

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

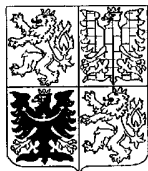
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

1999 - 2968

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **19.02.1998**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **21.02.1997 28.03.1997
03.10.1997**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **1997/804700 1997/825314
1997/943576**

(33) Země priority: **US US US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.04.2000**
(Věstník č. 4/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/US98/03235**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO98/36745**

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 31/202

A 61 K 31/14

A 61 K 31/661

A 61 P 1/00

(71) Přihlašovatel:

ABBOT LABORATORIES, Abbott Park,
IL, US;
THE UNIVERSITY OF TENNESSEE
RESEARCH CORPORATION, Knoxville, TN,
US;

(72) Původce:

Carlson Susan E., Kansas City, MO, US;
Ponder Debra L., Evansville, IN, US;
Montalto Michael B., Columbus, OH, US;
Dohnalek Margaret H., Worthington, OH, US;
Benson John D., Powell, OH, US;
Borror David A., Westerville, OH, US;
Diodato David V., Hilliard, OH, US;

(74) Zástupce:

Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7,
170 00;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Přípravky pro omezení výskytu nekrotizující
enterokolitidy a způsob jejich výroby**

(57) Anotace:

Popisují se enterální přípravky, které obsahují polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (PUFA), například kyselinu arachidonovou (AA) a kyselinu dokosahexanovou (DHA), v podstatě prosté cholesterolu, a postup přípravy uvedených enterálních přípravků. Řešení zvláště popisuje způsoby omezení výskytu nekrotizující enterokolitidy aplikací přípravků, které poskytují n-6 a n-3 PUFA s dlouhým řetězcem, fosfolipidy a/nebo cholin. Preferují se přípravky z lipidů vaječného žloutku, které obsahují n-6 a n-3 PUFA s dlouhým řetězcem a jsou převážně ve formě fosfadylocholinu. V tomto případě se předpokládá synergický účinek. Také se popisuje způsob přípravy takového přípravku, který poskytuje lepší organoleptické vlastnosti a stabilitu přípravku.

Přípravky pro omezení výskytu nekrotizující enterokolitidy a způsob jejich výroby

Oblast techniky

Vynález se obecně týká enterálních přípravků, které obsahují polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (PUFA), způsobu výroby takových enterálních přípravků a jejich použití při omezování výskytu nekrotizující enterokolitidy. Zvláště vynález popisuje enterální přípravky, které poskytují PUFA s dlouhým řetězcem arachidonovou kyselinu (AA) a dokosaheptaenovou kyseliny (DHA) v podstatě bez cholesterolu a které je možné získat z lipidů vaječného žloutku. PUFA s dlouhým řetězcem získané z vaječného žloutku se převážně vyskytují ve formě fosfolipidů. Způsob výroby takového přípravku umožňuje zlepšit jeho organoleptické vlastnosti a stabilitu. Enterální aplikace takových přípravků může omezovat výskyt nekrotizující enterokolitidy.

Dosavadní stav techniky

PUFA s dlouhým řetězcem obsažené ve formulacích a přípravcích se popisují v různé literatuře. Například U.S. patent č. 4,670,285 („Clandinin,“) popisuje specifickou tukovou směs, kterou lze použít v přípravcích pro kojence. Tuková směs podle Clandinina obsahuje alespoň jednu mastnou kyselinu C_{20} nebo C_{22n-6} a C_{20} nebo C_{22n-3} . O těchto mastných kyselinách se uvádí, že jsou v určitém definovaném množství, které zabraňuje nežádoucím účinkům u kojenců, kteří jsou krmeni touto tukovou směsí. C_{20} nebo C_{22n-6} mastné kyseliny tvoří přibližně 0,13 až 5,6 hmotnostních % všech mastných kyselin v produktu. C_{20} nebo C_{22n-3} mastná kyselina, jestliže je přítomna, tvoří přibližně 0,013 až 3,33 hmotnostních % všech mastných kyselin v produktu. Clandinin popisuje použití vaječných lipidů za účelem dodání n-6 a n-3 mastných kyselin; vaječné lipidy,

které používá Clandinin, také obsahují vysoké množství cholesterolu. Dále se v této publikaci popisuje použití 75 až 95 hmotnostních dílů lipidů vaječného žloutku a zbytek oleje tvoří kokosový nebo sojový olej. Zde se používá názvosloví mastných kyselin, jak jej používá Clandinin.

V publikaci WO 93/20717 se popisuje přípravek pro kojence, který obsahuje volné mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (C_{16} až C_{22}) a triglyceridy v množství ne vyšším než subiritačním. Tato přihláška také uvádí, že přítomnost nižších alkylesterů, jako jsou etylestery, uvedených mastných kyselin, v přípravcích pro kojence eliminuje tendenci volné mastné kyseliny poškozovat střevní epitel kojenců, ale umožňuje absorpci a zpracování mastné kyseliny.

US patent č. 4,918,063 (Lichtenberger) popisuje přípravky obsahující specifické směsi fosfolipidů a neutrálních lipidů pro prevenci nebo ošetření vředů a zánětlivého onemocnění tlustého střeva. V tomto patentu se uvádí, že směsi nasycených nebo nenasycených fosfolipidů spolu s nasycenými nebo nenasycenými triglyceridy a/nebo steroly prokazují na zvířecích modelech ochranný protivředový účinek. Dále se v tomto patentu popisuje zahrnutí vícemocných kationtů nebo antioxidantů do směsí lipidů pro zvýšení aktivity.

Publikace č. WO 96/10922 (Kohn et al.,) popisuje směs tuků vhodnou pro přípravky pro kojence, pro niž je charakteristické, že ve směsi se vyskytuje kyselina arachidonová a dokosaheptaenová ve formě fosfolipidů.

V publikaci přihlášky evropského patentu č. 0 376 628 B1 se popisují plně rostlinná kompozice oleje, která používá randomizovaný palmový olej nebo olein randomizovaného palmového oleje jako jediný zdroj oleje kyseliny palmitové. Také se uvádí, že plně rostlinné tukové přípravky jsou zvláště vhodné

při použití v přípravcích určených pro předčasně narozené kojence (nebo kojence s nízkou porodní vahou). Tukové přípravky pro předčasně narozené kojence popsané v této přihlášce zahrnují triglyceridy se středně dlouhým řetězcem (MCT) s randomizovaným olejem palmitové kyseliny, olejem kyseliny laurové, olejem kyseliny olejové a olejem kyseliny linolové.

I když byly výše uvedené publikace značným přínosem, stále existuje potřeba přípravků pro kojence, které obsahují vaječné fosfolipidy jako zdroj PUFA s dlouhým řetězcem v koncentracích vhodných pro výživu. Dále je nutné vyvinout způsoby přípravy enterálních přípravků obsahujících vaječné fosfolipidy tak, aby přípravky měly přijatelné organoleptické vlastnosti. Takové přípravky nacházejí konkrétní uplatnění v přípravcích pro kojence a/nebo pro předčasně narozené novorozence, jejichž potřeba PUFA s dlouhým řetězcem je uznávána pro správný neurální vývoj a vývoj ostrosti zraku. Navíc mohou vykazovat ochranný účinek na střeva.

Nekrotizující enterokolitida (NEC) je vážný problém u kojenců, jejichž porodní váha je nižší než přibližně 1500 gramů. Navzdory skoro třem desítkám let studia zůstává přesná etiologie a patofyziologie NEC nejasná. NEC je onemocnění ohrožující, charakterizované ischemickou nekrózou příslušných struktur zažívacího traktu a pneumatosis intestinalis, jejímž častým výsledkem je perforace tlustého střeva. Předčasně narození kojenci trpící NEC vykazují klinický obraz kolísavé teploty, letargie, gastrické retence, zvracení, abdominální distenze, makroskopické nebo skryté krve ve stolici a radiografického důkazu pneumatosis intestinalis, vzduchu v portálních cévách nebo v pneumoperitoneu. Objevují se záchvaty zástavy dýchání, šoku a skleredemu a běžně může nastat i smrt.

