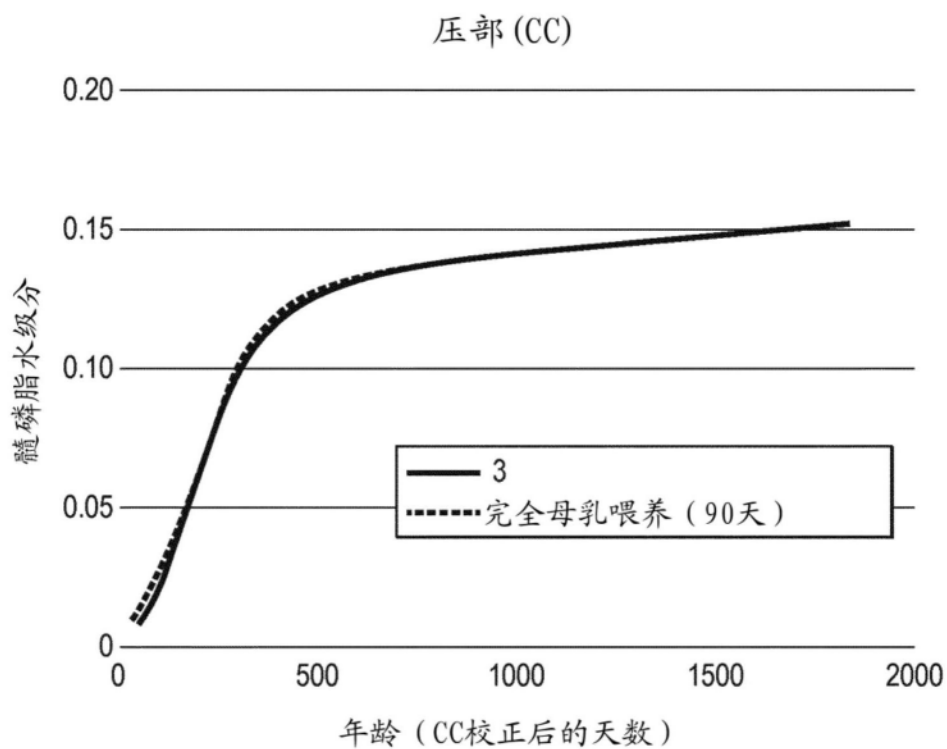


图11续

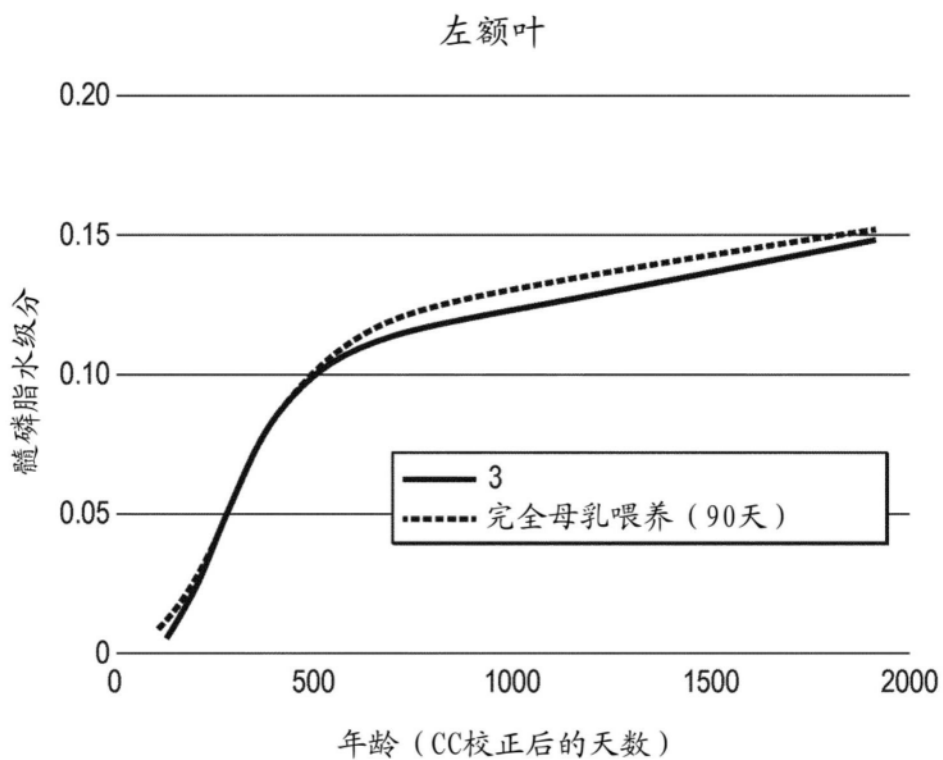
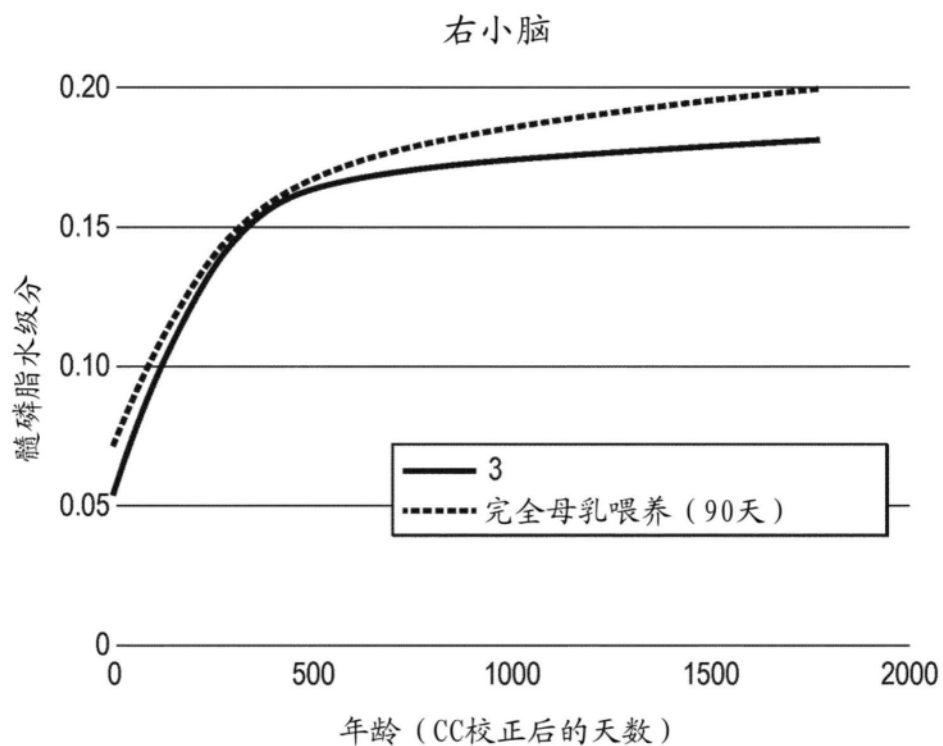


图11续

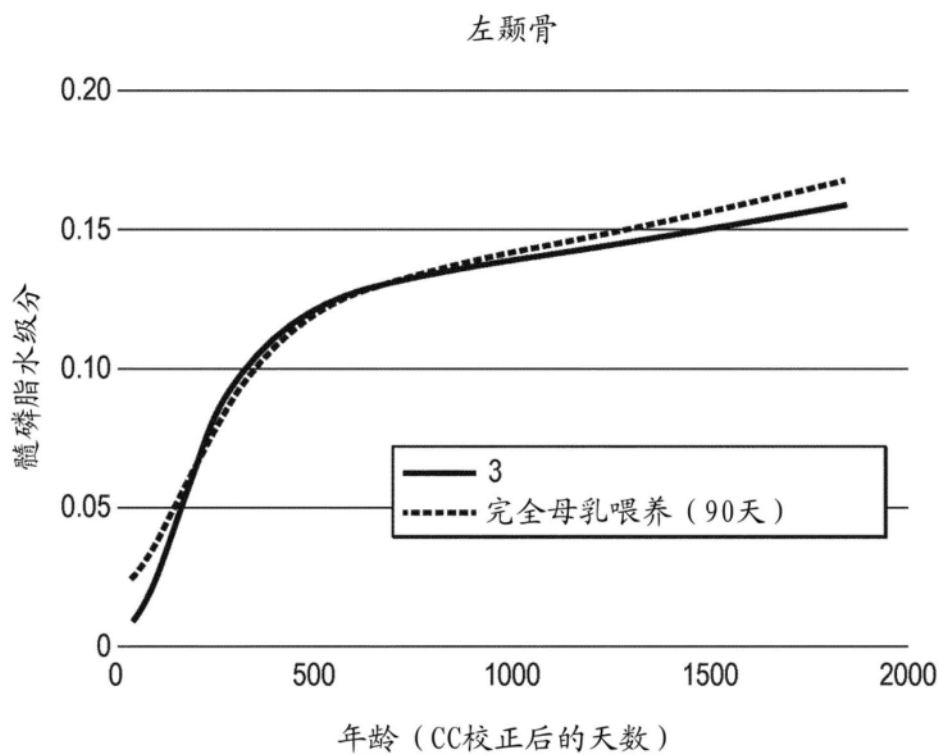
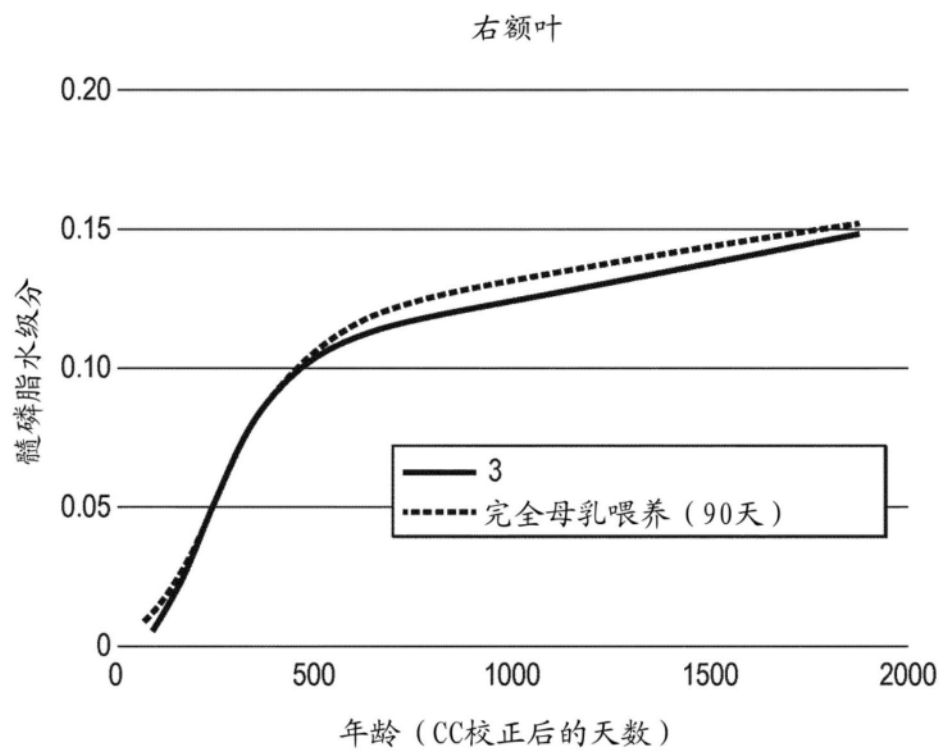


图11续

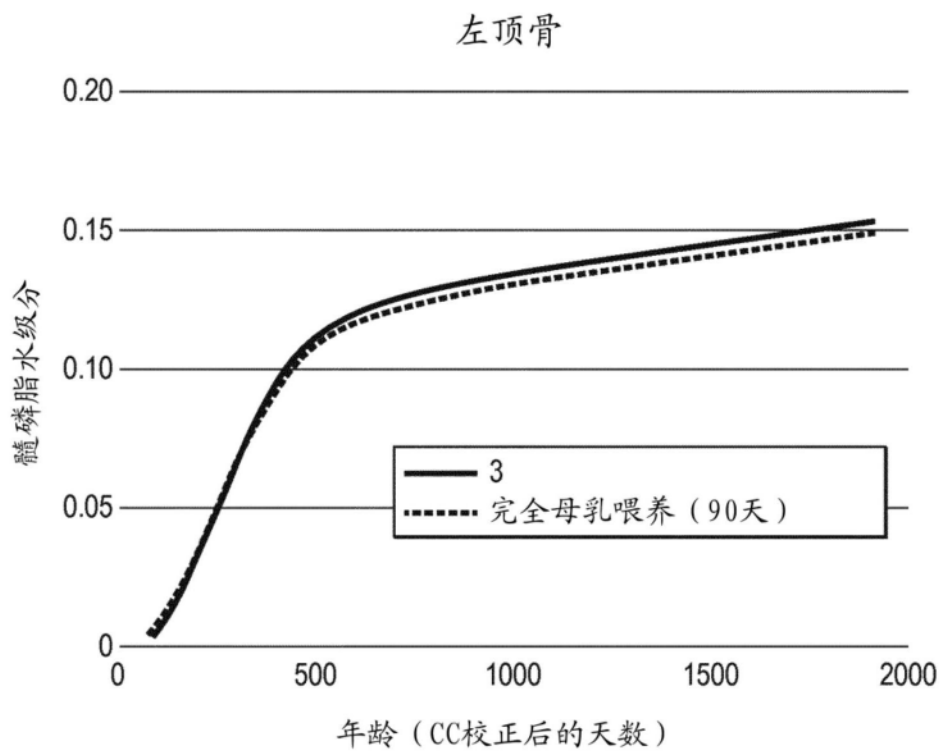
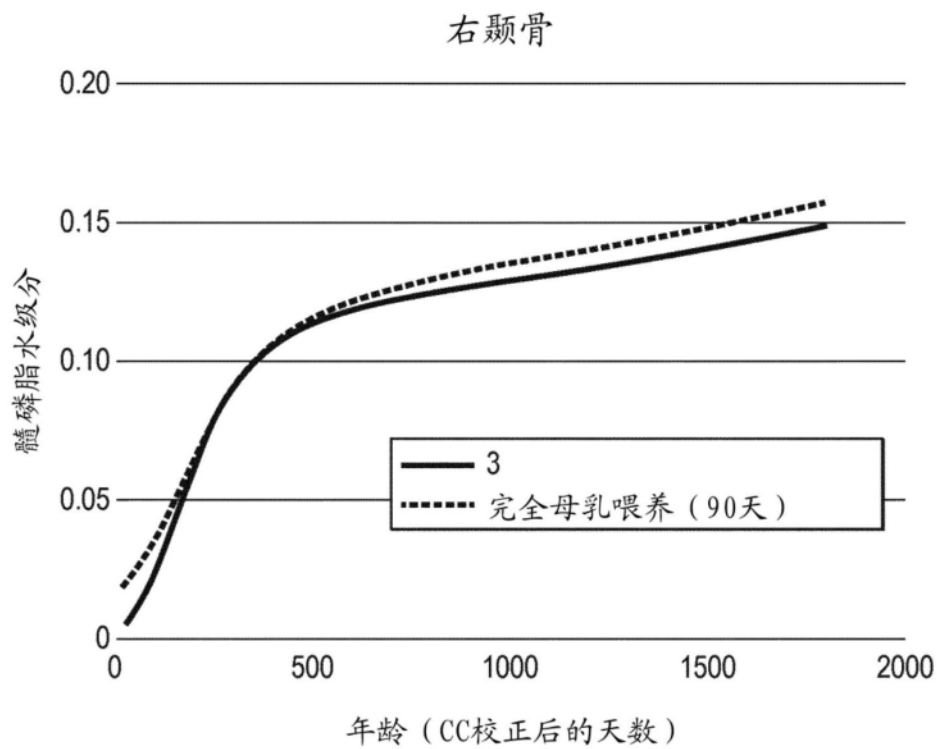


图11续

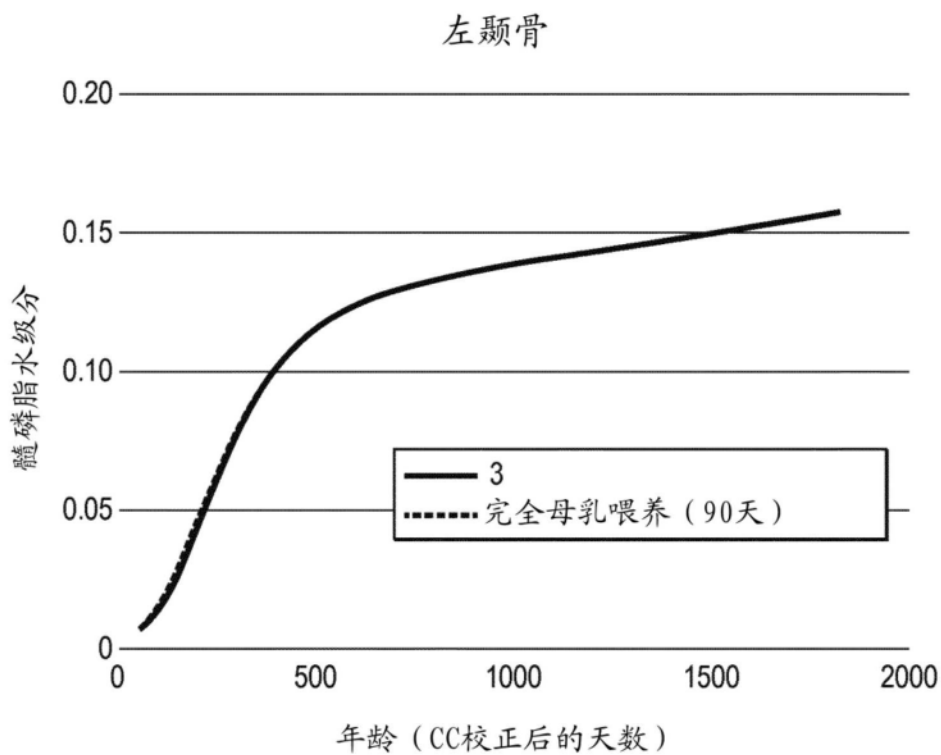
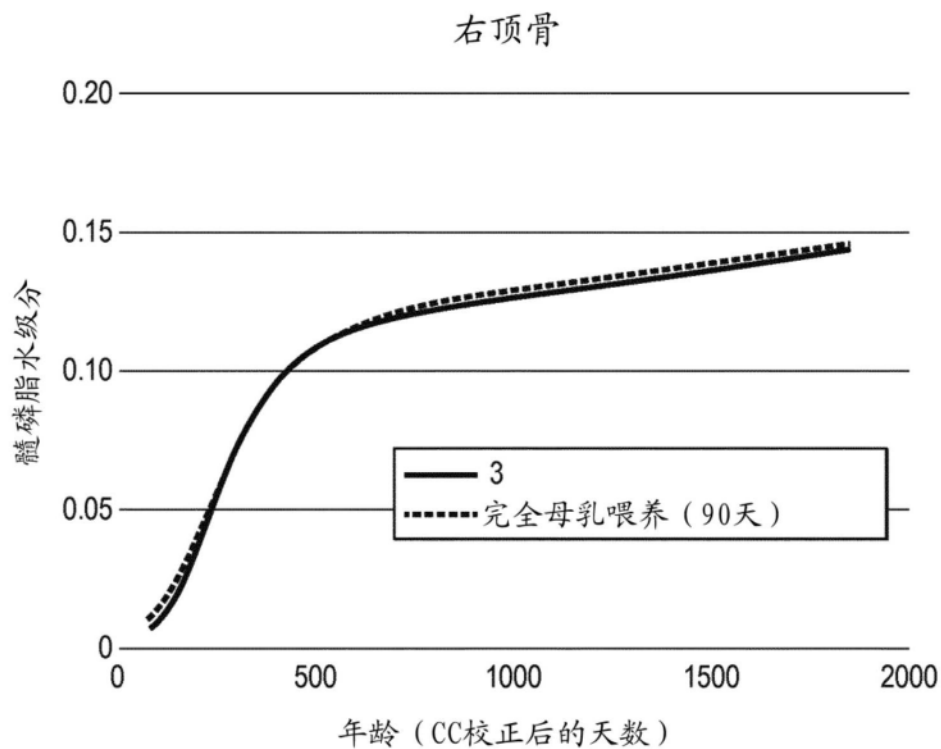


