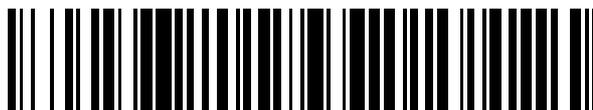


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 527 959**

51 Int. Cl.:

**A61K 35/20** (2006.01)

**A23C 9/14** (2006.01)

**A23C 9/15** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.12.2009 E 09831061 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **22.10.2014 EP 2370084**

54 Título: **Composiciones de permeado de leche humana y métodos para realizarlas y usarlas**

30 Prioridad:

**02.12.2008 US 119176 P**

**05.12.2008 US 193546 P**

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

**02.02.2015**

73 Titular/es:

**PROLACTA BIOSCIENCE, INC. (100.0%)**  
**605 E. Huntington Drive**  
**Monrovia, CA 91016, US**

72 Inventor/es:

**FOURNELL, JOSEPH;**  
**EAKER, SCOTT;**  
**ELSTER, SCOTT y**  
**RECHTMAN, DAVID J.**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

**ES 2 527 959 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Composiciones de permeado de leche humana y métodos para realizarlas y usarlas

### 5 **Campo técnico**

La presente divulgación se refiere a composiciones de permeado de leche humana concentrado, por ejemplo, composiciones que comprenden oligosacáridos de leche humana y métodos para preparar y usar dichas composiciones.

10

### **Antecedentes**

La leche humana es en general el alimento elegido para bebés prematuros y a término debido a su composición nutricional y beneficios inmunológicos. La fuente de la leche humana puede ser, por ejemplo, un donante o la madre del bebé. El valor nutricional de la leche de donante sin procesar o procesada convencionalmente, sin embargo, varía y, en la mayoría de los casos, no es suficiente para cumplir las necesidades de bebés prematuros. Además, existe la posibilidad de contaminación bacteriana, viral y otra de la leche de donante sin procesar. Incluso la leche de la propia madre con frecuencia no es nutricionalmente suficiente para el bebé prematuro. Con frecuencia es deseable alimentar a los bebés prematuros con leche que está enriquecida con diversos complementos, por ejemplo, oligosacáridos. Las composiciones que contienen oligosacáridos de leche humana también pueden ser útiles como complementos para bebés, niños y adultos que tienen o están en riesgo de desarrollar diversos trastornos y enfermedades, por ejemplo, infecciones o inmunodeficiencias, y que necesitan desarrollar y/o mantener una flora intestinal apropiada.

15

20

### 25 **Sumario**

La presente divulgación presenta composiciones de permeado de leche humana, por ejemplo, composiciones que incluyen oligosacáridos, péptidos y otras moléculas pequeñas humanos y métodos para realizar y usar dichas composiciones. Las composiciones de permeado pueden contener diversos niveles de componentes nutricionales y pueden usarse en la alimentación de bebés prematuros y a término, así como niños y adultos con diversos trastornos y/o enfermedades. Las composiciones se generan de, entre otros, partes filtradas de leche humana. Los presentes inventores han descubierto que sorprendentemente, el permeado (que se había pensado que era un producto residual sin valor nutricional significativo) contiene alto contenido biológicamente activo, incluyendo oligosacáridos humanos. Se ha descubierto que el contenido de oligosacáridos del permeado y los productos de leche humana descritos en la solicitud U.S.S.N. 11/947.580 (documento 2008/0124430), tanto naturales como concentrados, no diferían sustancialmente con respecto al tamaño y composición en comparación con la leche materna. Debido a que el material de partida, del que se obtiene el permeado, es leche humana agrupada, el permeado y otros productos de leche humana procesados (por ejemplo, los descritos en la solicitud U.S.S.N. 11/947.580) pueden contener más variedades de oligosacáridos que la leche materna individual. Por lo tanto, el permeado puede añadirse a leche no humana (por ejemplo bovina) y/o humana para aumentar su valor nutricional y/o inmunológico. El permeado también puede usarse para luchar contra infecciones, tratar enfermedades inflamatorias del intestino y ayudar a desarrollar y mantener una flora intestinal apropiada. El permeado también puede diluirse o concentrarse y usarse en formas tales como un complemento nutricional. Pueden obtenerse beneficios similares del permeado obtenido por el procesamiento de leche humana agrupada y administrándolo a bebés, por ejemplo, bebés prematuros (por ejemplo, leche humana agrupada descrita en la solicitud U.S.S.N. 11/947.580).

30

35

40

45

Los métodos presentados en el presente documento se usan para procesar grandes volúmenes de leche de donante, por ejemplo, aproximadamente 75-2.000 litros/lote de material de partida.

50

La presente invención es como se expone en las reivindicaciones. Se describe en el presente documento una composición que comprende leche y un permeado de leche humana. Opcionalmente, la leche es leche humana. Como alternativa, la leche es leche no humana, opcionalmente, la leche no humana es leche bovina. Como se describe en el presente documento el permeado de la composición puede obtenerse filtrando líquido de la leche humana. Como se describe en el presente documento, la composición puede obtenerse filtrando líquido de leche desnatada humana. Como se describe en el presente documento, la composición puede comprender además vitaminas y minerales.

55

También se describe en el presente documento una composición nutricional que comprende un permeado de leche humana concentrado o diluido. Opcionalmente, el permeado se obtiene filtrando líquido de leche humana. Como alternativa, el permeado se obtiene filtrando líquido de leche desnatada humana. Como se describe en el presente documento, la composición puede comprender además vitaminas y minerales.

60

La presente invención proporciona un método para realizar un permeado de leche humana concentrado, que comprende (a) obtener leche humana, (b) separar la leche en nata y leche desnatada; (c) filtrar la leche desnatada para obtener un permeado; (d) retener el permeado; y (e) concentrar el permeado. En algunas realizaciones, la

65

etapa de concentración en (e) comprende ósmosis inversa. En algunas realizaciones, el método para realizar un permeado de leche humana concentrado o diluido comprende además añadir vitaminas y minerales al permeado después de la etapa (d). En algunas realizaciones, el filtrado de la etapa (c) comprende ultrafiltración. En algunas realizaciones, el método para realizar un permeado de leche humana concentrado o diluido incluye además (f) reducir la carga biológica. En algunas realizaciones, la reducción de la carga biológica comprende pasteurización o filtración estéril.

También se describe en el presente documento un método para administrar una composición de permeado concentrado a un sujeto que comprende oligosacáridos de leche humana a un sujeto que comprende (a) obtener leche humana, (b) separar la leche en nata y leche desnatada; (c) filtrar la leche desnatada para obtener un permeado; (d) retener el permeado; y (e) administrar el permeado a un sujeto. Opcionalmente, el sujeto es un bebé humano prematuro o a término. Como se describe en el presente documento, la composición puede administrarse por vía tópica o por vía oral. Como se describe en el presente documento, la composición puede administrarse por vía oral mediante un tubo de alimentación.

También se describe en el presente documento un método para establecer flora intestinal beneficiosa en un sujeto que comprende administrar una composición de permeado que comprende oligosacáridos de leche humana a un sujeto. Como se describe en el presente documento, el sujeto puede ser un ser humano. Opcionalmente, el sujeto es un bebé humano prematuro o a término. Opcionalmente, el bebé humano prematuro o a término se alimenta con fórmula después del nacimiento. Como se describe en el presente documento, la composición puede administrarse antes de, simultáneamente con, o después de otras composiciones útiles para establecer una flora intestinal beneficiosa. Opcionalmente, las otras composiciones útiles para establecer una flora intestinal beneficiosa son bacterias probióticas o polisacáridos vegetales. Opcionalmente, la composición se administra junto con una formulación de leche no humana. Como se describe en el presente documento, la composición puede estar en una mezcla con una formulación de leche no humana. Como se describe en el presente documento, la composición puede ser un permeado de ultrafiltración de leche humana. Como se describe en el presente documento, el permeado puede obtenerse filtrando leche humana. Como se describe en el presente documento el permeado puede obtenerse filtrando leche desnatada humana. Como se describe en el presente documento, el establecimiento de la flora intestinal beneficiosa puede comprender poblar el intestino con bifidobacterias o lactobacilos o ambos.

También se describe en el presente documento un método para tratar a un sujeto que tiene una infección o está en riesgo de desarrollar una infección que comprende administrar una composición de permeado que comprende oligosacáridos de leche humana al sujeto. Como se describe en el presente documento, los síntomas de la infección pueden estar provocados por bacterias, toxinas bacterianas o virus. Como se describe en el presente documento, el sujeto puede ser un ser humano. Como se describe en el presente documento, el sujeto puede ser un neonato, bebé, niño o adulto humano. Como se describe en el presente documento, el tratamiento puede comprender aliviar al menos un síntoma de la infección. Opcionalmente el tratamiento comprende promover el desarrollo de bacterias intestinales beneficiosas. Como se describe en el presente documento, las bacterias intestinales beneficiosas pueden ser bifidobacterias o lactobacilos o ambos.