Řada autorů uskutečnila pozorování za různých podmínek a stanovila faktory ovlivňující toto onemocnění (Nue, Pediatr. Clin. North. Am., April, 1996, 43(2): 409-32). Příklady pozorování a faktorů:

- Flageole et al., Necrotizing Enterocolitis of the Newborn, Review for the Clinician. Union-Med-Can. 1991 Sep-Oct; 120(5): 334-8. V této publikaci se naznačuje, že patogeneze NEC zahrnuje mezenterickou ischemii, nezralost gastrointestinálního traktu, enterální výživu a dokonce je možná infekce.
- Caplan et al., Role of Platelet Activating Factor and Tumor Necrosis Factor-Alpha in Neonatal Necrotizing Enterocolitis, Journal of Pediatrics, June, 1990, 960-964. Tato publikace popisuje, že u pacientů s onemocněním NEC se zvyšuje množství destičky aktivujícího faktoru a nádor nekrotizujícího faktoru-alfa.
- Kliegman et al., Clostridia as Pathogens in Neonatal Necrotizing Enterocolitis, The Journal of Pediatrics, August, 1979, 287-289. V publikaci se popisuje izolace bakterie *Clostridia perfringens* u dítěte s neonatální NEC.
- Ostertag et al., Early Enteral Feeding Does Not Affect the Incidence of Necrotizing Enterocolitis, Pediatrics, Vol. 77, NO. 3, March 1986, 275-280. Tato publikace ukazuje, že ředěné kalorie aplikované do střev negativně neovlivňují výskyt NEC.
- Bell et al., Neonatal Necrotizing Enterocolitis, Annals of Surgery, Vol. 187, January 1978, No. 1, 1-7. Tato publikace naznačuje možnost použití kombinace antimikrobiální terapie při léčbě kojenců s NEC.
- Eyal et al., Necrotizing Enterocolitis in the Very Low Birth Weight Infant: Expressed Breast Milk Feeding Compared with Parenteral Feeding, Archives of Disease in Childhood, 1982, 57, 274-276. Tato publikace popisuje, že výskyt onemocnění NEC u kojenců s nízkou porodní vahou se snížil po započetí s enterální výživou.

- *Finer et al., Vitamin E and Necrotizing Enterocolitis, Pediatrics, Vol. 73, No. 3, March 1984.* Tato publikace naznačuje, že aplikace vitamínu E za účelem snížení výskytu těžkých následků retrolentální fibroplázie může být spojena se zvýšením výskytu onemocnění NEC.
- *Brown et al., Preventing Necrotizing Enterocolitis in Neonates, JAMA, Nov. 24, 1978, Vol. 240, No. 22, 2452-2454.* Tato publikace popisuje, že onemocnění NEC se může eliminovat použitím pomalu postupujícího režimu krmení.
- *Kosloske, Pathogenesis and Prevention of Necrotizing Enterocolitis: A Hypothesis Based on Personal Observation and a Review of the Literature, Pediatrics, Vol. 74, No. 6, Dec. 1984, 1086-1092.* Publikace uvádí hypotézu, že onemocnění NEC se diagnostikuje při výskytu dvou ze tří patologických rysů: (1) intestinální ischemie, (2) kolonizace patogenních bakterií a (3) nadbytek proteinového substrátu v intestinálním lumen.
- *Kosloske, Pathogenesis and Prevention of Necrotizing Enterocolitis: A Hypothesis Based on Personal Observation and a Review of the Literature, Pediatrics, Vol. 74, No. 6, Dec. 1984, 1086-1092.* Dále se v publikaci uvádí, že onemocnění NEC se řídce vyskytuje u kojenců, kteří se krmí mateřským mlékem. U lidí mateřské mléko hraje důležitou úlohu při pasivní imunizaci neonatálního střeva a obsahuje faktory, které podporují v intestinální flóře růst organismu *Bifidobacterium*. Také se popisuje, že výhodné složení mateřského mléka se může negativně ovlivnit mrazením, pasterizací nebo skladováním.

Etiologie a léčba onemocnění NEC se diskutuje v daleko více publikacích a stále je nutné vyvinout kompozice a

způsoby, které lépe umožní léčit a/nebo redukovat výskyt těchto poškozujících a často fatálních stavů.

Podstata vynálezu

Vynález zahrnuje řadu aspektů. Vynález popisuje způsob omezení výskytu nekrotizující enterokolitidy u kojenců, kteří jsou náchylní k tomuto onemocnění, přičemž uvedený způsob zahrnuje aplikaci účinného množství alespoň jedné PUFA s dlouhým řetězcem vybrané ze skupiny zahrnující $C_{20}n-6$ mastné kyseliny, $C_{22}n-3$ mastné kyseliny a $C_{22}n-3$ mastné kyseliny. Zjistilo se, že účinná je například kyselina arachidonová (n-6 mastná kyselina). Aplikace se může provést enterální nebo parenterální cestou. Upřednostňuje se kombinace n-6 a n-3 mastných kyselin, například arachidonová kyselina a dokosaheptaenová kyselina. Enterální aplikace se provádí v množství alespoň 1,0 mg n-6 mastných kyselin na jeden kilogram váhy kojence za den. Více výhodné provedení vynálezu je použití kombinace n-6 a n-3 mastných kyselin ve hmotnostním poměru přibližně 2:1 až přibližně 4:1 a aplikuje se alespoň 5,0 mg n-6 mastných kyselin s dlouhým řetězcem za den.

Tento způsob se může provést aplikací dostatečného množství enterální kompozice, která obsahuje kyselinu arachidonovou a dokosaheptaenovou, což je 1,0 až přibližně 60 mg na jeden kilogram za den v případě kyseliny arachidonové a přibližně 0,25 až 35 mg na kilogram za den v případě kyseliny dokosaheptaenové. Více typické je množství okolo 5 až přibližně 40 mg kyseliny arachidonové a přibližně 1,5 až přibližně 20 mg kyseliny dokosaheptaenové na kilogram za den. Upřednostňuje se, aby hmotnostní poměr kyseliny arachidonové a dokosaheptaenové byl v rozmezí od přibližně 2 až 4. Upřednostňuje se, aby polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem byly ve formě fosfolipidů, zvláště fosfatidylcholinu. Takové fosfolipidy jsou přítomné ve vysokých koncentracích ve vaječném lecitinu a ve vaječných fosfatidech.

Dále vynález poskytuje způsob snížení výskytu nekrotizující enterokolitidy u kojence, při němž se kojenci podává enterální výživná směs, obsahující proteiny, uhlohydráty a fosfolipidy v množství dostatečném k dodání alespoň 1,0 mg polynenasycených mastných kyselin n-6 s dlouhým řetězcem za den. Výživa dále výhodně poskytuje alespoň 0,5 mg polynenasycených mastných kyselin n-3 za den, a to ve formě arachidonové, resp. dokosahexaenové kyseliny.

Dále vynález poskytuje způsob snížení výskytu nekrotizující enterokolitidy u lidského kojence, při němž se kojenci podávají fosfolipidy v množství účinném pro snížení výskytu nekrotizující enterokolitidy. V typickém případě se uvedené fosfolipidy aplikují tak, aby poskytovaly mezi asi 60 a asi 2400 μmol , výhodně mezi asi 200 a asi 1500 μmol a zejména mezi asi 400 a asi 1000 μmol fosfolipidů na kilogram a den. Zdroj fosfolipidů není rozhodující; podle vynálezu jsou vhodné fosfolipidy získané z vaječného lecitinu. Fosfolipidy je možné také získat ze zvířecích membrán, kam patří také membrána globulí mléčného tuku. Jiné zdroje bohaté na fosfolipidy jsou sojový olej a další oleje získané ze semen. Když se použijí fosfolipidy vaječného lecitinu, preferované množství aplikované enterálně je pak dostatečné, aby kojenec dostal denně alespoň 1,0 mg n-6 mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Upřednostňuje se, aby vaječné fosfolipidy dodávaly arachidonovou kyselinu jako významnou část n-6 mastných kyselin a s výhodou také kyselinu dokosahexaenovou a/nebo jiné n-3 mastné kyseliny s dlouhým řetězcem ve výše uvedených poměrech. To může mít synergický účinek. Je však nutné poznamenat, že délka a nasycenost mastných kyselin připojených na kostru glycerolu není v tomto „fosfolipidovém“ znaku vynálezu rozhodující a mohou se použít i jiné mastné kyseliny než LCPUFA.