图11续

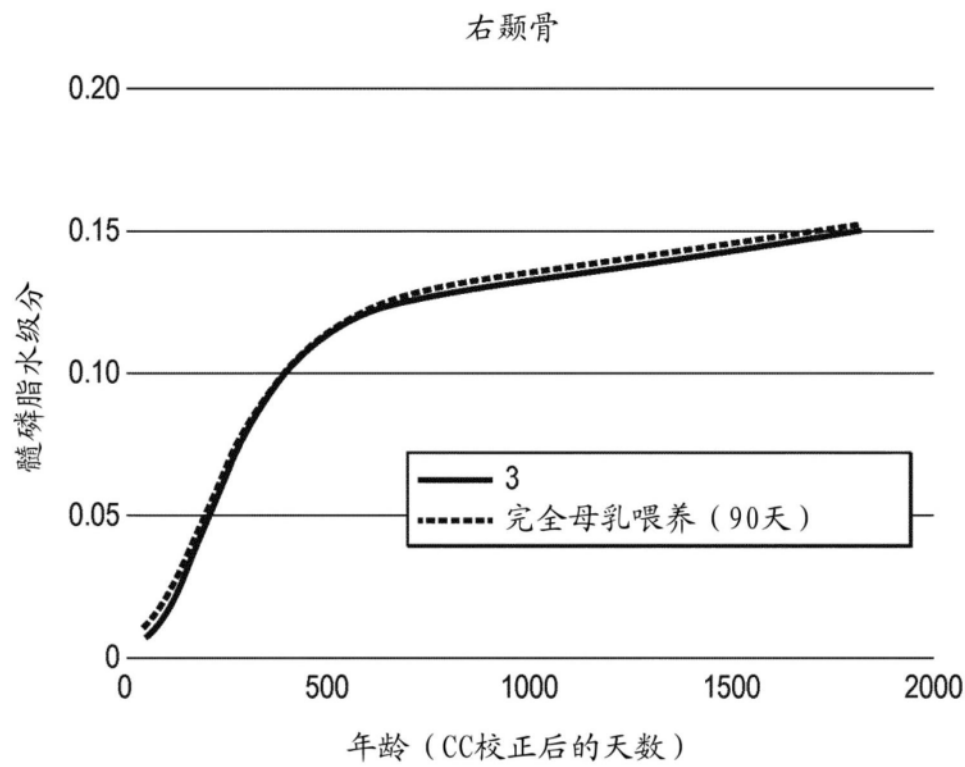


图11续

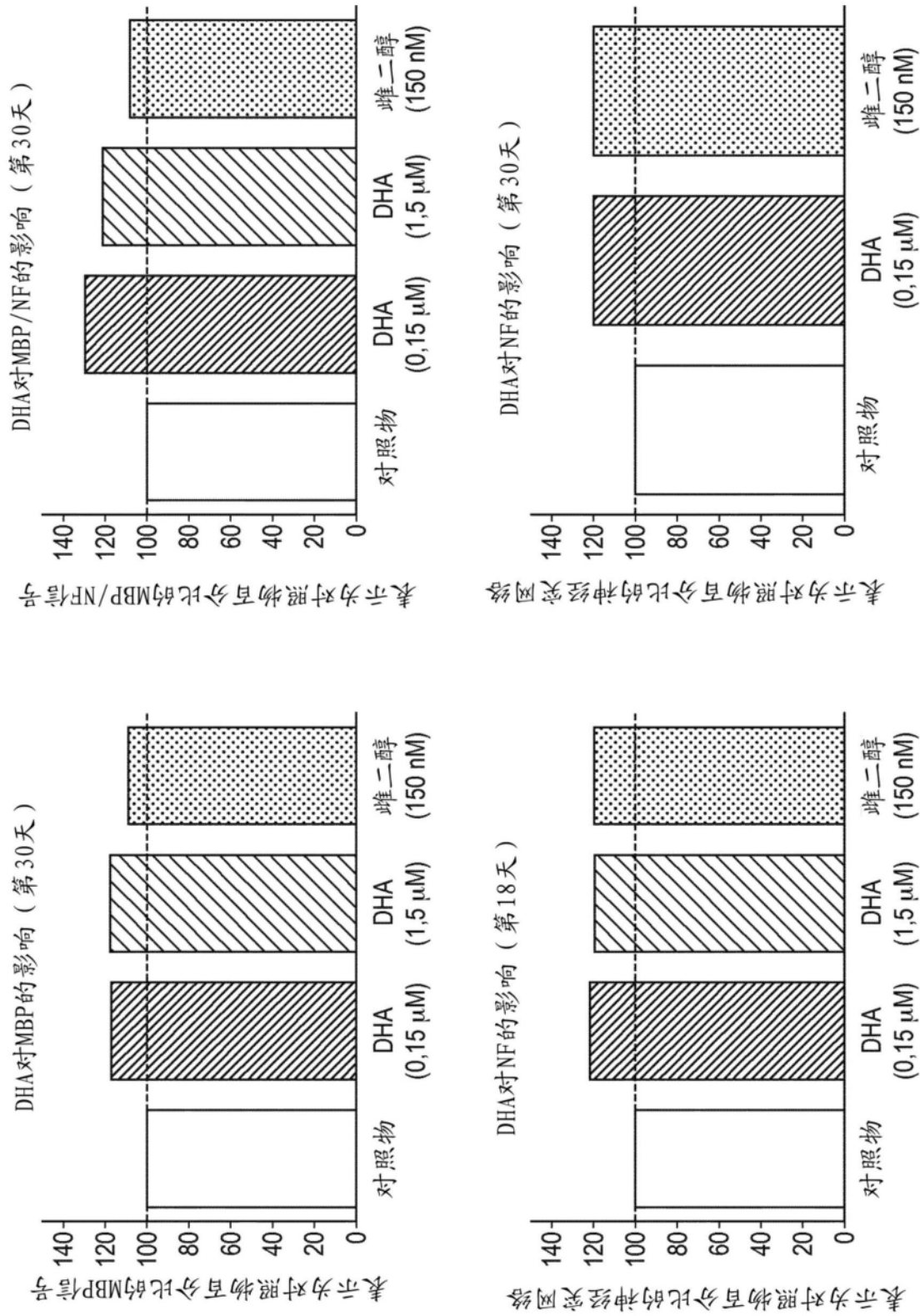


图12

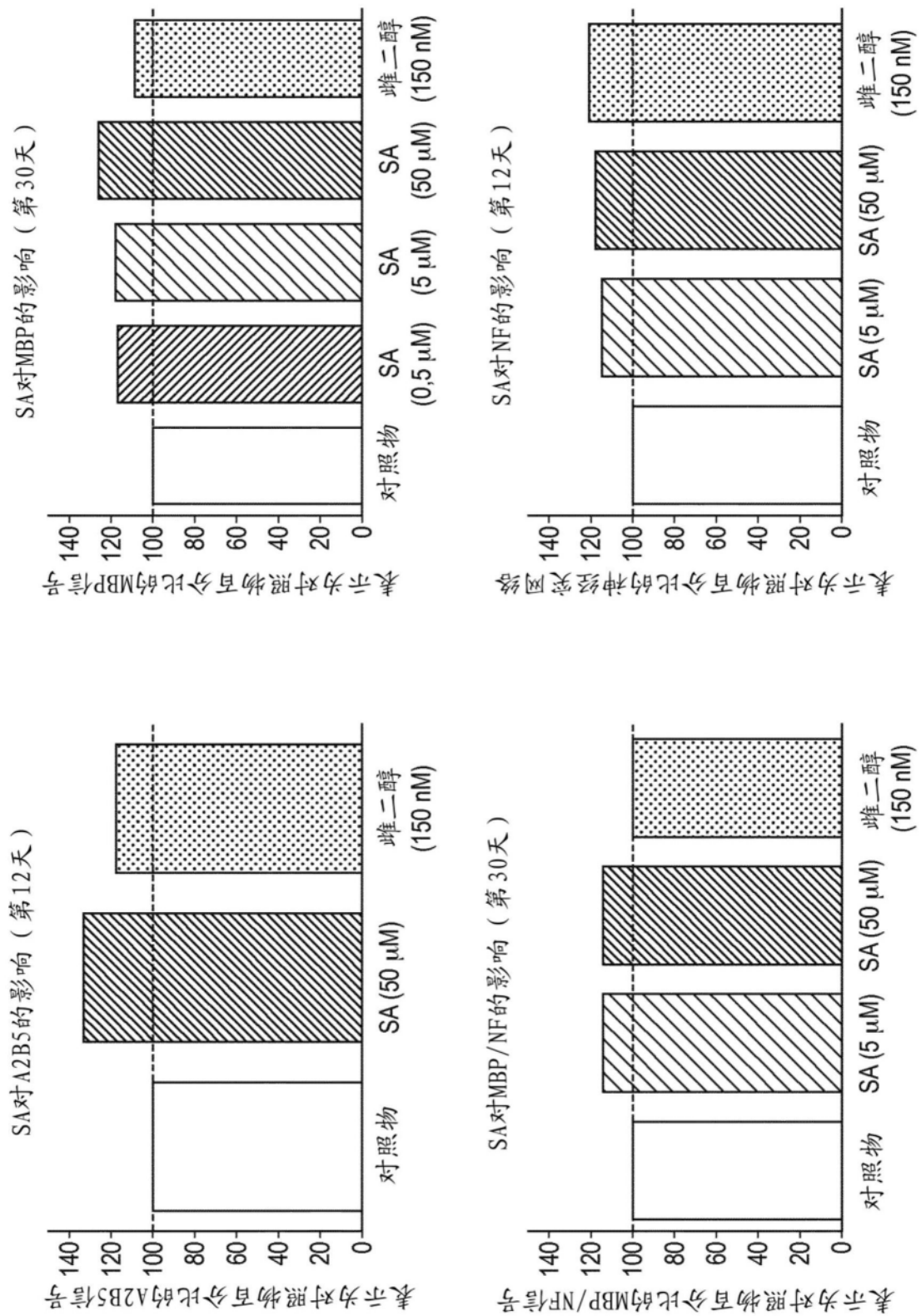


图13

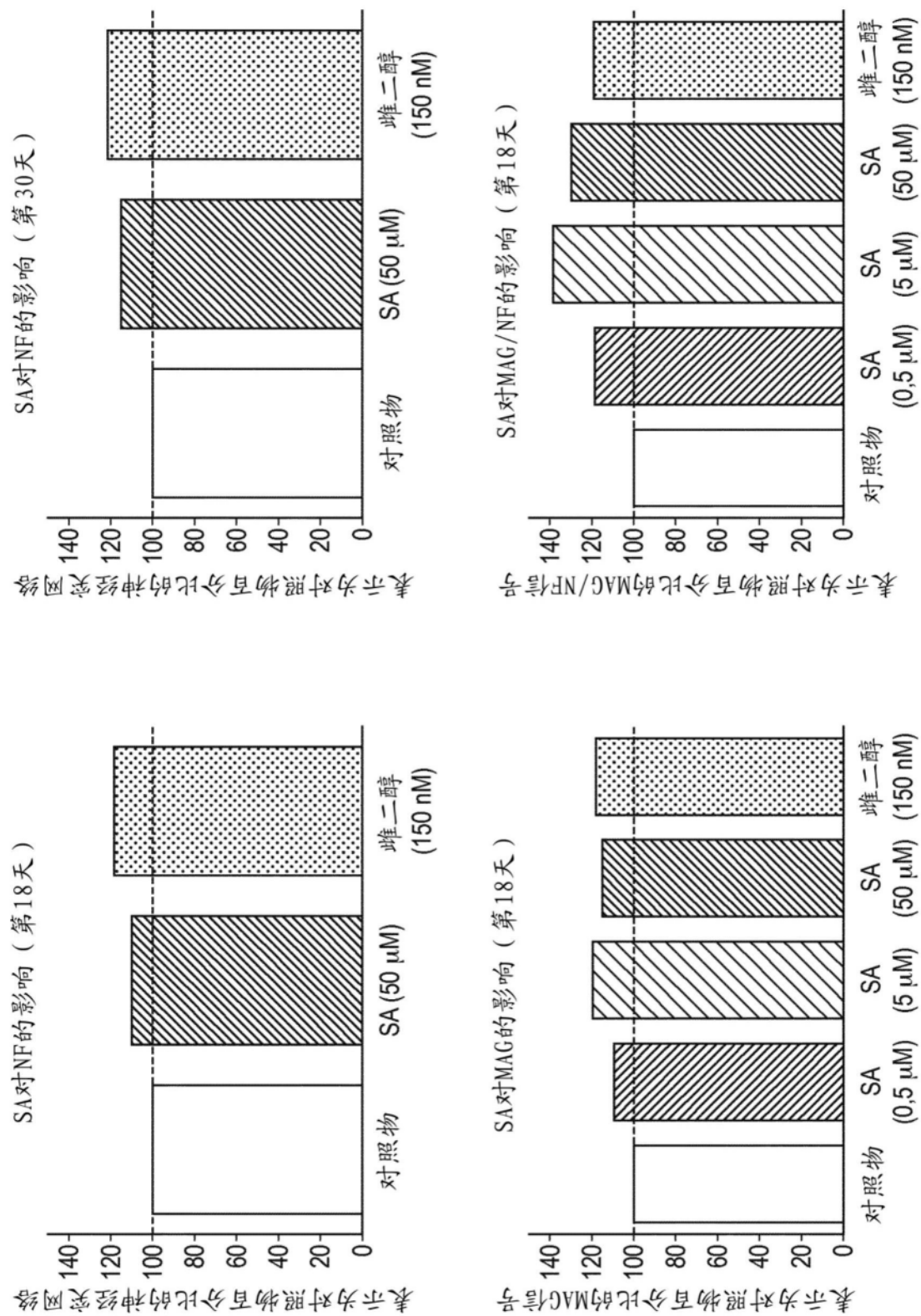


图13续

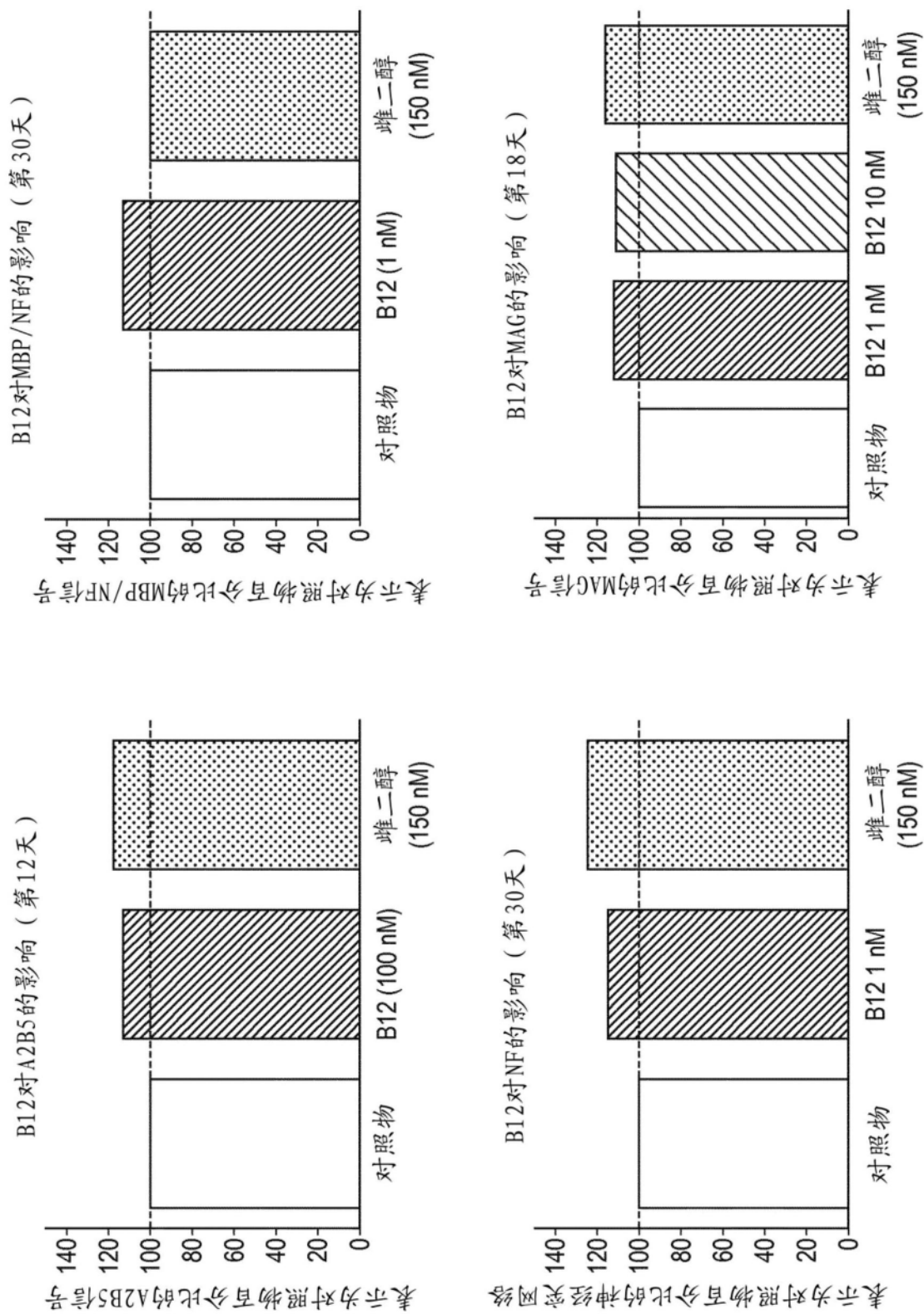


图14

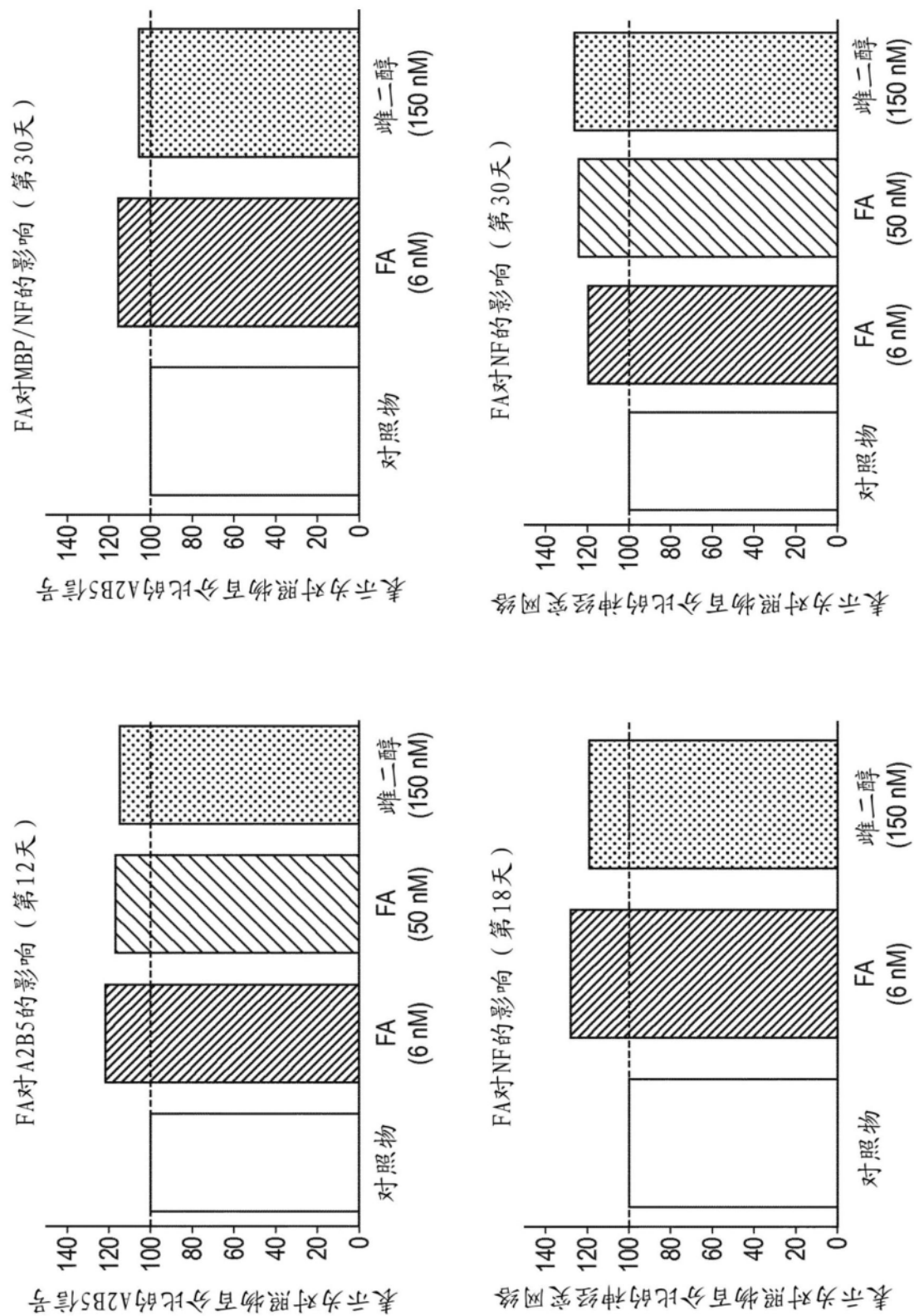


图15

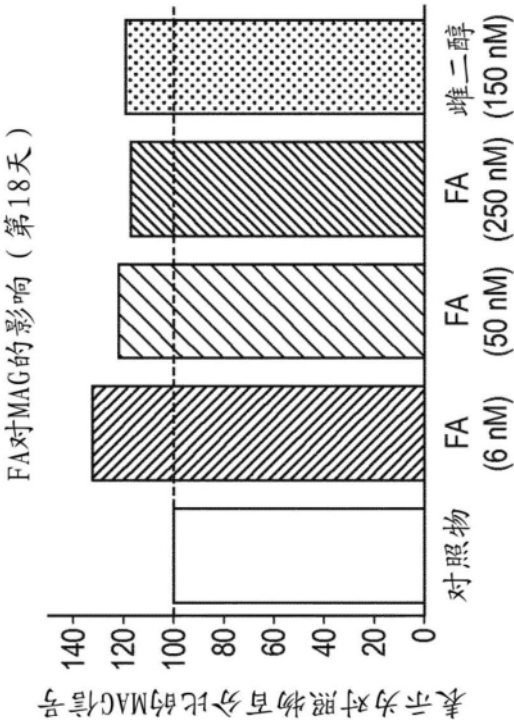
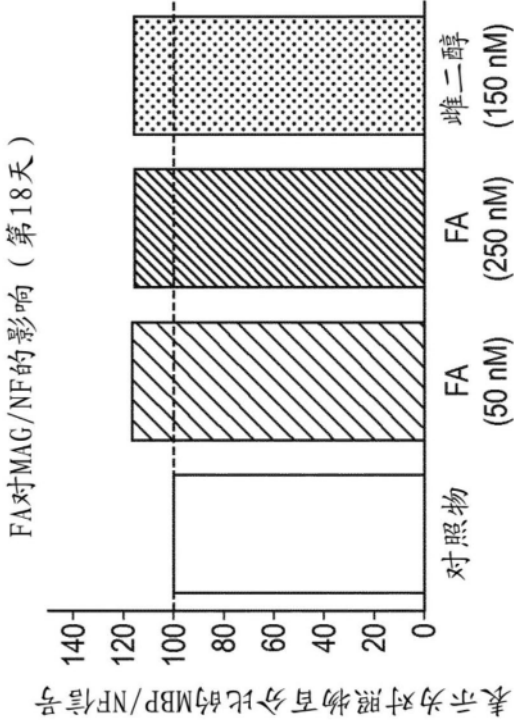


