

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 603 328**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/43** (2006.01)

**A61P 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.10.2010 PCT/EP2010/065916**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.04.2012 WO12052060**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.10.2010 E 10773032 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016 EP 2629790**

54 Título: **Método para incrementar la tasa de crecimiento de lactantes humanos**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.02.2017**

73 Titular/es:  
**SWEDISH ORPHAN BIOVITRUM AB (PUBL)**  
**(100.0%)**  
**112 76 Stockholm, SE**

72 Inventor/es:  
**HERNELL, OLLE;**  
**STRÖMBERG, PATRIK;**  
**SVENSSON, LENNART;**  
**TIMDAHL, KRISTINA;**  
**VAGERÖ, MÁRTEN;**  
**ÖHMAN, MARIA y**  
**OLSSON, BIRGITTA**

74 Agente/Representante:  
**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 603 328 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

Método para incrementar la tasa de crecimiento de lactantes humanos

## CAMPO TÉCNICO

- 5 La presente invención se refiere a una lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares para uso en el incremento de la tasa de crecimiento de un lactante humano prematuro, comprendiendo dicho método la administración entérica a dicho lactante de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares (rhBSSL). Tal método tiene particular utilidad para lactantes prematuros humanos que son pequeños para su edad gestacional.

## ANTECEDENTES

- 10 Los lactantes que nacen con un peso inferior a 2.500 g se consideran de bajo peso al nacer (BPN), y tienen un mayor riesgo que los recién nacidos de problemas de salud graves, incapacidades permanentes e incluso de muerte. Ciertos lactantes BPN se pueden clasificar además en lactantes con muy bajo peso al nacer (MBPN), que nacen con menos de 1.500 g, y lactantes con extremadamente bajo peso al nacer (EBPN), que nacen con menos de 1000 g. La tasa de recién nacidos con BPN muestra diferencias por todo el mundo. Por ejemplo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estimaba que el 16,5% de los nacimientos en regiones menos desarrolladas en el año 2000 fueron BPN. En contraste, aproximadamente 1 de cada 12 (8,3%) bebés en 2005 en los Estados Unidos, nació BPN (Martin et al., 2007; National Vital Statistics Reports, 56 (6)) y en Inglaterra y Gales, la tasa global de bebés BPN se ha descrito como del 7,3% (Doyle, 2000; BMJ, 320: 941-942). La tasa de bebés BPN se está incrementando, especialmente en regiones más desarrolladas, tales como Estados Unidos, lo que se cree que principalmente es el resultado de un aumento en el parto prematuro de embarazos múltiples concebidos artificialmente.

- 20 Muchos bebés BPN requieren una atención especializada en unidades de cuidados intensivos neonatales (UCINs), ya que son especialmente susceptibles a problemas de salud (por ejemplo, como se informa en McIntire et al., 1999; N Engl J Med, 340: 1234-1238) incluyendo síndrome de dificultad respiratoria (SDR), ataques de cianosis, hemorragia cerebral (hemorragia intraventricular, HIV), parálisis cerebral, problemas cardíacos como conducto arterioso persistente (CAP), hipocalcemia, hipoglucemia, problemas intestinales como enterocolitis necrotizante (ECN), ictericia y problemas de desarrollo de la retina, tales como retinopatía del prematuro (ROP). Una variedad de estudios han detectado que el costo de la atención para el cuidado neonatal se eleva abruptamente a medida que disminuye el peso al nacer, en donde un estudio estadounidense estima que los costes neonatales son de 224.400 dólares para un recién nacido con un peso al nacer de 500 - 700 g, en comparación con solo 1000 dólares para un bebé que nace con un peso superior a 3.000 g, y una estimación de más de 50 mil millones de dólares en costos anuales para tal atención recibida en los Estados Unidos. Además de estos cuidados intensivos, se ha descrito que el nacimiento con un peso inferior al normal está asociado con una serie de problemas de salud a medio plazo, que incluyen: (a) ganancia de peso y crecimiento de la cabeza deficientes en la infancia (Gutbrod et al., 2000; Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 82: 208-214); (b) retraso en el desarrollo y problemas posteriores de lenguaje en la primera infancia (Marlow et al., 2005; N Engl J Med, 352: 9-19); (c) anomalías neurológicas; y (d) aumento de la incidencia de sordera. Algunos estudios también sugieren que los individuos nacidos con BPN pueden tener un mayor riesgo de ciertas afecciones crónicas en la edad adulta, incluyendo una presión arterial elevada, diabetes de tipo 2 y enfermedades cardíacas.

- 40 Hay dos razones principales por las que un bebé puede nacer con bajo peso: (1) nacimiento prematuro - un embarazo normal tiene una duración de aproximadamente 40 semanas (38-42 semanas), y la OMS define la prematuridad como un bebé nacido antes de que se hayan cumplido 37 semanas completas desde el primer día de la última menstruación. Cuanto antes nazca un bebé, más probable es que pese menos; y (2) crecimiento fetal restringido - los bebés que pueden llegar a término, pero que tienen un bajo peso, también conocidos como pequeños para la edad gestacional (PEG) o bebés pequeños para la fecha. Algunos de estos bebés son pequeños, simplemente porque sus padres son pequeños (y estos bebés suelen estar sanos), mientras que otros tienen bajo peso al nacer porque algo ha ralentizado o detenido su crecimiento en el útero (o retraso del crecimiento intrauterino, RCIU). Algunos bebés son prematuros y han sufrido RCIU, y estos bebés tienen un riesgo particularmente elevado de problemas de salud, tales como los descritos anteriormente.

- 50 Recientemente, la OMS ha revisado sistemáticamente la incidencia mundial del parto prematuro (Beck et al., 2010; Bull World Health Organ, 88: 31-38), y se estima que en 2005, 12,9 millones de nacimientos, o el 9,6% de todos los nacimientos mundiales, fueron prematuros. Aproximadamente 11 millones (85%) de estos nacimientos prematuros se concentraron en África y Asia, mientras que aproximadamente 0,5 millones tuvieron lugar en Europa y América del Norte (excluyendo México) y 0,9 millones en América Latina y el Caribe. Las mayores tasas de parto prematuro se produjeron en África y América del Norte (11,9% y 10,6% de todos los nacimientos, respectivamente), y las menores fueron en Europa (6,2%). La tasa relativamente alta de nacimientos prematuros estimada para América del Norte equivale a un número absoluto estimado de 480.000 nacimientos prematuros en el año 2005, y a pesar de la tasa relativamente baja, aún equivale a una estimación de 466.000 nacimientos prematuros en Europa durante el mismo año. Las tasas de nacimientos prematuros disponibles para algunos países desarrollados, como el Reino Unido, los Estados Unidos y los países escandinavos, muestran un aumento espectacular en los últimos 20 años (por ejemplo, Callaghan et al., 2006; Pediatrics, 118: 1566-1573). Los factores que contribuyen posiblemente pero

no explican completamente esta tendencia al alza, incluyen un aumento de la tasa de nacimientos múltiples, un mayor uso de las técnicas de reproducción asistida, aumentos en la proporción de nacimientos entre mujeres mayores de 34 años de edad y cambios en las prácticas clínicas, como uso más frecuente de la cesárea programada.

5 Los bebés prematuros son generalmente susceptibles a los mismos problemas de salud que los bebés BPN, en donde la gravedad de los problemas se incrementa con el grado de prematuridad: un bebé nacido a las 36 semanas, es probable que tenga un desarrollo lento; un bebé que nace antes de que se hayan cumplido 33 semanas tendrá problemas más graves, incluyendo posiblemente, pulmones inmaduros; mientras que un parto antes de que se hayan cumplido 28 semanas provoca problemas muy importantes, pero la tasa de supervivencia es bastante notable. Los datos sugieren una supervivencia del 90% si nace con más de 800 g, 50% de supervivencia si tiene más de 10 pueden ocultar una discapacidad significativa de los supervivientes. Por ejemplo, problemas graves, como parálisis cerebral, ceguera y sordera pueden afectar de forma significativa desde el 10 hasta al 15% de los bebés prematuros, 1 de cada 4 bebés con un peso al nacer inferior a 1,5 kg tiene una discapacidad auditiva periférica o central, o ambas (Jiang et al., 2001; Acta Paediatr, 90 1411-1415) y el 66% de los bebés con menos de 1,25 kg desarrollan ROP (Allin et al., 2006; Pediatrics, 117: 309-316).

20 Las funciones del páncreas y el hígado no están completamente desarrolladas al nacer, y en los lactantes prematuros esto es particularmente destacado. Lindquist y Hernell (1990; Curr Opin Clin Nutr Metab Care, 13: 314-320) han revisado recientemente el tema de la digestión y la absorción de lípidos en los primeros años. Los lactantes amamantados digieren y absorben la grasa (y de forma importante ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga, LCPUFAs) de forma más eficaz que los lactantes alimentados con fórmula de leche maternizada (Bernback et al., 1990; J Clin Invest, 85: 1221-1226; Carnielli et al., 1998; Am J Clin Nutr, 67: 97-103). Además de las fórmulas de leche maternizada infantil con una composición de grasa similar, la leche materna también contiene una lipasa de amplia especificidad, la lipasa estimulada con sales biliares (BSSL) (EC 3.1.1.13), que promueve una absorción muy eficaz de la grasa de la leche humana.