Dále vynález zahrnuje způsob snížení výskytu nekrotizující enterokolitidy u lidského kojence, zahrnující aplikaci

cholinu v množství, které je účinné při redukci výskytu nekrotizující enterokolitidy. V typickém případě se uvedený cholin aplikuje tak, aby kojenec získal mezi přibližně 60 a přibližně 1 800 mikromolů, výhodněji mezi přibližně 150 a přibližně 1 200 mikromoly cholinu na kilogram a den. Zdroj cholinu není limitující. Může se s výhodou podle vynálezu použít fosfatidylcholin získaný z vaječného lecitinu. Jiné zdroje, které jsou bohaté na cholin nebo fosfatidylcholin zahrnují sojový olej a oleje jiných semen. Když se použije cholin z vaječného lecitinu, preferuje se aplikace v kombinaci s n-6 a/nebo n-3 mastnými kyselinami, aby kojenec dostal alespoň 1,0 mg n-6 mastných kyselin s dlouhým řetězcem za den. Upřednostňuje se, aby vaječný lecitin poskytl arachidonovou kyselinu jako podstatnou část n-6 mastných kyselin a také dokosaheptaenovou kyselinu a/nebo jiné n-3 mastné kyseliny s dlouhým řetězcem ve shora uvedeném poměru. To může mít synergický účinek. S ohledem na aspekt fosfolipidů délka a nasycenost mastných kyselin připojených na glycerolovou kostru libovolného fosfatidylcholinu užívaného podle vynálezu není limitující. Mohou se v souladu s vynálezem použít také jiné mastné kyseliny než uvedené LCPUFA. V jiném případě se může použít jiný nefosfolipidový zdroj cholinu.

Navíc vzhledem k pozitivním účinkům, které je možné spatřit u kojenců náchylných k enterokolitidě, je dobře možné, že se tyto účinky objeví také u dospělých. Pak dalším předmětem vynálezu je použití libovolné shora v textu uvedené kompozice při léčbě a prevenci vředové kolitidy a příbuzných intestinálních stavů u dospělých. Samozřejmě dávkování je možné přizpůsobit hmotnosti dospělého pacienta a faktorům, které jsou známy v oboru.

Dále vynález popisuje enterální přípravky a způsoby jejich přípravy. Dalším předmětem vynálezu je například způsob produkce enterálního přípravku obsahujícího fosfolipidy vaječného žloutku, který zahrnuje:

(a) získání suchého prášku vaječného fosfatidu, v podstatě prostého cholesterolu,

(b) dispergování uvedené fosfolipidové frakce ve vodné fázi za účelem vytvoření fosfolipidové disperze a

© kombinování uvedené fosfolipidové disperze se suspenzí dalších složek uvedeného enterálního přípravku.

Podle tohoto způsobu poskytuje disperze ve vodné fázi vaječný fosfatid v množství asi 2 až asi 15 % a práškový vaječný fosfatid se k vodě přidává výhodně při asi 20 až 50 °C. Tento aspekt může být použit při přípravě kojenecké výživy, obsahující kyselinu arachidonovou a dokosaheptaenovou ve formě fosfolipidů, způsobem podle vynálezu.

Dále vynález poskytuje přípravek vhodný pro výživu kojenců, který obsahuje proteiny, sacharidy a lipidy, jehož podstata podle vynálezu spočívá v lipidové směsi zahrnující triglyceridy se středně dlouhým řetězcem a vaječný fosfolipid, kde uvedený vaječný fosfolipid je přítomen v množství asi 1 až asi 40 % hmotn. lipidové směsi a uvedený vaječný fosfolipid je v podstatě prostý cholesterolu. V typickém případě je vaječný fosfolipid v lipidové směsi přítomen v množství od 5 do 30 % hmotn. a arachidonová kyselina je v koncentraci od asi 10 do asi 31 mg na 100 kcal. Výhodnější je, jestliže přípravek také zahrnuje dokosaheptaenovou kyselinu v koncentraci od asi 3 do asi 16 mg na 100 kcal a arachidonová a dokosaheptaenová kyselina se zde vyskytuje v poměru asi 4:1 až asi 2:1.

Obecná terminologie

Mastné kyseliny jsou uhlovodíkové řetězce různé délky, které mají na svém jednom konci karboxylovou kyselinu, takže této oblasti jsou poněkud polární a hydrofilní, zatímco jinak jsou hydrofobní a jejich

hydrofobicita dosahuje různého stupně v závislosti na délce uhlovodíkového řetězce. Mastné kyseliny se dělí do kategorií podle délky uhlovodíkového řetězce. Například řetězce o méně než asi 6 uhlíků se považují za „krátké“, řetězce o délce asi 6 až 18 uhlíků jsou „středně dlouhé“ a řetězce o 20 nebo více uhlíkách se považují za „dlouhé“. Mastné kyseliny mohou mít také jednu nebo více dvojných vazeb, které jsou místem „nenasycenosti“ uhlovodíkového řetězce. Termín „PUFA s dlouhým řetězcem“ znamená mastnou kyselinu s dvaceti atomy uhlíku nebo více s alespoň dvěma dvojnými vazbami uhlík-uhlík (polynenasycenou). Počet a poloha dvojných vazeb u mastných kyselin se označují podle nomenklaturní konvence. Například kyselina arachidonová („AA„ nebo „ARA„) má délku řetězce 20 uhlíků a obsahuje 4 dvojně vazby počínaje u šestého uhlíku od metylového konce. Výsledkem je označení „C₂₀:4n-6„. Podobně dokosahexaenová kyselina („DHA“) má v řetězci 22 uhlíků s šesti dvojnými vazbami, které začínají u třetího uhlíku od metylového konce, a označuje se „C₂₂:6n-3„. Jsou také známy méně obvyklé PUFA s dlouhým řetězcem a některé jsou uvedeny v tabulce I a IV (dále v textu).

„Glyceridy„ jsou komplexní lipidy, kde glycerolová kostra je esterifikována mastnými kyselinami. „Triglycerid„ (to znamená „triacylglycerol„) vykazuje tři esterifikované mastné kyseliny, na každém místě hydroxylové skupiny glycerolové kostry jednu. Di- a monoglyceridy vykazují dvě, resp. jednu esterifikovanci mastnou kyselinu. Fosfoglycerid (to znamená „fosfolipid„ nebo „fosfatid„, mohou se mezi sebou zaměnit) se odlišuje od triglyceridu tím, že má maximálně dvě esterifikované mastné kyseliny, zatímco třetí pozice glycerolové kostry je esterifikována kyselinou fosforečnou a vzniká „fosfatidová“ kyselina. V přírodě je kyselina fosfatidová obvykle spojena s alkoholem, který dodává silnou polaritu. Dva takové alkoholy, které se běžně vyskytují v přírodě, jsou cholin a etanolamin. „Lecitin„ je

kyselina fosfatidová spojená s aminoalkoholem „cholinem“. Také se nazývá fosfatidylcholin“. Lecitiny se liší podle obsahu komponentu mastné kyseliny a jejich zdrojem jsou ^{například} vejce a soja. Cefalin (fosfatidyletanolamin), fosfatidylserin a fosfatidylinositol jsou další fosfoglyceridy.

Fosfolipidy se běžně nacházejí v membránách všech živých systémů. Tradiční zdroje fosfolipidů jsou vaječný žloutek a sojový olej. Fosfolipidy je také možné získat z mozku savců, ledvin, srdce a plic nebo z membrán globulí mléčného tuku. Mohou se také použít zdroje mikrobiálního původu (oleje jediné buňky), jako je oleje z řas a hub, zvláště pak mastných kyselin AA a DHA, které jsou komponenty fosfolipidů. Slepíčí vejce jsou relativně hojný zdroj lipidů. Přibližně 33 % žloutku slepičích vajec je lipid, z něhož přibližně 67 % je triglycerid, 28 % je fosfolipid a zbytek většinou tvoří cholesterol (procenta jsou hmotnostní procenta). Tato čísla jsou přibližná a liší se v závislosti na potravě, na chovu a podmínkách chovu slepic. Přibližně 75 % fosfolipidové frakce tvoří fosfatidylcholin, přibližně dalších 20 % je fosfatidyletanolamin. Cholin tvoří až přibližně 15 až 30 % každé fosfolipidové molekuly v závislosti na určité mastné kyselině, která je připojena. Pak obsah cholinu vaječných fosfolipidů může kolísat od přibližně 10 % do přibližně 25 % (hmotnostní procenta) nebo na základě celkového vaječného fosfolipidu je obsah cholinu přibližně 3 až 7 hmotnostních %.