图15续

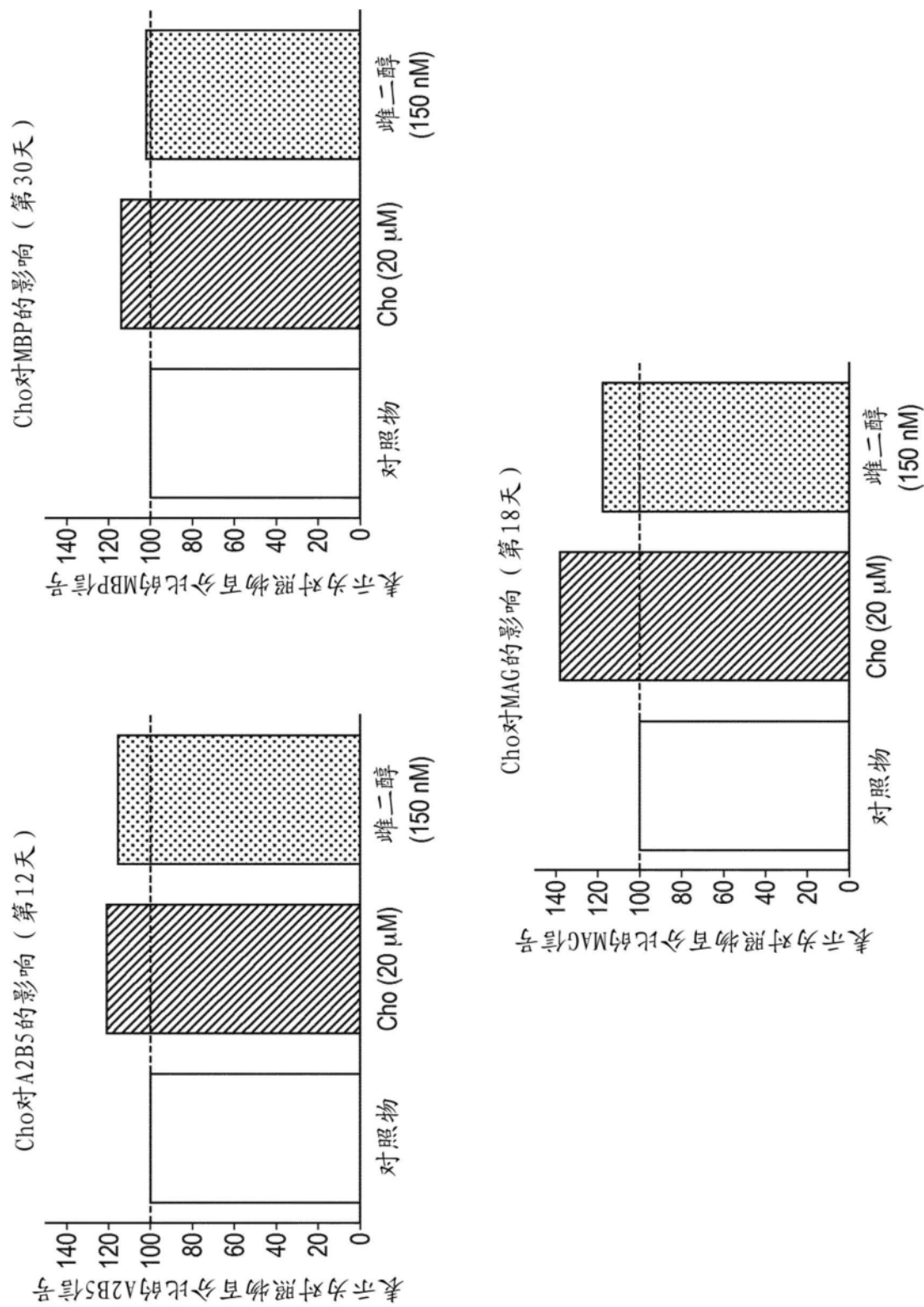


图16

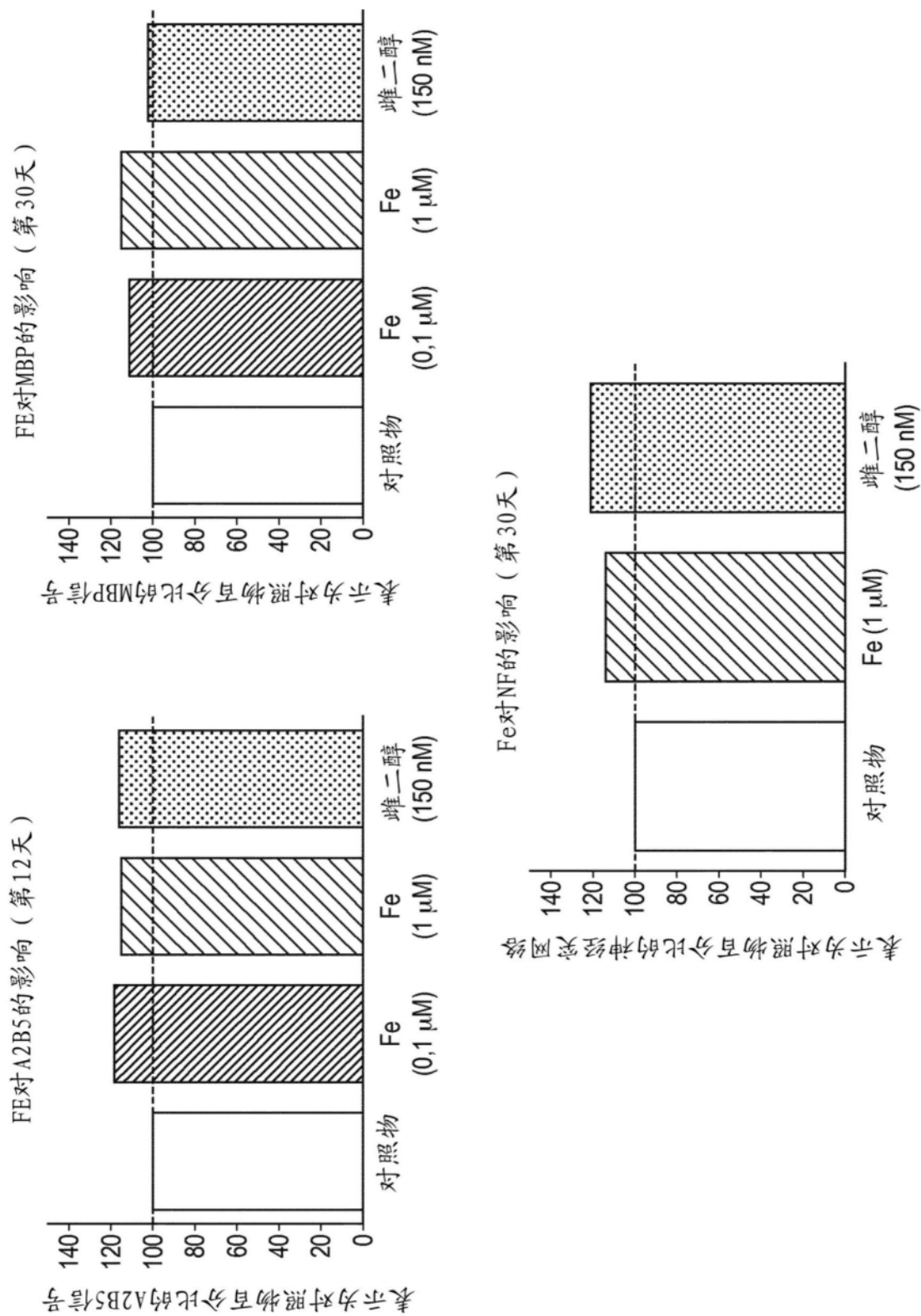


图17

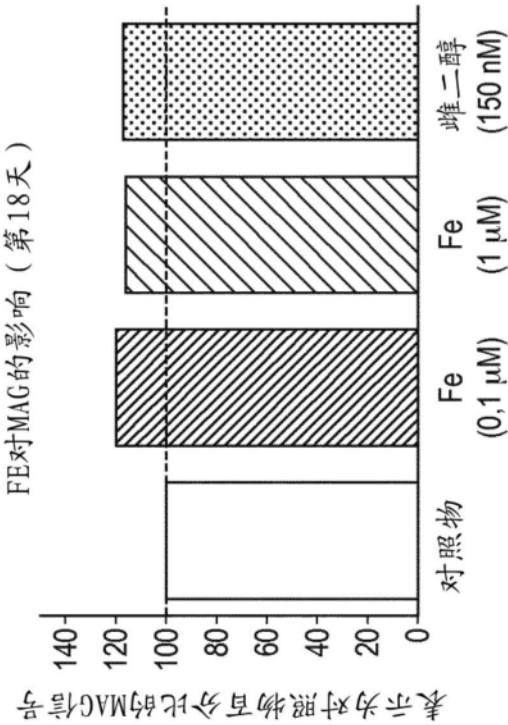
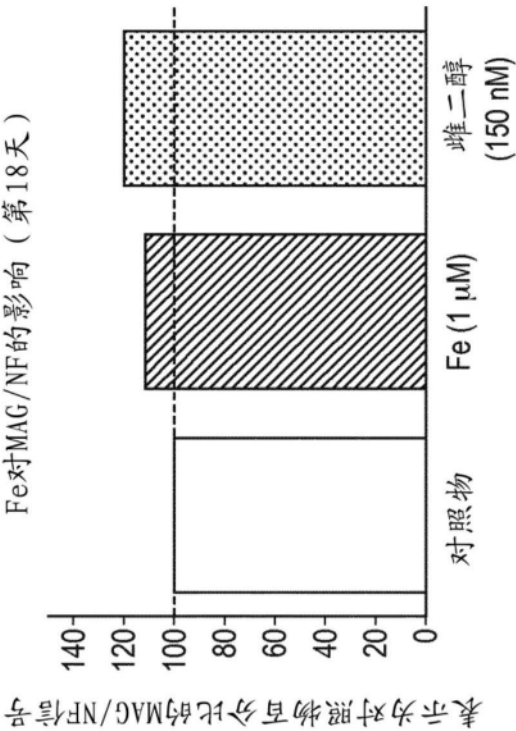


图17续

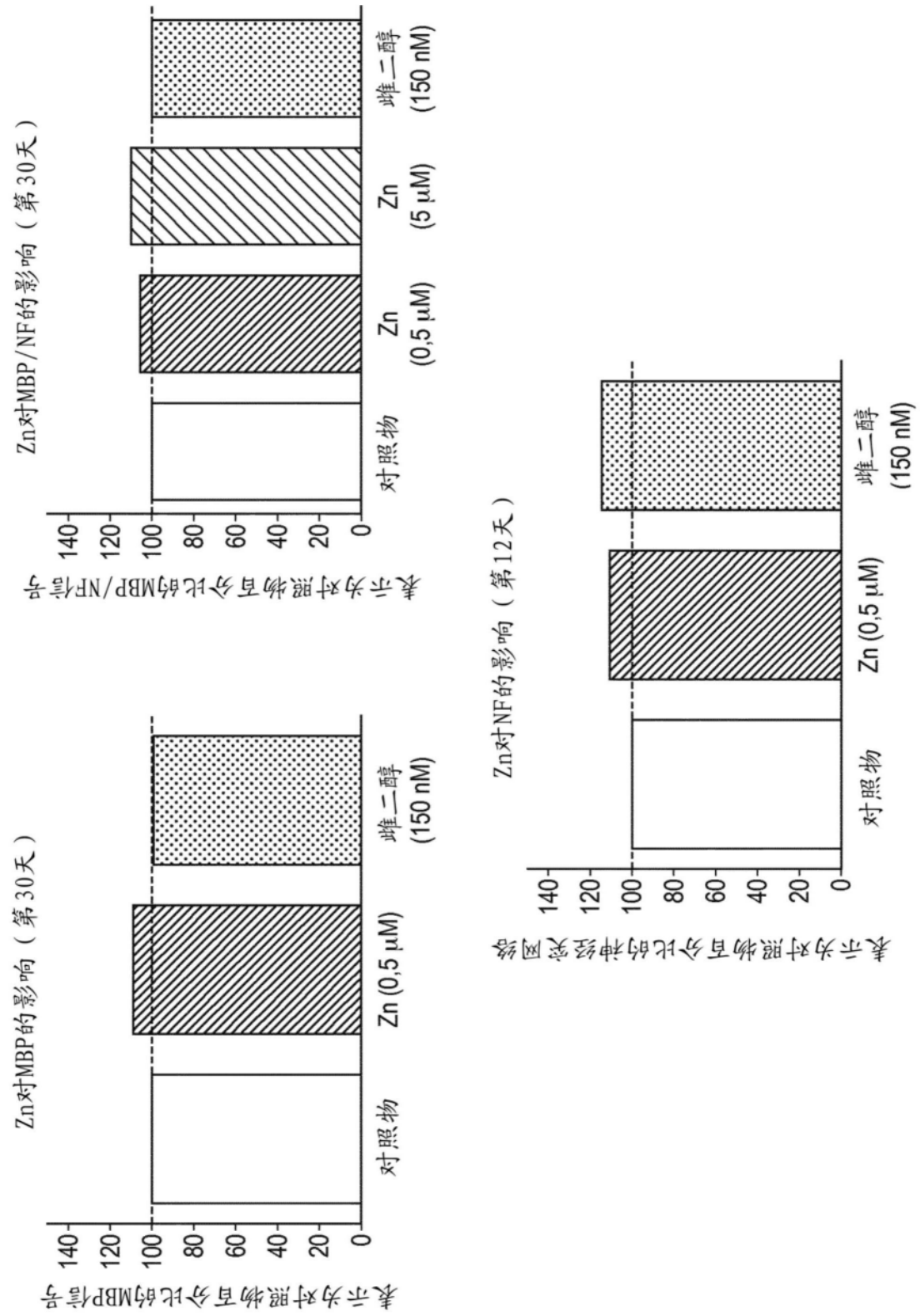


图18

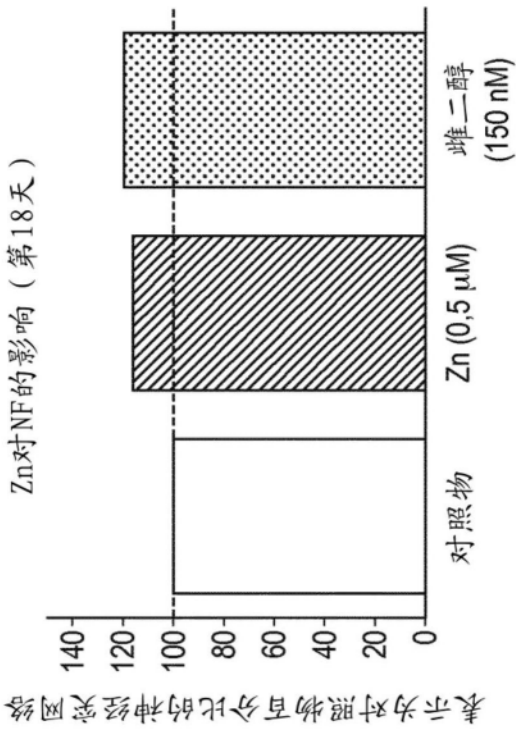
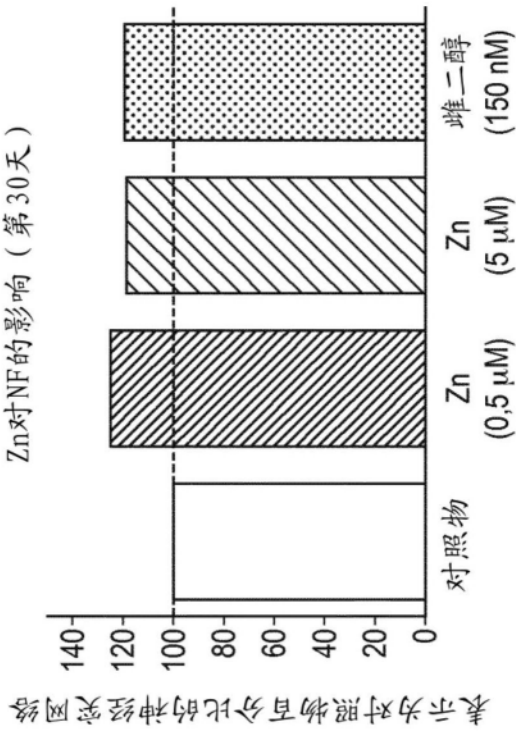