25 La BSSL es una enzima pancreática de origen natural que se activa con las sales biliares en el duodeno y participa en la hidrólisis de lípidos junto con otras lipasas. En la primera infancia, y especialmente en el lactante prematuro, las funciones exocrinas del páncreas no están completamente desarrolladas (Manson & Weaver, 1997; Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 76: 206-211). Por lo tanto, en el páncreas de prematuros, la expresión de las lipasas pancreáticas es baja en comparación con los páncreas de adultos (Lombardo, 2001; Biochim Biophys Acta, 1533: 1-28; Li et al. 1007; Paediatr Res, 62: 537-541). Por lo tanto, la BSSL presente en la leche materna es una lipasa importante para estos lactantes; el bajo nivel de lipasa pancreática se compensa por la expresión de BSSL en la glándula mamaria en el período de lactancia y la secreción de la enzima con la leche de la madre. La glándula mamaria en el período de lactancia humano sintetiza y secreta BSSL que, después de una activación específica a través de las sales biliares primarias en el intestino grueso del bebé, contribuye a la capacidad endógena del lactante alimentado con leche materna para la digestión intestinal de la grasa.

40 La BSSL se cree que tiene una especificidad de sustrato más amplia que la mayoría de las lipasas. No solo es una enzima capaz de hidrolizar completamente los tres ácidos grasos de los triglicéridos (triacilglicéridos, TGs), sino también ésteres de vitaminas liposolubles como la vitamina A, así como ésteres de colesterol. Por lo tanto, la BSSL dirige la lipólisis intraluminal hacia su compleción y da lugar a la formación de glicerol y ácidos grasos libres (AGLs), incluyendo ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga (LCPUFAs), siendo estos últimos elementos fundamentales para el sistema nervioso central en desarrollo (Hernell, 1975; Eur J Clin Invest, 5: 267-272; Bernback et al., 1990; Hernell et al., 1993; J Paediatr Gastro Nutr, 16: 426-431; Chen et al., 1994; Biochem Biophys Acta, 1210: 239-243). La BSSL muestra una actividad óptima a pH de 8-8,5 y es más estable en entornos ácidos que la lipasa pancreática. La BSSL es resistente a la degradación con pepsina a concentraciones fisiológicas. La BSSL representa aproximadamente el 1% de la proteína total en la leche y está presente en concentraciones de 0,1 - 0,2 g/L (Blackberg et al., 1987; FEBS Lett, 217: 37-41; Wang y Johnson, 1983; Anal Biochem, 133: 457-461; Stromqvist et al., 1997; Arch Biochem Biophys, 347: 30-36). Los niveles de BSSL en la leche humana son similares a lo largo del día (Freed et al., 1986; J Paediatr Gastroenterol Nutr, 5: 938-942) y la producción de BSSL en la leche humana se mantiene durante al menos 3 meses (Hernell et al., 1977; Am J Clin Nutr, 30: 508-511), aunque las concentraciones de BSSL pueden disminuir con la duración de la lactancia (Torres et al., 2001; J Natl Med Assoc, 93: 201-207). Los triglicéridos comprenden aproximadamente el 98% o más de todos los lípidos en la leche humana o la fórmula de leche maternizada y, por lo tanto, representan aproximadamente el 50% del contenido en energía.

55 La superioridad de la leche humana como fuente nutricional para lactantes a término, así como para prematuros se ha manifestado en muchos estudios y recomendaciones de grupos de expertos. En consecuencia, el método de alimentación recomendada en todo el mundo es la lactancia materna. Sin embargo, no siempre es posible la lactancia materna o la alimentación con la propia leche materna, o no está recomendada por razones médicas - y la lactancia materna no se puede poner en práctica por una variedad de razones distintas - en cada caso, como se describe en otro lugar en este documento.

60 A pesar de la disminución desde aproximadamente un 60% a aproximadamente un 50% en la década de los años 80 (Foss y Southwell, 2006; Int Breastfeeding J 1: 10), el porcentaje de mujeres estadounidenses que inician la lactancia materna aumentó desde la década de los años 90 y se notificó que era aproximadamente del 74% en el año

- 2004 (Scanlon et al., 2007, en CDC Morbidity and Mortality Weekly Report, 2 de agosto 2007). Sin embargo, el porcentaje de mujeres que continúan con la lactancia materna parece disminuir sustancialmente después de la iniciación en el período de postparto temprano, describiendo este informe que en 2004 solo el 42% y el 21% de las mujeres todavía practicaban la lactancia materna a los 6 y 12 meses, respectivamente. Los datos de Sheffield en GB mostraban las mismas tendencias, con una caída aproximadamente de 70% a 50% durante la década de los años 80, pero solo el 35% y el 30% (durante el mismo período) de esas mujeres continuaba haciéndolo en realidad, un mes después del nacimiento (Emery et al., 1990, Arch Dis Childhd, 65: 369-372). El porcentaje de mujeres que amamantan exclusivamente es aún más bajo, y en general para los lactantes nacidos en los EE.UU. en 2004, solo el 31% y el 11% de las mujeres amamantaban exclusivamente entre los 3 y 6 meses de edad, respectivamente, y con diferencias significativas entre subgrupos de estas mujeres; las tasas de lactancia materna exclusiva hasta la edad de 3 meses fueron las más bajas entre los lactantes negros (20%) y entre los lactantes de madres que tenían <20 años (17%), que tenían educación secundaria o inferior (23% y 24%, respectivamente), no estaban casadas (19%), residían en zonas rurales (24%) y tenían una relación entre ingresos y pobreza de <100% (24%) (Scanlon et al., 2007). De hecho, existen importantes diferencias nacionales y culturales en la lactancia materna. Emery y colaboradores (1990) informaron de un porcentaje significativamente menor de mujeres asiáticas que mujeres blancas que decidieron amamantar en Sheffield GB. Por otra parte, Singh (2010; Eur J Sci Res, 40: 404-422) ha informado que en Brasil, la duración media de la lactancia materna exclusiva es solo de 28,9 días, en Malasia solo el 25% de los lactantes son alimentados exclusivamente con leche materna a los 2 meses y en Bogotá y Nairobi este porcentaje es del 12% y el 21% de los lactantes, respectivamente.
- En los casos en los que el lactante no es alimentado con leche materna, se emplea frecuentemente una fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada y/o congelada procedente o no de bancos de leche. Todas son, sin embargo, en algunos aspectos nutricionalmente subóptimas para los lactantes.
- Debido a los riesgos de infección vírica (virus de inmunodeficiencia humana [VIH], citomegalovirus [CMV], hepatitis) y a una transmisión en menor grado de bacterias patógenas, la leche de donantes usada en los denominados bancos de leche se pasteuriza generalmente antes del uso. Sin embargo, la BSSL se inactiva durante la pasteurización de la leche humana (Björkstén et al., 1980; Br Med J, 201: 267-272); y no está presente en ninguna de las muchas fórmulas de leche maternizada diferentes que existen para la nutrición de los recién nacidos prematuros o a término. Se ha mostrado que la absorción de grasa, el aumento de peso y el crecimiento lineal es mayor en los lactantes alimentados con leche materna fresca en comparación con la pasteurizada (Andersson et al. 2007; Acta Paediatr, 96: 1445-1449; Williams et al., 1978; Arch Dis Child 43: 555-563). Esta es una de las razones por las que se ha defendido que los lactantes recién nacidos, especialmente los prematuros, que no pueden ser alimentados con la leche de su propia madre deben ser alimentados con leche no pasteurizada de otras madres (Björkstén et al., 1980).
- Hamosh (1983; J Ped Gastro Nutr, 2: 248-251) notificó que la actividad enzimática de la BSSL está presente en la leche materna fresca de mujeres que dieron a luz a las 26 a 30 semanas. Este informe describe además que las muestras de leche almacenadas a -20 o -10°C mostraban una pérdida lenta de la actividad de BSSL, pero una pérdida más dramática de la dependencia de sales biliares sobre la actividad después de un almacenamiento durante solo tres semanas a -10°C, lo que puede contribuir a una hidrólisis de los lípidos de la leche, incluso durante un almacenamiento de la leche materna a -20°C.
- La lipasa de la leche estimulada con sales biliares solo se ha encontrado en la leche de ciertas especies, a saber los humanos, los gorilas, los gatos y los perros (Freed, et al., 1986; Biochim Biophys Acta, 878: 209-215). La lipasa de la leche estimulada con sales biliares no es producida por vacas, caballos, ratas, conejos, cabras, cerdos o monos Rhesus (Blackberg et al., 1980; Freudenberg, 1966; Experientia, 22: 317).
- La BSSL de leche humana natural (hBSSL-MAM) ha sido purificada hasta la homogeneidad, según lo informado por Blackberg y Hernell (1981; Eur J Biochem, 116: 221-225) y Wang y Johnson (1983), y la secuencia de ADNc de BSSL humana fue identificada por Nilsson (1990; Eur J Biochem, 192: 543-550) y se ha descrito en el documento WO 91/15234 y WO 91/18923. Estudios de caracterización y de la secuencia de varios laboratorios concluyeron que las proteínas hBSSL-MAM y la hidrolasa pancreática de éster carboxílico (CEH) (también conocida como BSSL pancreática) son productos del mismo gen (por ejemplo, Baba et al., 1991; Biochem, 30: 500-510 Hui et al., 1990; FEBS Lett, 276: 131-134; Reue et al., 1991; J Lipid Res, 32: 267-276).
- Después del aislamiento de la secuencia de ADNc, se ha producido BSSL humana recombinante (rhBSSL), así como variantes de la misma, también en ovejas transgénicas (rhBSSL-OVI); tal como se describe en los documentos US 5716817, WO 94/20610 y WO 99/54443. La producción de proteínas para uso terapéutico utilizando animales transgénicos se ha conseguido con una seguridad significativa, solidez científica, regulatoria y ética. De hecho, hasta la fecha no hay ningún producto terapéutico aprobado en el mercado de los EE.UU. o de la UE que se haya producido a partir de ovejas transgénicas, y solo dos productos médicos producidos a partir de otros animales transgénicos han sido aprobados hasta la fecha: ATRYN (antitrombina recombinante) producida a partir de cabras transgénicas, y RUCONEST (inhibidor recombinante de la esterasa del componente 1) producido a partir de conejos transgénicos. Las proteínas producidas de esa manera (para ser expresadas en el tejido mamario y excretadas en la leche) pueden estar contaminadas con componentes que se encuentran de forma natural en la leche de estos animales, tales como suero de leche o leche no humana o proteínas del suero, que pueden causar problemas de seguridad si tales proteínas se utilizan para uso en humanos en ciertos individuos, como los que son intolerantes o alérgicos a compo-