Přípravky

Přípravky použitelné podle vynálezu obsahují PUFA n-6 a/nebo n-3 s dlouhým řetězcem. Zdroj PUFA s dlouhým řetězcem není omezující. Známé zdroje PUFA s dlouhým řetězcem zahrnují rybí a mořský olej, lipidy z vaječného žloutku a fosfolipidy, olej z jednobuněčných organismů (jde například o olej z řas a z hub). Jak je známo v oboru, některé zdroje jsou lepší než jiné, protože obsahují větší množství specifických PUFA s

dlouhým řetězcem. V oboru jsou dobře známy další jedlé, částečně nebo zcela čištěné zdroje PUFA s dlouhým řetězcem. Nové zdroje PUFA s dlouhým řetězcem se mohou vyvinout pomocí genových manipulací zeleniny a olejnatých rostlin a použití takových rekombinantních produktů je také předmětem vynálezu.

PUFA s dlouhým řetězcem mohou být v přípravcích obsaženy ve formě esterů volných mastných kyselin, mono-, di- a triglyceridů, fosfoglyceridů včetně lecitinů a/nebo jejich směsí. Výhodné může být, aby PUFA s dlouhým řetězcem byly ve formě fosfolipidů, zvláště pak ve formě fosfatidylcholinu. V současnosti preferovaným zdrojem, alespoň je-li zpracován tak, aby byly organoleptické vlastnosti a množství cholesterolu přijatelné, se zdají být fosfolipidy vaječného žloutku, k čemuž pravděpodobně přispívá vysoký obsah fosfolipidů a/nebo fosfatidylcholinu spojený s PUFA získanými z vajec.

n-6 a/nebo n-3 PUFA s dlouhým řetězcem se může aplikovat ve formě intravenózního roztoku (to znamená parenterálně) stejně jako cholin a fosfatidylcholin. Intravenózní roztok bude s výhodou obsahovat účinné množství PUFA, fosfolipid a/nebo cholin v přiměřené denní dávce parenterálního roztoku. Přesná koncentrace proto kolísá v závislosti na předpokládaném objemu, který je přijat, a je podstatně více koncentrovaný ve formě bolusu nebo v malém objemu parenterálního roztoku, než v hydratačním nebo nutričním parenterálním produktu. Parenterální kompozice budou v obecném případě zahrnovat farmaceuticky přijatelné nástroje a excipienty, jako jsou pufrы, konzervační činidla a podobně.

n-6 a/nebo n-3 PUFA s dlouhým řetězcem a cholin a fosfolipidy se mohou v jiném případě aplikovat ve formě enterální kompozice. Enterální kompozice obsahující PUFA s dlouhým řetězcem, cholin nebo fosfolipid se může vyskytovat ve formě roztoku nebo emulze aktivní látky nebo jako nutriční matrice obsahující proteiny, sacharidy, jiné tuky, minerály a vitamíny. Enterální kompozice obsahující aktivní komponenty se

mohou připravovat buď jako doplňková nebo celková nutriční podpora. Koncentrace PUFA s dlouhým řetězcem v enterální kompozici může být v rozmezí od přibližně 100 hmotnostních % (jako v případě bolusové emulze) do 0,5 hmotnostních % (jako je tomu v případě nutričně kompletního přípravku) přípravku v závislosti na módu aplikace a účelu aplikace. V úplných nutričních přípravcích může být koncentrace dokonce nižší, jestliže se aplikuje dostatek přípravku tak, že se zavede účinné množství PUFA s dlouhým řetězcem.

Zvláště preferované provedení tohoto vynálezu se týká zlepšení nutričně úplného přípravku, který je vhodný ke krmení kojenců, zvláště pak předčasně narozených kojenců. Takový preferovaný přípravek obsahuje protein, sacharidy a lipidy, kde přibližně 6 až 40 hmotnostních procent celkového lipidu tvoří vaječný fosfolipid, který v podstatě neobsahuje volný cholesterol. Termín „v podstatě neobsahuje“ znamená, že obsah cholesterolu vaječného fosfolipidu je menší než 0,1 hmotnostních procent a s výhodou je nižší než 0,05 hmotnostních procent celkového lipidu.

Pro odborníky v oboru je zřejmé, co se myslí pojmem dětská výživa. Když se ředí nebo rekonstituuje, je-li na počátku v koncentrované nebo práškové formě, do stádia, které je možné aplikovat, pak typická dětská výživa obsahuje přibližně 10 až 35 gramů proteinu na litr výživy, 20 až 50 gramů lipidů na litr výživy, 60 až 110 gramů sacharidů na litr výživy a další komponenty, jako jsou vitamíny, minerály, vláknina, emulgátory a podobně. Za účelem vysvětlení komponentů dětské výživy a způsobu jejich produkce jsou zde uvedeny následující US patenty : 1) US patent č. 5,492,899 (Masor et al.,); 2) US patent 5,021,245 (Borchel et al.,) 3) US patent č. 5,234,702 (Katz et al.,) a 4) US patent č. 5,602,109 (Masor et al.,) a 5) US patent č. 4,670,268 (Mahmoud). Toto provedení vynálezu zahrnuje dětskou výživu obsahující přibližně 40 až 50 gramů lipidu na litr výživy, kde lipid obsahuje směs triglyceridů se

středním řetězcem a vaječný fosfolipid, který v podstatě neobsahuje cholesterol. V typickém případě směs lipidů obsahuje přibližně 1 až 49 hmotnostních procent, s výhodou přibližně 5 až 30 hmotnostních % vaječných fosfolipidů. Toto provedení vynálezu je zvláště vhodné pro přípravu PUFA s dlouhým řetězcem vybraných z n-3 mastných kyselin a n-6 mastných kyselin, fosfolipidů a/nebo cholinu v množství, které je pro kojence výhodné.

Způsob přípravy

Protože žloutky vajec od slepic zahrnují jak triglyceridy tak i fosfatidy, preferuje se zpracování vaječných žloutků za použití organických rozpouštědel způsobem, který odděluje fosfatidy od triglyceridů, sterolů (například cholesterolu) a jiných komponentů. Při této separaci je možné alespoň v laboratorním měřítku použít různé způsoby uvedené v literatuře. V jiném případě takové vaječné fosfatidy, které jsou v podstatě bez cholesterolu, jsou běžně dostupné v podobě suchého prášku u firmy Pfanstiehl, Inc. (Waukegan, IL; katal. Č. P-123).

Vaječný fosfatid se pak zamíchá do enterálního přípravku podle vynálezu. Vzhledem k obsahu lipidů se předpokládá, že začlenění vaječných fosfatidů do enterálního přípravku je snadné v olejové fázi. Překvapivě se zjistilo, že tyto disperze lipid-lipid jsou nepřijatelné a že příprava vodné disperze vaječného fosfatidu vede ke zlepšení produktu. Vodné disperze obsahující přibližně 2 až 15 hmotnostních procent, upřednostňuje se přibližně 3 až 8 hmotnostních procent, se připravují ve vodě, jejíž teplota je přibližně 20 až 25 °C, tak se dosáhne nejlepšího výsledku. V teplejší vodě se nedosáhne tak přijatelných organoleptických vlastností.

Připraví se kaše obsahující sacharidy, proteiny a lipidy, které slouží jako makronutriční zdroj. Tato kaše se míchá při

teplotě asi 130 až 140 °C. Těsně před homogenizací se fosfatidová disperze smíchá se zbývajícím přípravkem.

Ve zvláště preferovaných případech se před přidáním fosfatidové disperze ke směsi konečného produktu (těsně před homogenizací) z disperze odsaje vzduch při mírném vakuu. Odsátí vzduchu se může provést libovolným mechanismem, ale uspokojivé výsledky poskytuje rozprašovací de-aerátor při přibližně 375 mm (15 palců) rtuťového sloupce. Ukázalo se, že tento dodatečný krok zlepšuje organoleptické a olfaktorické vlastnosti konečného produktu dokonce více než filtrace na aktivním uhlí nebo jejich kombinace (viz příklad III).

Při přípravě parenterálních kompozic použitelných podle vynálezu se může použít běžná sterilní parenterální technologie produkce. V tomto případě může být výhodné vyhnout se vaječným fosfatidům a místo nich použít triglyceridové oleje nebo estery mastných kyselin, které se mohou nacházet v rekombinantních nebo jednobuněčných zdrojích oleje.

Průmyslová využitelnost

Přípravky podle vynálezu se mohou použít jako nutriční doplněk kojenců a/nebo dospělých. Přídavek PUFA s dlouhými řetězci, zejména n-6 a n-3 mastných kyselin a zvláště pak AA a DHA, se obecně považuje za přínosný pro neurální vývoj a ostrost zraku u kojenců, ačkoli v literatuře se našly i konfliktní údaje.