图18续

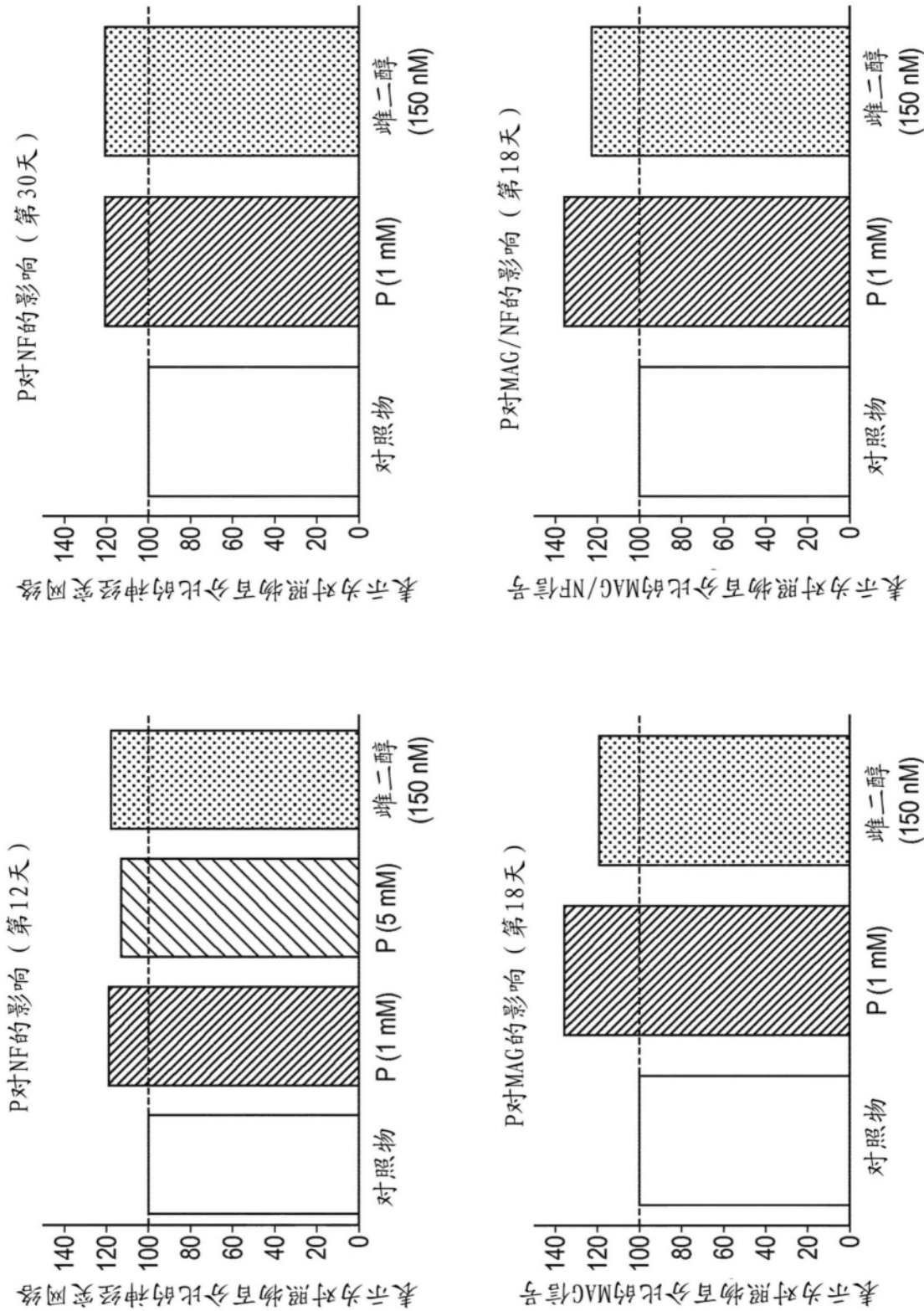


图19

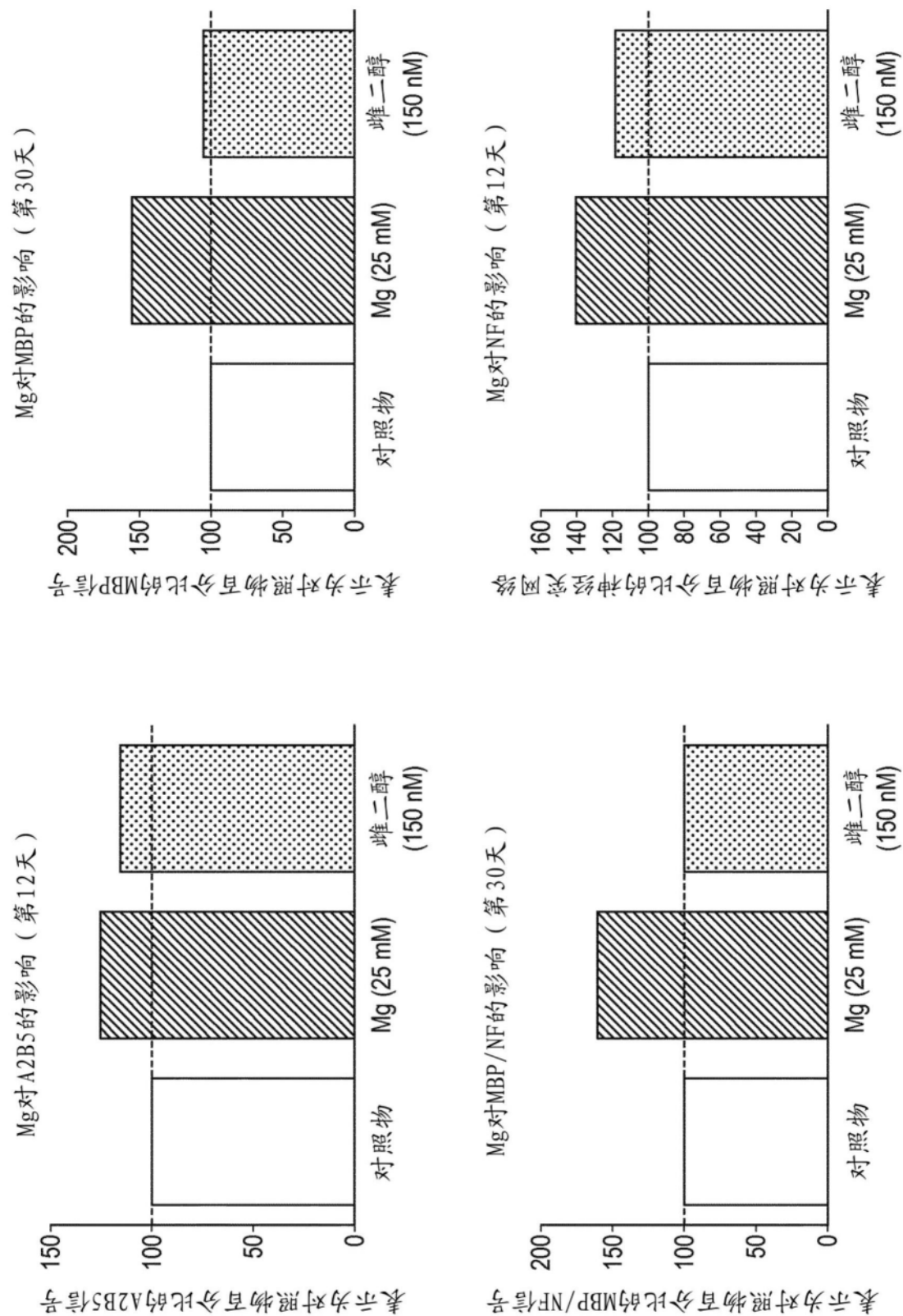


图20

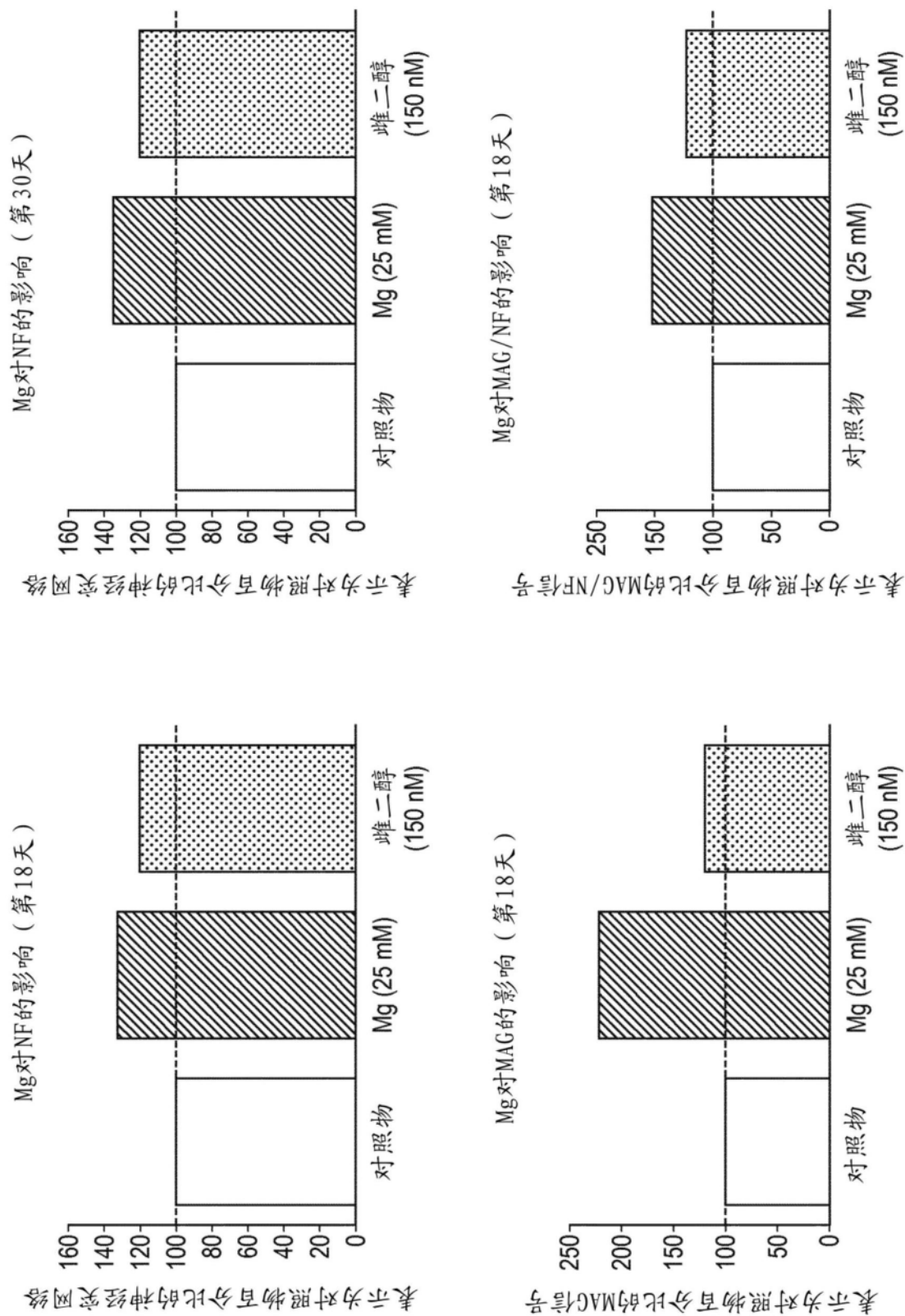


图20续

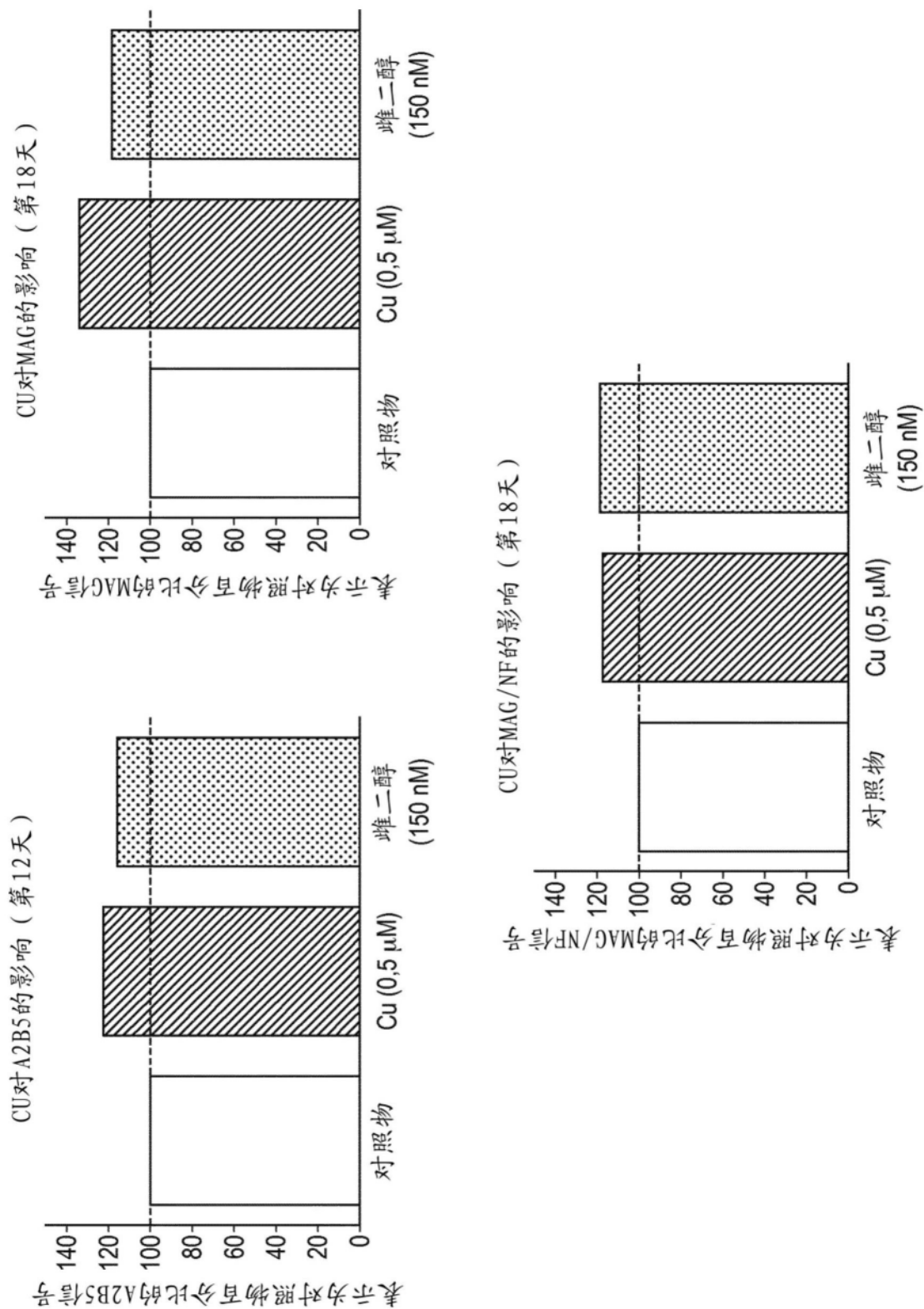


图21

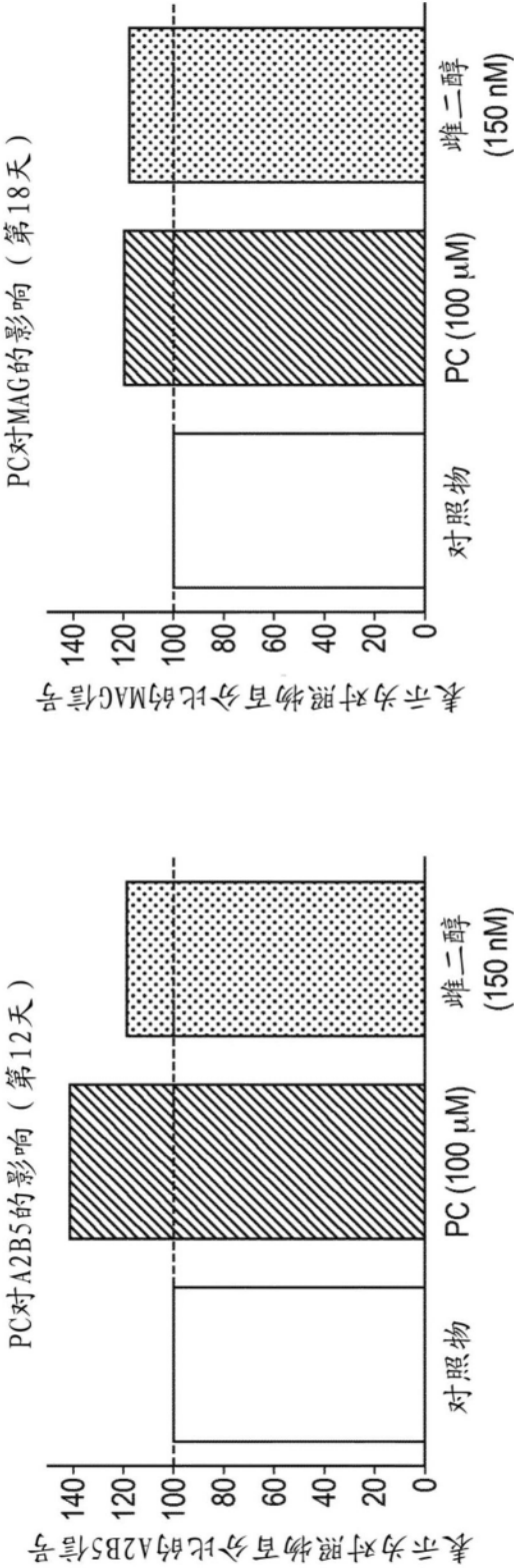


图22

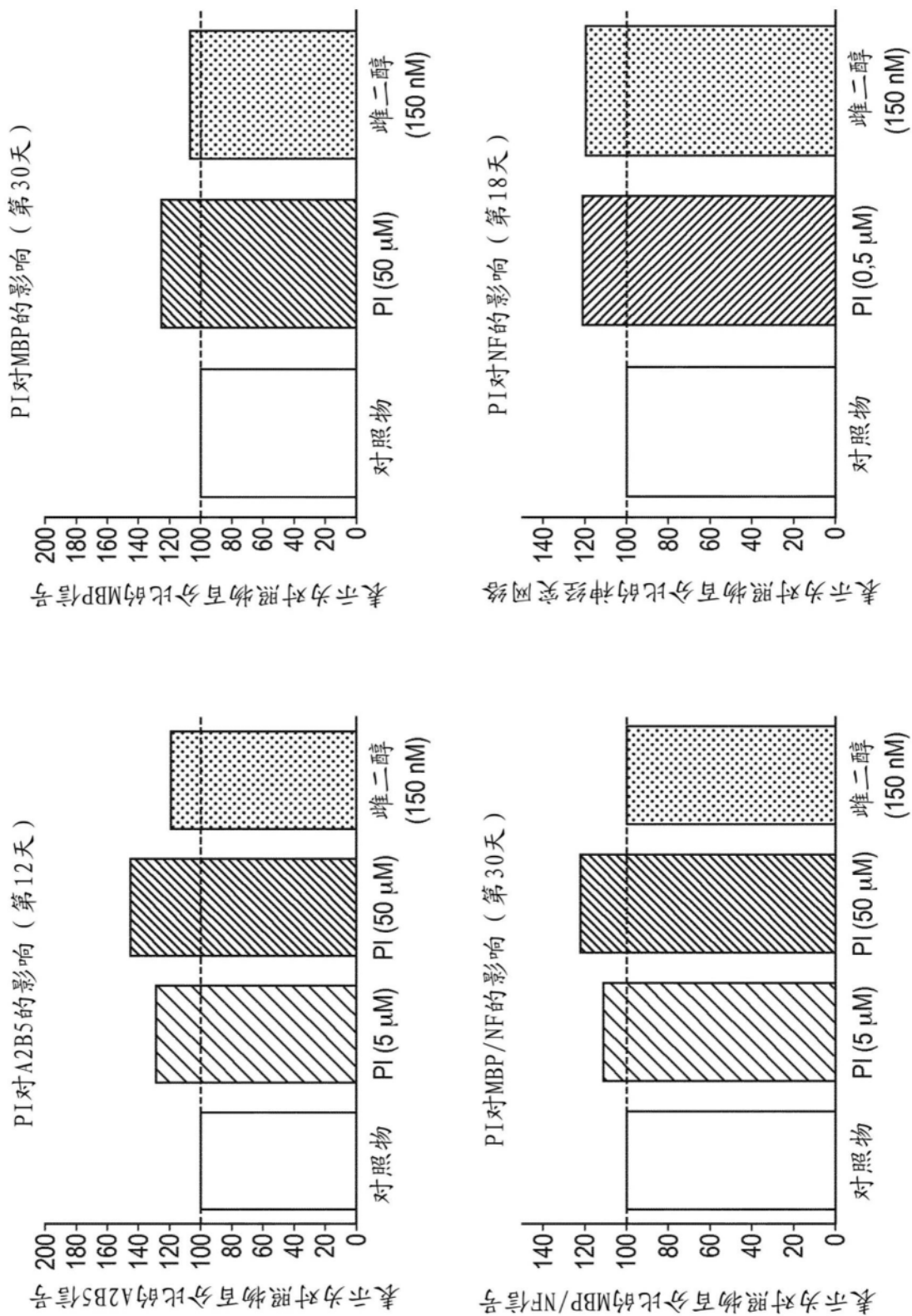


图23

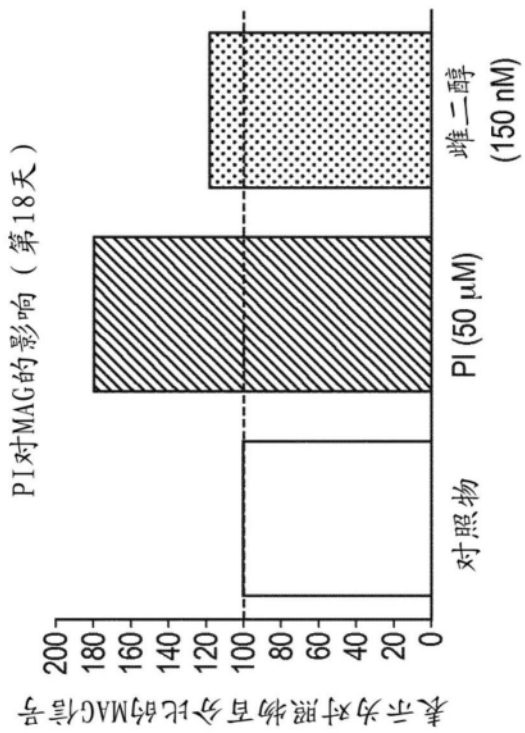
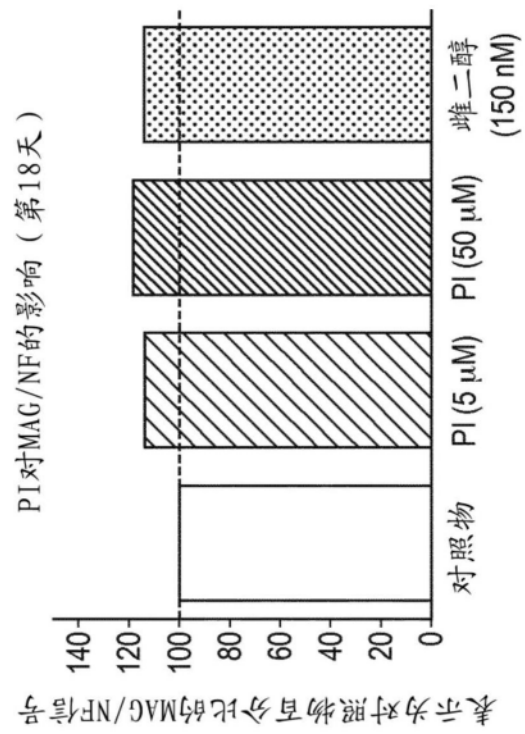