nentes o productos a base de leche.

Desde hace tiempo se sabe (al menos desde mediados de la década de los 60) que la adición de lipasa o de extractos de tejidos que contenían esterasa a alimentos a base de leche, es útil en el tratamiento de la diarrea en los animales (documentos CA 662815 y US 3081225). Además, el documento US 326150 sugiere el uso de lipasas exógenas para el tratamiento de la enfermedad celíaca o el síndrome de mala absorción en los seres humanos, en particular en los niños pequeños. Los métodos descritos en el mismo implican la extracción y el uso de una mezcla de enzimas en gran medida no caracterizadas, procedentes de tejidos tales como la lengua y otros tejidos orales de terneros, cabritos y corderos.

Haciendo referencia a la puesta en práctica de la alimentación infantil, en particular la alimentación de lactantes BPN, se ha favorecido durante mucho tiempo que la leche materna fresca es el alimento más adecuado para los lactantes BPN. Esto se basa en estudios tales como el primer trabajo de Williams et al. (1978) que mostraba que el tratamiento térmico de la leche humana reducía la absorción de grasa en aproximadamente un tercio (en comparación con la leche humana cruda) en un estudio experimental de siete lactantes prematuros MBPN (menos de 1,3 kg) con edades comprendidas entre 3 y 6 semanas, alimentados durante tres semanas consecutivas con leche humana cruda, pasteurizada y hervida, cada una durante una semana. Este estudio sugería que la mejora en la absorción de grasa puede estar relacionada con la conservación de las lipasas lácteas en la leche humana cruda, en comparación con la leche humana tratada térmicamente. Es de destacar que este estudio describe que todos los lactantes aumentaron de peso más rápidamente durante la semana en la que fueron alimentados con leche cruda; siendo la ganancia media de peso (registrada en g adquiridos por semana por cada 100 mL de leche consumida) durante este período aproximadamente un tercio superior que en los períodos similares, durante los cuales se administró leche pasteurizada o hervida. En un estudio más amplio (pero más corto) descrito por Alemi (1980; *Pediatrics*. 68: 484-489), se estudió la excreción de grasa en 15 lactantes MBPN, nacidos con un peso al nacer entre 660 y 1.695 g y una edad gestacional de 26 a 33 semanas, y el estudio se inició 7 a 44 días después del nacimiento. La excreción de grasa era menor en los lactantes alimentados con una mezcla de leche humana y fórmula de leche maternizada durante 72 horas, en comparación con los lactantes alimentados solamente con fórmula de leche maternizada. Más recientemente, Andersson y colaboradores (2007) describieron en un estudio aleatorizado que la pasteurización de la leche de la propia madre reduce la absorción de grasa y el crecimiento en lactantes prematuros, y propusieron que estos efectos eran debidos a la inactivación de la BSSL de la leche mediante pasteurización. Es de destacar que el intervalo descrito del coeficiente de absorción de grasa (CFA), procedente de una serie de estudios, incluidos los anteriores, es amplio; tanto de la leche humana como de las fórmulas de leche maternizada. Esto puede explicarse en parte por la cantidad y la composición de la grasa dada, y en parte por grandes diferencias interindividuales en la capacidad para utilizar grasa de la dieta en recién nacidos prematuros, pero también refleja una dificultad considerable en la evaluación correcta de CFA (Hernell, 1999; *J Pediatr*, 136: 407-409).

Un estudio en un modelo animal ha intentado investigar los efectos de la adición de BSSL exógena a la alimentación neonatal sobre el crecimiento infantil (Wang et al., 1989; *Clin Nutr Am J*, 49: 457-463). Este estudio incluía la adición de BSSL humana purificada (0,1 mg/mL) a una fórmula de leche maternizada para gatitos (mezclada tres a uno con leche de vaca) para seis gatitos alimentados con biberón durante 5 días. Este estudio informaba de que los gatitos alimentados con fórmula de leche maternizada para gatito complementada con hBSSL tenían una tasa de crecimiento que era el doble que la de los alimentados solo con fórmula de leche maternizada. Es de destacar que la fórmula de leche maternizada estaba complementada con leche de vaca, los gatitos no eran prematuros o de bajo peso al nacer, fueron amamantados durante las primeras 48 horas de vida y el estudio se llevó a cabo con hBSSL natural purificada. Los autores sugirieron que los gatitos se podrían utilizar como un modelo animal en la investigación del papel funcional de la BSSL, y basándose en este estudio, se presentaron solicitudes de patentes relacionadas (incluyendo, los documentos US 4944944, EP 0317355 y EP 0605913) que describen (entre otros aspectos): un método para enriquecer una fórmula de leche maternizada infantil que contiene grasa que es pobre en lipasa activada por sales biliares, que comprende añadir a la fórmula de leche maternizada una cantidad eficaz de una lipasa activada por sales biliares aislada, seleccionada a partir del grupo que consiste en lipasa de la leche activada por sales biliares [BSSL] y carboxilesterasa pancreática activada por sales biliares [ahora conocida también como BSSL] para aumentar la absorción de grasa de la fórmula de leche maternizada y el crecimiento del lactante; y un método para alimentar a un lactante con base alimenticia de una primera fuente que comprende grasas, que consiste en la administración de una lipasa activada por sales biliares aislada seleccionada a partir del grupo que consiste en lipasa de la leche activada por sales biliares [BSSL] y carboxilesterasa pancreática activada por sales biliares [también BSSL] al lactante, en una cantidad suficiente para mejorar la digestión del lactante y la absorción de las grasas en la base y aumentar el crecimiento del lactante, en donde la lipasa se obtiene a partir de una segunda fuente. No se revelaron datos que apoyaran una mejora en la absorción de grasa, ni ningún dato obtenido a partir de ningún estudio que implicara lactantes humanos. Otro estudio (Lindquist et al., 2007; *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 44: E335) ha sido descrito por Lindquist y Hernell (2010) sobre cómo alimentar artificialmente con BSSL humana purificada a crías de ratones con el gen de BSSL inactivado, amamantadas por ratas madre con el gen de BSSL inactivado para restaurar la absorción normal de grasa y la prevención de formación de lesiones intestinales.

Después de la clonación del ADNc de hBSSL y la publicación de diversos enfoques para producir grandes cantidades de BSSL humana recombinante (rhBSSL), se han realizado numerosas descripciones, y reivindicaciones para las mismas, de diversas fórmulas de leche maternizada infantil que comprenden rhBSSL (por ejemplo, los documentos US 5200183, WO 91/15234, WO 91/18923 y US 5716817) y diversos métodos o usos de tales fórmulas de leche

maternizada o rhBSSL, incluyendo como un complemento infantil, para la mejora de la utilización de los lípidos de la dieta, el tratamiento de la mala absorción de grasas, ciertas anomalías pancreáticas y fibrosis quística (por ejemplo, los documentos WO 91/18923, WO 94/20610 y WO 99/54443). Sin embargo, al igual que con los estudios anteriores sugeridos, no se describen datos de apoyo, obtenidos a partir de experimentos en los que lactantes humanos se complementan con lipasa estimulada por sales biliares recombinante. De hecho, en 1996, después de todas estas sugerencias, estudios asociativos y descripciones, los trabajadores principales en el área estaban todavía cuestionando: "¿Se debería complementar con componentes bioactivos de la leche humana [tales como BSSL] a lactantes alimentados con fórmula de leche maternizada?"; y que indicaban además: "No hay datos sobre intentos para complementar con enzimas digestivas [tales como BSSL]" (Hamosh, en el Simposio: Bioactive Components in Milk and Development of the Neonate: Does Their Absence Make a Difference? Recogido en *J Nutr*, 12: 971-974; 1997). Más recientemente, Andersson y colaboradores (2007) han especulado que el complemento de la leche pasteurizada con BSSL de leche humana recombinante puede restaurar la actividad lipolítica endógena de la leche.