También se describe en el presente documento un método para tratar a un sujeto que padece una enfermedad inflamatoria del intestino, comprendiendo el método administrar una composición de permeado que comprende oligosacáridos de leche humana a un sujeto. Como se describe en el presente documento, la enfermedad inflamatoria del intestino puede ser una o más de enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino irritable, colitis ulcerosa (CU), colitis indeterminada, colitis microscópica, colitis colagenosa y colitis pseudomembranosa. Como se describe en el presente documento, el sujeto puede ser un ser humano. Como se describe en el presente documento el sujeto puede ser un neonato, bebé, niño o adulto humano. Opcionalmente, el tratamiento comprende aliviar al menos un síntoma de la enfermedad inflamatoria del intestino. Opcionalmente, el tratamiento comprende promover el desarrollo de bacterias intestinales beneficiosas. Como se describe en el presente documento, las bacterias intestinales beneficiosas pueden ser bifidobacterias o lactobacilos o ambas.

También se describe en el presente documento un método para realizar un complemento nutricional que comprende obtener una composición de permeado que comprende oligosacáridos de leche humana y complementar una formulación de leche no humana con la composición. Como se describe en el presente documento, la composición puede ser una composición de permeado de leche humana concentrado o diluido. Como se describe en el presente documento, la composición de permeado puede obtenerse filtrando líquido de leche humana. Como se describe en el presente documento, la composición de permeado puede obtenerse filtrando el líquido de la parte desnatada de la leche humana.

## Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 es un diagrama de un método para realizar un permeado de leche humana concentrado.

La Fig. 2 es un diagrama que muestra un sumario de la composición de oligosacáridos de las muestras 42, 48, 49, 53 y 54.

La Fig. 3 es un histograma de oligosacáridos de leche humana habituales hallados en la leche humana y en las muestras 42, 48, 54 (todo el producto final en bruto), 53 (permeado por ultrafiltración) y 49 (grupo inicial de leche

de donante).

La Fig. 4 es una gráfica que muestra un perfil espectrométrico de masas típico de oligosacáridos libres en leche humana. Los puntos redondos representan oligosacáridos de leche humana.

5 La Fig. 5 es una gráfica que muestra el perfil del espectro de masas obtenido para la muestra 42 (PROLACT+™H2MF™) (Véase el documento U.S.S.N. 11/947.580). Los puntos redondos representan oligosacáridos de leche humana.

La Fig. 6 es una gráfica que muestra el perfil del espectro de masas obtenido para la muestra 53 (producto secundario de proceso de PROLACT+™H2MF™ o permeado) (Véase el documento U.S.S.N. 11/947.580). Los puntos redondos representan oligosacáridos de leche humana.

10 La Fig. 7 es una representación gráfica del proceso de separación del permeado de la leche humana completa recogida.

### Descripción detallada

15 La presente divulgación presenta composiciones de permeado de leche humana, por ejemplo, composiciones que incluyen oligosacáridos, péptidos y otras moléculas pequeñas humanas y métodos para realizar y usar dichas composiciones. Las composiciones contienen diversos niveles de componentes nutricionales y pueden usarse en la alimentación de o administración a bebés prematuros y a término, así como a niños y adultos con diversos trastornos y/o enfermedades. Las composiciones se generan de, entre otras, partes filtradas de leche desnatada  
20 humana. Los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente, el permeado (que se había pensado que era un producto residual sin valor nutricional significativo) contiene un alto contenido biológicamente activo, incluyendo oligosacáridos humanos. Debido a que el material de partida, del que se obtiene el permeado, es leche humana agrupada, el permeado puede contener más formas moleculares discretas o tipos de oligosacáridos que la leche materna individual.

25 El permeado puede añadirse a leche no humana o humana para aumentar su valor nutricional. Por ejemplo, el permeado puede añadirse a agentes de refuerzo de leche humana y composiciones de leche normalizadas descritas en la solicitud U.S.S.N. 11/947.580, presentada el 29 de noviembre de 2007. El permeado también puede añadirse a fórmula de leche no humana, por ejemplo, formulaciones de leche bovina o mezclas de formulaciones de leche humana y no humana. Sin quedar ligado a la teoría, los inventores creen que las composiciones de permeado que comprenden oligosacáridos, péptidos y otras moléculas pequeñas de leche humana pueden usarse para promover el desarrollo de flora intestinal beneficiosa en bebés prematuros o neonatos y para mantener una flora intestinal apropiada en niños y adultos. El permeado también puede ser útil como un complemento para bebés, niños y adultos que tienen o están en riesgo de desarrollar diversos trastornos y enfermedades, por ejemplo, infecciones o inmunodeficiencias. El permeado puede diluirse o concentrarse y/o enriquecerse con vitaminas y minerales y usarse en dichas formas como un componente nutricional.

40 Los métodos presentados en el presente documento se usan para procesar grandes volúmenes de leche de donante, por ejemplo, aproximadamente 75-2.000 litros/lote de material de partida. Las composiciones de la presente divulgación se generan de leche de donante humano, por ejemplo, leche agrupada, que se somete a una exploración y procesamiento genético riguroso (por ejemplo, para reducir la carga biológica).

45 Por "permeado" (también denominado en el presente documento "composición de permeado" o un "producto secundario del procesamiento de la leche" o "productos secundarios de la leche") se entiende una parte de la leche que se ha procesado por filtración, por ejemplo, ultrafiltración, de leche humana, por ejemplo, leche desnatada. Normalmente, el tamaño de exploración usado en la ultrafiltración es de 1 Kda - 1.000 Kda de tamaño. El líquido que pasa a través de la filtración contiene una cantidad significativa de oligosacáridos y se denomina permeado.

50 Por "leche entera" se entiende leche de la que no se ha retirado grasa.

Por "leche desnatada" se entiende leche de la que se ha retirado al menos el 75 % de la grasa.

55 Las expresiones bebés "prematuros", "antes de término" y "de bajo peso al nacer (BPN)" se usan de forma intercambiable y se refieren a niños nacidos con menos de 37 semanas de edad gestacional y/o con pesos al nacer menores de 2500 g.

60 La expresión niño "a término" se usa para referirse a niños nacidos después de 37 semanas de edad gestacional y/o con pesos al nacer mayores de 2500 g. Por "carga biológica" se entiende los contaminantes microbiológicos y patógenos (generalmente vivos) que pueden estar presentes en la leche, por ejemplo, virus, bacterias, moho, hongos y similares.

### Composiciones de permeado y métodos para obtener dichas composiciones

65 Las composiciones de permeado presentadas en el presente documento se obtienen de leche humana, por ejemplo, leche de donante agrupada. Se describen métodos para obtener y explorar leche de donante humano (incluyendo la calificación de los donantes) en las solicitudes U.S.S.N. 11/947.580 y U.S.S.N. 11/526.127 (documento

2007/0098863).

La Fig. 1 muestra un método para obtener permeado de leche humana concentrado. Como se ha analizado anteriormente, la leche de donante se analiza cuidadosamente tanto para fines de identificación como para evitar la contaminación. La leche del donante se congela y, cuando se desea, se descongela y se agrupa. Después se explora (etapa 1 de la Fig. 1), por ejemplo, se explora genéticamente, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se realizó exploración genética para identificar cualquier contaminante, por ejemplo, viral, por ejemplo, VIH-1, VHB y/o VHC. La leche se somete después a filtrado, por ejemplo, a través de un filtro de aproximadamente 200 micrómetros (etapa 2) y tratamiento por calor (etapa 3). Por ejemplo, la composición puede tratarse a aproximadamente 63 °C o más durante aproximadamente 30 minutos o más. En la etapa 4, la leche se transfiere a un separador, por ejemplo, una centrífuga, para separar la nata de la leche desnatada. La leche desnatada puede transferirse a un segundo tanque de procesamiento en el que permanece a aproximadamente 2 a 8 °C hasta una etapa de filtración (etapa 5). Opcionalmente, la nata separada de la leche desnatada en la etapa 4 puede someterse a separación de nuevo para producir más leche desnatada.

Después de la separación de la nata y de la leche desnatada (etapa 4), puede añadirse una cantidad deseada de nata a la leche desnatada, y la composición se somete a filtración adicional (etapa 5), por ejemplo, ultrafiltración, por ejemplo, con un tamaño de poro entre 1-1000 Kda. Este proceso concentra los nutrientes en la leche desnatada separando por filtrado lo que previamente se creía que era en general agua o denominado como permeado. Los presentes inventores han descubierto, sin embargo, que el permeado conserva una cantidad significativa de oligosacáridos y puede usarse en sí mismo, por ejemplo, como un complemento nutricional o de otras maneras descritas en el presente documento.

La leche desnatada puede someterse adicionalmente a procesamiento para un agente de refuerzo de la leche humana o composición de leche humana normalizada, como se describe, por ejemplo, en el documento U.S.S.N. 11/947.580. Por ejemplo, la leche desnatada puede mezclarse con nata para obtener un producto final en bruto, pasteurizarse y procesarse con respecto a carga biológica. El permeado se retiene (etapa 6) y puede usarse como un complemento nutricional. La Figura 7 también representa la producción de un "permeado" y un "segundo permeado", este último producido por filtración adicional del "permeado".