图23续

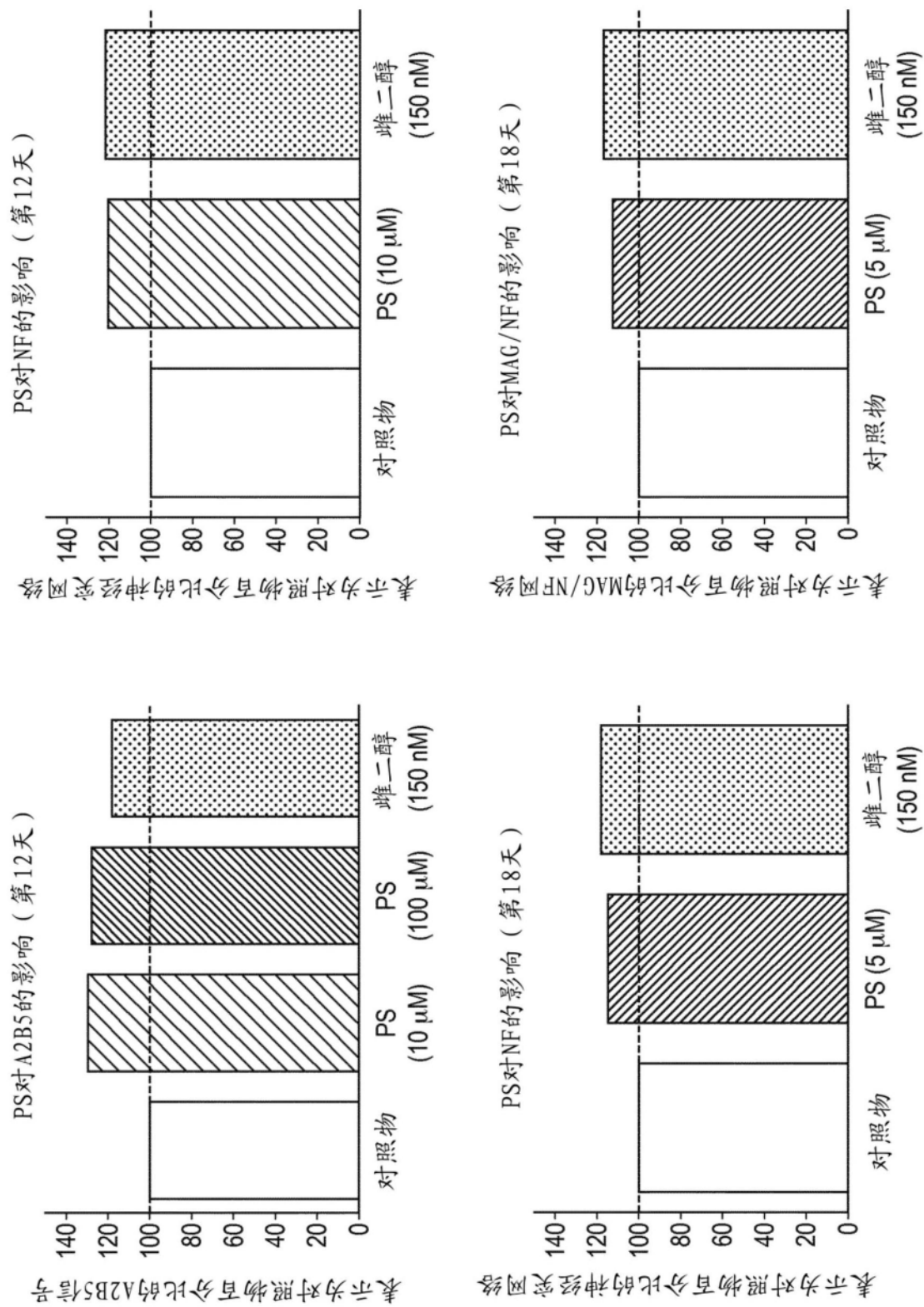


图24

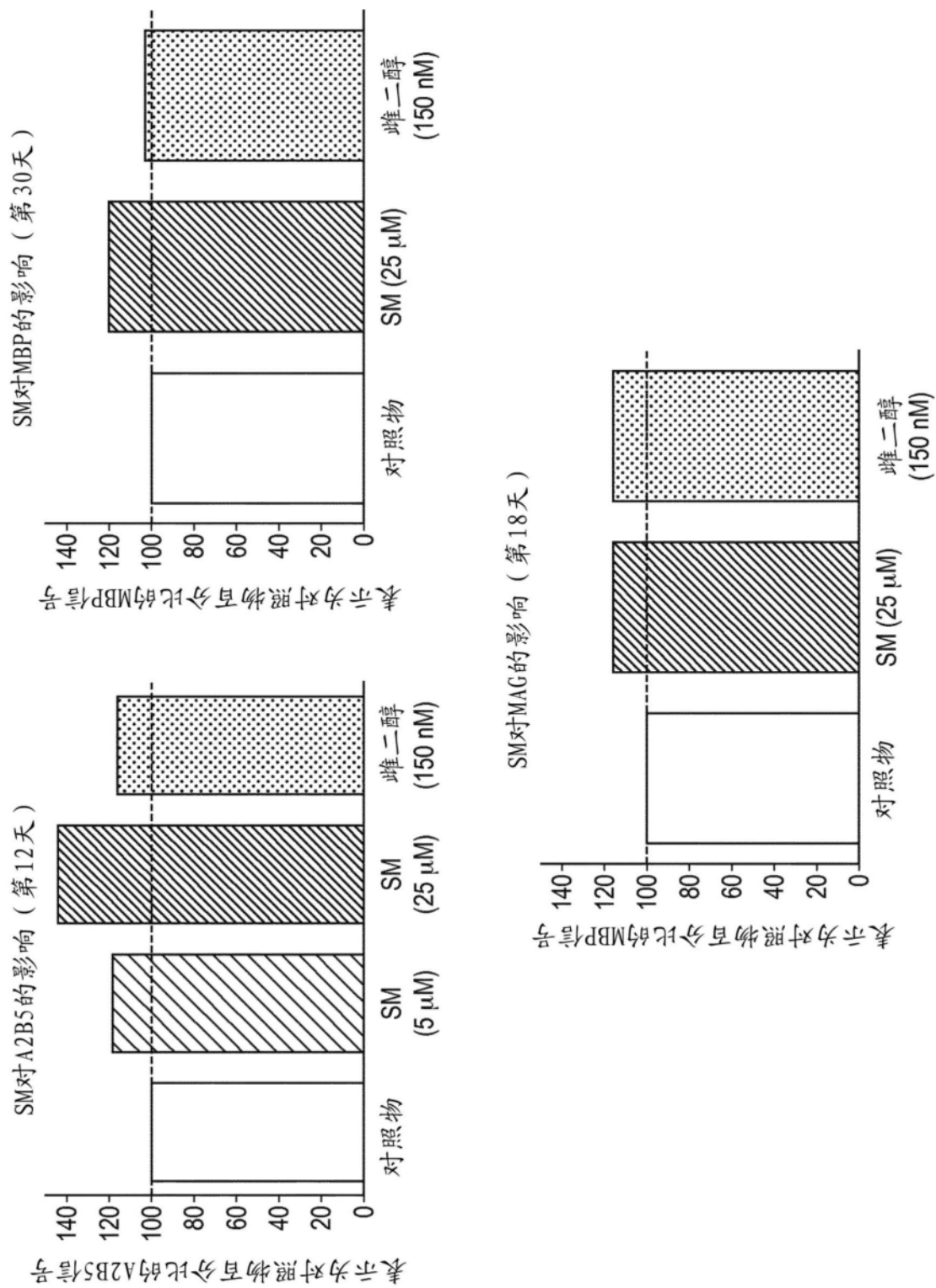


图25

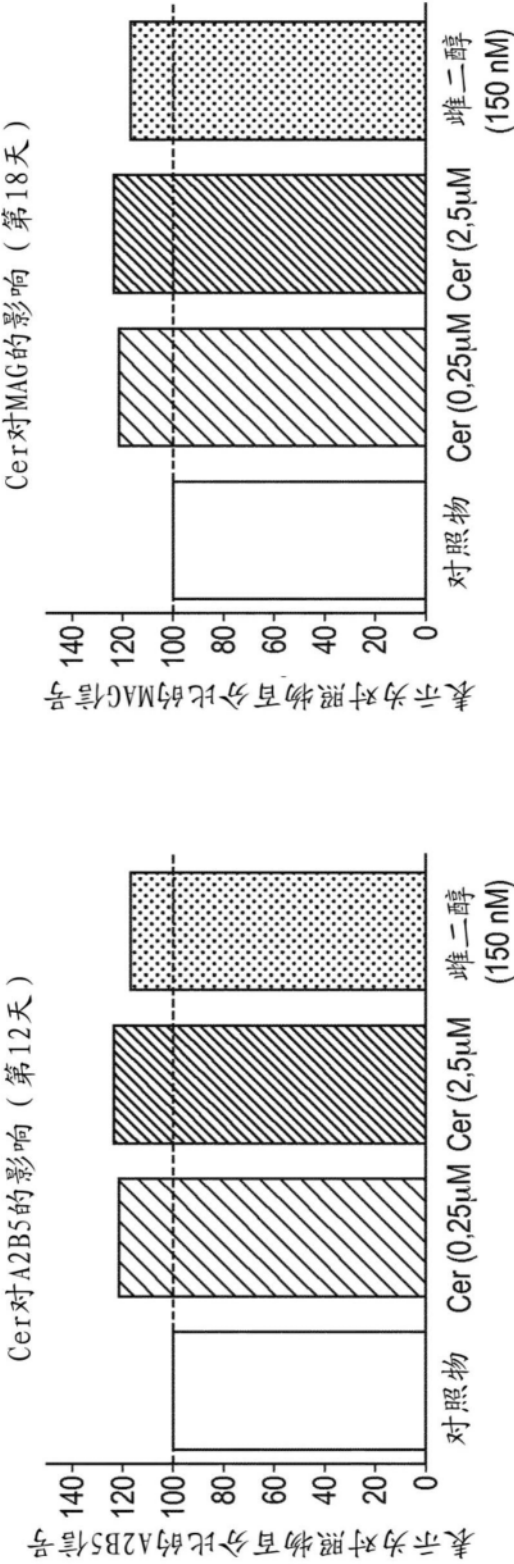


图26

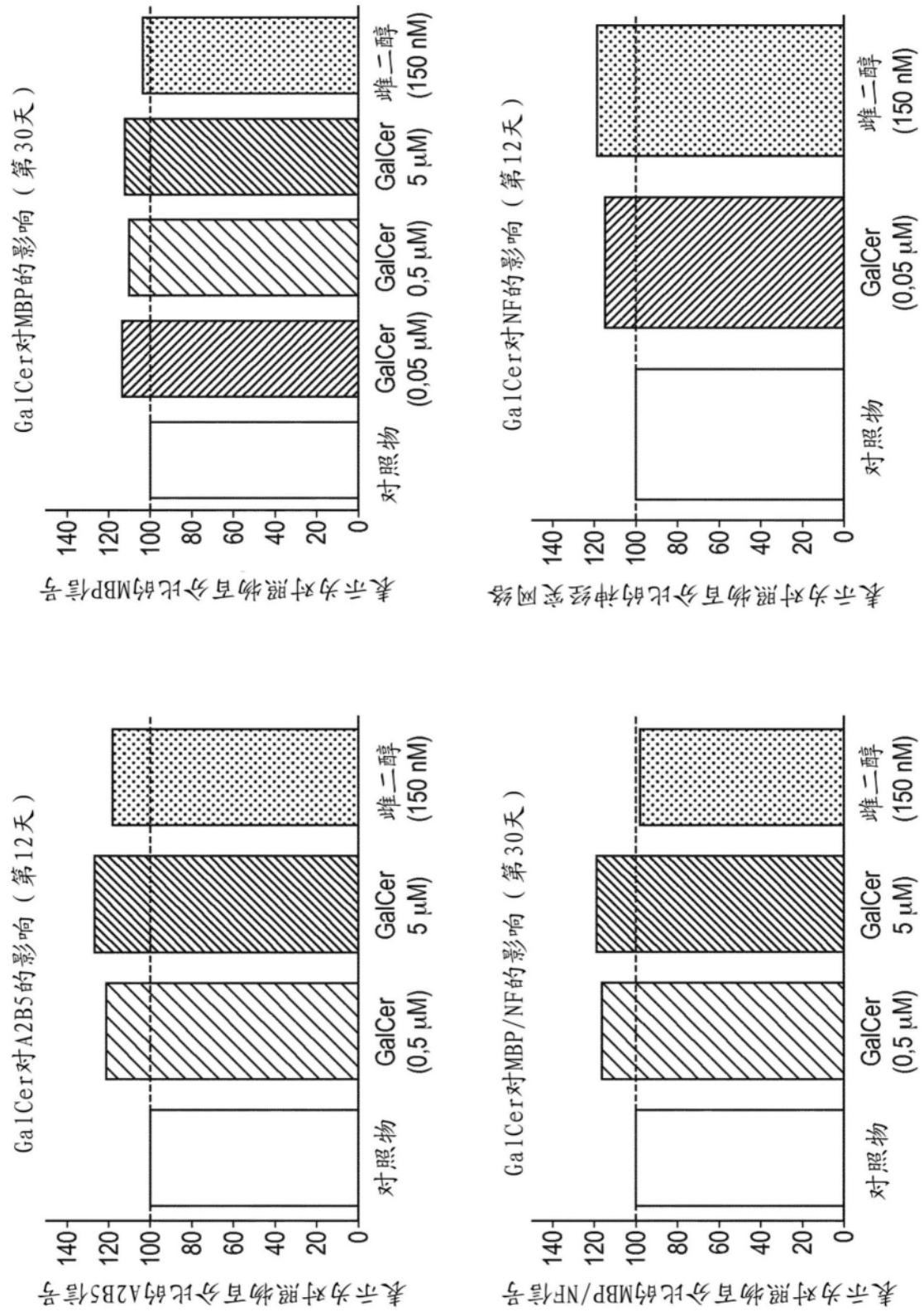


图27

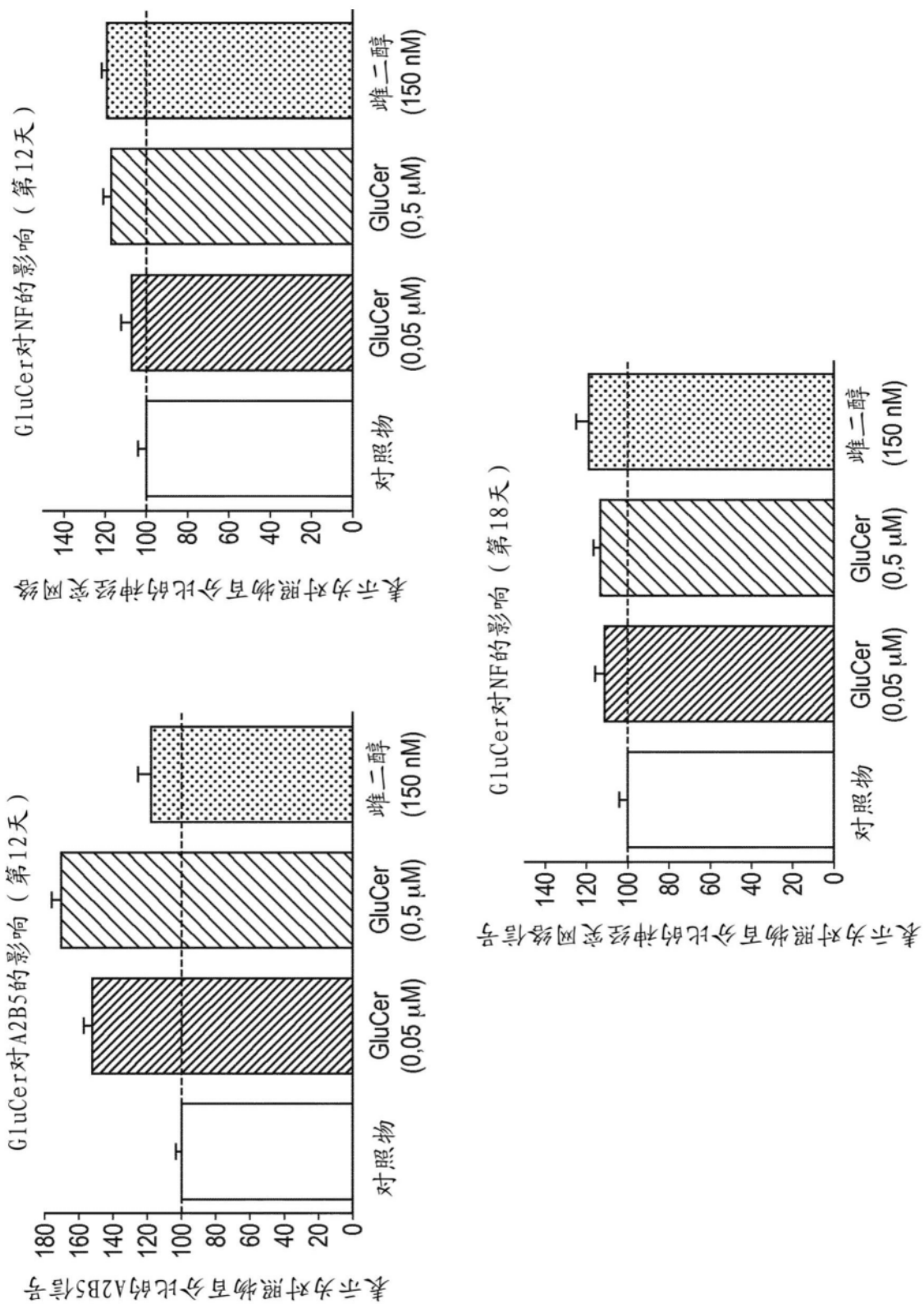


图28

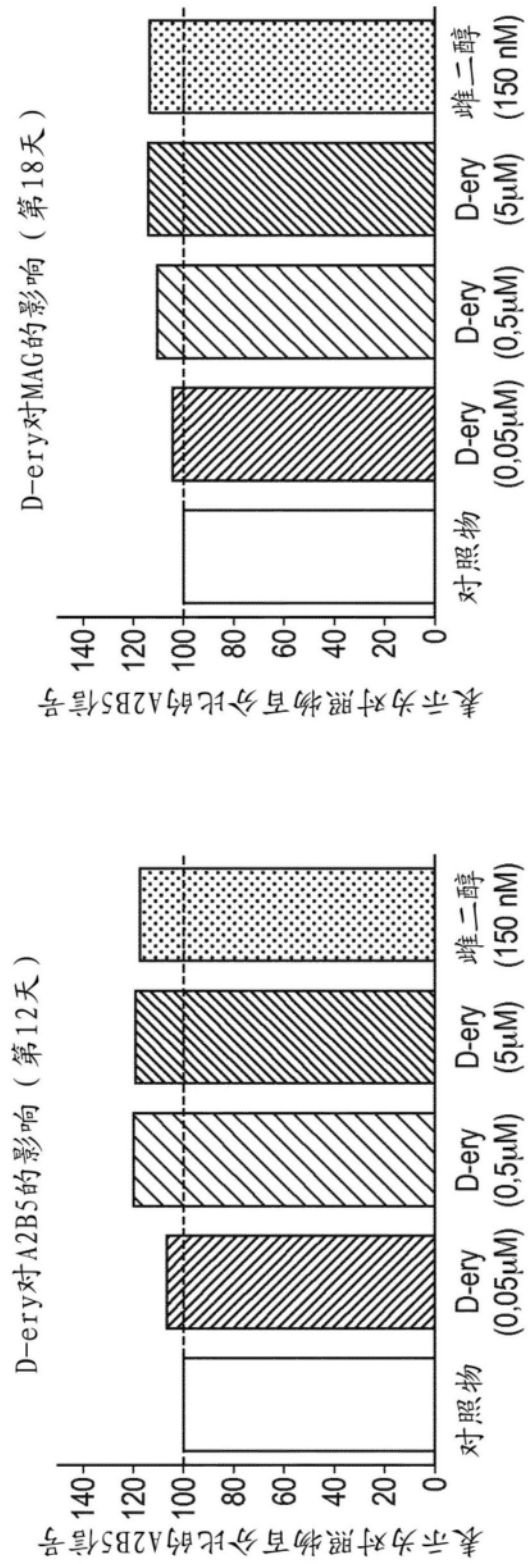


图29

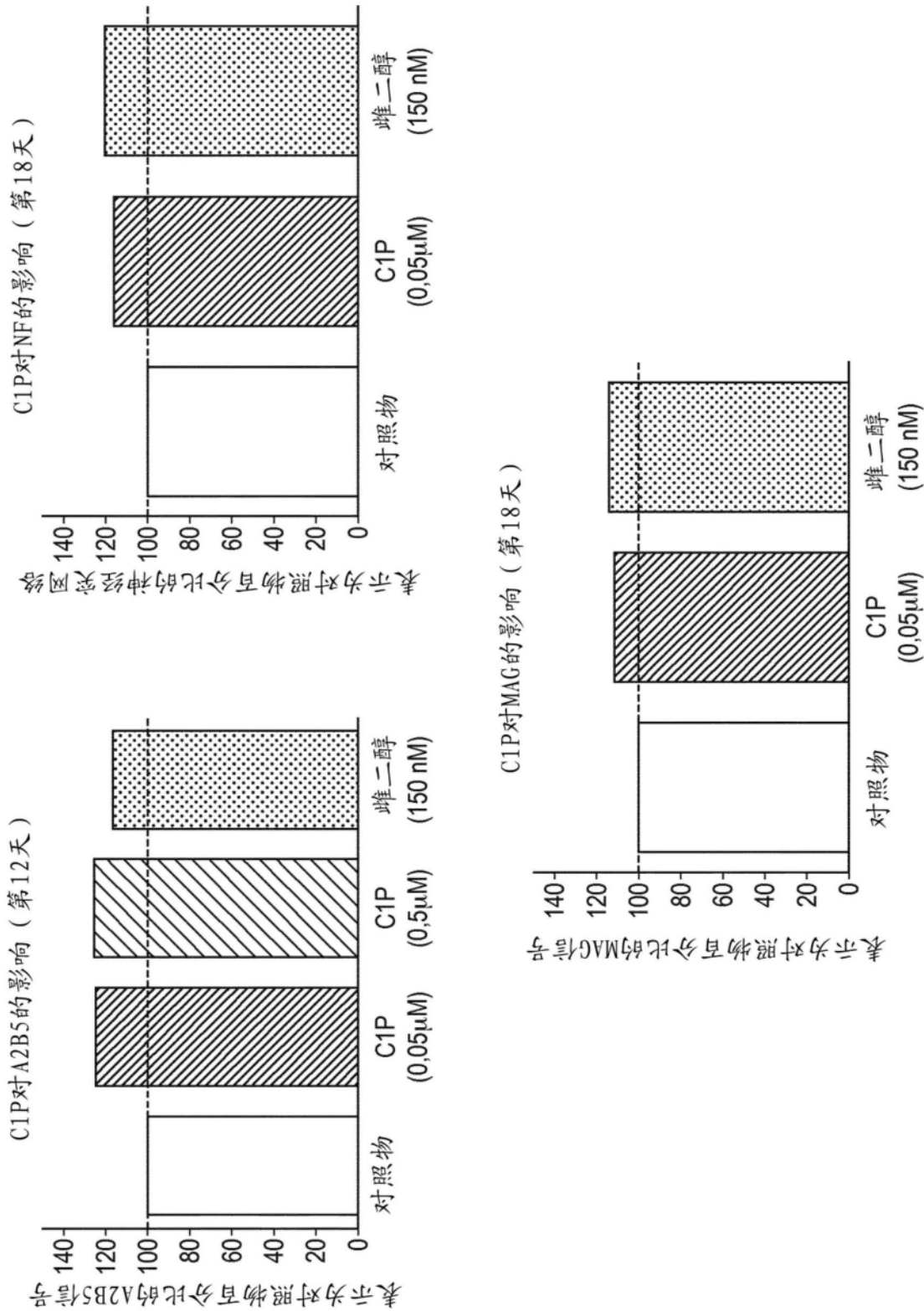


图30

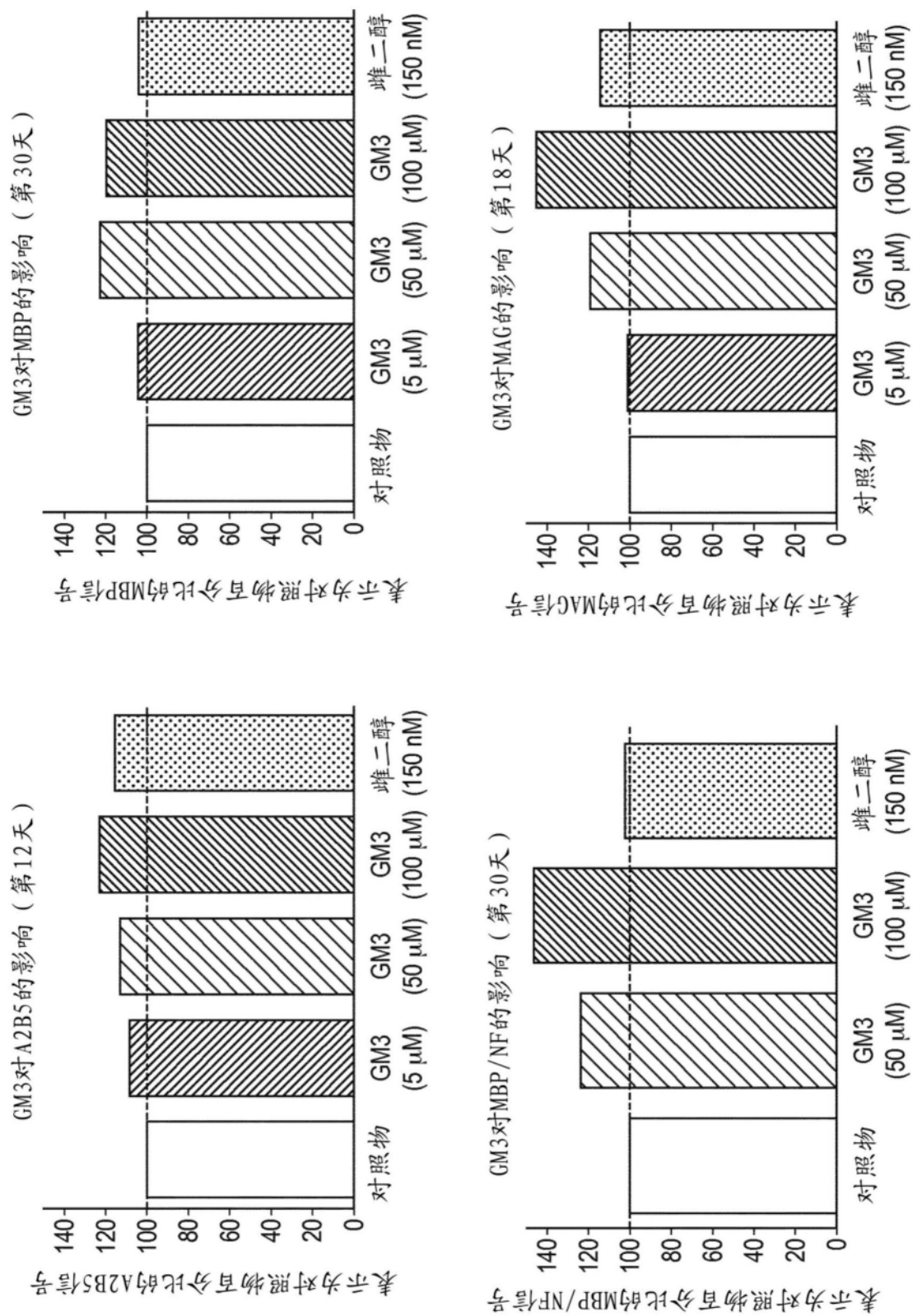


图31