La BSSL natural de 722 aminoácidos está fuertemente glicosilada (30-40% de hidratos de carbono) (Abouakil et al., 1989; *Biochem Biophys Acta*, 1002: 225-230), con sitios de O-glicosilación extensos dentro de la porción C-terminal de la molécula que, en su forma más abundante, contiene 16 repeticiones ricas en prolina de 11 residuos con carbohidratos ligados a O (Hansson et al., 1993; *J Biol Chem*, 268: 26692-26698). El papel de la O-glicosilación extensa no está comprobado, pero basándose en la composición de su secuencia, se prevé que la cola C-terminal larga sea muy hidrófila y accesible (Wang et al., 1995; *Biochemistry*, 34: 10639-10644).

Diferencias en los patrones de glicosilación pueden tener diferencias decisivas en la actividad u otras propiedades de muchas proteínas, especialmente proteínas usadas en medicina. Por ejemplo, ARANESP (darbepoetina alfa) es una variante modificada genéticamente de forma específica de la eritropoyetina que difiere de PROCRIT (epoetina alfa) en 2 aminoácidos, lo que proporciona que la molécula tenga 5 cadenas de oligosacáridos ligados a N en lugar de 3, y que altera significativamente las propiedades farmacocinéticas; mostrando darbepoetina un aumento triple de la semivida sérica y un aumento *in vivo* de la actividad, en comparación con epoetina (Sinclair y Elliot, 2005; *J Pharm Sci* 94: 1626-1635).

Diferentes sistemas de producción recombinantes (por ejemplo, células de mamífero, de levadura, animal transgénico), e incluso cambios aparentemente menores en el proceso de producción a partir del mismo sistema de expresión, pueden conducir a cambios en la glicosilación de la misma secuencia de proteína/polipéptido. Por ejemplo, la alfa-galactosidasa A humana recombinante se utiliza en la terapia de sustitución enzimática para la enfermedad de Fabry, y el producto farmacéutico comercial se produce de dos maneras que tienen la misma secuencia de aminoácidos pero en donde cada uno tiene un patrón de glicosilación diferente: REPLAGAL (agalsidasa alfa) y FABRAZYME (agalsidasa beta). REPLAGAL se produce en una línea continua de fibroblastos humanos, mientras que FABRAZYME se produce en células de ovario de hámster chino (CHO), y cada producto tiene una glicosilación diferente. Al igual que otras proteínas producidas a partir de células CHO, FABRAZYME es una glicoproteína sializada, y tiene diferencias en el grado de sialización y fosforilación en comparación con REPLAGAL (Lee et al., 2003; *Glycobiology*, 13: 305-313). Las diferencias cualitativas y cuantitativas en la sialización de glicoproteínas producidas en células CHO, en comparación con glicoproteínas humanas naturales, tienen consecuencias tanto para el nivel de biodistribución como la potencia inmunogénica. De hecho, la presencia de IgG se ha descrito en casi todos los pacientes tratados con agalsidasa beta, en comparación con solo 55% de los pacientes tratados con agalsidasa alfa (Linthorst et al., 2004; *Kidney Int*, 66: 1589-1595). Además, en algunos casos, se ha descrito una reacción de tipo alérgica al tratamiento con agalsidasa beta, con presencia de IgE en la circulación y/o una reacción intradérmica positiva (Wilcox et al., 2004; *Am J Hum Genet*, 75: 65-74).

De hecho, aunque sus mapas peptídicos son muy similares, los patrones de glicosilación de BSSL natural difieren sustancialmente de los de rhBSSL producida en líneas celulares C127 de ratón y CHO de hámster, y también en la capacidad de unirse a ciertas lectinas, incluyendo concanavalina, aglutinina de *Ricinus communis* y aglutinina de *Aleuria aurantia*, lo que sugiere que la BSSL natural contiene considerablemente más residuos de fucosa y beta-galactosa terminales que las formas recombinantes (Stromqvist et al., 1995; *J Chromatogr*, 718: 53-58). Landberg et al. (1997; *Arch Biochem Biophys* 344: 94-102) caracterizaron adicionalmente estas dos formas recombinantes, e informaron que ambas formas recombinantes tenían un porcentaje molar inferior de monosacárido total (20% y 15% para rhBSSL producida por C127 y por CHO, respectivamente, en comparación con 23% para la hBSSL natural), y que aunque la hBSSL natural reaccionaba con ciertos anticuerpos que detectaban el antígeno de Lewis, la C127-rhBSSL no lo hizo.

Aunque la rhBSSL producida por C127 y por CHO descritas anteriormente eran en general similares entre sí, en términos de masa molecular, glicosilación y unión a lectina, la rhBSSL aislada a partir de la leche de ratones transgénicos mostraba por el contrario una masa molecular aparente menor en cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) y no había interacciones detectables con un panel de lectinas, lo que indicaba un grado significativamente menor de O-glicosilación de rhBSSL en la leche de ratones transgénicos, que la encontrada para las otras formas recombinantes (Stromqvist et al., 1996; *Transgen Res* 5: 475-485).

Se han descrito estudios clínicos en indicaciones específicas llevadas a cabo con una forma particular de rhBSSL; a saber, estudios exploratorios en fase temprana de insuficiencia pancreática exocrina (IP) debida a pancreatitis crónica o fibrosis quística (FQ). En 2004, se notificó que un estudio de fase II mostraba que los pacientes con FQ (de 12

a 39 años) con IP presentaban una absorción más rápida y eficaz de los lípidos cuando se complementaban con rhBSSL en una sola dosis de 0,2 g o 1 g, como un complemento del 25% de su dosificación habitual de Creon, en comparación con Creon solo administrado en su dosis regular, o con una dosificación del 25% (Strandvik et al., 2004; 18ª North American Cystic Fibrosis Conference, St Louis MI; artículo publicado en *Pediatr Pulmonol*, S27: 333), y en 2005 se notificó de los resultados de un segundo ensayo de fase II en donde rhBSSL mostraba una capacidad muy mejorada para digerir la grasa en un grupo de pacientes suecos con FQ que padecían IP (comunicado de prensa de Biovitrum, informantes Strandvik et al., 2005; 28ª European Cystic Fibrosis Society (ECFS) Conference, Creta). En ambos ensayos clínicos, estos resultados clínicos se obtuvieron utilizando rhBSSL-OVI. Más recientemente, se ha anunciado que se ha completado un ensayo adicional de fase II con una suspensión oral de rhBSSL (descrita en el mismo como "bucelipasa alfa"), administrada a una dosis de 170 mg, 3 veces al día durante 5 - 6 días, para evaluar el efecto sobre la absorción de grasa en pacientes adultos con FQ e IP, pero hasta la fecha no se han publicado resultados de la eficacia del mismo (clinicaltrials.gov identifier NCT00743483).

Se ha dado a conocer, desde al menos 2008, que se habían planificado dos ensayos clínicos de fase II que empleaban rhBSSL y se habían puesto en marcha cada uno para investigar el coeficiente de absorción de grasa, y el cambio en la longitud y el peso corporal, en lactantes prematuros, nacidos antes de haber cumplido 32 semanas de edad gestacional con 0,15 g/L de rhBSSL o placebo durante una semana cada uno, añadidos a la fórmula de leche maternizada infantil (clinicaltrials.gov identifier NCT00658905) o a la leche materna pasteurizada (clinicaltrials.gov identifier NCT00659243).

De cara a la técnica anterior, y a la necesidad de una solución desde hace tiempo, un objeto de la presente invención es por lo tanto proporcionar un método para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano, tal como un lactante humano de bajo peso o prematuro. Dicho método debe superar una o varias de las desventajas de la técnica anterior que incluyen: que un ingrediente activo se pueda producir de forma fiable y/o reproducible en grandes cantidades; que el ingrediente activo se prepare por un método científico, reglamentario y/o éticamente aceptable; y/o que el método o el ingrediente activo utilizado en el método, haya demostrado en un ensayo clínico aleatorizado implicando lactantes humanos que es eficaz y seguro.

La solución del problema técnico anterior se proporciona con los diversos aspectos y realizaciones de la presente invención, como se define o se describe de otra manera en este documento y/o en las reivindicaciones.