Přípravky použitelné podle vynálezu zahrnují směsi obsahující libovolnou nebo všechny z následujících složek:

- (a) PUFA s dlouhým řetězcem vybrané z n-6 a n-3 mastných kyselin, v typickém případě ve fosfolipidové nebo fosfatidylcholinové formě,
- (b) polární fosfolipidy, bez ohledu na podstatu nebo délku připojených mastných kyselin,
- (c) cholin, s výhodou fosfatidylcholin.

Například výživa obohacená vaječnými fosfolipidy popsaná podrobně v příkladech poskytuje vyšší množství

každého ze specifikovaných komponentů a překvapivě se zjistilo, že se podstatně redukuje výskyt NEC u populace kojenců, které jsou náchylné k onemocnění NEC. U více specifického provedení vynálezu je způsob redukující výskyt NEC doprovázen aplikací kyseliny arachidonové (AA, 20:4 n-6) nebo výhodnější je aplikace AA v kombinaci dokosahe^uenovou kyselinou (DHA, 22:6 n-3).

Vynález popisuje způsob redukce výskytu nekrotizující enterokolitidy u kojenců, kteří jsou náchylní k tomuto onemocnění. Uvedená metoda zahrnuje aplikaci účinného množství alespoň jedné PUFA s dlouhým řetězcem ze skupiny C₂₀n-6 mastných kyselin, C₂₂n-6 mastných kyselin, C₂₅n-3 mastných kyselin. Aplikace se provádí v množství alespoň 1,0 mg n-3 mastných kyselin na kilogram váhy kojence za den. Výhodnější provedení vynálezu je použití kombinace n-6 a n-3 mastných kyselin ve hmotnostním poměru přibližně 2:1 až přibližně 4:1.

Dále se zde popisuje způsob snížení výskytu nekrotizující enterokolitidy u kojenců, přičemž uvedená metoda zahrnuje aplikaci vaječných fosfolipidů v množství, kdy výsledkem je alespoň 1,0 mg n-6 mastných kyselin s dlouhým řetězcem za den. Je výhodné, aby vaječné fosfolipidy dodávaly AA, jako podstatnou část n-6 mastných kyselin, a také je výhodné, aby dodávaly DHA a/nebo jiné n-3 mastné kyseliny s dlouhým řetězcem ve shora uvedeném poměru.

Dále vynález popisuje enterální aplikaci fosfolipidů, zvláště fosfolipidů, které obsahují AA a/nebo DHA a které ve srovnání s přípravky obsahujícími triglyceridy AA a DHA často zvyšují množství AA a DHA v krevním séru.

Správnější míra aplikace přípravků podle vynálezu je denní příjem v jednotkách miligram na kilogram tělesné váhy. Následující tabulka A udává preferované a ideální cílové rozmezí každé z kompozice podle vynálezu.

Tabulka A

Denní příjem (vztaženo na kilogramy hmotnosti kojence)

složka	Minimální množství	Výhodné množství	Výhodnější množství	Nejvýhodnější množství
AA (mg)	1	2 až 60	5 až 40	10 až 30
DHA (mg)	0,25	0,5 až 35	1,5 až 20	3 až 15
AA/DHA poměr	0,25	0,5 až 10	1 až 8	2 až 4
Fosfolipidy (μmol)	50	60 až 2400	150 až 1200	400 až 1000
Cholin (μmol)	50	60 až 1800	150 až 1200	300 až 900

Existuje zde široké rozpětí, což způsobuje skutečnost, že ne všichni kojenci budou konzumovat stejné objemy výživy. Ti, kteří konzumují méně, dostávají také méně každé složky. Předpokládá se, že ideální cílové rozmezí je přibližně 100 kcal. Dochází také ke sporu, jaký zvolit postup pro odhad obsahu cholinu.

Z tabulky A je možné vidět, že nejvýhodnější je, aby výživa obsahovala přibližně 2 krát až 4 krát více AA než DHA. Je také patrné, že minimální množství fosfolipidu a cholinu je stejné. Této skutečnosti lze dosáhnout tak, že se všechny fosfolipidy poskytnou ve formě fosfatidylcholinu. Jak je cholin nahrazován jinými nitrogenními alkoholy (například etanolamin, serin nebo inositol) relativní množství cholinu vzhledem k celkovému množství fosfolipidů klesá.

AA a /nebo DHA je možné aplikovat jednotlivě jako oddělené složky nebo společně nebo v kombinaci s jinými složkami, jako jsou bílkoviny, tuky, sacharidy, vitamíny a minerály. Nutriční podpora pro novorozence s nízkou porodní vahou může být parenterální (nitrožilní výživa) nebo enterální. Tak se může příslušné množství PUFA s dlouhým řetězcem přidat do parenterálního nutričního roztoku nebo do běžné enterální výživy vhodné pro novorozence s nízkou porodní hmotností. Nejvýhodnější je, když se způsob podle vynálezu uskuteční enterální aplikací dětské výživy, která je určena pro novorozence s nízkou porodní hmotností a obsahuje AA a DHA. Taková dětská výživa

dále obsahuje správné množství sacharidů a proteinů a vhodnou kombinaci minerálů a vitamínů. Jako příklad dětské výživy podle vynálezu slouží modifikovaná výživa Similac Special Care® (Ross Product Division of Abbott Laboratories, Columbus, Ohio), která se popisuje detailněji v příkladu II.

Dále vynález popisuje způsob zvýšení množství kyseliny arachidonové a dokosaheptaenové v krevním séru. Uvedená metoda zahrnuje aplikaci enterální výživy, která obsahuje AA a DHA ve formě fosfolipidů.

Jisté studie ukazují, že aplikace PUFA s dlouhým řetězcem kojencům náchylným k NEC bude snižovat výskyt NEC a může také snížit stupeň a obtížnost onemocnění NEC. Dále se zjistilo, že aplikace fosfolipidů pocházejících ze zvířat nebo ze zeleniny je také účinná při snížení výskytu onemocnění NEC u populace kojenců, kteří jsou náchylní k onemocnění NEC.

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1:

Fosfatid vaječného žloutku se získal od firmy Pfanstiehl, Inc. (Waukegan, IL; katalogové číslo P-123) a jeho použití se popisuje v následujícím příkladu. Profil mastných kyselin a cholesterolu uvedených vaječného fosfatidu se uvádí v tabulce I. Dále se zde uvádí součet všech n-3 a všech n-6 PUFA s dlouhým řetězcem.

Tabulka I: Profil mastných kyselin a obsah cholesterolu v lecitinu vaječného žloutku

Mastná kyselina	V gramech na 100 gramů vzorku
C14:0	0,08
C16:0	18,83
C16:1 n-7	0,82
C16:4	0,21
C18:0	6,72
C18:1 n-9	17,36
C18:2 n-6	9,8
C20:1 n-9	0,11

C20:1 n-9	0,11	
C20:2 n-6		0,24
C20:3 n-6		0,3
C20:4 n-6-kys. arachidonová		4,93
C22:0	0,07	
C22:4 n-6		0,3
C22:5 n-6		1,45
C22:5 n-3	0,09	
C22:6 n-3-kys. dokosaheptaenová	1,24	
cholesterol	<0,05	
Celkem LCPUFA n-6		7,22
Celkem LCPUFA n-3	1,33	

Odborníkovi je zřejmé, že konkrétní množství různých mastných kyselin obsažených v lipidech vaječného žloutku bude kolísat v závislosti na chovu, krmení a stáří slepic. Navíc postup extrakce, který používá Pfanstiehl, pro přípravu fosfatidu používaného v příkladech vede ke vzniku materiálu, jenž obsahuje extrémně nízké množství cholesterolu, zatímco vykazuje profil mastných kyselin, který je vysoce využitelný při výživě.

Příklad II

V tomto příkladu se připravily kontrolní a experimentální kojenecké výživy, které neobsahují respektive obsahují vaječný fosfatid podle příkladu I. Kontrolním přípravkem je výživa Similac Special Care® (Ross Products Division of Abbott Laboratories, Columbus, Ohio) a připravila se za použití následujícího seznamu složek, což vede ke vzniku výživy o složení, jež uvádí tabulky II až IV dále v textu:

Voda (Kosher), netučné mléko, hydrolyzovaný kukuřičný škrob, laktóza, frakcionovaný kokosový olej (triglyceridy se středně dlouhými řetězci), syrovátkový proteinový koncentrát, sojový olej, kokosový olej, fosforečnan trivápenatý, citrát draselný, citrát sodný, chlorid hořečnatý, kyselina askorbová, mono- a diglyceridy, sojový lecitin, uhličitan vápenatý, karagenan, chlorid cholinu, síran železnatý, m-inositol, taurin, niacinamid, L-karnitin, alfa-tokoferolacetát, síran zinečnatý, pantotenát vápenatý, chlorid draselný, síran

měďnatý, riboflavin a palmitát vitamínu A, thiaminchloridhydrochlorid, pyridoxinhydrochlorid, biotin, kyselina listová, síran manganatý, fylochinon, vitamín D₃, seliničitan sodný a kyanokobalamin.