El permeado puede procesarse adicionalmente por ejemplo, concentrarse y/o pasteurizarse. El permeado puede congelarse y almacenarse para su uso futuro. El permeado puede concentrarse por ósmosis inversa o secarse usando técnicas con las que están familiarizados los expertos en la materia. Los productos líquidos resultantes podrían después pasteurizarse, esterilizarse por filtración o someterse a otras etapas de reducción de la carga biológica. El producto se cargaría después en el recipiente de producto final.

El permeado también puede complementarse con vitaminas y/o minerales, por ejemplo, calcio, cloruro, cinc, cobre, hierro, manganeso, magnesio, fósforo, potasio, sodio, selenio, cromo, molibdeno, yodo, taurina, carnitina, colina, vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, niacina y m-inositol. Las vitaminas y minerales son importantes, por ejemplo, para una nutrición y desarrollo apropiados de un niño. Los oligoelementos se asocian con la división celular, función inmunitaria y el crecimiento. Algunos oligoelementos clave incluyen el cobre, magnesio y hierro (que es importante, por ejemplo, para la síntesis de hemoglobina, mioglobina y enzimas que contienen hierro). El cinc es necesario, por ejemplo, para el crecimiento, para la actividad de numerosas enzimas y para la síntesis de ADN, ARN y proteínas. El cobre es necesario para, por ejemplo, la actividad de varias enzimas. El manganeso es necesario, por ejemplo, para el desarrollo de hueso y cartílago y es importante la síntesis de polisacáridos y glucoproteínas. La vitamina A es una vitamina liposoluble esencial para, por ejemplo, el crecimiento, diferenciación celular, visión y el funcionamiento apropiado del sistema inmunitario. La vitamina D es importante, por ejemplo, para la absorción del calcio y, en menor grado, el fósforo, y para el desarrollo del hueso. La vitamina E (tocoferol) previene la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en la célula, evitando de este modo el daño tisular. El ácido fólico desempeña un papel, por ejemplo, en el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos. Por lo tanto, las composiciones de permeado pueden complementarse con diversos minerales y/o vitaminas, según se desee.

#### Aplicaciones

La presente divulgación presenta composiciones que incluyen permeado de leche humana concentrado y métodos para usar dichas composiciones. Las composiciones de permeado pueden obtenerse, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente filtrando líquido de leche desnatada. Las composiciones contienen un número significativo de oligosacáridos humanos, fucosilados y/o sialilados como se ha descrito en el Ejemplo 1 anterior. La leche humana también contiene péptidos y otras moléculas pequeñas que también pueden estar presentes en el permeado, por ejemplo, pueden obtenerse variando el tamaño de los poros durante la ultrafiltración. Debido a que el permeado deriva de leche humana agrupada, puede contener más formas de oligosacáridos que las halladas en la leche materna individual. Las composiciones de permeado pueden usarse solas o junto con otras composiciones de la leche, por ejemplo, composiciones de leche humana descritas en el documento U.S.S.N. 11/947.580 y fórmulas de leche no humana. El permeado o fórmulas de leche humana y no humana complementadas con permeado pueden administrarse a bebés prematuros o a término para, por ejemplo, promover el desarrollo de la flora intestinal

apropiada, tratar afecciones caracterizadas por inmunodeficiencia y tratar y prevenir infecciones. El permeado también puede administrarse a niños y adultos solo o junto con probióticos para promover una flora intestinal beneficiosa, tratar afecciones caracterizadas por inmunodeficiencia y tratar o prevenir infecciones. Pueden administrarse composiciones de permeado, por ejemplo, por vía oral o por vía tópica para tratar afecciones cutáneas.

*Oligosacáridos de leche humana*

Muchos factores pueden afectar al resultado clínico de un niño recién nacido, por ejemplo, nacido de forma prematura. Los bebés prematuros tienen sistemas inmunitarios vulnerables, sistemas digestivos inmaduros y mayores necesidades calóricas totales y de nutrientes específicos (en comparación en general con bebés a término). Por lo tanto, la nutrición proporcionada a dichos niños es un factor importante en su crecimiento y desarrollo. La leche humana se ha reconocido durante mucho tiempo como el alimento ideal para bebés prematuros y a término debido a su composición nutricional y beneficios inmunológicos. No todas las madres, sin embargo, pueden o quieren dar de mamar a su bebé (o usar un sacaleches y almacenar su leche). Por ejemplo, las madres que tienen ciertas enfermedades, por ejemplo, tuberculosis activa, o a las que se administran radioisótopos, antimetabolitos o quimioterapia pueden no dar de mamar a sus bebés. Además, la propia leche materna puede no contener suficiente contenido nutricional para mantener a un bebé prematuro. El uso de la leche de donante también puede ser problemático, ya que dicha leche puede no contener nutrición adecuada para un bebé prematuro.

La presente divulgación presenta composiciones de permeado que incluyen oligosacáridos de leche humana agrupada, y métodos para usar dichas composiciones para el beneficio, por ejemplo, de bebés humanos prematuros, bebés a término, niños y adultos.

Los oligosacáridos de leche humana son carbohidratos que contienen lactosa en el extremo reductor y, normalmente, una fucosa o un ácido siálico en el extremo no reductor (Morrow *et al.*, J. Nutrit. 135: 1304-07, 2005). Estos azúcares terminales son los restos que influyen más fuertemente en el crecimiento selectivo de bacterias y la interacción de oligosacáridos con otras moléculas o células, incluyendo patógenos bacterianos en la luz intestinal. Por ejemplo, los ácidos siálicos son componentes estructurales y funcionales de gangliósidos cerebrales y se han implicado en el desarrollo neurológico de bebés. Los oligosacáridos pueden estar libres o conjugados como glucoproteínas, glucolípidos, etc., y se clasifican como glucanos. Constituyen el tercer componente sólido más numeroso de la leche humana, después de la lactosa y los lípidos (Morrow *et al.*). La mayoría de estos oligosacáridos de la leche, sin embargo, no son digeribles por los bebés y pueden encontrarse en las heces de los bebés en su mayor parte intactos. La presente divulgación describe diversos usos de estos oligosacáridos presentes en el permeado de leche humana (que, de hecho, contiene una amplia diversidad de oligosacáridos ya que deriva de un grupo de leche donada), que se creía previamente que era un producto residual del procesamiento de la leche humana. El permeado o composiciones obtenidas del permeado pueden usarse (solos o en combinación con formulaciones de leche humana o no humana o en combinación con fármacos o prebióticos), por ejemplo, para promover la flora intestinal beneficiosa, luchar contra infecciones, aliviar síntomas de afecciones caracterizadas por inmunodeficiencia, y proporcionar nutrición adicional. Estas composiciones pueden ser beneficiosas para receptores de diversas edades: desde bebés prematuros hasta de niños a adultos.

*Flora intestinal*

La flora intestinal humana, es decir, bacterias halladas en el intestino, cumple diversas funciones, incluyendo la digestión de ciertos polisacáridos y el desarrollo del sistema inmunitario mucoso del intestino. Las bacterias intestinales pueden estimular el tejido linfoide asociado con la mucosa intestinal para producir anticuerpos para patógenos, dejando las especies útiles en paz, una tolerancia desarrollada en la infancia.

El tracto gastrointestinal de un feto normal es estéril. Durante el nacimiento y poco después, el intestino del bebé se coloniza por diversas bacterias. Las fuentes de las bacterias pueden ser el cuerpo de la madre y/o el ambiente. Después del nacimiento, diversas bacterias pueden transferirse de la madre al bebé mediante la lactancia y el tacto. La mayoría de los tratos gastrointestinales de los bebés se colonizan inicialmente por grandes números de *E. coli* y estreptococos. Con el tiempo, los bebés amamantados se ven dominados por bifidobacterias, mientras que los bebés alimentados con fórmula tienen diversas bacterias, incluyendo enterobacterias, enterococos, bifidobacterias, bacteroides y Clostridia en el intestino. Después de la introducción de alimento sólido y el destete, la microflora de bebés amamantados se hace similar a la de los bebés alimentados por fórmula. Aproximadamente a los dos años, la microflora fecal de los niños es similar a la de los adultos.

Dada la importancia de la flora intestinal, es crucial desarrollar una población bacteriana beneficiosa en el nacimiento y mantenerla durante la infancia y la vida adulta. Las composiciones y métodos presentados en el presente documento pueden ayudar en el establecimiento y el mantenimiento de dicha flora intestinal beneficiosa.

Las composiciones que incluyen oligosacáridos de leche humana, por ejemplo, permeado de leche humana o composiciones derivadas del permeado de leche humana, pueden administrarse a bebés prematuros, bebés a término, niños y adultos. Pueden administrarse solos o en combinación con otras composiciones que ayuden a

establecer una flora intestinal beneficiosa, por ejemplo, bacterias probióticas o polisacáridos vegetales prebióticos, para formar una composición simbiótica. Pueden administrarse como parte de formulaciones de leche humanas (por ejemplo, composiciones descritas en la solicitud U.S.S.N. 11/947.580) o fórmulas infantiles de leche no humana. Sin quedar ligado a la teoría, se cree que las presentes composiciones de permeado pueden promover la colonización del intestino por lactobacilos y/o bifidobacterias. Tanto los lactobacilos como las bifidobacterias se conocen como probióticos, bacterias que protegen a su hospedador y evitan enfermedades. Las bifidobacterias son bacterias anaerobias que ayudan en la digestión y se han asociado con una incidencia reducida de alergias y prevención del cáncer. Los lactobacilos son bacterias que convierten la lactosa y otros azúcares en ácido láctico y pueden poseer propiedades antiinflamatorias y antineoplásicas.