## COMPENDIO

La presente invención se refiere a una lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares (rhBSSL) para uso en el aumento de la tasa de crecimiento de un lactante humano prematuro, comprendiendo dicho uso la etapa de administración entérica de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a dicho lactante, en donde dicha lipasa se administra en una cantidad al día de entre 1 y 100 mg de dicha lipasa por kg de lactante, entre 5 y 50 mg de dicha lipasa por kg de lactante o entre 15 y 40 mg de dicha lipasa por kg de lactante, durante un período de al menos aproximadamente 4 semanas, en donde dicho lactante es pequeño para la edad gestacional.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La [Figura 1.1](#) muestra una presentación esquemática de la estructura de rhBSSL, también muestra sitios para una glicosilación potencial.

La [Figura 2.1](#) muestra un plan esquemático de los estudios clínicos de rhBSSL añadida a la fórmula de leche maternizada infantil o a la leche materna pasteurizada.

La [Figura 2.2](#) muestra una correlación entre las diferencias en la tasa de crecimiento (g/kg/día) y CFA (%), datos combinados, para la población PP.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA

La presente invención se refiere a rhBSSL para uso en el incremento de la tasa de crecimiento de un lactante humano, comprendiendo dicho método la etapa de administración entérica de una lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a dicho lactante, en donde dicha lipasa se administra en una cantidad al día entre 1 y 100 mg de dicha lipasa por kg de lactante, entre 5 y 50 mg de dicha lipasa por kg de lactante o entre 15 y 40 mg de dicha lipasa por kg de lactante, durante un período de al menos aproximadamente 4 semanas, en donde dicho lactante es pequeño para la edad gestacional.

La lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares (rhBSSL) útil en la invención se describe, se define o se menciona en el presente documento. Por ejemplo, incluye polipéptidos reconocibles por una persona con experiencia ordinaria en la técnica, como es la lipasa humana estimulada por sales biliares, en donde dicha lipasa humana ha sido producida o aislada a partir de una fuente no humana, tal como un organismo no humano, adaptado o modificado (por ejemplo, mediante tecnología genética recombinante) para producir tal polipéptido.

La lipasa humana estimulada por sales biliares (BSSL) es una enzima conocida por varios identificadores o alias; por ejemplo, "lipasa de éster carboxílico (CEL)", "lipasa activada por sales biliares (BAL)", "lipasa dependiente de sales

biliares (BSDL)", "carboxilesterasa", "hidrolasa de éster carboxílico" (CEH), y una variedad de otros alias y descripciones que estarán fácilmente disponibles para la persona con experiencia ordinaria en la técnica a partir de fuentes de información tales como "GeneCards" ([www.genecards.org](http://www.genecards.org)). Se ha identificado una variedad de secuencias de aminoácidos naturales e isoformas de BSSL humana a partir de leche humana (y páncreas), y se ha descrito una variedad de diferentes secuencias de aminoácidos (típicamente, previstas a partir del ADNc o la secuencia genómica); todas ellas se incluyen en el presente documento dentro de la expresión "lipasa humana estimulada por sales biliares". Por ejemplo, una lipasa humana estimulada por sales biliares se produce de forma natural primero como una secuencia precursora que incluye una secuencia señal de 20 a 26 aminoácidos, y la forma madura de longitud completa de la proteína descrita por tener 722 a 733 aminoácidos (por ejemplo, véase, Nilsson et al., 1990; documentos WO 91/15234; WO 91/18923; el polipéptido previsto a partir de la secuencia de ADNc con ID de presentación de GenBank: X54457; GenBank ID: CAA38325.1; registro de GeneCards para "CEL/BSSL"; GenBank ID: AAH42510.1; RefSeq ID: NP\_001798.2; Swiss-Prot ID: P19835). En otros ejemplos, otras isoformas más cortas de la lipasa humana estimulada por sales biliares se describen en Venter et al. (2001; Science, 291: 1304-1351); GenBank ID: AAC71012.1; Pasqualini et al. (1998; J Biol Chem, 273: 28208-28218); GenBank ID: EAW88031.1; documento WO 94/20610 y Blackberg et al. (1995; Eur J Biochem, 228: 817-821).

En realizaciones particulares, la lipasa humana estimulada por sales biliares comprende una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende, o como se muestra en, SEQ ID. NO. 1. En otras realizaciones particulares, la lipasa humana estimulada por sales biliares (recombinante) tiene una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las formas maduras o precursoras de BSSL, seleccionadas a partir de las descritas en Nilsson et al., 1990; documentos WO 91/15234, WO 91/18923; RefSeq ID: NP\_001798.2; GenBank ID: AAH42510.1; GenBank ID: CAA38325.1; registro de GeneCards para "CEL/BSSL"; Swiss-Prot ID: P19835. En otras realizaciones de este tipo, la lipasa humana estimulada por sales biliares (recombinante) comprende una proteína con una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 720 aminoácidos consecutivos de cualquiera de las secuencias descritas en las referencias anteriores o de SEQ ID. NO. 1. En otras realizaciones, la lipasa humana estimulada por sales biliares (recombinante) comprende una proteína que tiene al menos la secuencia de aminoácidos desde la posición 1 hasta 101 de la descrita en SEQ ID. NO. 1. o en el documento WO 91/15234, o al menos la secuencia de aminoácidos desde la posición 1 hasta 535 de la descrita en SEQ ID. NO. 1, tal como "Variante A" descrita en Hansson et al., 1993; J Biol Chem, 35: 26692-26698, en donde tal proteína tiene actividad lipasa dependiente de la unión a sales biliares y/o dependiente de sales biliares, como se puede determinar, por ejemplo, con los métodos descritos en Blackberg et al. (1995; Eur J Biochem 228: 817-821).

Por tanto, ahora será evidente para la persona con experiencia ordinaria en la técnica que en ciertas realizaciones de la presente invención, una o varias de estas formas descritas de lipasa humana estimulada por sales biliares (recombinante) pueden ser útiles en diversos aspectos de la invención. Además, será evidente para tal persona que otras proteínas (recombinantes) que tienen actividad lipolítica dependiente de sales biliares (por ejemplo, como se puede determinar por los métodos descritos en Blackberg et al., 1995) y que son similares en la secuencia de aminoácidos a las secuencias de polipéptidos descritas, definidas o mencionadas en este documento, también pueden tener utilidad en la presente invención, y por lo tanto también están incluidas por la expresión "lipasa humana estimulada por sales biliares". En ciertas realizaciones de este tipo, una proteína que muestra más de 90%, 95%, 98%, 99%, 99,5% de identidad de secuencia con una secuencia descrita, definida o a la que se hace referencia en este documento, en más de al menos aproximadamente 30, 50, 100, 250, 500, 600, 700, 711, 720, 722, 733 o 750 aminoácidos. En otras realizaciones, se pueden realizar una o varias sustituciones de aminoácidos en una de las secuencias de polipéptidos de BSSL descrita, definida o mencionada en este documento. Por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta 10 sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos se pueden realizar en la secuencia descrita en SEQ ID. NO. 1. Tales cambios de aminoácidos pueden ser cambios neutros (tales como sustituciones de aminoácidos neutros), y/o pueden afectar de alguna manera (deseada) a la glicosilación, unión, actividad catalítica u otras propiedades de la proteína. Las proteínas con tales sustituciones, siempre que tengan actividad lipolítica dependiente de sales biliares, también serán reconocidas por la persona con experiencia ordinaria en la técnica como "lipasa humana estimulada por sales biliares" en el sentido de la presente invención.

En otras realizaciones, la lipasa humana estimulada por sales biliares se puede expresar a partir de un ácido nucleico que tiene una secuencia de ácido nucleico adecuada o es codificada de otra manera por el mismo. A modo de ejemplo no limitado, dicha lipasa se puede expresar a partir de un ácido nucleico que comprende la secuencia entre las posiciones 151 y 2316 de SEQ ID. NO. 2, o la descrita en el documento WO 94/20610 o Nilsson et al. (1990), o es codificada de otra manera por el mismo. Como también apreciará la persona experta, una "secuencia de ácido nucleico adecuada" también incluirá variantes de las secuencias de ácidos nucleicos anteriores. Por ejemplo, cambios en una o varias bases de nucleótidos que no cambian el aminoácido codificado por un triplete de codón (por ejemplo, en la 3ª posición del codón) también serán "adecuados". Los subfragmentos de tales secuencias de ácido nucleico también serán "adecuados" si codifican una isoforma (corta) de la lipasa humana estimulada por sales biliares, como se describe en el presente documento. Además, las secuencias de ácido nucleico que codifican una proteína que tiene una variante de la secuencia de aminoácidos mostrada por SEQ ID. NO. 1, tal como las descritas anteriormente, también serán "adecuadas". De acuerdo con ello, la presente invención contempla realizaciones mediante las cuales la lipasa humana estimulada por sales biliares (recombinante) es una proteína que se puede expresar o codificar de otra manera por un ácido nucleico que se hibrida con un ácido nucleico que comprende la secuencia entre las posiciones 151 y 2316 de SEQ ID. NO. 2 o por uno que comprende la secuencia entre las posi-



ciones 151 y 755, y en donde dicha proteína tiene actividad lipolítica dependiente de sales biliares. En ciertas realizaciones de este tipo, la hibridación se lleva a cabo en condiciones rigurosas, como será conocido por la persona con experiencia ordinaria, y se describe en libros de texto generales, por ejemplo, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", de Joe Sambrook y David Russell (CSHL Press).