V obecném případě se suspenze proteinů, sacharidů, lipidů, vitaminů a minerálů připravují odděleně a pak se před homogenizací smíchají, jak se uvádí v předchozích US patentech, které se vztahují k výrobě kojenecké výživy.

U experimentální výživy byl vaječný fosfatid podle příkladu I přidán do výživy během výroby. Nejdříve se vaječný fosfatid dispergoval ve vodě při teplotě 25 °C, čímž se vytvořila 8 % disperze. Těsně před homogenizací se fosfatidová disperze smíchala s proteiny, sacharidy, vitamíny, minerály a jinými lipidy za vzniku experimentální výživy, která vykazuje složení uvedené v tabulce II až IV. Množství každé složky se udávají vztahovaná na litr a na kilokalorii, protože v oboru je známo připravovat kojenecké výživy s vyšší nebo nižší kalorickou hustotou než je standardních 20 kcal na 34 ml (20 kcal na objemovou unci).

Tabulka II: složky kontrolních a experimentálních přípravků

Živina	Preferované rozmezí	
	U/l*	U/100 kcal
Protein (g)	21,9 - 23,4	2,61 - 2,88
Tuk (g) (jak se popisuje v tabulce III)	40,0 - 46,0	5,24 - 5,67
Sacharidy (g)	84,0 - 88,0	10,00 - 10,84
[popel] (g)	6,7 - 8,0	0,80 - 0,99
Celkové pevné látky (g)	158,6 - 165,0	18,88 - 20,32
Kyselina linolová (g)	5,6 - 12,2	0,67 - 1,50
Vápník (mg)	1 300 - 1 700	154,76 - 209,36
Fosfor (mg)	720 - 970	85,71 - 119,46
Hořčík (mg)	100 - 700	11,90 - 20,94
Sodík (mg)	349 - 389	41,55 - 47,91
Draslík (mg)	1 000 - 1 420	119,05 - 174,88
Chlorid (mg)	650 - 770	77,38 - 94,83
Železo (mg)	3,0 - 5,5	0,36 - 0,68

Zinek (mg)	12,0 - 14,6	1,43 - 1,80
Měď (mg)	2,0 - 3,0	0,24 - 0,37
Mangan (μg)	100 - 500	11,90 - 61,58
Jód (mg)	0,05 - 0,30	0,01 - 0,04
Selen (μg)	12 - 29	1,43 - 3,57
Vitamin A (IU)	6 000 - 8 000	714,29 - 985,22
Vitamin D (IU)	1 200 - 1 580	142,86 - 194,58
Vitamin E (IU)	35,0 - 45	4,17 - 5,54
Vitamin K ₁ (μg)	100 - 140	11,90 - 17,24
Vitamin C (mg)	350 - 450	41,67 - 55,42
Thiamin (B ₁) (mg)	2,66 - 4,6	0,32 - 0,57
Riboflavin (B ₂) (mg)	5,03 - 9,0	0,60 - 1,11
Pyridoxin (B ₆) (mg)	2,6 - 3,4	0,31 - 0,42
Vitamin B ₁₂ (μg)	4,47 - 9,5	0,53 - 1,17
Kyselina pantotenová (mg)	15,4 - 24,0	1,83 - 2,96
Kyselina listová (μg)	340 - 450	40,48 - 55,42
Niacin (mg)	40,6 - 65	4,83 - 8,00
Biotin (μg)	350 - 460	41,67 - 56,65
Cholin (mg)	81 - 243	9,64 - 29,93
m-inositol (mg)	44,7 - 61	5,32 - 7,51
L-karnitin (mg)	35 - 60	4,17 - 7,39
Taurin (mg)	60 - 80	7,14 - 9,85
Energie (kcal)	812 - 840	

*předpokládá se 24 kcal na 34 ml (24 kcal na objemovou unci))

V následující tabulce III se uvádí obsah lipidů (jediná proměnná) použitých v kontrolním a experimentálním produktu. Je možné vidět, že výživy vykazují stejné celkové množství lipidů, ale podstatně se liší v záměně vaječných fosfolipidů částí triglyceridů se středně dlouhým řetězcem. Tato substituce s sebou nese vyšší množství fosfolipidů a cholinu, stejně jako další PUFA s dlouhým řetězcem.

Tabulka III: lipidy kontrolních a experimentálních přípravků

ingredience	Kontrolní přípr.	Experimentální přípr.
Směs lipidů	Hmotnostní %	Hmotnostní %
MCT	50	41
Kokosový olej **	30	30
Sojový olej	20	20
Vaječné fosfolipidy	0	9(4,0 g/l)
Jako cholin		75 % z 9 %
Jako etanolamin		20 % z 9 %
Sojový lecitin	0,45 g/l	0,0 g/l

Cholesterol	ND	ND
Celkové lipidy (g/l)	44,1	44,1

MCT triglyceridy se středně dlouhým řetězcem

** frakcionovaný

ND nebyl detekován

Tabulka č. 4 uvádí profil mastných kyselin u kontrolních a experimentálních výživách. To reprezentuje součet složek mastných kyselin vaječného lecitinu a výživy Similac Special Care®.

Tabulka IV: Průměrné profily mastných kyselin udávané ve hmotnostních procentech.

Mastná kyselina místo nenasycenosti	Kontrolní			experimentální		
	n-3	jiné	n-6	n-3	jiné	n-6
6:0 kapronová		0,71			0,27	
8:0 kaprylová		30,56			23,11	
10:0 kaprinová		19,61			16,44	
12:0 laurová		9,69			10,24	
14:0 myristová		3,85			4,08	
15:0 a 14:1		0,04			0,01	
16:0 palmitolejová		5,51			7,65	
16:1 palmitolejová		0,03			0,12	
16:2		-			-	
17:0 margarová		0,04			0,09	
16:3		-			-	
16:4		-			-	
18:0 stearová		2,68			3,89	
18:1 n-9 olejová		8,31			11,25	
18:2 n-6 linolová			16,36			18,87
18:3 n-6 linolenová			2,3			-
18:3 n-3	2,24			2,45		
18:4 n-6			-			0,02
20:2 arachidová		0,12			0,14	
20:1 n-9		0,04			0,09	
20:2 n-9		0,02			0,02	
20:3 n-9		-			0,05	
20:4 n-6 AA			-			0,41
20:4 n-3	-			-		
20:5 n-3	-			-		
22:0 behenová		0,07			0,12	
22:5 n-6			-			0,07

22:5 n-3	-			0,07		
22:6 n-3 DHA	-			0,14		
24:0		0,04			0,07	
Celkové LC PUFA n-3	0			0,21		
Celkové LC PUFA n-6			0			0,48
Celkem n-3	2,24			2,66		
Celkem n-6			18,66			19,37

Inkluze vaječného fosfatidu vede k tomu, že 0,21 hmotnostních procent celkové směsi lipidů tvoří n-3 mastné kyseliny s dlouhým řetězcem a 0,48 hmotnostních procent tvoří n-6 mastné kyseliny s dlouhými řetězci. 0,14 hmotnostních procent celkové směsi tuků tvoří DHA a 0,41 hmotnostních procent tvoří AA. Na základě aplikace 100 kcal/kg/den na hmotnost 1 kg kojence tato výživa poskytuje přibližně 22 mg AA a přibližně 7 mg DHA za den. To je samozřejmě právě jedno možné provedení poměru podle vynálezu.

Příklad III

V tomto experimentu se hodnotily proměnné procesy za účelem omezit organoleptickou zpětnou vazbu spojenou s použitím vaječných fosfolipidů. Izolace vaječných fosfolipidů, které lze použít podle vynálezu, často vede ke vzniku vaječného fosfatidu, který vykazuje nevyhovující organoleptické vlastnosti pro případ použití v kojenecké výživě. Tyto vlastnosti se mohou dále vylepšit, aby vznikl produkt, který je vyhovující jak pro kojence tak pro osobu, která tuto výživu aplikuje. Tento postup jak zdokonalit konečný produkt se popisuje dále v textu.