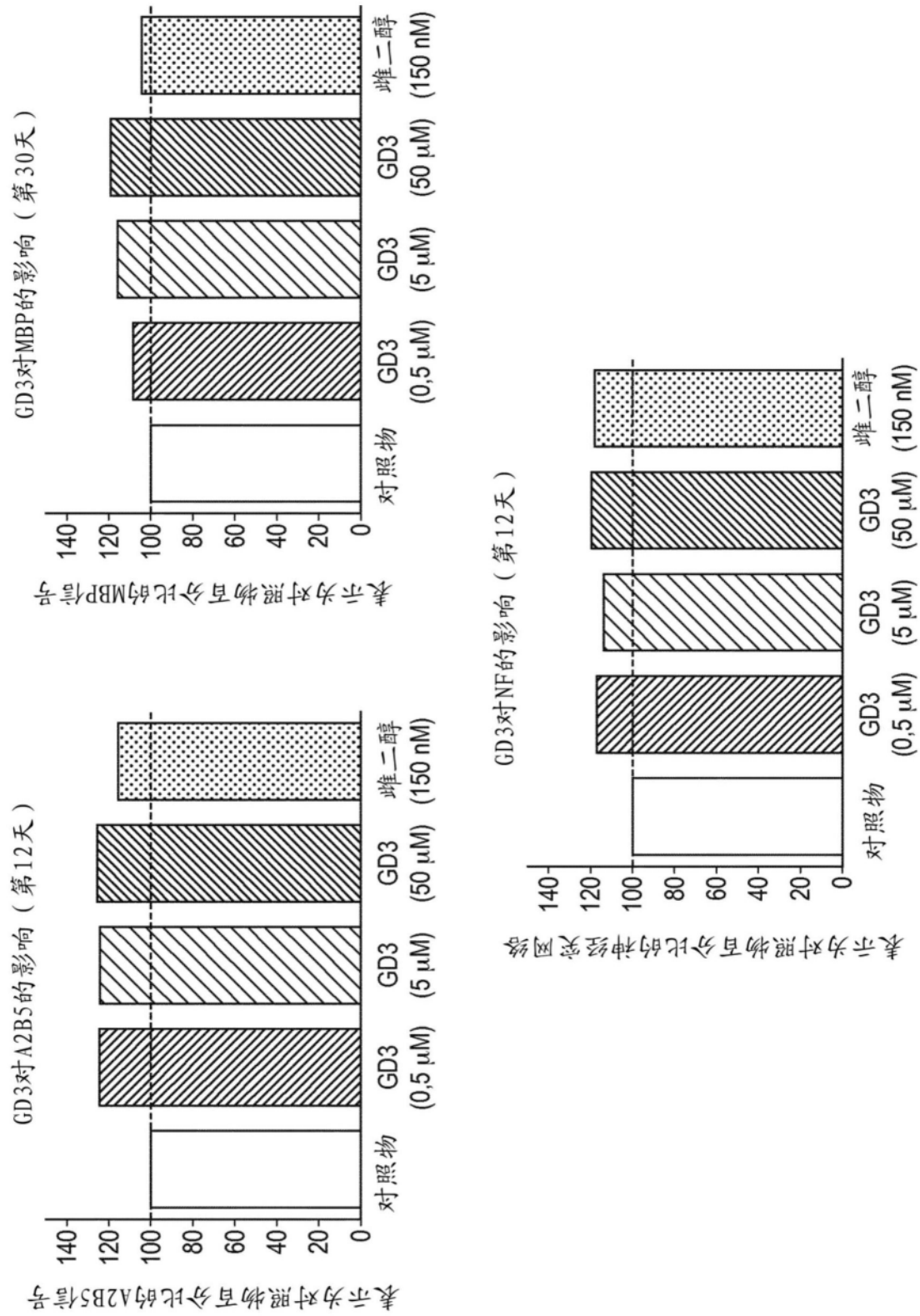


图32

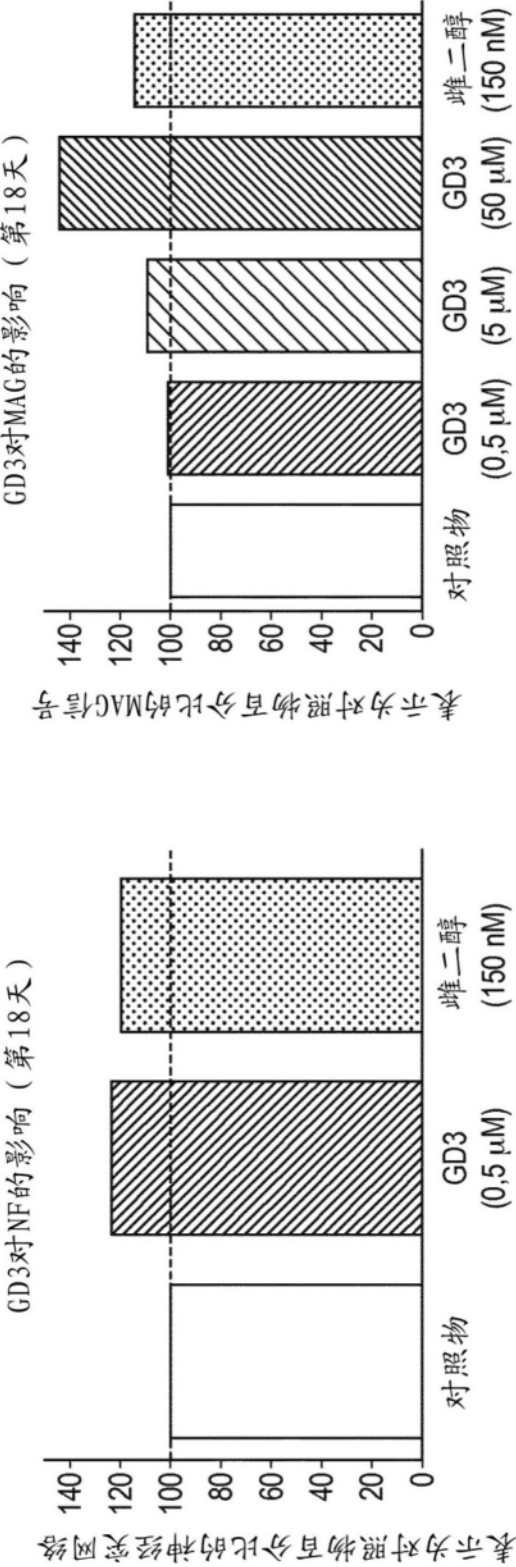


图32续

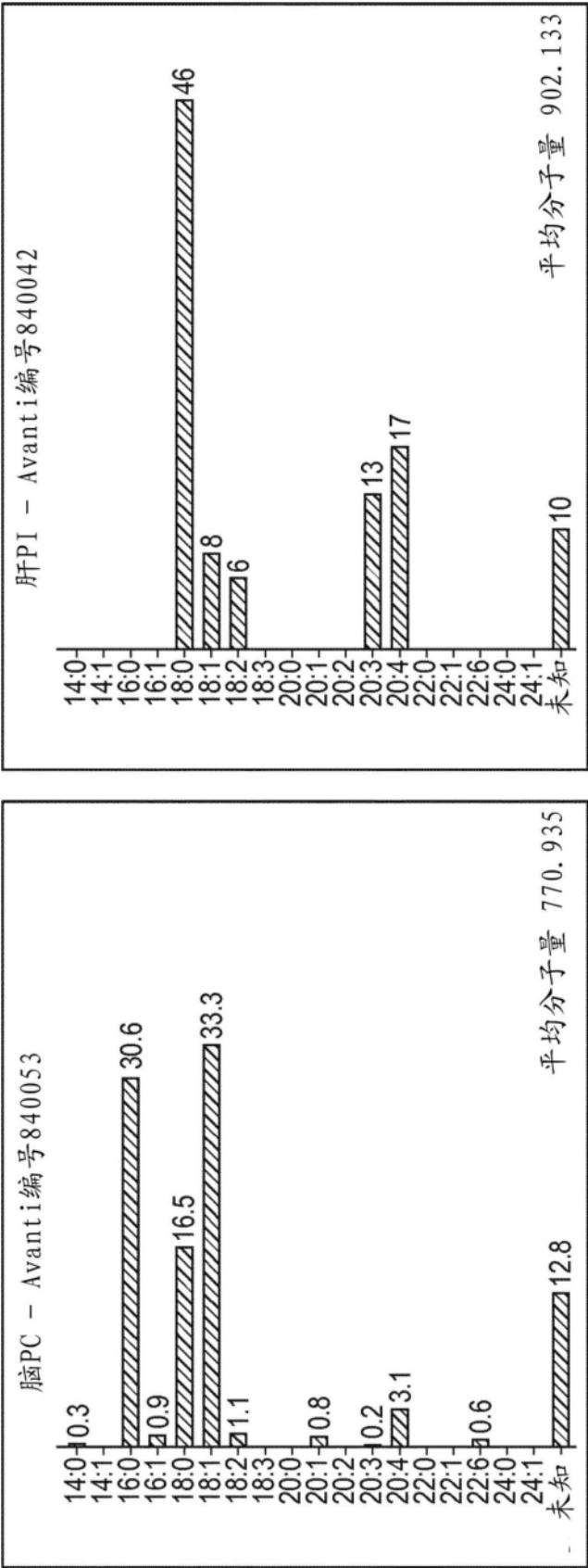


图33

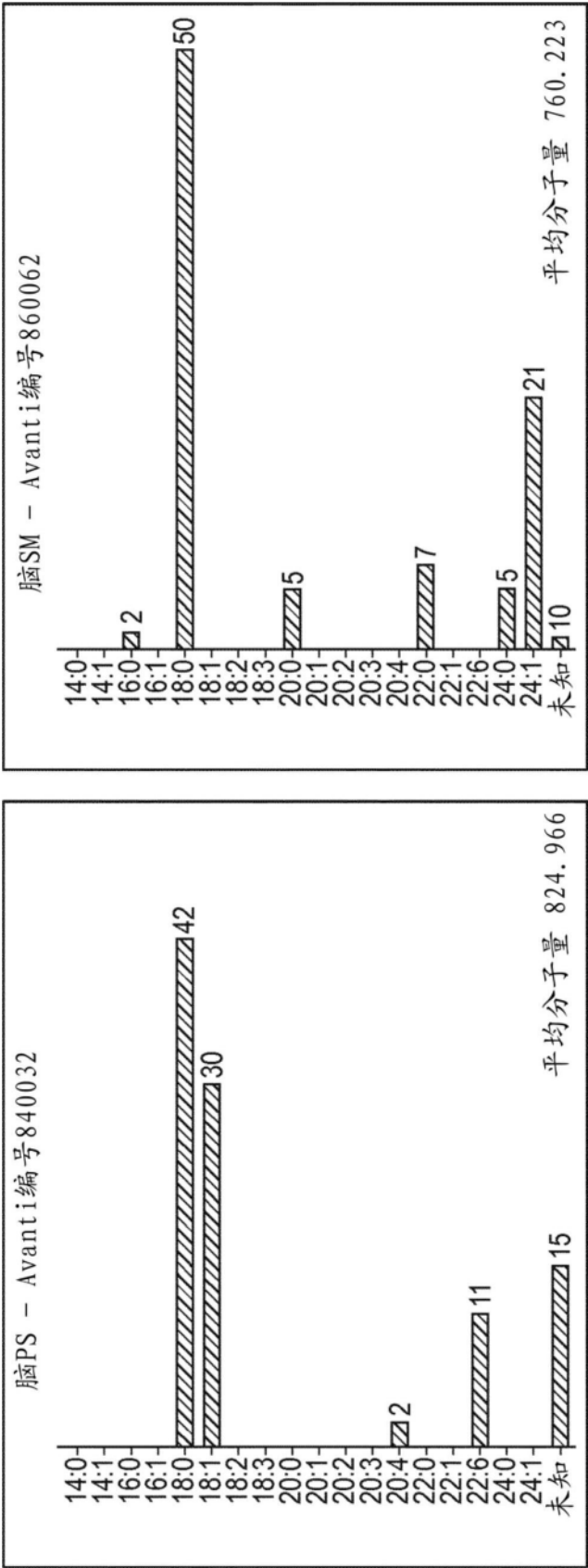


图33续

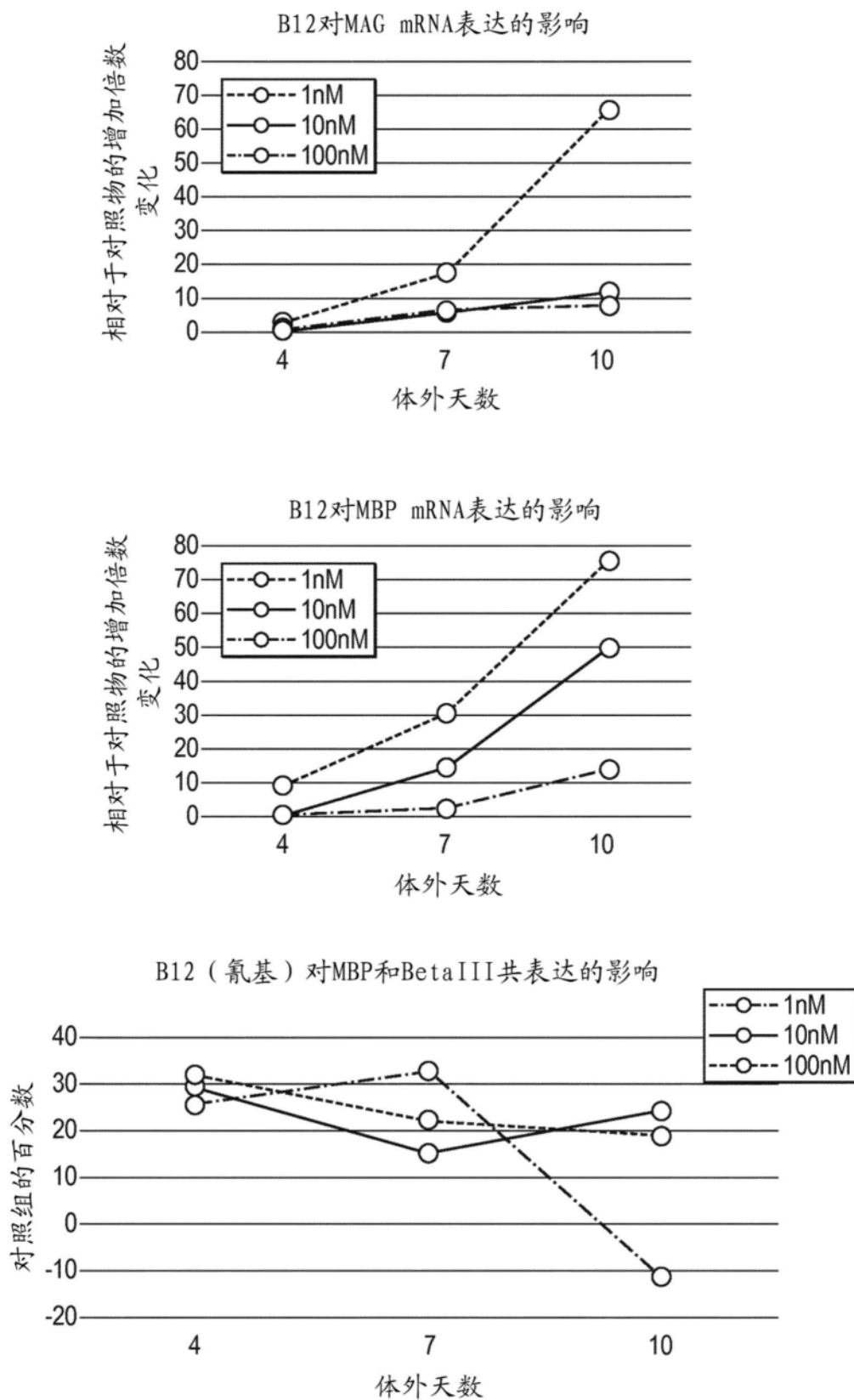


图34

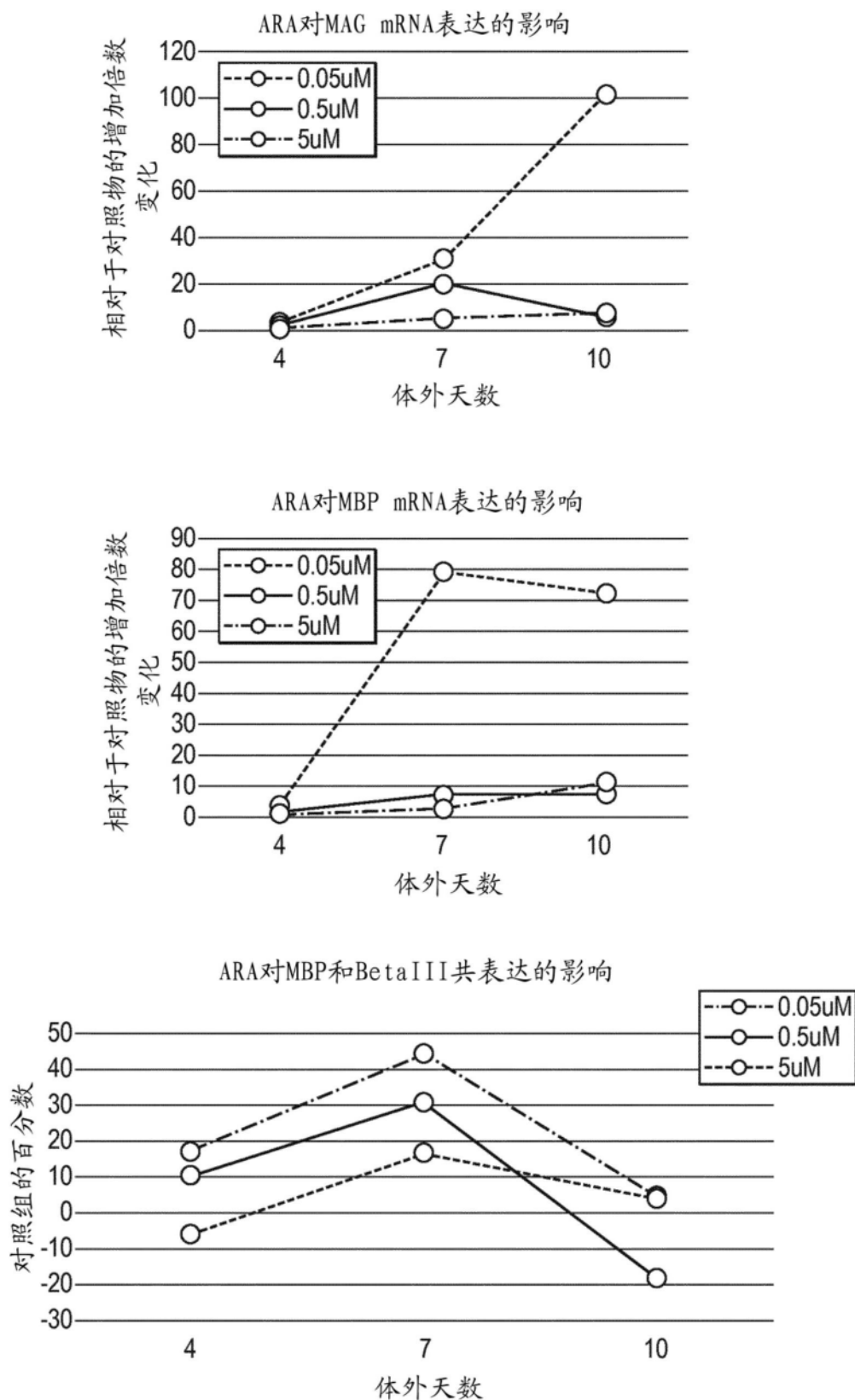


图35

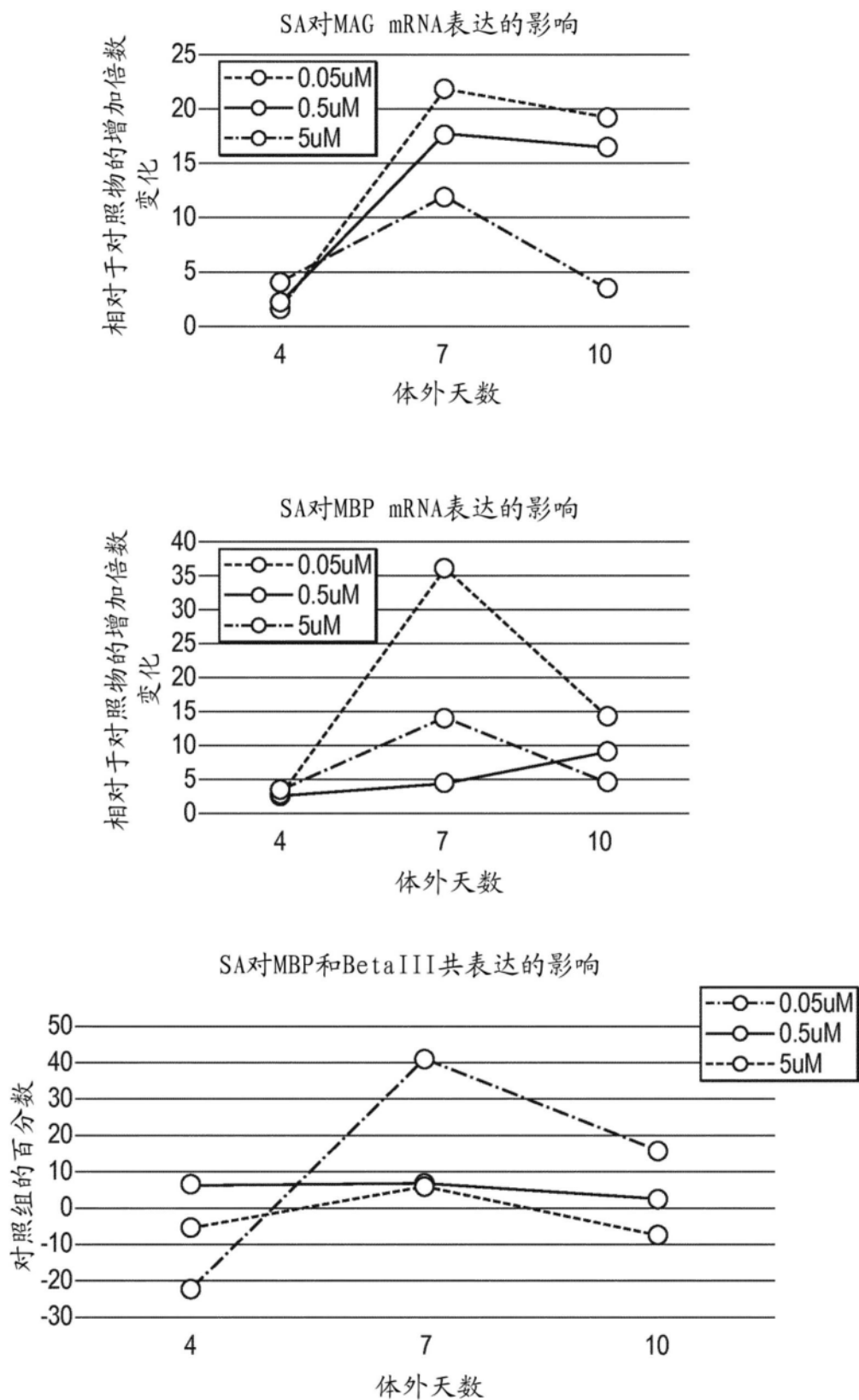


图36

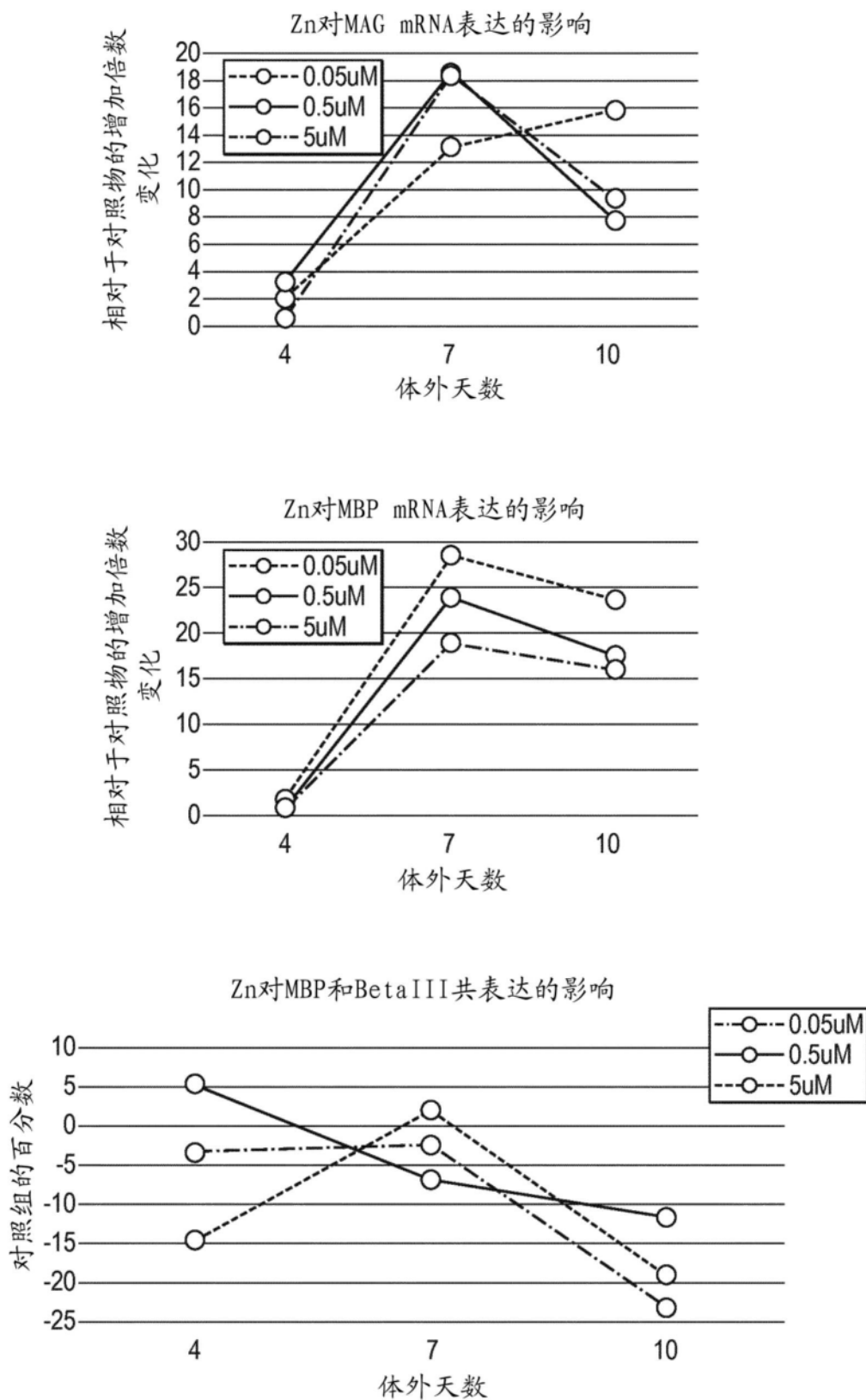


图37

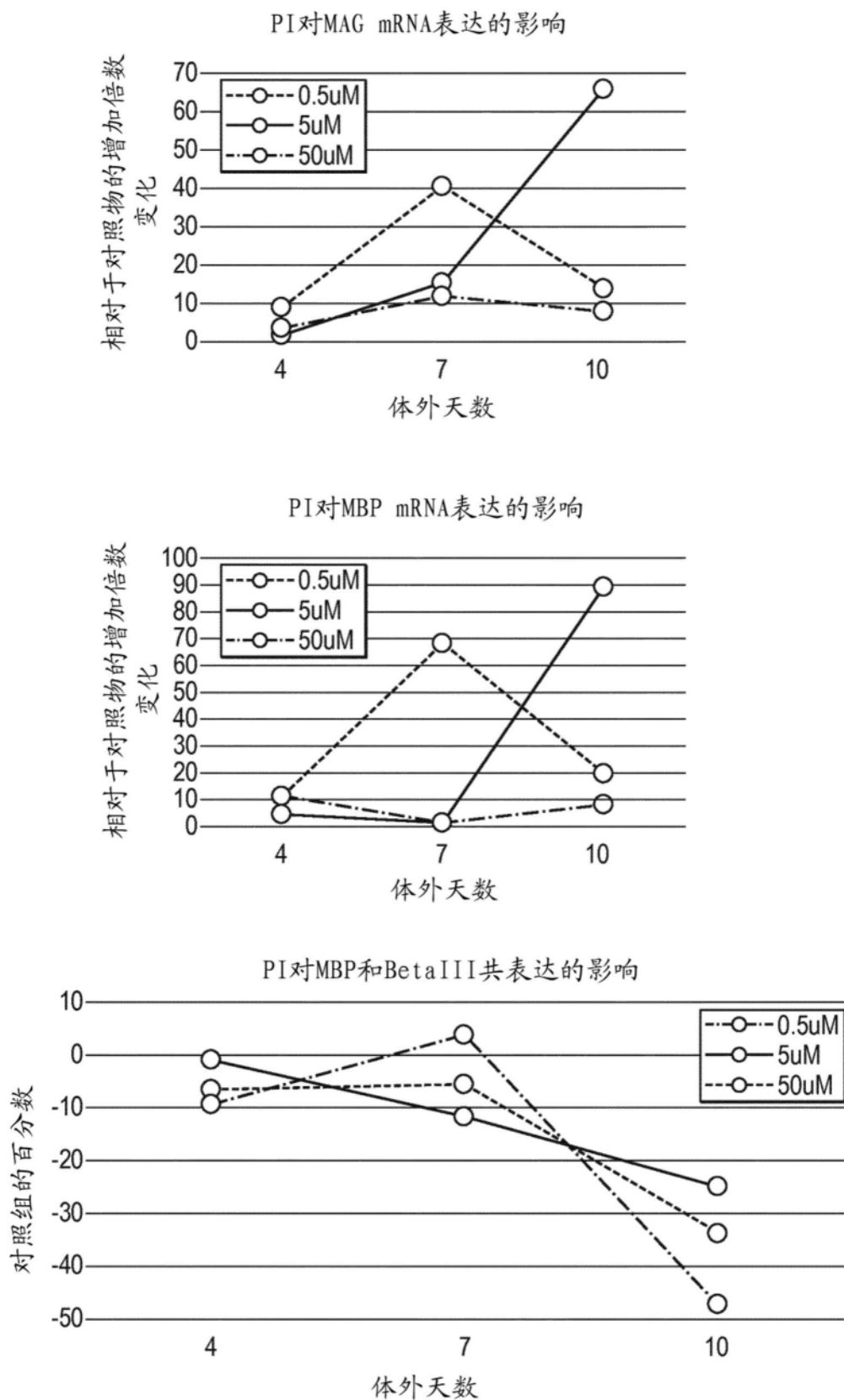