- 5 En una realización particular, la lipasa humana estimulada por sales biliares (recombinante) se produce mediante la expresión de un ácido nucleico descrito, definido o mencionado en este documento.

Una lipasa humana estimulada por sales biliares descrita, definida o mencionada en el presente documento, en el contexto de la presente invención es una lipasa estimulada por sales biliares recombinante (rhBSSL); es decir, en donde dicha lipasa humana ha sido producida o aislada a partir de una fuente no humana, tal como un organismo no humano, adaptado o modificado (por ejemplo, mediante tecnología genética recombinante) para producir tal lipasa. En realizaciones particulares, la rhBSSL se produce utilizando técnicas de transcripción-traducción exentas de células y/o *in vitro* a partir de una molécula de ácido nucleico aislada descrita, definida o mencionada en este documento. Alternativamente, se utiliza un organismo no humano recombinante, en donde dicho organismo no humano incluye al menos una copia de un ácido nucleico de este tipo, y en donde dicho ácido nucleico se puede expresar a través de dicho organismo no humano para producir la proteína deseada: rhBSSL. Por ejemplo, se pueden utilizar células recombinantes bacterianas, de algas, levaduras u otras células eucariotas, y la rhBSSL se produce en ciertas realizaciones a partir del cultivo de tales células recombinantes. En otras realizaciones, la rhBSSL se puede producir mediante cultivo extracorporal de células humanas modificadas o seleccionadas específicamente, por ejemplo, mediante su cultivo *in vitro*. En aún otras realizaciones, la rhBSSL se puede producir mediante su aislamiento a partir de la leche de animales transgénicos; tales como vacas, ovejas, cabras o conejos transgénicos. El experto será consciente de las numerosas tecnologías disponibles para producir una lipasa humana estimulada por sales biliares mediante tecnología recombinante.

La lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares ha demostrado que se puede producir a partir de un cultivo celular recombinante que incluye el cultivo de células de *E. coli*, ratón y hámster (Hansson et al., 1993), y *P. pastoris* (Trimple et al., 2004; *Glycobiol*, 14: 265-274). La lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares también se ha mostrado que se puede producir y aislar a partir de la leche de ratones transgénicos (Stromqvist et al., 1996; *Transgen Res*, 5: 475-485) y de la leche de ovejas transgénicas (documento WO 99/54443). En ciertas realizaciones de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se aísla a partir del cultivo de tales células recombinantes o de la leche de tales animales transgénicos. En una realización alternativa, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares no es una aislada a partir de la leche de una oveja transgénica o de un ratón transgénico.

En una realización particular de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se aísla a partir de un producto de expresión de una línea celular de ovario de hámster chino recombinante (CHO), se produce a través de una línea celular CHO recombinante o se puede expresar o aislar a partir de una línea celular CHO recombinante. El uso de un sistema de expresión de una línea celular CHO recombinante para producir tal lipasa, puede producir rhBSSL que muestra una característica estructural, actividad u otras características particulares, tales como una o varias de las descritas en este documento. A modo de ejemplo no limitativo, la rhBSSL útil en la presente invención se puede aislar usando un procedimiento y/o presentar características análogas o que sean sustancialmente como las que se describen en la Ejemplificación en el presente documento.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se identifica por el segmento clave de la Denominación Común Internacional (DCI) "bucelipasa" (véase WHO Drug Information, 21: 62, 2007), por ejemplo porque tiene la secuencia de aminoácidos mostrada en el mismo. La lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, cuando se utiliza en la presente invención en relación con SEQ ID. NO. 1, tiene uno o varios puentes disulfuro en los lugares Cys64-Cys80 y Cys246-Cys257, y/o está glicosilada en uno o varios de los posibles sitios de glicosilación en Asn-187, Thr-538, Thr-549, Thr-559, Thr-576, Thr-587, Thr-598, Thr-609, Thr-620, Thr-631 y Thr-642 (en una realización de este tipo, se representa esquemáticamente en la Figura 1.1). En ciertas realizaciones de este tipo, la rhBSSL está en una glicofoma y, por ejemplo, puede tener la DCI de "bucelipasa alfa".

En otras realizaciones particulares de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares tiene propiedades estructurales, composición y/u otras propiedades que son diferentes a las de la lipasa humana natural estimulada por sales biliares (BSSL-MAM) y/o que son diferentes de la forma de lipasa estimulada por sales biliares recombinante que se ha producido por aislamiento a partir de la leche de ovejas transgénicas (rhBSSL-OVI), tal como se describe en el documento WO 99/54443.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones de este tipo, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares útil para la presente invención está (sustancialmente) exenta de otras proteínas de la leche o componentes de la leche. Como será evidente por la descripción de la presente invención, en ciertas realizaciones se añade la rhBSSL a un alimento infantil a base de leche antes de la administración al lactante humano. En consecuencia, en tales realizaciones, estar "exenta de otras proteínas de la leche o componentes de la leche" se aplicará a esta forma, composición o formulación de la lipasa estimulada por sales biliares recombinante que existe desde poco antes (por ejemplo, inmediatamente antes) de la adición de dicha lipasa a dicho alimento infantil a base de leche. Por ejemplo,

en tales realizaciones, las composiciones farmacéuticas o los kits de componentes que contienen rhBSSL, o la cantidad de rhBSSL que se proporciona preparada para la adición a cualquier fórmula de leche maternizada infantil y/o leche materna pasteurizada, están exentas de tales contaminantes a base de leche. En algunas de tales realizaciones, la rhBSSL está exenta de caseína láctea y proteínas del suero de la leche, tales como lactoferrina, o está exenta de otros contaminantes naturales de la leche, en particular cuando tales proteínas obtenidas a partir de la leche u otros contaminantes se obtienen a partir de la leche de seres humanos, ovejas o ratones. En estas realizaciones, el "estar exento de" cualquier proteína o contaminante de este tipo significa que no se pueden detectar cantidades importantes de tal proteína u otro contaminante, por metodologías de detección rutinarias. Alternativamente, cualquier impureza particular de este tipo puede estar presente en un nivel menor de aproximadamente 5%, tal como menor de aproximadamente 2%, 1%, 0,5% o 0,1%, o estar esencial o efectivamente ausente, o que el total de todas esas proteínas obtenidas a partir de la leche u otros contaminantes de este tipo está presente en un nivel menor de aproximadamente 5%, tal como menor de aproximadamente 2%, 1%, 0,5% o 0,1%, o está esencial o efectivamente ausente. Como entenderá la persona con experiencia ordinaria en la técnica, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares producida y aislada a partir de un cultivo celular, por ejemplo, a partir de células CHO recombinantes, se considerará que está "exenta de" tales contaminantes basados en la leche.

En otras ciertas realizaciones de este tipo de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares tiene una pureza superior a aproximadamente 70%, tal como una pureza superior a aproximadamente 80%, 90% o 95%. En realizaciones particulares de este tipo, tal porcentaje de pureza es un porcentaje de pureza de la proteína total. Como se ha descrito anteriormente, en las realizaciones aplicables, tal medida de pureza es la de la composición que comprende dicha lipasa antes de la adición a cualquier alimento infantil u otro medio de administración. Tales valores de pureza se pueden determinar por técnicas de RP-HPLC, SE-HPLC o SDS-PAGE (con tinción SyproRuby o con plata).

En otras realizaciones de la invención, en particular si la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se produce usando (se expresa a partir de) células CHO recombinantes, la rhBSSL cuando se utiliza en la presente invención se puede caracterizar por una o varias propiedades estructurales, de la actividad u otras propiedades tales como las descritas a continuación.

En otras ciertas realizaciones de este tipo de la invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares tiene un nivel (general/total) de glicosilación que es menor que el de la lipasa natural humana estimulada por sales biliares (BSSL-MAM) y/o tiene un nivel (general/total) de glicosilación que es superior al de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, aislada a partir de la leche de ovejas transgénicas (rhBSSL-OVI). Los niveles de glicosilación, tales como el nivel de contenido en monosacáridos y/o ácido siálico de BSSL (o una muestra de la misma) se pueden medir utilizando cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado, con detección amperiométrica pulsada (HPAEC-PAD). En realizaciones particulares de la presente invención, el contenido total en monosacáridos de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares (moles de monosacárido por mol de rhBSSL) está entre aproximadamente 20 y 100, entre aproximadamente 25 y 65 o entre aproximadamente 25 y 55, tal como entre aproximadamente 40 a 45 moles/(mol de rhBSSL). En ciertas realizaciones de la invención, el contenido total en ácido siálico de la rhBSSL (moles de ácido siálico por mol de rhBSSL) está entre aproximadamente 20 y 35, tal como entre aproximadamente 25 y 30 moles/(mol de rhBSSL).