Adicionalmente, el permeado de leche humana o composiciones derivadas del permeado de leche humana de la presente invención que contienen oligosacáridos de leche humana pueden administrarse a niños o adultos para el tratamiento de enfermedad inflamatoria del intestino. La enfermedad inflamatoria del intestino es una expresión colectiva que abarca trastornos inflamatorios crónicos relacionados, pero distintos, del tracto gastrointestinal, tales como enfermedad de Crohn, enfermedad del intestino irritable, colitis ulcerosa, colitis indeterminada, colitis microscópica y colitis colagenosa. Se ha descubierto que los pacientes que padecen enfermedad de Crohn activa tienen bifidobacterias significativamente menos recuperables en sus heces en comparación con individuos sanos. Se ha observado que esta reducción de los números de bifidobacterias está correlacionada directamente con niveles reducidos de producción y actividad de  $\beta$ -D galactosidasa (Favier, C. *et al.*, Dig. Dis. Sci. 1997; 42: 817-822). La  $\beta$ -D galactosidasa es una enzima producida por bifidobacterias. Estos resultados apoyan las sugerencias propuestas en otros estudios de que las cepas de bifidobacterias pueden desempeñar papeles importantes en el mantenimiento de una microflora intestinal sana equilibrada. Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, la promoción de las colonias de colonización de bifidobacterias en el intestino por el permeado rico en oligosacáridos de la presente invención puede ser útil en el alivio de los síntomas de una enfermedad inflamatoria del intestino. De forma similar, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser útiles en el tratamiento de colitis pseudomembranosa (también conocida como colitis relacionada con *C. difficile*), una complicación habitual del tratamiento con antibióticos de amplio espectro prolongado que se debe al crecimiento excesivo de la flora normal por una cepa productora de toxinas de *C. difficile*. Las composiciones de permeado de la presente invención pueden administrarse antes, durante o después de cualquier otro tratamiento para enfermedad inflamatoria del intestino incluyendo formulaciones probióticas, medicamentos antiinflamatorios o inmunomoduladores.

#### *Infecciones*

Se cree que los oligosacáridos de la leche humana cumplen diversas funciones anti-infecciosas, por ejemplo, inhibir la unión de patógenos. Por lo tanto, las composiciones de permeado presentadas en el presente documento y que contienen una amplia diversidad de oligosacáridos de leche humana (ya que derivan de leche humana agrupada) pueden usarse para proteger a bebés, niños y adultos de diversos tipos de infecciones. Por ejemplo, los bebés prematuros y a término a los que se administran las presentes composiciones pueden protegerse de diarrea infecciosa, enterocolitis necrotizante (NEC), infecciones del tracto respiratorio, bacteriemia, meningitis y otros. Los niños y adultos pueden beneficiarse de forma similar de la administración de las composiciones. Las composiciones pueden administrarse después de una aparición de una infección, para aliviar y/o eliminar sus síntomas o antes de la infección (para individuos que se cree que están en riesgo). Las composiciones pueden administrarse mediante diversos medios, incluyendo por vía oral o por vía tópica (por ejemplo, para tratar infecciones cutáneas y otras afecciones cutáneas).

En general, las composiciones de permeado presentadas en el presente documento pueden administrarse a sujetos, por ejemplo, sujetos humanos de diversas edades, para cualquier afección o trastorno que se aliviaría o eliminaría por la aplicación de oligosacáridos, péptidos u otras moléculas pequeñas derivadas de la leche humana.

#### Kits

La presente divulgación también presenta kits que incluyen las composiciones de permeado de leche humana concentrado descritas en el presente documento y recipientes para mezclar las composiciones con leche humana o leche no humana sin procesar. Los recipientes pueden incluir frascos, por ejemplo, frascos graduados para ayudar en la dilución apropiada, jeringas, botes y otros recipientes conocidos en la técnica.

#### Ejemplo 1. Recogida y análisis de permeado de leche humana

Se recogió leche materna de donantes explorados por todos los Estados Unidos y se almacenó a -20 °C durante hasta 12 semanas. La leche humana de donantes agrupada se procesó y se analizaron diversas muestras para su composición de oligosacáridos. Se usaron grupos de 20-50 donantes para producir composiciones de refuerzo de leche humana descritas en la solicitud U.S.S.N. 11/947.580.

Antes del procesamiento, se apartó una muestra de leche de donante agrupada inicial para su análisis (muestra 49 en la Tabla III). La leche agrupada se exploró, se filtró, se trató por calor, se separó en nata y leche desnatada, y la leche desnatada se ultrafiltró. Una parte de la composición separada por filtración, el permeado, se apartó para su

análisis (muestra 53 en la Tabla IV). La leche desnatada se mezcló con nata y se pasteurizó. Una parte del producto final en bruto se apartó para su análisis (muestras 42, 48 y 54 en las Tablas I, II y V, respectivamente).

Cada muestra de leche que se apartó para su análisis (0,5 ml) se diluyó con 0,5 ml de agua pura y se centrifugó a 4000 rpm a 4 °C durante 30 minutos para separar la grasa. El permeado se analizó sin diluir. La fracción sin grasas se trató con 4 volúmenes (2:1) de una solución de cloroformo-metanol (v/v). La emulsión se centrifugó a 3500 rpm durante 30 minutos a 4 °C, y la capa de cloroformo inferior y la proteína desnaturalizada se descartaron. La capa superior se recogió, se añadieron dos volúmenes de etanol puro y la fracción proteica se dejó precipitar a 4 °C durante una noche.

Después de la separación de proteínas por centrifugación a 3500 rpm durante 30 minutos a 4 °C, se recogió la solución superior clara y se liofilizó. El polvo resultante (fracción rica en oligosacáridos liofilizada) se usó para análisis de oligosacáridos. Los oligosacáridos se redujeron a forma de alditol usando borohidruro sódico 1,0 M en agua desionizada y se incubó a 42 °C durante una noche. Después de la reacción, los oligosacáridos se purificaron de contaminantes por extracción de fase sólida usando un cartucho de carbono grafitizado no poroso (GCC-SPE). Los cartuchos de carbono grafitizado no poroso (150 mg de peso de lecho, 4 ml de tamaño de tubo) para desalar se obtuvieron de Alltech (Deerfield, IL, Estados Unidos). Se realizó evaporación de disolventes usando una centrífuga speedvac.

*Extracción de fase sólida.* Antes de su uso, cada cartucho de GCC-SPE se lavó con 3 volúmenes de columna de acetonitrilo al 80 % en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,05 % (v/v) seguido de 3 volúmenes de columna de agua desionizada. Después de cargar la mezcla de oligosacáridos en un cartucho, se retiraron las sales y los péptidos residuales lavando con 8 volúmenes de cartucho de agua desionizada. Los oligosacáridos se eluyeron después de la columna usando acetonitrilo al 10 % en agua (v/v) y acetonitrilo al 20 % en agua (v/v). Cada fracción (6 ml) se recogió y se evaporó al vacío antes de su análisis por MS.

*Análisis espectrométrico de masas.* Se realizó una espectrometría de masas de resonancia por ciclotrón de ión con transformada de Fourier (FT ICR MS) de desorción/ionización por láser asistida por matriz (MALDI) en un HiResMALDI (IonSpec Corp., Irvine, CA) equipado con una fuente de MALDI externa, un imán superconductor de 7,0 Tesla y un láser Nd:YAG pulsado (355 nm). Se usó ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB) como una matriz (5 mg/100 µl en una solución de acetonitrilo al 50 %/agua al 50 % (v/v)). La solución de oligosacárido (1 µl) se aplicó a la sonda de MALDI seguido de la adición de NaCl 0,01 M (0,5 µl) y la solución de matriz (1 µl). La muestra se secó bajo una corriente de aire y se sometió a espectrometría de masas.

Las composiciones de las diversas muestras analizadas anteriormente se presentan en la Tablas I-IV, y se muestra un sumario en la Fig. 2. Las relaciones de masa:carga experimentales ( $m/z$  expe) se ajustaron a las relaciones de masa:carga calculadas ( $m/z$  cal) para oligosacáridos conocidos en leche humana. Se muestran perfiles espectrométricos de masas de muestras específicas en las Tablas III-V (muestra de leche humana en la Tabla III, producto en bruto en la Tabla IV y permeado en la Tabla V). El análisis espectrométrico de masas de las cinco muestras reveló una mezcla altamente compleja de oligosacáridos, típica de leche humana, y de diverso tamaño, composición y abundancia.