图38

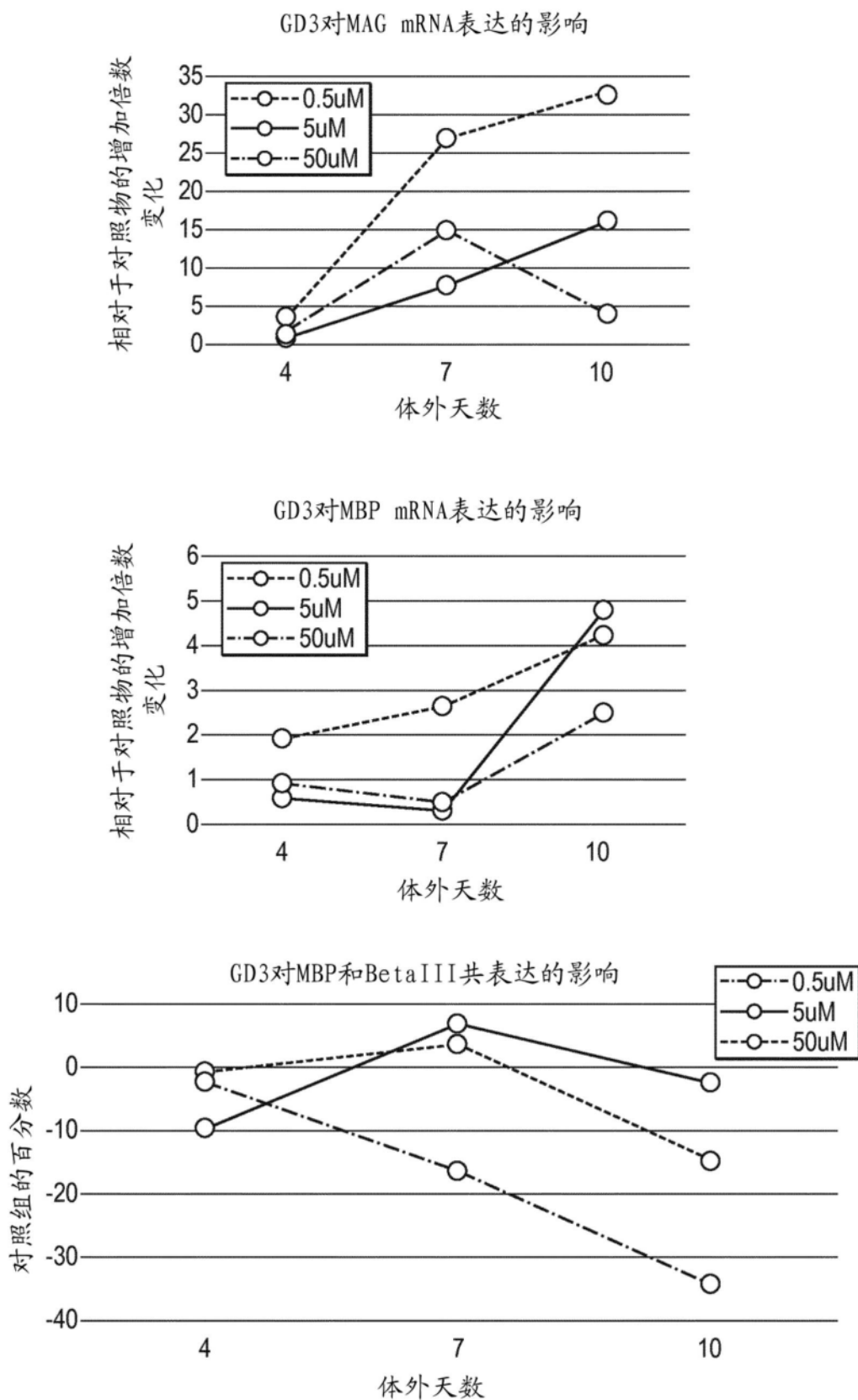


图39

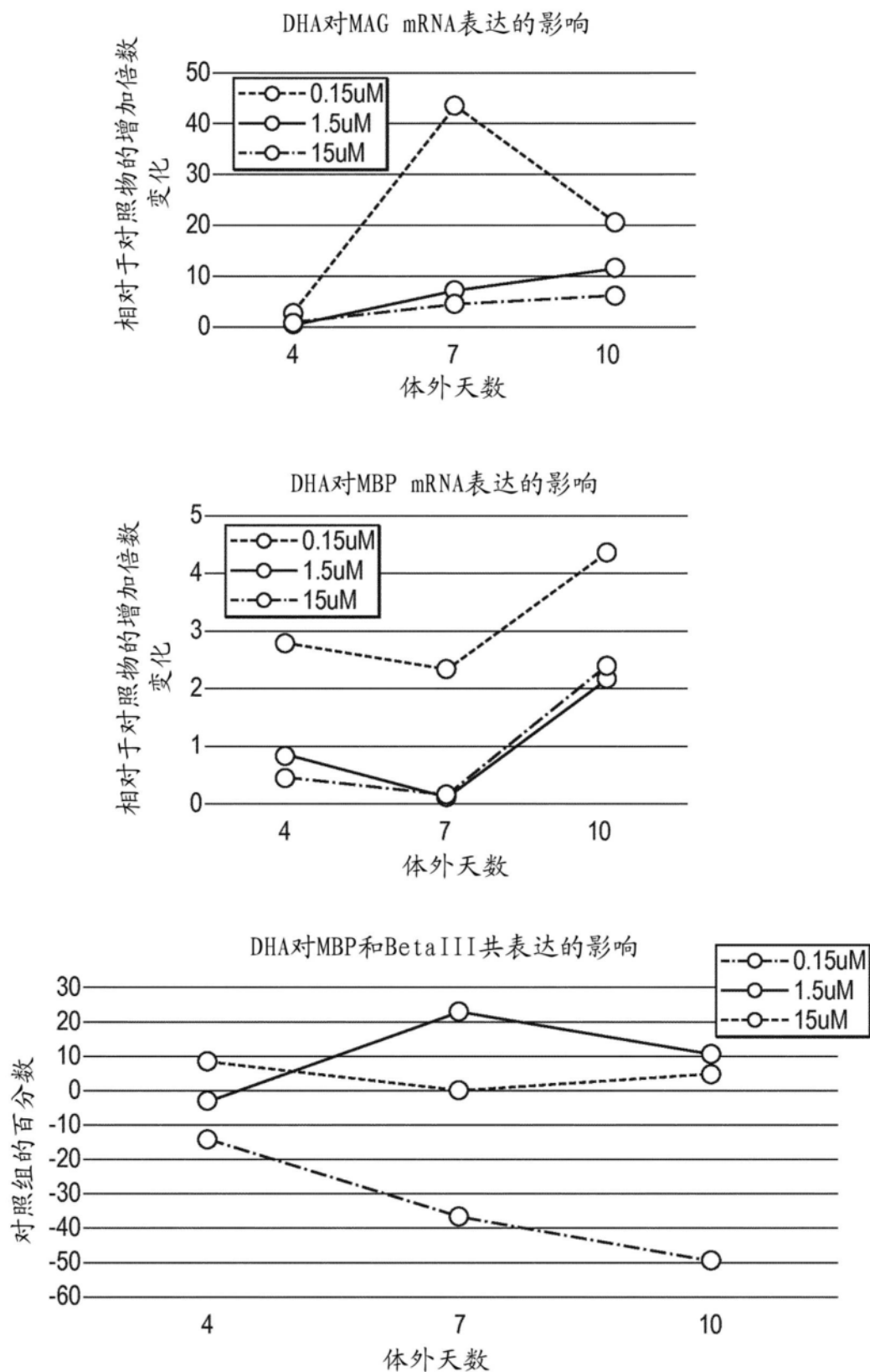


图40

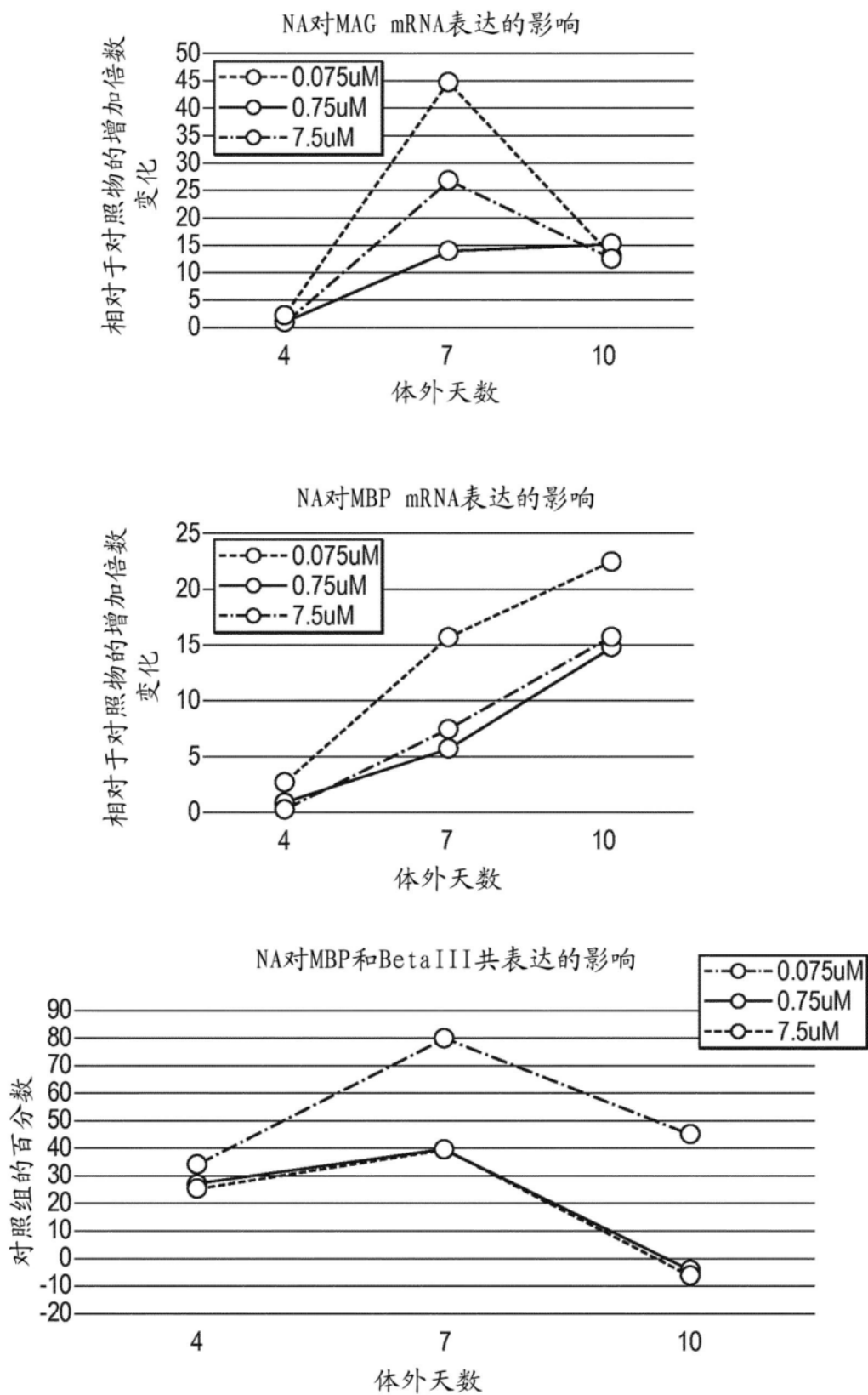


图41

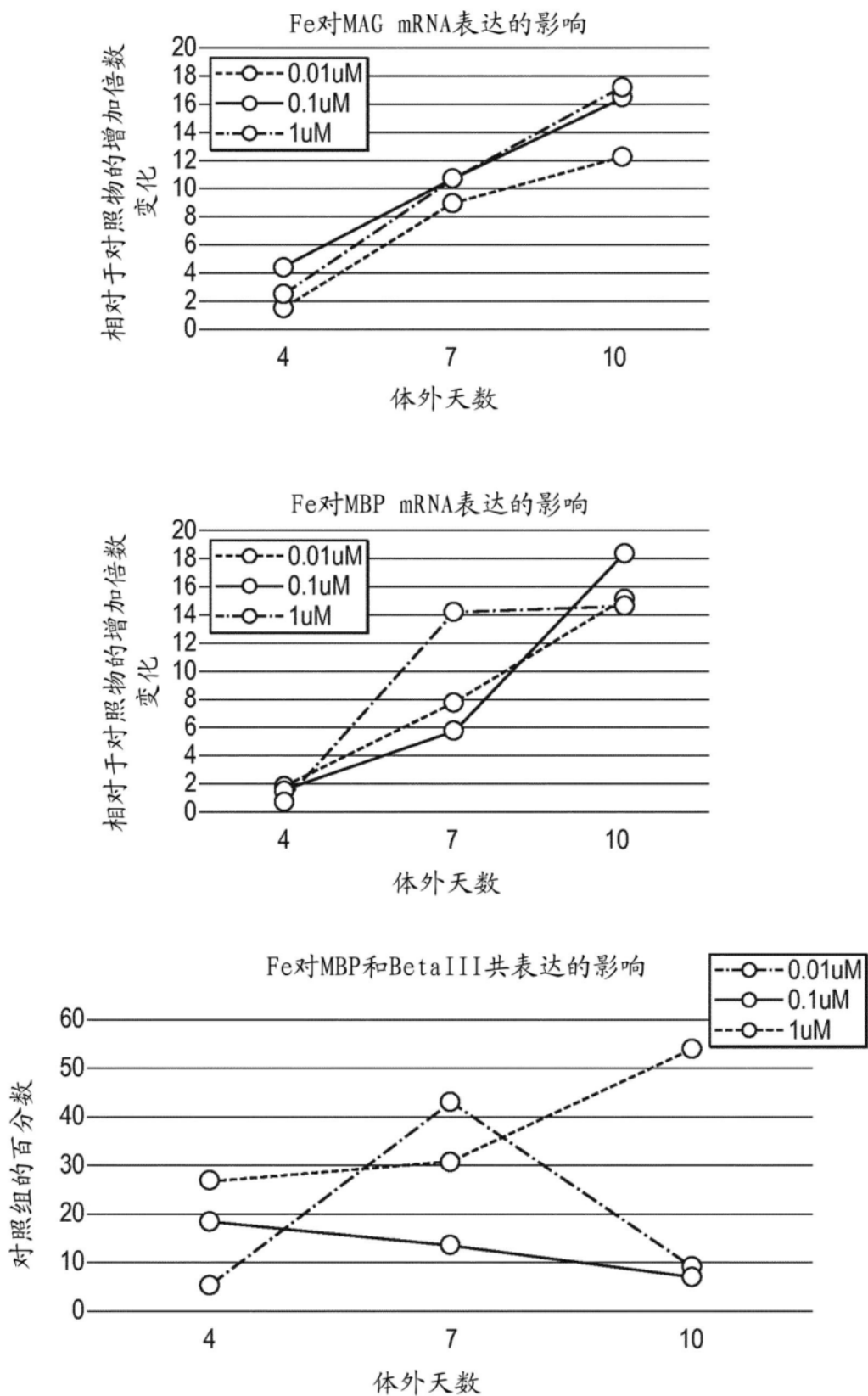


图42

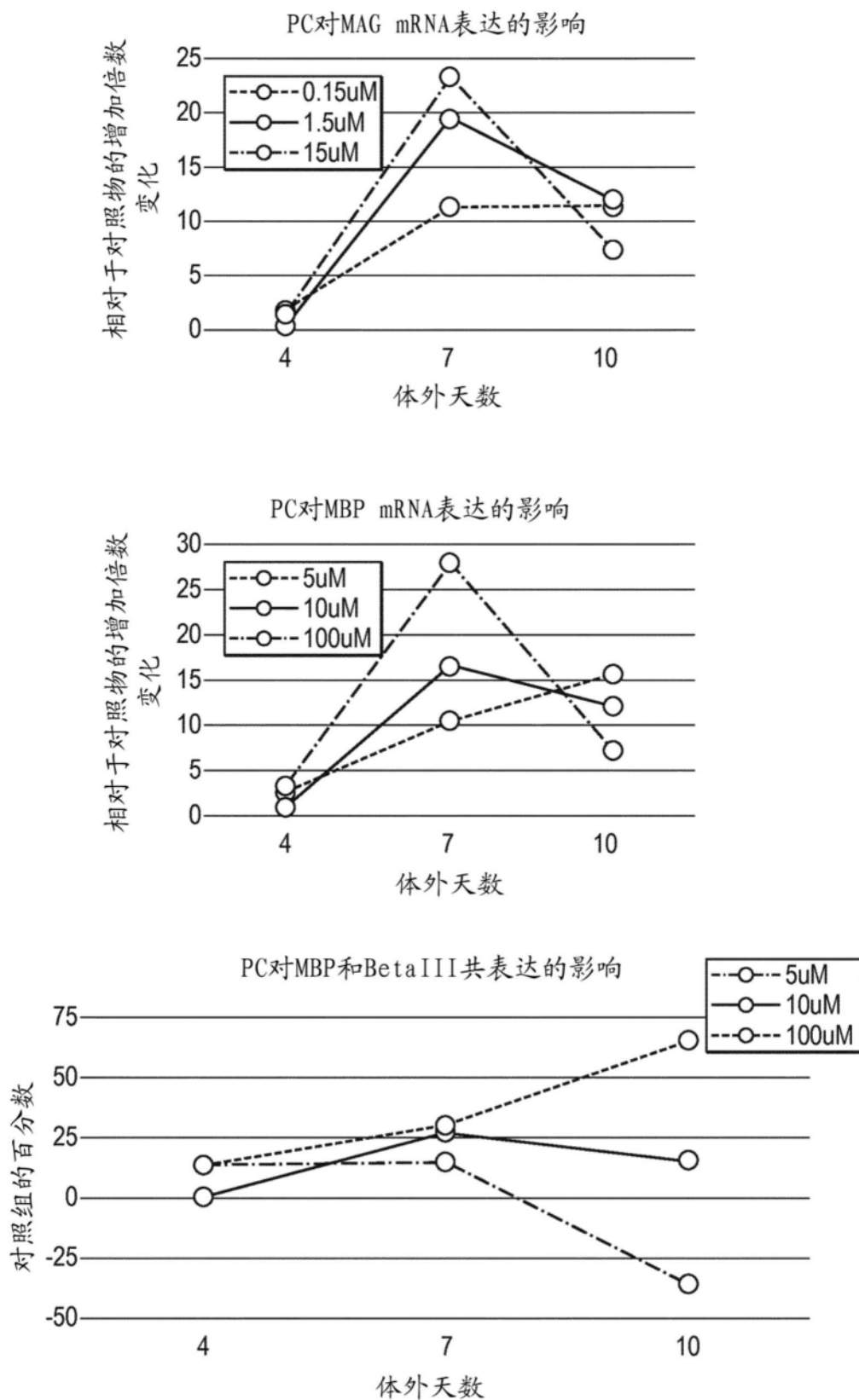


图43

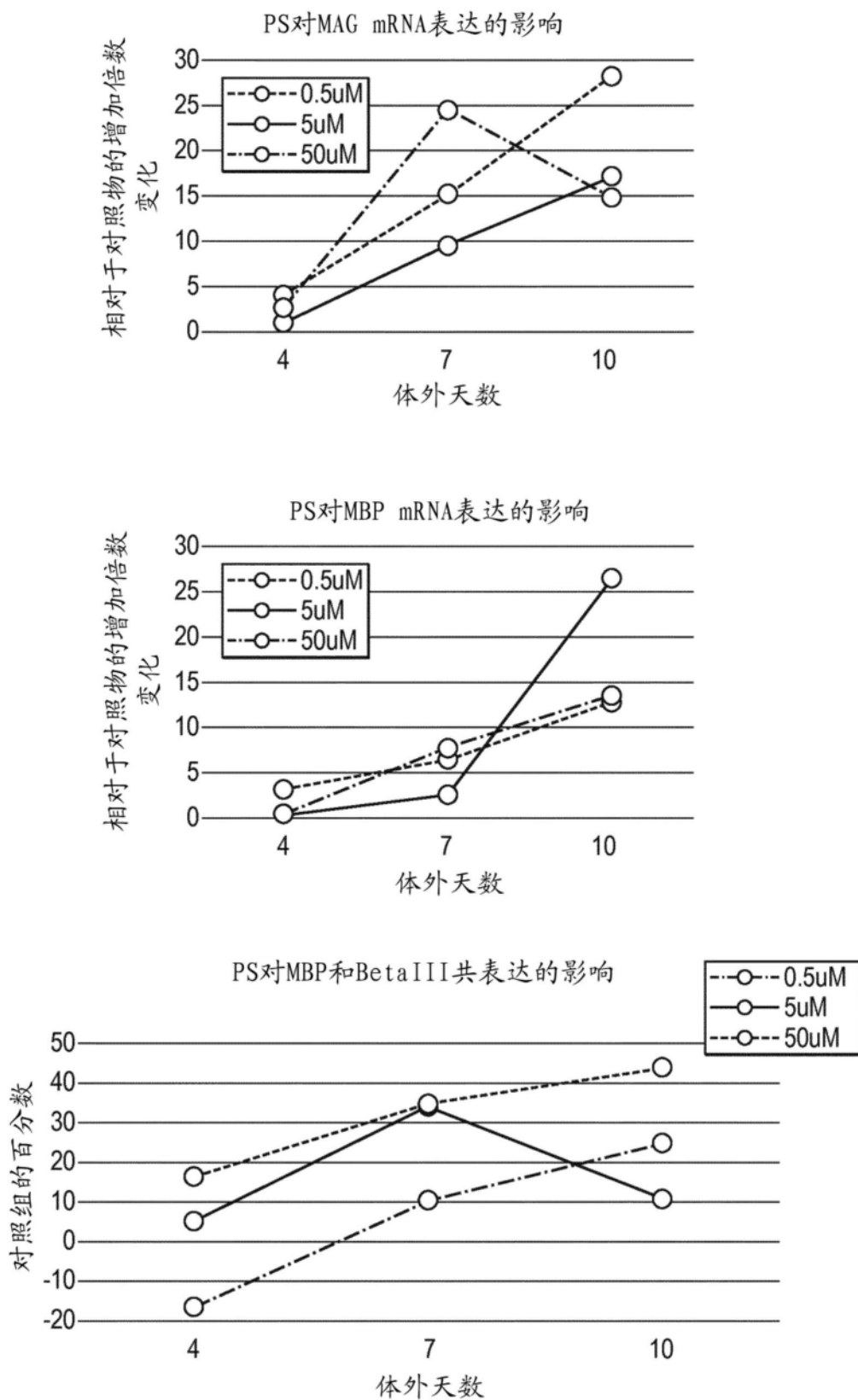


图44

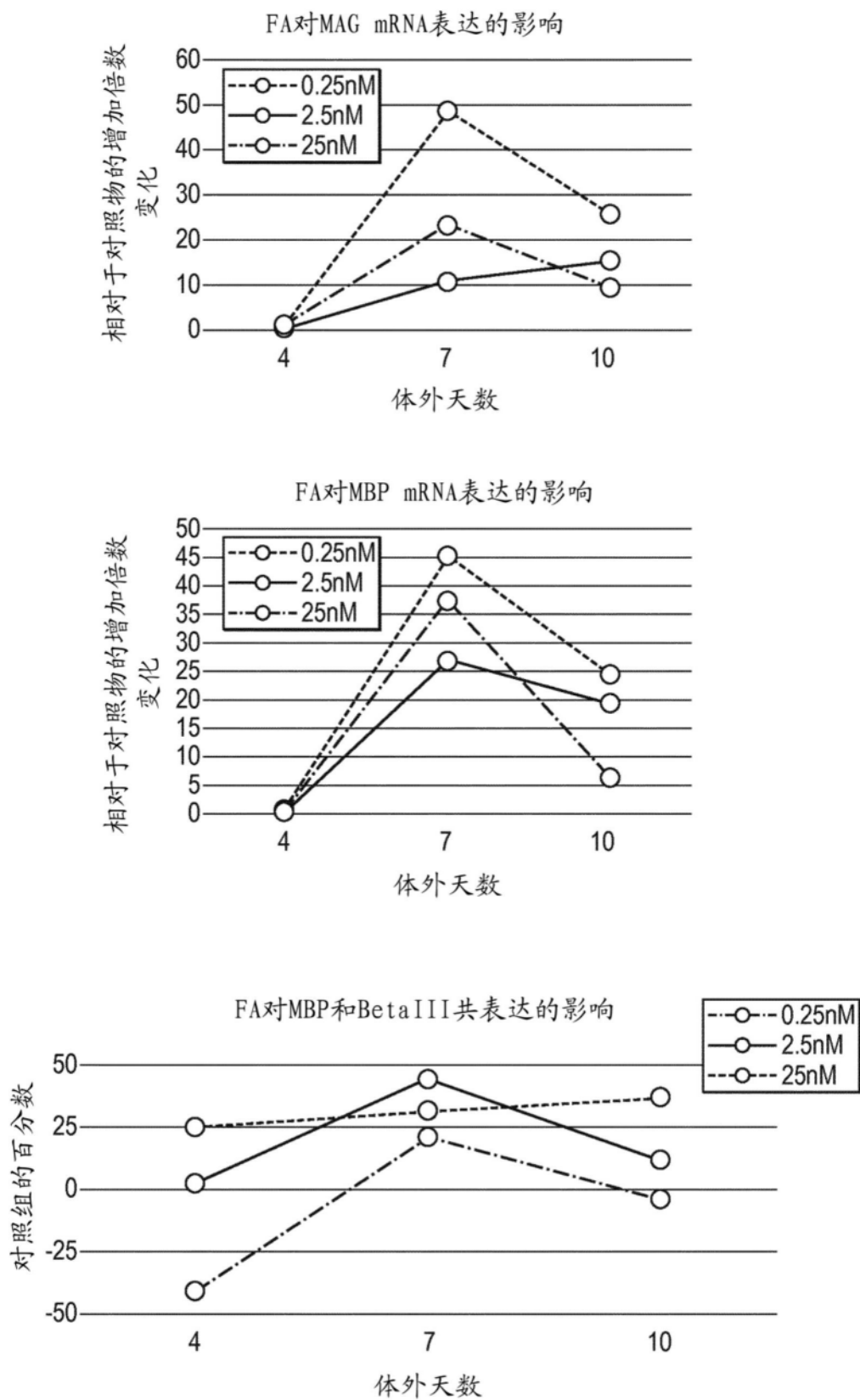


图45

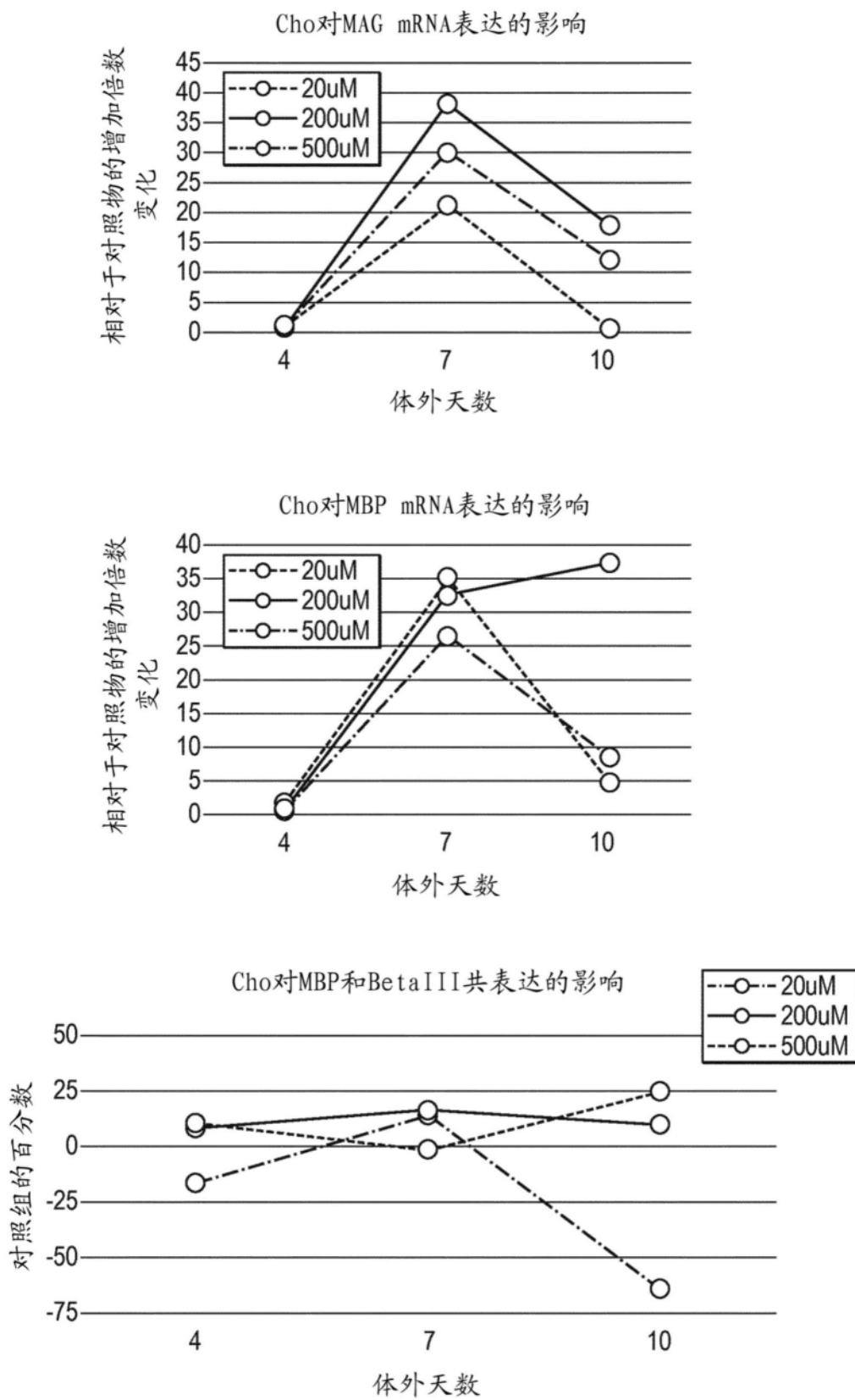


图46