Připravila se řada nutričních přípravků, které jsou podobné jako ten popsáný v příkladu II, s tou výjimkou, že 6 hmotnostních procent vaječného fosfolipidu se předem upravilo za použití různých postupů. Vaječné fosfolipidy se dispergovaly v části olejové směsi, která se popisuje v příkladu II nebo v části vody. Olejové disperze jsou nepřijatelné a nelze je použít ani dokonce po zahřátí na teplotu okolo 95 °C. Disperze fosfolipidů ve vodě se zvyšující

se teplotou se připravila jednoduše a tato metoda je preferovaným způsobem přípravy vodní disperze.

Hlavní vsádka 3 % (hmotnostní procenta) disperze vaječných fosfolipidů se připravila mícháním fosfolipidů ve vodě o teplotě 90 °C po dobu 1 hodiny. Část této disperze prošla skrz (1) samotný deaerátor; (2) samotnou jednotku filtrace na aktivním uhlí; (3) přes kombinaci deaerátoru a filtrační jednotky nebo (4) se dále neupravovala.

Jednotka filtrace na aktivním uhlí obsahuje 80 gramů aktivního uhlí a deaerátorová jednotka pracovala za mírného vakua (375 mm rtuťového sloupce). Části vsádky prošly 3 krát filtrační jednotkou a jednou přes deaerátor. Když se použily obě techniky, část prošla nejdříve filtrací, pak deaerátorem. Upravené části se pak přidaly do nutričního přípravku těsně před homogenizací a balením vzorku.

U vzorků se pak hodnotily stopy pachů (organoleptické vlastnosti) několika zkušenými osobami. Výsledky jsou uvedeny v tabulce V.

Tabulka V: Dětská výživa s fosfolipidy vaječného žloutku

Výsledky testů organoleptických vlastností

Úprava disperze	Počáteční AA		AAL po třech měsících	
Samotná deaerace	AA	1 - 2,5	AAL	2,5
Samotná filtrace na aktivním uhlí	AA	1,5 - 2	AAL	2,5
Deaerace/filtrace na aktivním uhlí	AA	2	AAL	2,5
Neupravuje se	AA	2,5 - 3	AAL	3

AA kyselina arachidonová

AAL dlouho přetrvávající kyselina arachidonová

Měřítka: 0,5 velmi slabá

1 slabá

1,5	slabá až mírná
2	mírná
2,5	mírná až silná
3	silná

Překvapivě nejméně aromatický vzorek byl ten, který obsahoval disperzi, která prošla pouze deareátorem. Disperze, která se upravovala na deareátoru a filtrací na aktivním uhlí vykazuje nejhorší hodnocení kromě kontroly (kterou je neupravená fosfolipidová disperze).

Příklad IV:

Přípravky připravené podle příkladů II a III se podávaly kojencům v rámci studie, která se provedla v instituci Neonatal Nursery of the University of Tennessee Newborn Center za vedení Dr. Susan E. Carlson a za finanční podpory Ross Products Division of Abbott Laboratories (Study AE78), NICHD grantu R01-HD31329 a grantu R01-EY08770 National Eye Institute. Zkoumané parametry zahrnují růst, neurální vývoj a ostrost zraku. Má se za to, že PUFA s dlouhým řetězcem jsou fyziologicky důležité při vývoji mozku a očí a rychle se akumulují ve fetální tkáni v posledním trimestru těhotenství. Předčasně narození kojenci pak ve srovnání s dětmi donošenými nepřijímají normální množství PUFA s dlouhým řetězcem.

Kritérium zařazení do studie:

Podmínkou zařazení do této klinické studie je „nízká“ porodní hmotnost, to znamená nižší než 1500 gramů (rozmezí 750 až 1375 gramů), nesmí se projevovat příznaky kardiálního, respiračního, gastrointestinálního nebo jiného systémového onemocnění. U novorozence nesměla být zjištěna asfyxie nebo klinické komplikace spojené s inkompatibilitou krevní skupiny. Matka novorozence nesměla prodělat prenatální infekci s prokázaným nežádoucím účinkem na plod. Zneužívání drog matkou bylo důvodem k vyloučení ze studie. Všichni novorozenci se začali krmit orálně 7. den života.

Během klinické studie se do ní zařadilo celkem 120 novorozenců v prvních 7 dnech života. S výjimkou jednoho novorozence, který se převezl do jiné nemocnice krátce po té, co byl zařazen do studie (jako kontrola), všichni novorozenci (n=119) byli ve stejné nemocnici. Novorozenci se zařadili (naslepo náhodně) do tří skupin, přičemž dvě z nich dostávaly během hospitalizace kontrolní přípravek a jedna skupina dostala experimentální přípravek (viz příklad II). Ztráty novorozenců během hospitalizace se nahradily jinými novorozenci, kteří se zařadili do stejné ošetřované skupiny. Vzhledem k návrhu studie více novorozenců dostávalo kontrolní přípravek. Celkový počet jedinců krmených kontrolním přípravkem odpovídal více jak dvojnásobku dětí krmených experimentálním přípravkem.

Zjištění:

Neočekávaným zjištěním bylo, že vyšší výskyt nekrotizující enterokolitidy (NEC) bylo u kontrolních skupin ve srovnání s experimentální skupinou. Tabulka VI ukazuje celkový počet novorozenců podle druhu ošetření (kontrolní versus experimentální) a uvádí počet novorozenců v každé skupině, u kterých se vyvinulo onemocnění NEC. Jako výskyt onemocnění NEC nebo podezření na ně se hodnotí, jsou-li s ním konzistentní klinické znaky a příznaky, jako je abdominální rozšíření, gastrické zbytky, biliózní zvracení, stolice pozitivní na krev, přítomnost hlenu ve stolici a přítomnost C-reaktivního proteinu v koncentraci vyšší nebo rovné 0,05 mg/dl (Pourcyrous et al., „Significance of Serial C-reactive Protein Responses in Neonatal Infection and Other Diseases“, *Pediatr.*, 1993, 92: 431-435). Výskyt onemocnění NEC byl potvrzen u 15 kontrolních novorozenců a pouze u 1 novorozence z experimentální skupiny.

Tabulka VI: Výsledky klinické studie

	kontrolní	Experimentální
NEC*	15	1
Bez NEC	70	33
celkem	85	34

*nebo podezření výskytu NEC

Statistická analýza těchto dat za použití Fisherova přesného testu ukazuje, že počet novorozenců, u kterých se prokázalo onemocnění NEC v kontrolní skupině(ách) je významně vyšší ($p=0,039$) než počet novorozenců v experimentální skupině, u kterých se projevilo onemocnění NEC.

Příklad V:

V tomto experimentu se hodnotí zahrnutí AA a DHA do parenterální (intravenózní výživa) aplikace výživy. Parenterální roztok může obsahovat různé komponenty, v oboru známé, přičemž AA a DHA se dodávají ve formě fosfolipid, triglyceridů nebo metylesterů. AA a DHA mohou být jako jediné aktivní složky smíchány s běžným parenterálním vehikulem a excipientem nebo s výhodou jsou AA a DHA zahrnuty do parenterálního přípravku, určeného pro doplnění nebo dodání celkové výživy pro novorozence. Typické parenterální nutriční roztoky obsahují lipidy v množství poskytujícím asi 2g/kg/den. Množství AA a DHA ve směsi lipidů by mělo výhodně vyústit v aplikaci 10 až 30 mg/kg/den v případě AA a 3 až 15 mg/kg/den v případě DHA.

Příklad VI:

V tomto experimentu se vaječný lecitin ve experimentálním přípravku podle příkladu II nahradí sojovým lecitem přibližně v desetinásobném množství než obsahuje kontrolní přípravek. Sojový lecitin, podobně jako ostatní fosfolipidy získané z rostlinných zdrojů, neobsahuje žádné polynenasycené kyseliny s dlouhým řetězcem; polární charakter fosfolipidů a jejich schopnost snadného zabudování do střevní sliznice může

poskytovat ochranný účinek na střevní výstelku, a tak poskytovat výsledky srovnatelné s experimentálním přípravkem podle příkladu II. Navíc sojový lecitin obsahuje kyselinu linolovou ($18:2n-6$, nutričně významnou mastnou kyselinu, která je prekurzorem AA) a kyselinu linoleovou ($18:3n-3$, nutričně významnou mastnou kyselinu, která je prekurzorem DHA).