Los oligosacáridos identificados fueron de dos clases principales: (1) oligosacáridos neutros que contienen galactosa, *N*-acetilglucosamina, lactosa y fuctosa (Hex, HexNAc y Fuc); y (2) oligosacáridos aniónicos que contienen las mismas composiciones de oligosacáridos con la adición de ácido *N*-acetilneuramínico (NeuAC). Una investigación previa (Ninonuevo *et al.*, J.Agric. Food Chem. 2008, 54: 7471-7480) identificó diversidad entre individuos en los números totales y abundancias relativas de oligosacáridos específicos en leche no filtrada. Por lo tanto, las muestras de leche analizadas (naturales o concentradas) confirmaron que todas las muestras muestran notablemente la mayoría de los oligosacáridos que previamente se había descubierto que eran habituales en la leche humana de diferentes donantes.

Tabla I

MUESTRA 42 (PRODUCTO FINAL EN BRUTO) OLIGASACÁRIDOS									
m/z expe	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAC	m/z cal	Error	Modo	Forma	abund.
1389,477	4	2	2	0	1389,501	-0,0246	Na	Alditol	100
1243,419	4	1	2	0	1243,443	-0,0239	Na	Alditol	79,32
1754,611	5	2	1	0	1754,633	-0,0228	Na	Alditol	36,36
1608,563	5	1	3	0	1608,576	-0,013	Na	Alditol	22,4
1900,682	5	3	3	0	1900,691	-0,0095	Na	Alditol	18,22
1535,545	4	3	2	0	1535,559	-0,0144	Na	Alditol	17,4
878,3013	3	1	1	0	878,3111	-0,0098	Na	Alditol	15,74
1097,368	4	0	2	0	1097,385	-0,0176	Na	Alditol	14,48
732,245	3	0	1	0	732,2532	-0,0082	Na	Alditol	13,02
1024,361	3	2	1	0	1024,369	-0,0083	Na	Alditol	6,88
1462,514	5	0	3	0	1462,518	-0,0041	Na	Alditol	4,29

ES 2 527 959 T3

1556,519	4	1	2	1	1556,521	-0,0021	1 Na	Alditol	3,48
2119,781	6	2	4	0	2119,766	0,0156	Na	Alditol	2,72
2046,765	5	4	3	0	2046,749	0,0154	Na	Alditol	2,24
1557,524	4	3	2	0	1557,541	-0,0168	1 Na	Alditol	2,21

Tabla II

MUESTRA 48 (PRODUCTO FINAL EN BRUTO) OLIGASACÁRIDOS									
m/z expe	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAC	m/z cal	Error	Modo	Forma	abund.
1389,474	4	2	2	0	1389,501	-0,0274	Na	Alditol	100
1754,609	5	2	3	0	1754,633	-0,0243	Na	Alditol	15,63
1462,519	3	5	1	0	1462,543	-0,0239	Na	Alditol	1,27
1243,422	4	1	2	0	1243,443	-0,0212	Na	Alditol	73,84
1405,476	5	1	2	0	1405,496	-0,0202	Na	Alditol	1,45
1900,672	5	3	3	0	1900,691	-0,0198	Na	Alditol	10,32
1535,54	4	3	2	0	1535,559	-0,0196	Na	Alditol	23,25
1097,373	4	0	2	0	1097,385	-0,0129	Na	Alditol	11,85
1608,567	5	1	3	0	1608,576	-0,0089	Na	Alditol	6,79
1024,364	3	2	1	0	1024369	-0,0047	Na	Alditol	14,85
878,3075	3	1	1	0	878,3111	-0,0036	Na	Alditol	24,05
2046,746	5	4	3	0	2046,749	-0,0031	Na	Alditol	1,28
732,2536	3	0	1	0	732,2532	0,0004	Na	Alditol	14,72
1462,519	5	0	3	0	1462,518	0,0012	Na	Alditol	1,27
1081,392	3	1	2	0	1081,391	0,0015	Na	Alditol	1,99
513,1818	2	1	0	0	513,1789	0,0029	Na	Alditol	9,19
935,3364	3	0	2	0	935,3326	0,0038	Na	Alditol	1,26
659,2407	2	2	0	0	659,2368	0,0039	Na	Alditol	1,08

Tabla III

MUESTRA 49 (GRUPO INICIAL DE LECHE DE DONANTE) OLIGASACÁRIDOS									
m/z expe	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAC	m/z cal	Error	Modo	Forma	abund.
1388,972	4	3	3	0	13	-0,0202	Na	Alditol	100
1754,608	5	2	3	0	1754,633	-0,0258	Na	Alditol	5,1
1243,423	4	1	2	0	1243,443	-0,0207	Na	Alditol	4,1
1900,671	5	3	3	0	1900,691	-0,0202	Na	Alditol	1,48
1535,542	4	3	2	0	1535,559	-0,0169	Na	Alditol	5,9
1608,562	5	1	3	0	1608,576	-0,0139	Na	Alditol	3,6
1097,377	4	0	2	0	1097,385	-0,0084	Na	Alditol	10,5
1024,364	3	2	1	0	1024,369	-0,0054	Na	Alditol	14,7
1462,513	5	0	3	0	1462,518	-0,0042	Na	Alditol	1,2
878,3073	3	1	1	0	878,3111	-0,0038	Na	Alditol	26
732,2535	3	0	1	0	732,2532	0,0003	Na	Alditol	14,2
513,1826	2	1	0	0	513,1789	0,0037	Na	Alditol	8,9
659,241	2	2	0	0	659,2368	0,0042	Na	Alditol	1,66

5

Tabla IV

MUESTRA 53 (PERMEADO) OLIGASACÁRIDOS									
m/z expe	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAC	m/z cal	Error	Modo	Forma	abund.
1973,685	6	1	4	0	1973,708	-0,0229	Na	Alditol	100
2119,75	6	2	4	0	2119,766	-0,0152	Na	Alditol	89,8
1608,564	5	1	3	0	1608,576	-0,0116	Na	Alditol	69,33
1754,626	5	2	3	0	1754,633	-0,0077	Na	Alditol	54,88
1827,651	6	0	4	0	1827,65	0,0009	Na	Alditol	41,26
2265,835	6	3	4	0	2265,824	0,0119	Na	Alditol	34,5
1462,52	5	0	3	0	1462,518	0,0022	Na	Alditol	28,01
1900,709	5	3	3	0	1900,691	0,0177	Na	Alditol	15,16
2484,931	7	2	5	0	2484,898	0,0334	Na	Alditol	15,12
2338,868	7	1	5	0	2338,84	0,028	Na	Alditol	14,2
1243,447	4	1	2	0	1243,443	0,0039	Na	Alditol	13,39
1389,508	4	2	2	0	1389,501	0,0069	Na	Alditol	11,41
732,2539	3	0	1	0	732,2532	0,0007	Na	Alditol	8,37
2631,035	7	3	5	0	2630,956	0,0792	Na	Alditol	4,85
2192,827	7	0	5	0	2192,782	0,0447	Na	Alditol	4,82
2411,932	6	4	4	0	2411,881	0,0504	Na	Alditol	3,39

2704,042	8	1	6	0	2703,972	0,0697	Na	Alditol	2,85
1556,543	4	1	2	1	1556,521	0,0227	Na	Alditol	2,67
2850,121	8	2	6	0	2850,03	0,0908	Na	Alditol	2,16
570,2012	2	0	1	0	570,2004	0,0008	Na	Alditol	1,94
1097,392	4	0	2	0	1097,385	850,0063	Na	Alditol	1,82
2557,988	8	0	6	0	2557,914	0,0739	Na	Alditol	1,28
1300,476	4	0	3	0	1300,465	0,011	Na	Alditol	1,19
659,2383	2	2	0	0	659,2368	0,0015	Na	Alditol	1,16
513,1802	2	1	0	0	513,1789	0,0013	Na	Alditol	1,01

Tabla V

MUESTRA 54 (PRODUCTO FINAL EN BRUTO) OLIGASACÁRIDOS									
m/z expe	Hex	HexNAc	Fuc	NeuAc	m/z cal	Error	Modo	Forma	abund.
513,1576	2	1	0	0	513,1789	-0,0213	Na	Alditol	12,82
659,2137	2	2	0	0	659,2368	-0,0231	Na	Alditol	1,38
570,1783		0	1	0	570,2004	-0,0221	Na	Alditol	4,24
878,2782	3	1	1	0	878,3111	-0,0329	Na	Alditol	20,97
1024,338	3	2	1	0	1024,369	-0,0309	Na	Alditol	8,82
732,2245	3	0	1	0	732,2532	-0,0287	Na	Alditol	16
935,3093	3	0	2	0	935,3326	-0,0233	Na	Alditol	1,16
1243,39	4	1	2	0	1243,443	-0,0536	Na	Alditol	76,72
1389,445	4	2	2	0	1389,501	-0,0567	Na	Alditol	100
1535,524	4	3	2	0	1535,559	-0,0348	Na	Alditol	19,2
1097,334	4	0	2	0	1097,385	-0,0511	Na	Alditol	14,86
1608,547	5	1	3	0	1608,576	-0,029	Na	Alditol	19,86
1754,592	5	2	3	0	1754,633	-0,0416	Na	Alditol	36,7
1900,669	5	3	3	0	1900,691	-0,0225	Na	Alditol	24,32
2046,773	5	4	3	0	2046,749	0,0236	Na	Alditol	4,32
1462,497	5	0	3	0	1462,518	-0,0204	Na	Alditol	3,8
1973,729	6	1	4	0	1973,708	0,0213	Na	Alditol	1,66
2119,792	6	2	4	0	2119,766	0,0261	Na	Alditol	4,15
2265,855	6	3	4	0	2265,824	0,0314	Na	Alditol	4,45
2411,941	6	4	4	0	2411,881	0,0596	Na	Alditol	1,3

m/z expe: masa/carga experimental, m/z cal: masa/carga calculada, Hex: hexosa;  
HexNAc: N-acetilhexosamina; Fuc: fucosa; NeuAc: ácido N-acetil-neuramínico o ácido siálico.