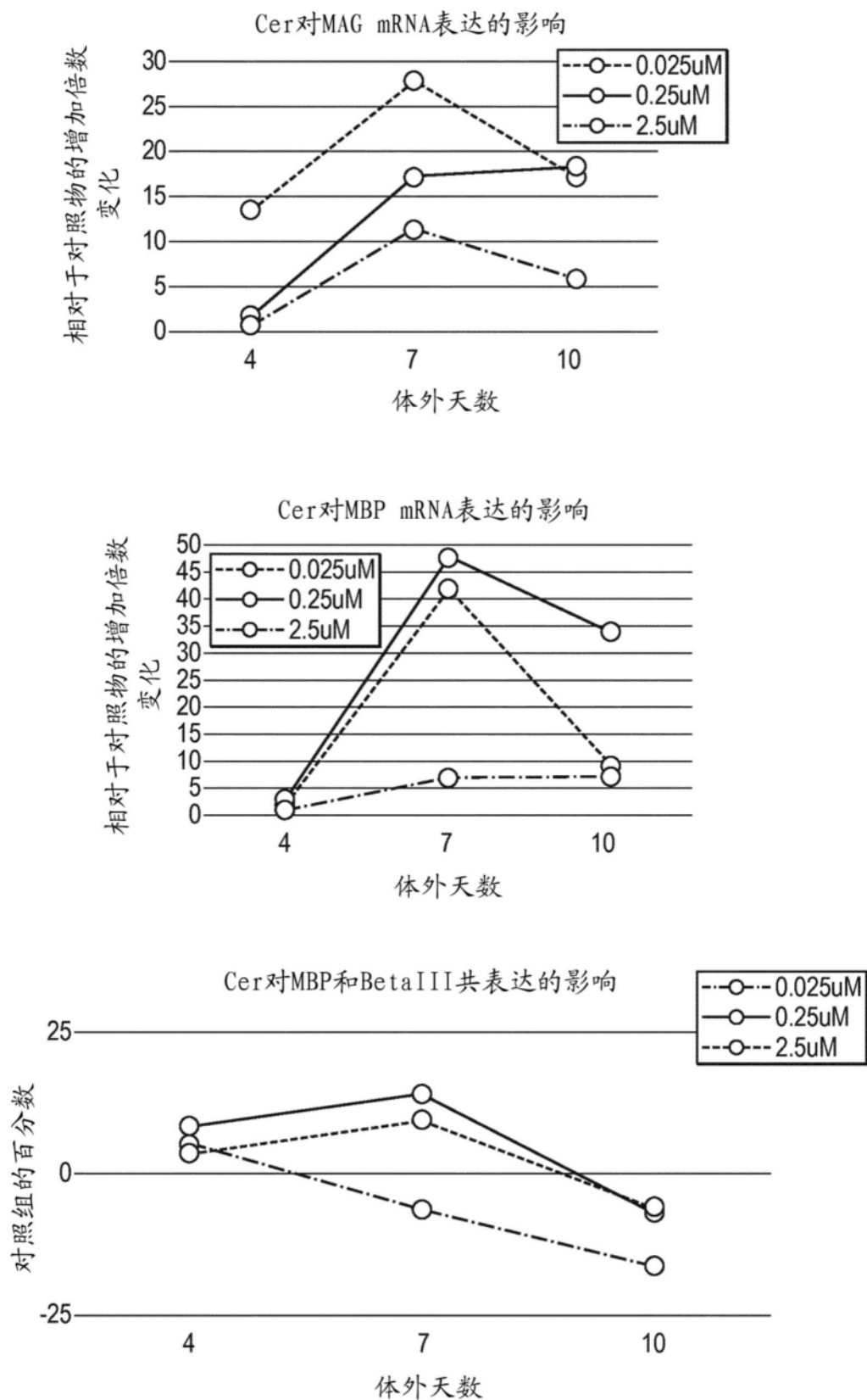


图47

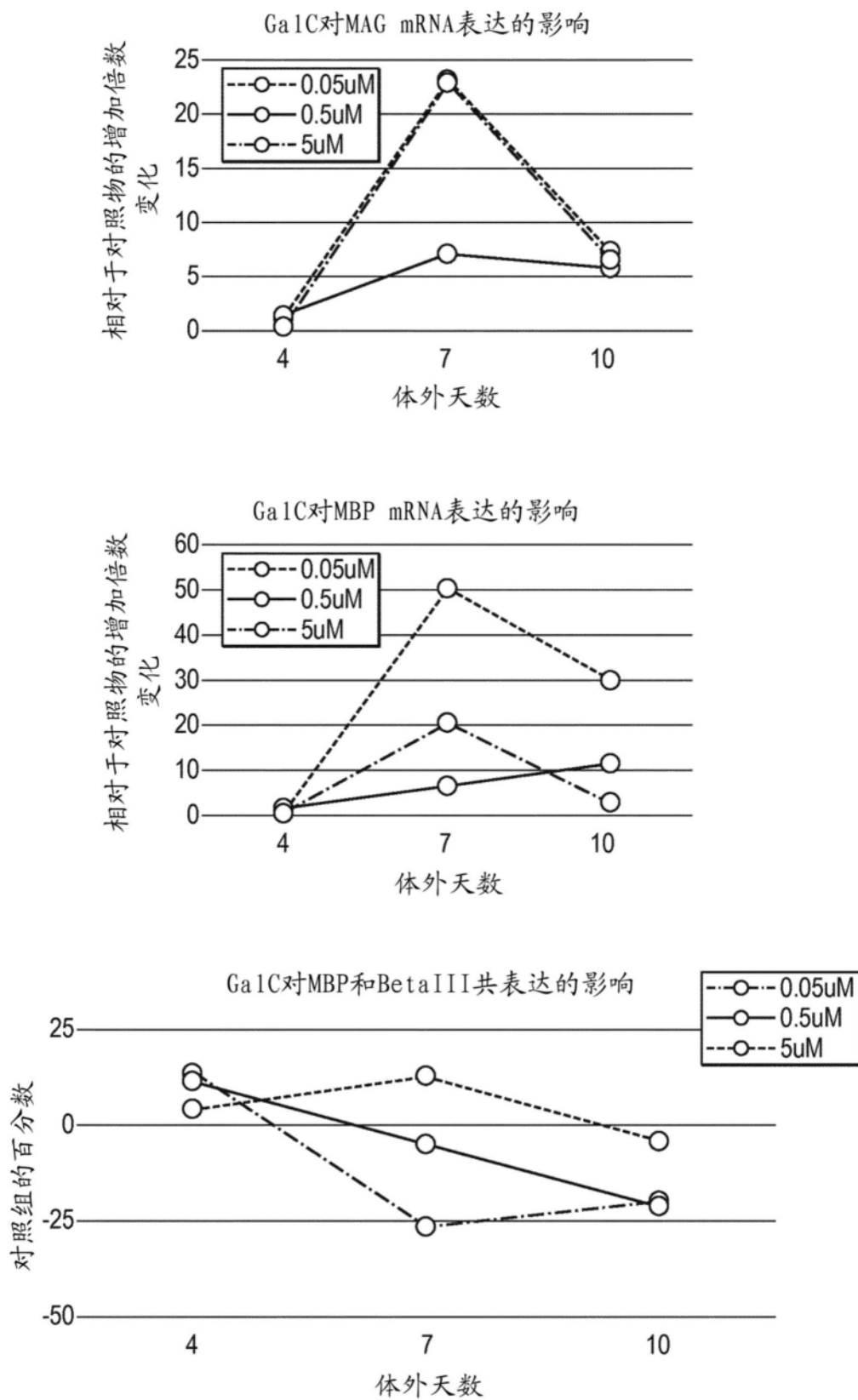


图48

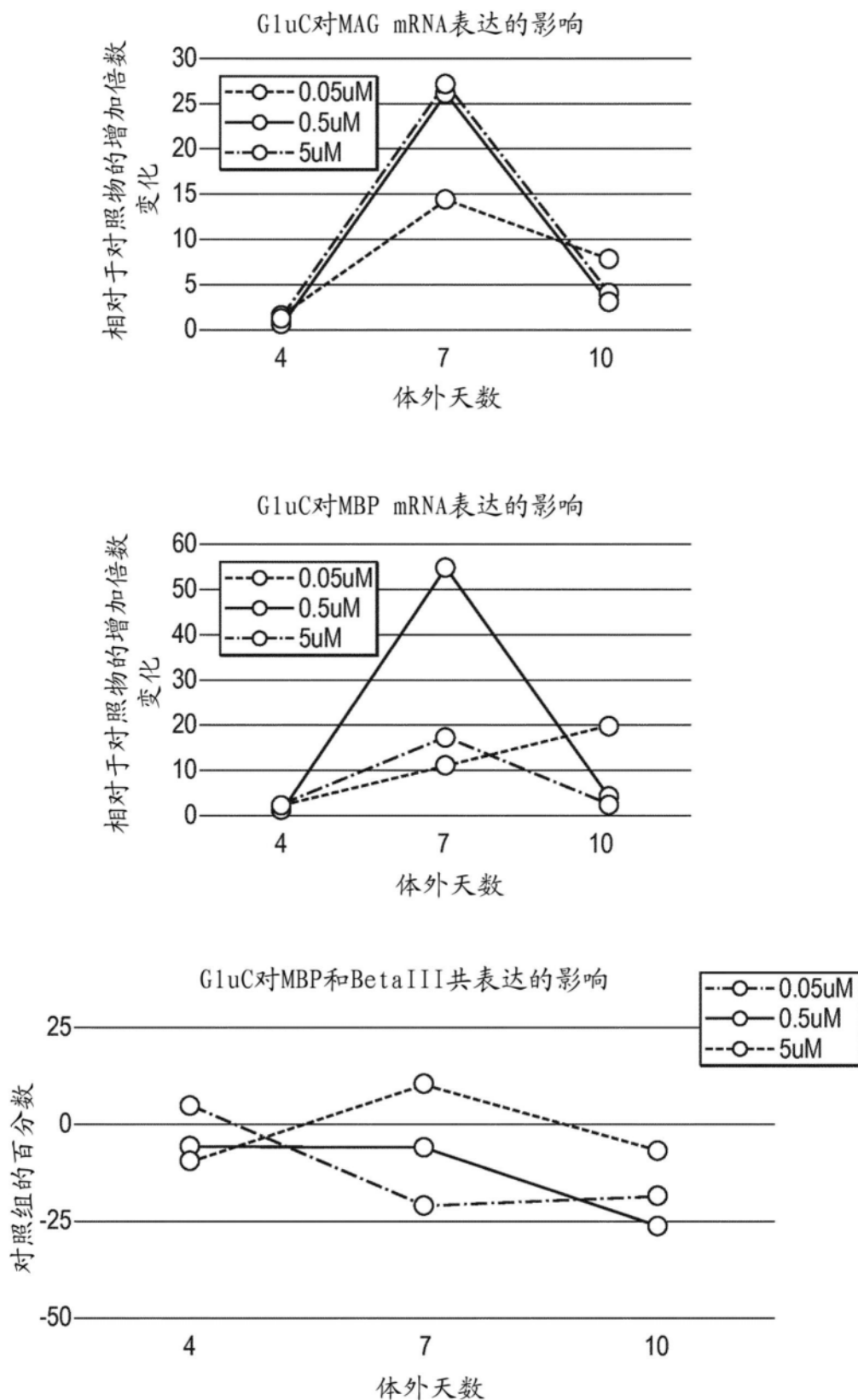


图49

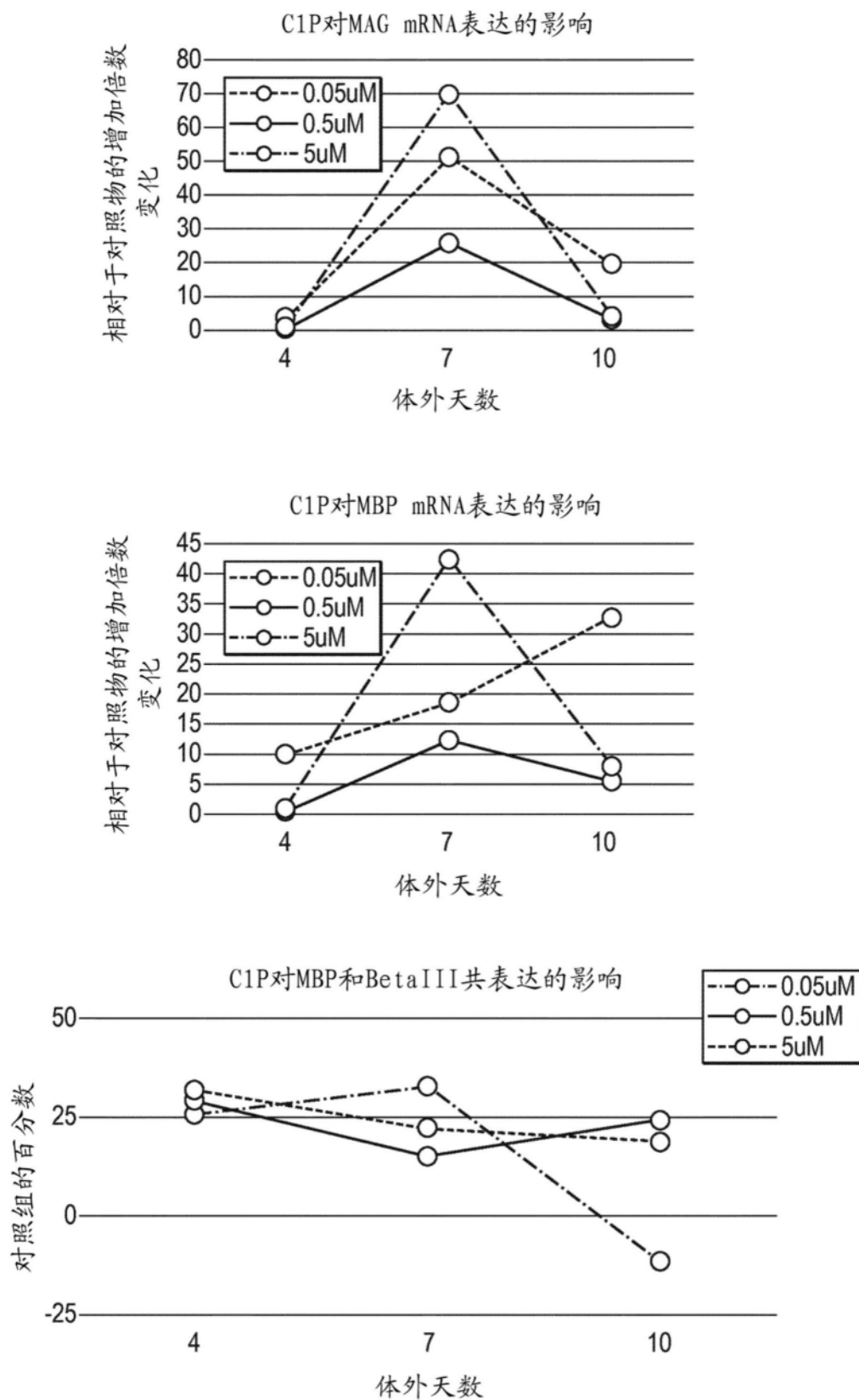


图50

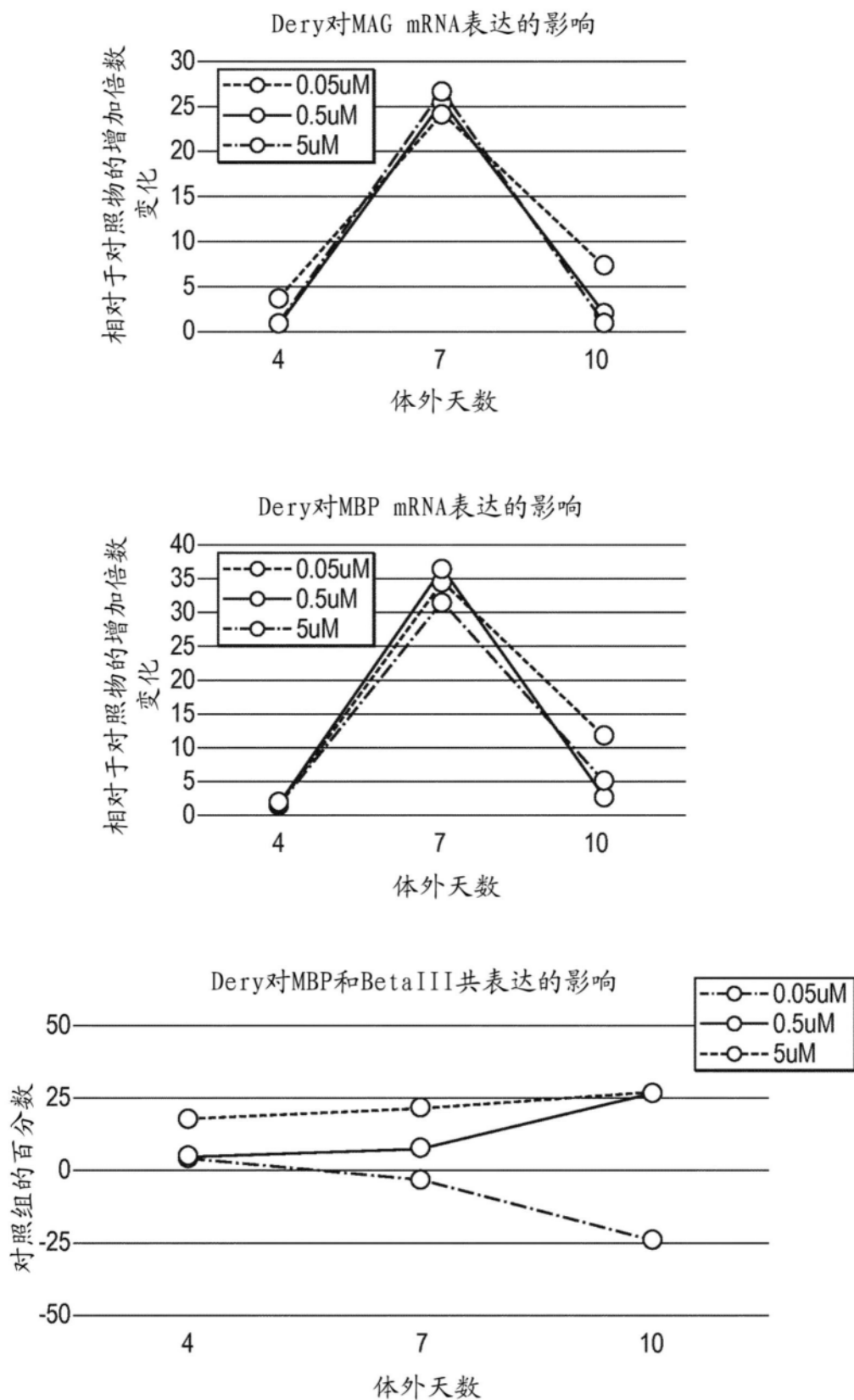


图51

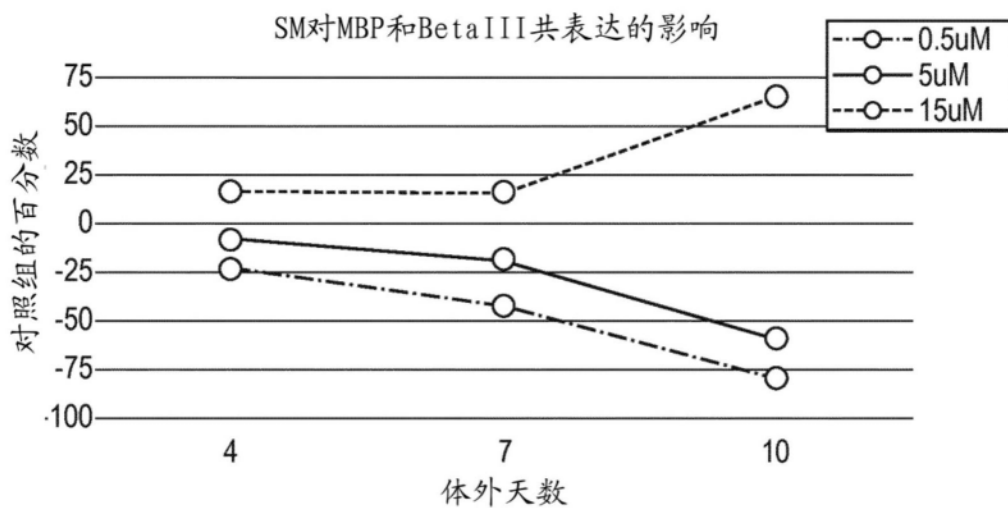


图52

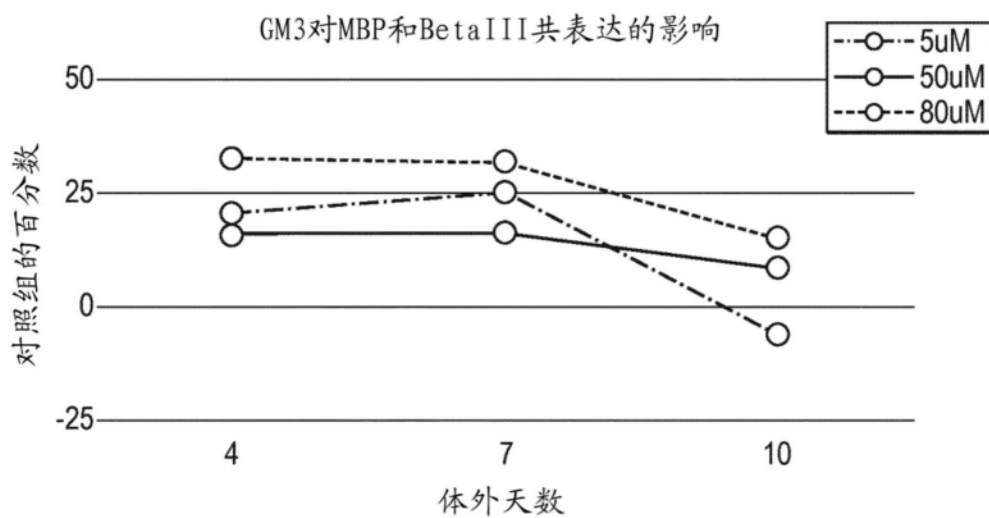


图53

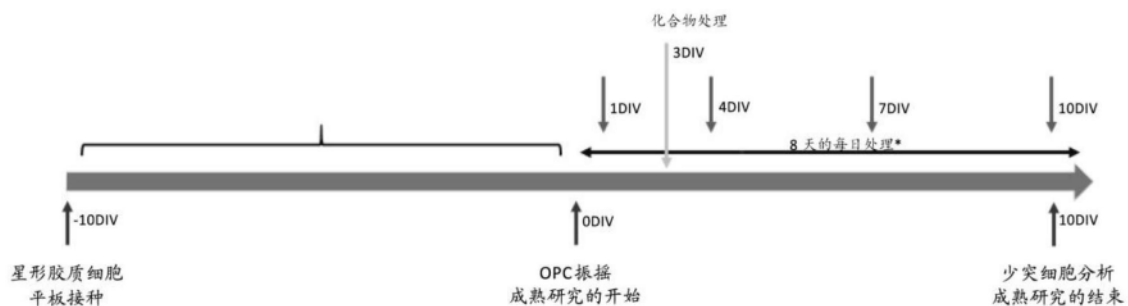


图54

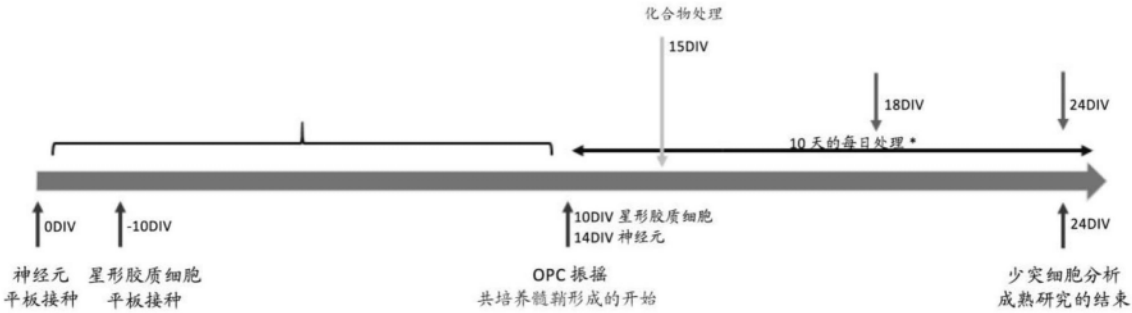


图55