En otras ciertas realizaciones de este tipo de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares tiene un patrón de glicosilación, por ejemplo de O-glicanos, que es diferente al de BSSL-MAM y/o es diferente al de rhBSSL-OVI. Tales diferencias se pueden detectar empleando electroforesis capilar con detección mediante fluorescencia inducida por láser (CE-LIF) y/o HPAEC-PAD. En realizaciones particulares de la invención, la rhBSSL puede tener entre aproximadamente 20 y 50 moles de ácido N-acetil neuramínico (NANA = Neu5Ac) por mol de rhBSSL [moles/(mol de rhBSSL)], tal como entre aproximadamente 25 y 40 moles/(mol de rhBSSL). La rhBSSL utilizada en la invención puede tener menos de aproximadamente 5 moles de ácido N-glicosil neuramínico (NGNA = Neu5Gc) por mol de rhBSSL, tal como menos de aproximadamente 2 moles/(mol de rhBSSL), o en donde NGNA es esencialmente indetectable. La rhBSSL utilizada en la invención puede tener menos de aproximadamente 20 moles de fucosa por mol de rhBSSL, tal como menos de aproximadamente 10, menos de aproximadamente 5, menos de aproximadamente 2 moles/(mol de rhBSSL), y en ciertas realizaciones la fucosa es esencialmente indetectable. La rhBSSL utilizada en la invención puede tener entre aproximadamente 5 y 25 moles de galactosamina por mol de rhBSSL, tal como entre aproximadamente 10 y 20 o entre aproximadamente 15 y 18 moles/(mol de rhBSSL). La rhBSSL utilizada en la invención puede tener menos de aproximadamente 10 moles de glucosamina por mol de rhBSSL, tal como menos de aproximadamente 5, menos de aproximadamente 3 o aproximadamente 2 moles/(mol de rhBSSL). La rhBSSL utilizada en la invención puede tener entre aproximadamente 5 y 25 moles de galactosa por mol de rhBSSL, tal como entre aproximadamente 10 y 20 o entre aproximadamente 15 y 18 moles/(mol de rhBSSL). La rhBSSL utilizada en la invención puede tener menos de aproximadamente 5 moles de glucosa por mol de rhBSSL, tal como menos de aproximadamente 2 moles/(mol de rhBSSL), o en donde la glucosa es esencialmente indetectable. La rhBSSL utilizada en la invención puede tener entre aproximadamente 2 y 8 moles de manosa por mol de rhBSSL, tal como entre aproximadamente 4 y 6 moles/(mol de rhBSSL). En realizaciones particulares de la invención, la rhBSSL puede tener un perfil de contenido en monosacáridos y/o ácido siálico aproximadamente como, o sustancialmente como el que se representa en la Tabla 1.1.

En otras realizaciones de la invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares útil para la pre-

sente invención es diferente de BSSL-MAM y de rhBSSL-OVI en el perfil o la cantidad de pruebas de unión a lectina o de unión a antígeno de Lewis, tales como los ensayos y los perfiles descritos en Blackberg et al. (1995) y Landberg et al. (1997), respectivamente. Los ensayos de unión a lectina o a antígeno de Lewis de este tipo pueden indicar diferencias en el patrón de glicosilación entre estas formas diferentes de BSSL. Se pueden utilizar otras técnicas para identificar y/o caracterizar la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares útil para la presente invención. Por ejemplo, rhBSSL se puede caracterizar (y/o diferenciar de BSSL-MAM o de rhBSSL-OVI) mediante digestión con endoproteasa de Lys-C seguida por un análisis de los péptidos resultantes con HPLC de fase inversa, con detección UV cuantitativa (a 214 nm), y registro/inspección del cromatograma resultante. Las diferencias en el cromatograma resultante pueden ser debidas - y por lo tanto reflejar adicionalmente - características únicas de la glicosilación de péptidos específicos que comprenden la rhBSSL que tienen diferencias específicas en el tiempo de retención.

Todavía en otras realizaciones de este tipo de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares tiene una masa molecular entre 90 kDa y 75 kDa. En realizaciones particulares de este tipo, la masa molecular de dicha lipasa está entre aproximadamente 84 y 86 kDa, tal como aproximadamente 85 kDa. La masa molecular se puede determinar mediante técnicas de rutina, incluyendo MALDI-MS. A modo de comparación, usando las mismas técnicas de detección, la masa molecular de BSSL-MAM se mide como sustancialmente mayor (por ejemplo, aproximadamente 100 kDa) y la de rhBSSL-OVI se mide como sustancialmente menor (por ejemplo, aproximadamente 78 kDa).

En otras realizaciones adicionales de este tipo de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares puede comprender una población de moléculas de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares que tiene secuencias de aminoácidos de diferentes longitudes. En algunas de tales realizaciones, la cantidad de moléculas de lipasa que está presente en una forma que es más corta en el extremo C-terminal en uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta diez aminoácidos, en comparación con la forma más larga o la forma de longitud completa (prevista) (tal como la mostrada por SEQ ID. NO. 1) es mayor que el 50% de la cantidad de moléculas de lipasa presente en una forma de este tipo más larga o de longitud completa (prevista). En ciertas realizaciones de este tipo, entre aproximadamente 100% y 500% de la cantidad de la molécula de lipasa más larga (o de longitud completa prevista) es la cantidad presente como una molécula de lipasa más corta, tal como en uno o dos aminoácidos desde el extremo C-terminal. En tales realizaciones en particular, entre 200% y 400%, por ejemplo, aproximadamente 300% de la cantidad de la molécula más larga (o de longitud completa prevista) (por ejemplo, la mostrada por SEQ ID. NO. 1), es la cantidad presente como una molécula de lipasa más corta tal como en uno o dos aminoácidos desde el extremo C-terminal. En realizaciones particulares o la anterior, menos del 1% de la cantidad de las moléculas de dichas lipasas más largas (o de longitud completa prevista) está presente como una molécula de lipasa que es más corta en dos aminoácidos. En otras realizaciones, entre dos a cinco veces, tal como aproximadamente tres veces, el número de dichas moléculas de lipasa más largas (o previstas) está presente en una forma que es más corta que tal molécula más larga (o prevista) desde el extremo C-terminal en uno, dos, tres, cuatro, cinco o hasta diez aminoácidos.

En aún otras realizaciones adicionales de este tipo de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares puede tener una actividad específica que es mayor que la de BSSL aislada a partir de leche humana y/o rhBSSL-OVI. Por ejemplo, la actividad específica de rhBSSL puede ser entre aproximadamente 15% y 35% más elevada, tal como una actividad específica aproximadamente 20% o 25% superior que la de BSSL-MAM y/o rhBSSL-OVI (basada en la masa). Las técnicas para medir la actividad específica de la BSSL humana serán conocidas por la persona con conocimientos ordinarios e incluyen el uso del ensayo de butirato de 4-nitrofenilo (PNPB) descrito en general en la Ejemplificación en el presente documento. Otros ensayos *in vitro* se conocen para la BSSL, por ejemplo, mediante el uso de trioleoilglicerol emulsionado en goma arábica como el sustrato para BSSL y colato de sodio (10 mM) como sal biliar para la activación (por ejemplo, tal y como se describe en Blackberg y Hernell, 1981; Eur J Biochem, 116: 221-225). En realizaciones particulares, antes de la medición de la actividad específica, la BSSL se puede purificar hasta que tenga una pureza elevada, como mediante el uso de técnicas de cromatografía de afinidad por heparina y cromatografía de exclusión por tamaño.

Como entenderá la persona con experiencia ordinaria, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares utilizada en la presente invención se puede caracterizar por más de una de las características distintivas descritas o definidas en este documento, tales como las mencionadas anteriormente. Por ejemplo, una combinación de dos o más (por ejemplo, tres, cuatro, cinco o más) de estas características puede caracterizar una realización particular de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares para uso en la presente invención.

En la presente invención, la cantidad de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares administrada por vía entérica al lactante humano puede variar. Las cantidades de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares que se pueden administrar al lactante en cualquier día dado, oscilan desde una cantidad por día de entre 1 y 100 mg de dicha lipasa por kg de lactante. En realizaciones particulares, entre 5 y 50 mg de dicha lipasa por kg de lactante o entre 15 y 40 mg de dicha lipasa por kg de lactante se pueden administrar durante un día, tal como entre aproximadamente 22,5 y 27 mg de dicha lipasa se administran por cada kg de peso del lactante por día. A modo de ejemplo no limitativo, a un lactante de 1,5 kg con una dosificación de 25 mg/kg/día, se puede administrar un total de aproximadamente 37,5 mg de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares al día. En ciertas realizaciones de la presente invención, la masa de rhBSSL utilizada o mencionada en el presente documento, en lugar de

ser proporcionada como una masa absoluta, se proporciona como la masa de moléculas rhBSSL activas. Dado que la actividad enzimática puede variar en diferentes lotes de producción o de almacenamiento de rhBSSL, la masa absoluta de rhBSSL administrada puede variar con el fin de compensar tales variaciones en la actividad y por lo tanto para proporcionar una cantidad más uniforme de rhBSSL activa. La actividad de rhBSSL se puede determinar fácilmente usando el ensayo de PNPB como se describe en este documento, haciendo referencia a una molécula patrón de BSSL activa. Las masas adecuadas de rhBSSL activa están dentro de los intervalos de masas proporcionadas anteriormente. Ya que la masa molecular de una proteína compleja, como rhBSSL, puede variar, por ejemplo, debido a diferencias en la glicosilación, la cantidad de dicha lipasa se puede definir de manera distinta que en términos de masa, tal como en términos de cantidades molares (activas). El experto en la materia será bien capaz de hacer otras conversiones desde cantidades específicas en mg a la cantidad micromolar correspondiente. Alternativamente, la cantidad de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se puede expresar en términos de actividad de la lipasa en unidades de enzima (U), tal como se define como la cantidad de dicha lipasa que cataliza la formación de 1 micromol de producto por minuto en las condiciones del ensayo, por ejemplo, como se determina en un ensayo *in vitro* para la actividad de BSSL, como uno descrito en este documento.