5 Parece que el producto de leche humana procesada (agente de refuerzo o muestras 42, 48 y 54) y el permeado (muestra 53) contienen la serie completa de oligosacáridos hallados habitualmente en la leche humana. La selección y las cantidades de los oligosacáridos individuales presentes en estas muestras reflejan las cantidades relativas en el grupo donante que promedian la variación entre donantes individuales.

10 Por lo tanto, de acuerdo con la presente invención, el permeado es una fuente valiosa de oligosacáridos de leche humana que puede usarse como un complemento nutricional o inmunológico para bebés prematuros, bebés, niños y adultos.

#### Ejemplo 2. Perfil de oligosacáridos de muestras de permeado agrupado

15 Se analizaron seis muestras de permeado agrupado con respecto al contenido de oligosacáridos específico (Tabla VI). Cada una de las muestras de permeado agrupado derivó de leche agrupada recibida de múltiples donantes por el método analizado anteriormente en el Ejemplo 1. Las muestras recogidas de permeado se analizaron por espectrometría de masas por el método descrito anteriormente en el Ejemplo 1, para detectar la presencia (1) o ausencia (0) de los oligosacáridos específicos indicados. Los oligosacáridos se representan en la Tabla VI por sus relaciones de masa/carga.

20

Tabla VI

m/z expe de Oligos	Muestra de Permeado Nº 5	Muestra de Permeado Nº 11	Muestra de Permeado Nº 23	Muestra de Permeado Nº 28	Muestra de Permeado Nº 47	Muestra de Permeado Nº 53
513	0	0	1	0	1	0
732	1	1	1	1	1	1
878	1	1	1	1	1	1
935	0	0	1	0	0	1
1024	1	1	1	1	1	0

1097	1	1	1	1	1	1
1243	1	1	1	1	1	1
1389	1	1	1	1	1	1
1462	1	1	1	0	1	1
1535	0	0	1	0	1	0
1556	0	0	0	0	0	1
1608	1	0	1	1	1	1
1754	0	1	1	1	0	1
1827	1	0	0	0	0	1
1900	0	1	0	0	0	1
1973	1	0	0	1	0	1
2119	1	1	0	1	0	1
2192	0	0	0	0	0	1
2264	0	0	0	0	0	1
2338	0	0	0	0	0	1
2411	0	0	0	0	0	1
2485	0	0	0	0	0	1
2631	0	0	0	0		1

1 = oligosacárido presente en la muestra  
0 = oligosacárido no detectable en la muestra

5 Parece que, aunque hay solapamiento entre las muestras con respecto a ciertos oligosacáridos (es decir, los oligosacáridos 732, 878, 1097, 1243 y 1389 están presentes en las seis muestras), hay también muchos oligosacáridos presentes en ciertas muestras que no están presentes en otras muestras (es decir, el oligosacárido 935 está presente en los números de permeado 23 y 53 pero no en los números de permeado 5, 11, 28 o 47). Por lo tanto, puede ser necesario agrupamiento adicional de las muestras de permeado agrupado para obtener una composición con todas o prácticamente todas las especies de oligosacáridos representadas.

10 Ejemplo 3. Administración de composiciones de permeado

Como se ha analizado anteriormente, los inventores creen que las composiciones de permeado de leche humana de leche agrupada pueden proporcionar una amplia diversidad de beneficios nutricionales e inmunológicos, ya que son una fuente de una mayor diversidad de oligosacáridos que los hallados en la leche materna individual. También pueden contener diversos tipos de péptidos y otras moléculas pequeñas beneficiosas.

15 Las composiciones de permeado de leche humana aislada se administrarán a bebés, tanto bebés prematuros como a término, para promover su desarrollo de la flora intestinal apropiada, aliviar y/o eliminar infecciones. El estudio investigará a bebés divididos en 5 ramas incluyendo bebés que reciben:

- 20
1. Leche materna más un agente de refuerzo.
  2. Leche de vaca más permeado
  3. Leche de vaca más la cepa 1 de bifidobacteria
  4. Leche de vaca más la cepa 2 de bifidobacteria
  5. Leche de vaca más oligosacárido fructosa no derivado de leche

25 La composición de las heces de los bebés se controlará para determinar el contenido de su flora intestinal. Los bebés que padezcan infecciones provocadas por patógenos, por ejemplo, bacterias, toxinas bacterianas y virus se beneficiarán particularmente de la administración oral de las composiciones de permeado. Se espera que la flora intestinal de los bebés que reciban leche de vaca más permeado imite más estrechamente la flora intestinal de  
30 bebés que reciban leche materna más agente de refuerzo.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Un complemento nutricional para administración a un ser humano, que comprende permeado de leche humana concentrado y filtrado a partir de leche humana.
2. El complemento nutricional de la reivindicación 1, en el que el permeado de leche humana se filtra de leche humana agrupada de dos o más donantes
- 10 3. El complemento nutricional de la reivindicación 1, que comprende además vitaminas y minerales.
4. Un método para realizar permeado de leche concentrado humano, que comprende:
- 15 (a) obtener leche humana;  
(b) separar la leche en nata y leche desnatada;  
(c) filtrar la leche desnatada para obtener un permeado;  
(d) retener el permeado; y  
(e) concentrar el permeado.
- 20 5. El método de la reivindicación 4, en el que la etapa de concentración en (e) comprende ósmosis inversa.
6. El método de la reivindicación 4, que comprende además añadir vitaminas y minerales al permeado.
7. El método de la reivindicación 4, en el que la filtración comprende ultrafiltración.
- 25 8. El método de la reivindicación 4, que comprende además filtración estéril o pasteurización del permeado.
9. El método de la reivindicación 4, que comprende además la purificación de oligosacáridos del permeado.
- 30 10. Una composición que comprende un permeado de leche humana para uso en un método de tratamiento que establece la flora intestinal beneficiosa o para uso en un método de tratamiento de una enfermedad inflamatoria del intestino seleccionada de enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, colitis indeterminada, colitis microscópica, colitis colagenosa y enfermedad del intestino irritable en un sujeto, comprendiendo el método administrar el permeado de leche humana al sujeto.
- 35 11. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el permeado de leche humana está concentrado.
- 40 12. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la flora intestinal beneficiosa comprende bifidobacterias o lactobacilos o ambos.
- 45 13. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que en el método el permeado de leche humana se administra simultáneamente con formulaciones de leche no humana o se mezcla con formulaciones de leche no humana o se administra antes, después o durante la administración con una segunda composición para establecer la flora intestinal, en donde la segunda composición comprende una bacteria probiótica, un polisacárido vegetal o ambos.
14. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que el sujeto es un bebé prematuro, un bebé o un adulto.
- 50 15. La composición para uso de acuerdo con la reivindicación 10, en la que en el método el permeado de leche humana se administra por vía oral o mediante un tubo de alimentación.