Příklad VII:

V tomto experimentu se porovnává použití fosfolipidů obsahujících AA a DHA a triglyceridů obsahujících AA a DHA. Přípravek podle příkladu II se porovnává s podobným přípravkem pro novorozence, kde vaječný fosfolipid se nahradí směsí triglyceridů jednobuněčných mikrobů, které obsahují srovnatelné množství AA a DHA.

Zdraví, donošení novorozenci byli zahrnuti v klinickém hodnocení, při němž se měřilo množství AA a DHA v krevním séru po enterální aplikaci. Očekává se, že novorozenci, kteří jsou krmeni fosfolipidovým přípravkem, dosáhnou množství AA a DHA v krevním séru, blíže se podobajícího obsahu zjištěnému u kojených novorozenců než v případě přípravku, jenž obsahuje AA a DHA ve formě triglyceridů. Tento experiment by měl ukázat, že fosfolipidy obsahující AA a DHA jsou preferovanou formou aplikace ve srovnání s triglyceridy, které obsahují AA a DHA. Vynález tedy zahrnuje zdokonalené enterální přípravky a způsoby zvýšení množství AA a DHA v krevním séru.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Použití jedné nebo více složek vybraných ze skupiny sestávající z

- a) alespoň jedné n-6 polynenasycené mastné kyseliny,
- b) popřípadě alespoň jedné n-3 polynenasycené mastné kyseliny,
- c) alespoň jednoho fosfolipidu a
- d) cholinu

k přípravě přípravku pro omezení výskytu nekrotizující enterokolitidy u kojence, který je vůči nekrotizující enterokolitidě náchylný, kde uvedená složka je přítomna v účinném množství v denní dávce tohoto přípravku.

2. Použití podle nároku 1, kde uvedená alespoň jedna n-6 polynenasycená mastná kyselina zahrnuje kyselinu arachidonovou a uvedená případná n-3 polynenasycená mastná kyselina zahrnuje kyselinu dokosahexaenovou.

3. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde se jedná o enterální přípravek.

4. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde se jedná o parenterální přípravek.

5. Použití podle nároku 3, kde se jedná o enterální přípravek obsahující kyselinu arachidonovou a kyselinu dokosahexaenovou v množství účinném pro dodání asi 1,0 až asi 60 mg/kg/den kyseliny arachidonové a asi 0,25 až asi 35 mg/kg/den kyseliny dokosahexaenové.

6. Použití podle nároku 3, kde hmotnostní poměr kyseliny arachidonové ke kyselině dokosahexaenové je v rozmezí asi 2 až asi 4.

7. Použití podle nároku 1, kde uvedená n-6 polynenasycená mastná kyselina a uvedená n-3 polynenasycená mastná kyselina jsou mastné kyseliny s dlouhým řetězcem nezávisle vybrané z jednoho nebo více zdrojů vybraných ze skupiny zahrnující vaječný lecitin, oleje hub, oleje řas a mořské oleje.

8. Použití podle nároku 1 nebo 2, kde uvedená n-6 polynenasycená mastná kyselina a uvedená n-3 polynenasycená mastná kyselina jsou použity ve formě fosfolipidů.

9. Použití podle nároku 4, kde uvedený parenterální roztok obsahuje v jednom litru alespoň 20 mg kyseliny arachidonové a alespoň 10 mg kyseliny dokosahexaenové a výhodně obsahuje v jednom litru asi 20 až 200 mg kyseliny arachidonové a asi 10 až 50 mg kyseliny dokosahexaenové.

10. Použití podle nároku 1, kde uvedený přípravek dále zahrnuje bílkoviny, uhlohydráty a fosfolipidy v množství dodávajícím denní dávku alespoň 2,0 mg n-6 polynenasycených mastných kyselin na kilogram a den a alespoň 0,5 mg uvedených případných n-3 polynenasycených mastných kyselin na kilogram a den.

11. Použití podle nároku 10, kde přípravek poskytuje alespoň 2,0 mg kyseliny arachidonové a alespoň 0,5 mg kyseliny dokosahexaenové na kilogram a den.

12. Použití podle nároku 11, kde uvedená enterální kompozice zahrnuje vaječný fosfolipid.

13. Použití podle nároku 1, zahrnující použití fosfolipidů v uvedeném přípravku v denním účinném množství pro dodání mezi 60 a 2400 μmol fosfolipidů na kilogram a den, výhodně mezi asi 200 a asi 1500 μmol fosfolipidů na kilogram a den.

14. Použití podle nároku 13, kde uvedené fosfolipidy jsou odvozeny z vaječného lecitinu.

15. Použití podle nároku 14, kde uvedené fosfolipidy se používají v kombinaci s jednou nebo více polynenasycenými mastnými kyselinami vybranými ze skupiny zahrnující kyselinu arachidonovou a kyselinu dokosahexaenovou, výhodně tak, že poskytují asi 200 až 1500 μmol fosfolipidu, asi 5,0 mg až 40 mg kyseliny arachidonové a asi 1,5 mg až asi 20 mg kyseliny dokosahexaenové na kilogram a den.

16. Použití podle nároku 1, kde se v uvedeném přípravku použije cholin v účinném množství poskytujícím mezi asi 60 a asi 1800 μmol cholinu na kilogram a den.

17. Použití podle nároku 16, kde uvedený cholin je ve formě fosfatidylcholinu, výhodně odvozeného z vaječného lecitinu.

18. Použití podle nároku 1, kde uvedený cholin se používá v kombinaci s jednou nebo více polynenasycenými mastnými kyselinami vybranými ze skupiny zahrnující kyselinu arachidonovou a kyselinu dokosahexaenovou, výhodně tak, že poskytuje asi 150 až asi 1200 μmol cholinu, asi 5,0 mg až 40 mg kyseliny arachidonové a asi 1,5 mg až asi 20 mg kyseliny dokosahexaenové na kilogram a den.

19. Způsob výroby enterálního přípravku obsahujícího fosfolipidy vaječného žloutku, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e zahrnuje:

a) získání suchého prášku vaječného fosfatidu, v podstatě prostého cholesterolu,

b) dispergaci uvedené fosfolipidové frakce ve vodné fázi za vzniku fosfolipidové disperze a

c) kombinování uvedené fosfolipidové disperze se suspenzí dalších komponent uvedeného enterálního přípravku.

20. Způsob podle nároku 19, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená disperze ve vodné fázi poskytuje asi 2 až asi 15 hmotnostních procent vaječného fosfatidu.

21. Způsob podle nároku 20, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e uvedená dispergace ve vodné fázi zahrnuje přidání prášku vaječného fosfatidu do vody při teplotě asi 20 až 50 °C.

22. Zdokonalený enterální přípravek obsahující kyselinu arachidonovou a kyselinu dokosahexaenovou, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e kyselina arachidonová a dokosahexaenová jsou ve formě fosfolipidů, přičemž přípravek je získán způsobem, který zahrnuje:

- a) přípravu 2 až 15% hm. vodné disperze uvedeného fosfolipidu,
- b) deaeraci uvedené disperze
- c) kombinování uvedené deaerované disperze s alespoň jedním členem vybraným ze skupiny, zahrnující bílkoviny, uhlohydráty, vitamíny a minerály za vzniku uvedeného enterálního přípravku a
- d) homogenizaci uvedeného enterálního přípravku.

23. Přípravek vhodný pro krmení kojenců zahrnující bílkoviny, uhlohydráty, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e lipidová směs obsahuje triglyceridy se středně dlouhým řetězcem a vaječný fosfolipid, přičemž uvedený vaječný fosfolipid je přítomen v množství v rozmezí přibližně 1 až 40 hmotnostních procent lipidové směsi a uvedený vaječný fosfolipid je v podstatě prostý cholesterolu.

24. Přípravek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e vaječný fosfolipid je přítomen v množství 5 až 30 hmotnostních procent lipidové směsi.

25. Přípravek podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e d á l e z a h r n u j e a r a c h i d o n o v o u k y s e l i n u v k o n c e n t r a c i a s i 10 a ž a s i 31 m g n a 100 k c a l.

26. Přípravek podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e d á l e z a h r n u j e k y s e l i n u d o k o s a h e x a e n o v o u v k o n c e n t r a c i a s i 3 a ž a s i 16 m g n a 100 k c a l.

27. Přípravek podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m, ž e u v e d e n á k y s e l i n a a r a c h i d o n o v á a k y s e l i n a d o k o s a h e x a e n o v á j s o u p ř í t o m n y v p o m ě r u a s i 4:1 a ž a s i 2:1.