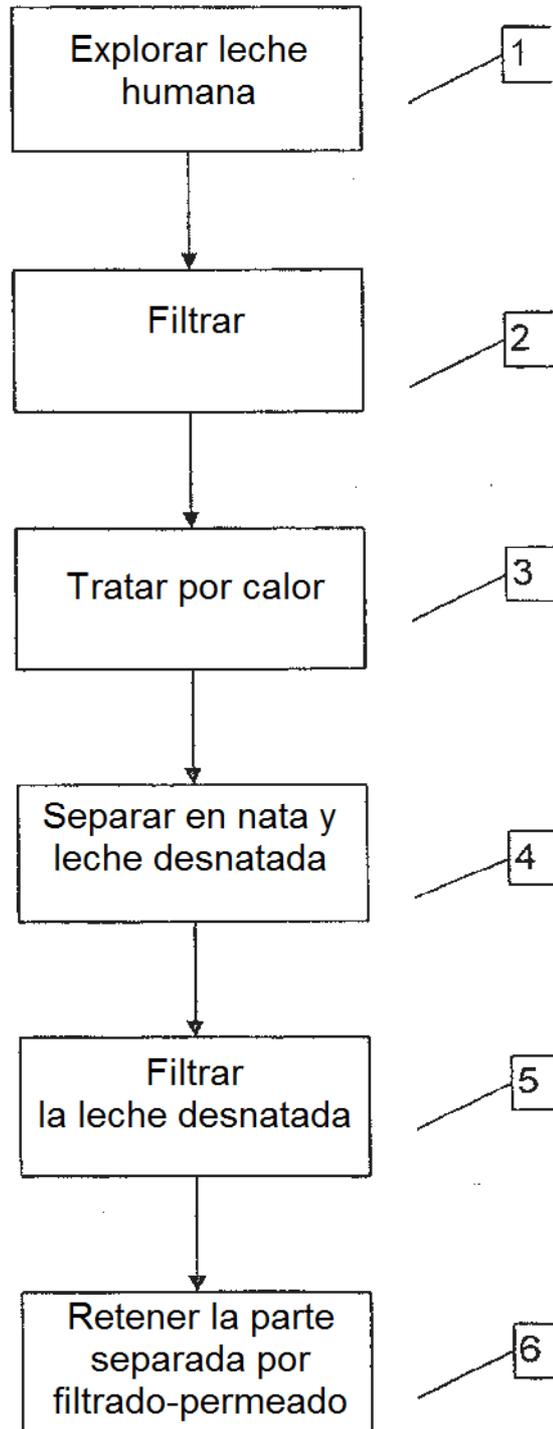


FIG. 1

SUMARIO

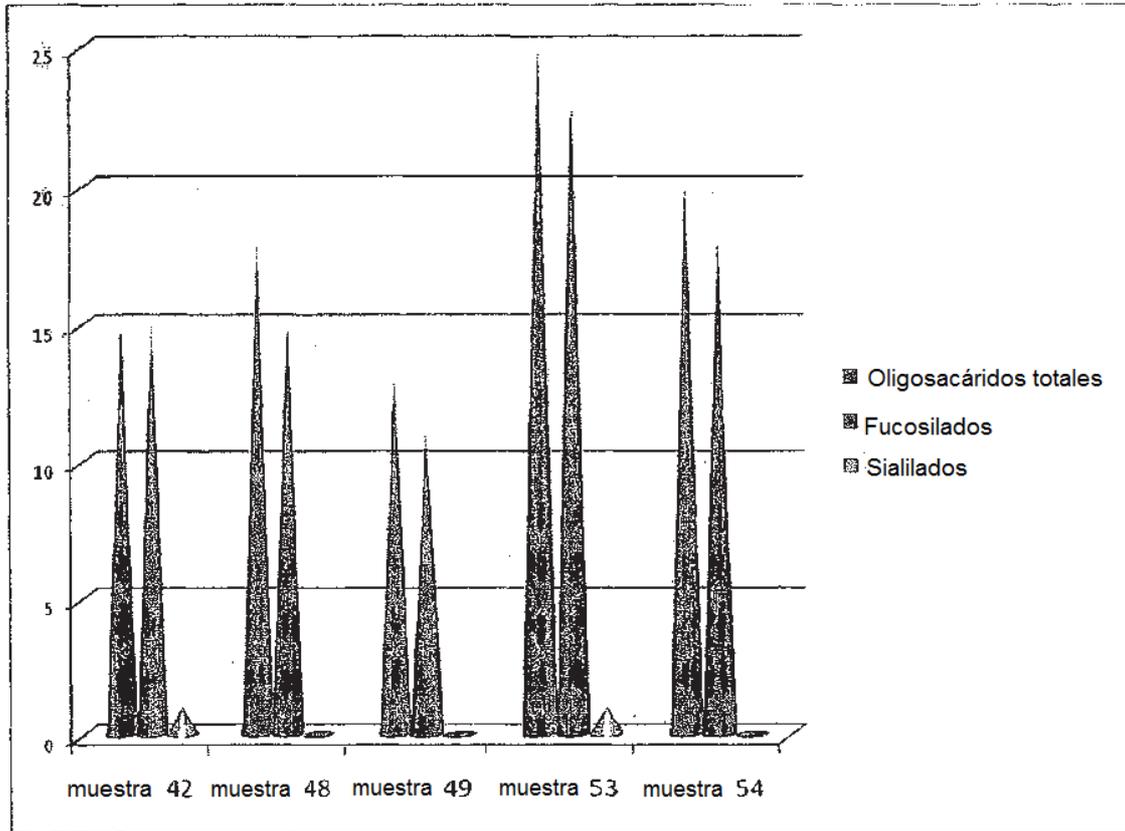


Figura 2

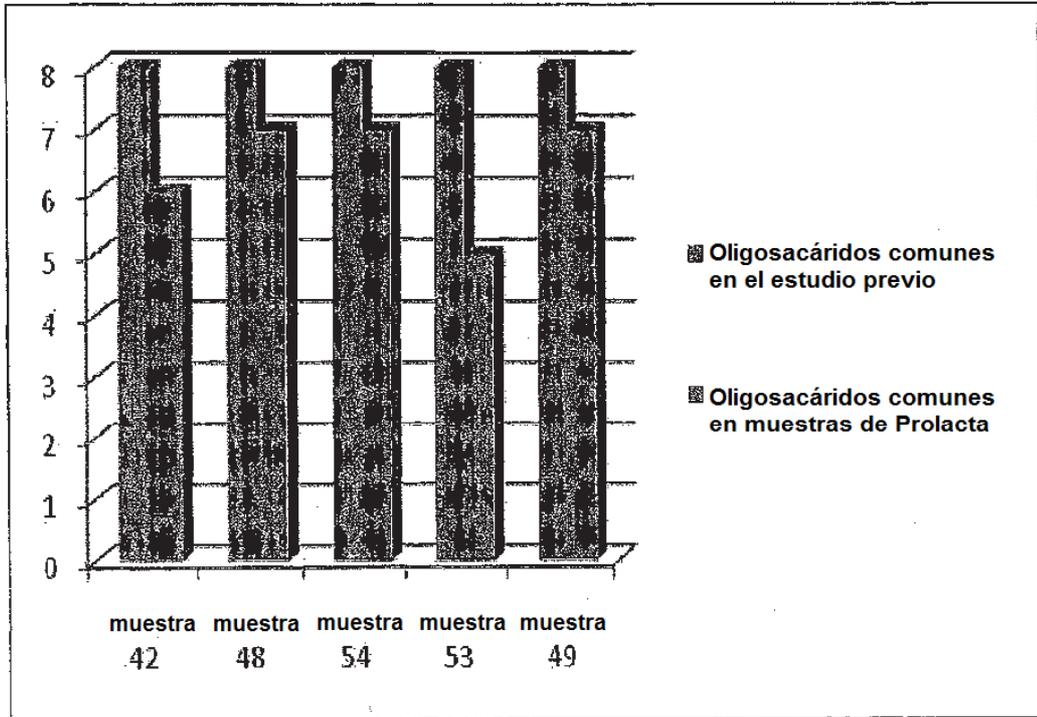


Figura 3

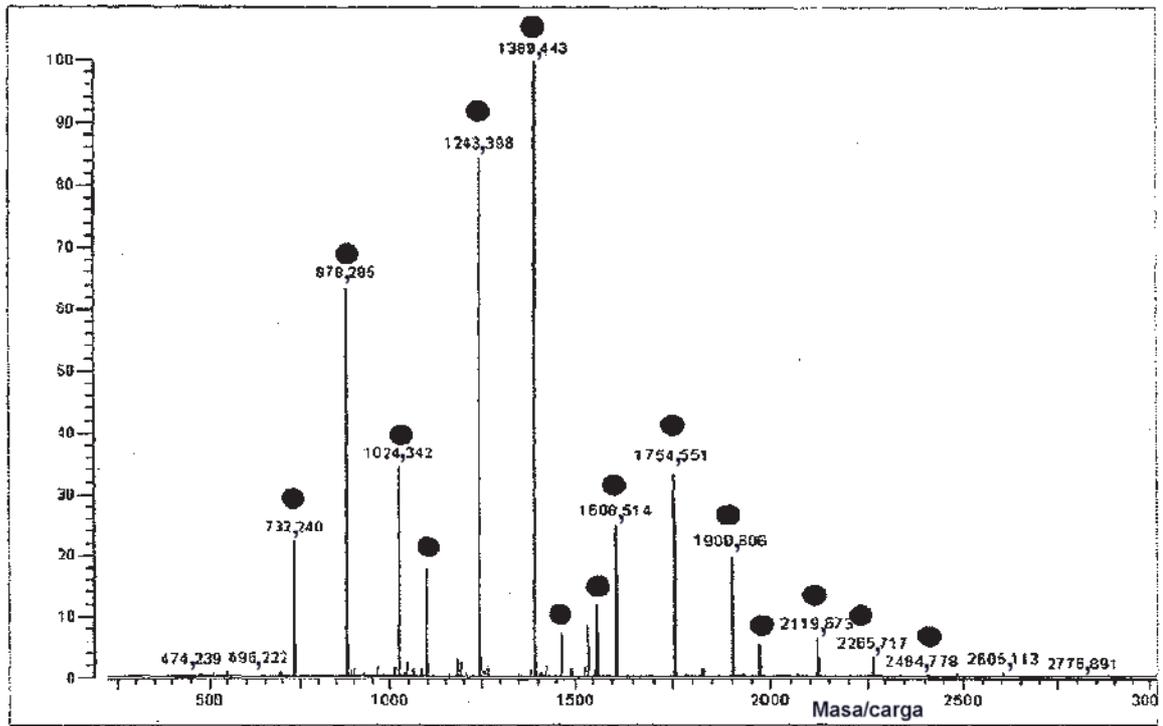


Figura 4

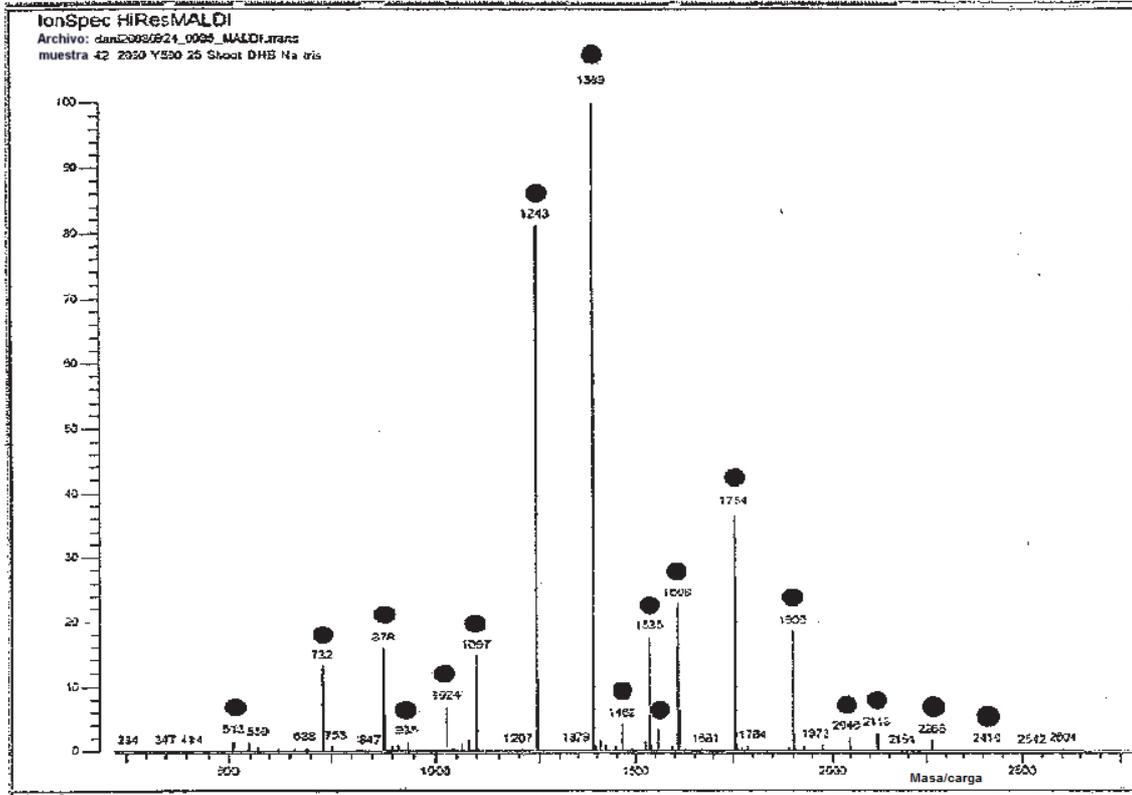


Figura 5

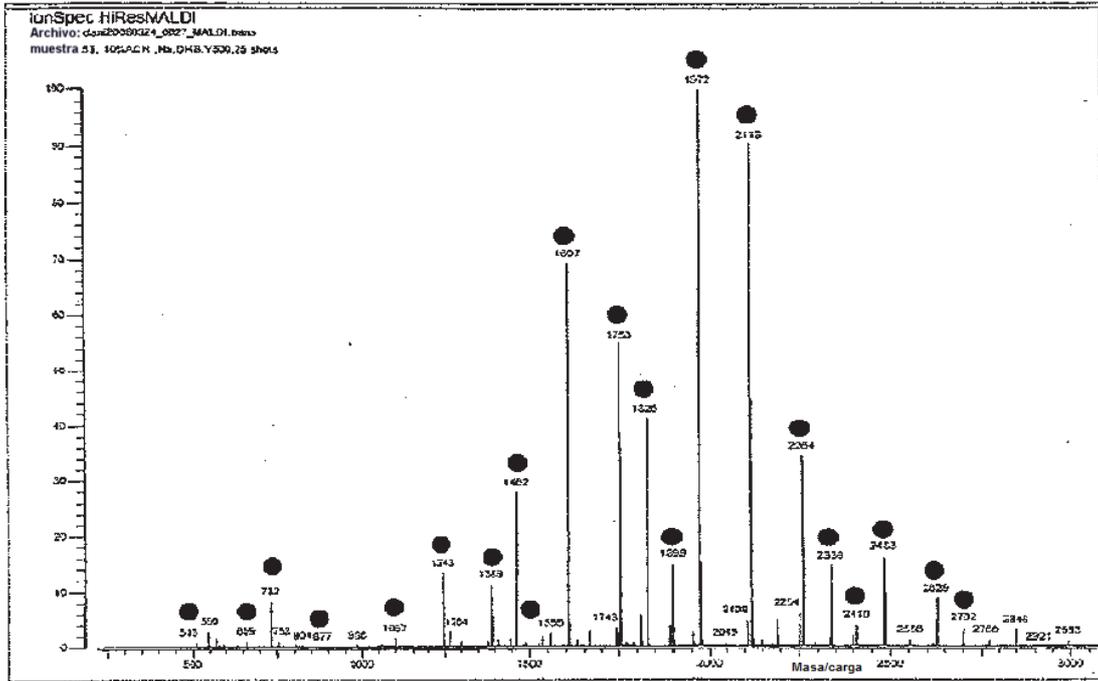


Figura 6

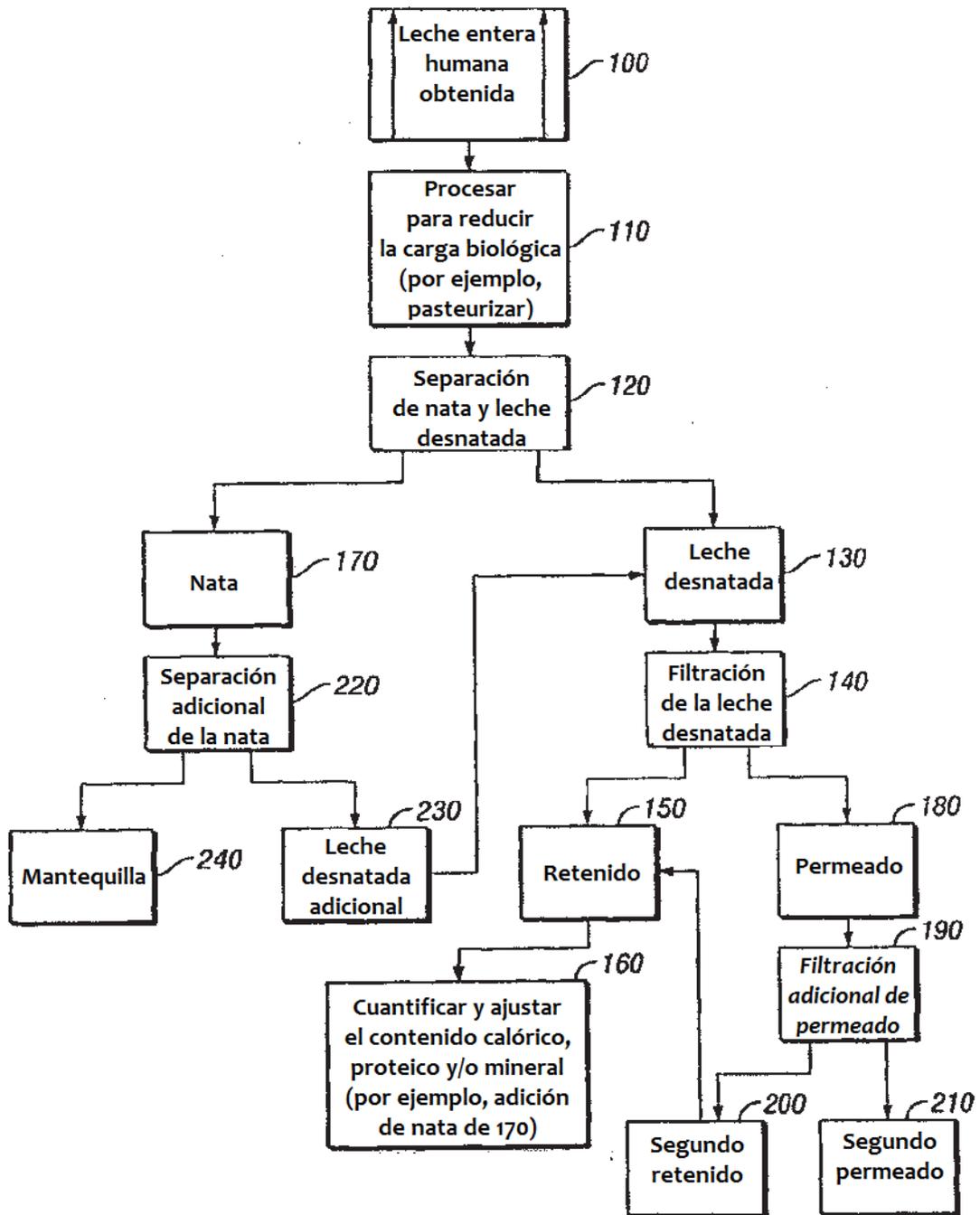


Figura 7