Como apreciará la persona con experiencia ordinaria en la técnica, un lactante humano se alimenta normalmente de forma regular (a menos que tenga, por ejemplo, un goteo de glucosa) con una base nutricional que contiene una fuente de grasa tal como triglicéridos. El lactante puede ser alimentado con la base nutricional por vía oral o a través de una alimentación por sonda. La base nutricional (animal o como alimento) es comúnmente una fórmula de leche maternizada infantil o leche materna humana. En consecuencia, en ciertas realizaciones de la invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se administra a un lactante humano que recibe una base nutricional que contiene una fuente de grasa tal como triglicéridos. En particular, en tales realizaciones dicha base nutricional es una fórmula de leche maternizada infantil y/o leche materna pasteurizada; ambas conocidas por la persona experta por contener una proporción sustancial de grasa en forma de triglicéridos. En varias de tales realizaciones de la invención, la administración entérica de la rhBSSL puede ser antes, después o concomitante a cuando dicho lactante recibe la base nutricional. Si se administra antes o después de la recepción de la base nutricional, entonces la rhBSSL se puede administrar aproximadamente 1 hora después de que dicho lactante reciba la base nutricional, tal como al cabo de aproximadamente 30 minutos, 15 minutos o 5 minutos, o al cabo de un período inferior a aproximadamente 2 min, después de que el lactante reciba la base nutricional. En caso de que el período entre la recepción de la base nutricional y la administración de la rhBSSL sea de aproximadamente 1 min, entonces se puede considerar efectivamente que la administración de la rhBSSL es concomitante a cuando dicho lactante recibe la base nutricional que contiene grasa (tal como una fórmula de leche maternizada infantil y/o leche materna pasteurizada). Tal administración (o coadministración) concomitante se producirá si la rhBSSL se añade primero a una fórmula de leche maternizada infantil o a leche materna, con la que luego se alimenta al lactante humano.

Como es de conocimiento general, es preferible una alimentación exclusivamente a base de leche materna fresca de la propia madre del lactante. Sin embargo, por diversas razones, el lactante puede estar alimentado con leche materna pasteurizada de otras madres, como a partir de un banco de leche materna. Alternativamente, el lactante puede estar alimentado, como es común, con una fórmula de leche maternizada infantil en lugar de o además de la leche materna (no fresca). La prevalencia de una lactancia no materna (o dejar de dar el pecho) de un lactante humano se describe en otro lugar en este documento. Que un lactante humano no se alimente de leche fresca de su madre, pero de una de estas alternativas, puede ser debido a una o varias causas. Por ejemplo: (i) la madre no puede producir suficiente leche materna, debido a razones de salud, como una cirugía de mama previa o una carencia de prolactina; (ii) la madre puede sufrir mastitis, eczema o una obstrucción del conducto galactóforo, lo que produce dolor durante la lactancia materna; (iii) el lactante puede tener un trastorno en la boca, como labio leporino o paladar hendido; (iv) la madre puede no tener los conocimientos suficientes para amamantar, puede optar por no alimentar con leche materna fresca debido a razones de cultura o de conveniencia; o (v) la madre puede haber sido aconsejada de no alimentar con su propia leche materna fresca con el fin de proteger al recién nacido de componentes potencialmente nocivos de su propia leche materna, incluyendo la transmisión de agentes infecciosos como el virus VIH, el virus CMV, virus linfotrópico de linfocitos T o micobacterias de tuberculosis, medicamentos o fármacos peligrosos (o sus metabolitos) como el consumo de drogas ilícitas, terapia con fármacos retrovirales o quimioterapia, o si la madre está recibiendo radioterapia. Por último, el lactante puede ser demasiado débil para alimentarse a través del pecho, lo que puede ser un problema particular para los neonatos prematuros o de bajo peso.

Por consiguiente, en ciertas realizaciones de la invención, el lactante humano no se alimenta exclusivamente de leche materna fresca, por ejemplo, el lactante no es alimentado exclusivamente con leche fresca de su propia madre, tal como exclusivamente lactancia o alimentación con leche materna fresca extraída. Un lactante que no se amamanta exclusivamente o no se alimenta exclusivamente con leche materna extraída (fresca) de su propia madre, recibirá la leche de otras fuentes, tales como una fórmula de leche maternizada infantil o leche pasteurizada y/o leche materna congelada (anteriormente) procedente de un banco de leche materna. En realizaciones particulares de la presente invención, el lactante no se alimenta con leche fresca de la madre, por ejemplo, el lactante se alimenta exclusivamente con fórmula de leche maternizada infantil, leche pasteurizada y/o leche materna congelada, tal como de un banco de leche materna. Esto puede ocurrir inmediatamente después del nacimiento, es decir, el lactante humano nunca recibe leche materna fresca de su madre, o muy poco tiempo después, tal como el primer, segundo, tercero, cuarto, quinto o sexto día después del parto. En otras realizaciones, el lactante humano puede dejar de ser alimentado con leche fresca de su madre al cabo de aproximadamente una semana, dos semanas o tres sema-

nas después del parto, o al cabo de aproximadamente un mes, dos meses, tres meses o hasta 6 meses después del parto.

La lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se puede administrar por vía entérica de acuerdo con la presente invención por varios medios, incluyendo la administración oral. Por ejemplo, la administración puede llevarse a cabo utilizando una pasta, jarabe, electuario, bolo, polvo, gránulos, elixir, suspensión, solución u otra forma líquida de la lipasa. La administración oral puede incluir una administración bucal y sublingual de la lipasa. Otras formas de administración entérica pueden incluir métodos que administran directamente la lipasa en el tracto gastrointestinal, tales como la administración directamente en el estómago mediante el uso de una sonda de alimentación de gastrostomía o gástrica, o colocada en el intestino delgado, utilizando una sonda de alimentación duodenal. Para los lactantes especialmente pequeños, prematuros o de semanas, tales formas basadas en sondas de administración pueden ser más prácticas, o pueden ser necesarias para administrar la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares de acuerdo con la presente invención.

Dependiendo del método particular de administración entérica, la formulación en la que se administra la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares puede ser diferente. Las formas de dosificación líquidas para administración entérica de rhBSSL incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables. Además de la rhBSSL, las formas de dosificación líquidas pueden contener diluyentes inertes usados comúnmente en la técnica, tales como, por ejemplo, agua u otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, y mezclas de los mismos. Además de los diluyentes inertes, las composiciones para administración entérica también pueden incluir aditivos tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y de suspensión, agentes aumentadores de volumen y estabilizantes. Las suspensiones, además del o de los inhibidores activos de la presente invención, pueden contener agentes de suspensión.

Aunque los medios y la formulación más adecuada para la administración entérica a un lactante humano en cualquier circunstancia específica pueden diferir, un medio particularmente adecuado de administración de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares es administrar dicha lipasa como parte de una alimentación regular a dicho lactante humano, ya sea por vía oral o mediante alimentación por sonda. De acuerdo con ello, en una realización particular de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se añade primero a la fórmula de leche maternizada infantil o a la leche materna que no es fresca (tal como pasteurizada [previamente]), con la cual se alimenta a continuación a dicho lactante. La alimentación del lactante con esta fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna no fresca modificada, proporciona así una administración entérica de dicha lipasa. Este medio de administración es de particular importancia, ya que proporciona que los lípidos comprendidos en el alimento a base de leche estén presentes al mismo tiempo y en el mismo lugar en el tracto gastrointestinal que la rhBSSL (co)administrada. En una cierta realización particular de la invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se (co)administra con fórmula de leche maternizada infantil, de modo que se añade primero a la fórmula de leche maternizada antes de alimentar a dicho lactante. La fórmula de leche maternizada infantil puede tener una composición análoga o sustancialmente similar a una descrita en otro lugar en este documento.

Como entenderá la persona con experiencia ordinaria, la fórmula de leche maternizada infantil o la leche materna pasteurizada (previamente) modificada por la adición de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, se administra generalmente a dicho lactante mediante el uso de un biberón equipado con una tetina o pezón apropiado para simular el pezón natural y por lo tanto, proporcionar una alimentación más eficaz. Alternativamente, la fórmula de leche maternizada infantil modificada o la leche materna no fresca modificada se puede administrar utilizando otros medios; por ejemplo, mediante el uso de un gotero, jeringa, cuchara o un paño empapado, como puede ser necesario si el lactante tiene una deformidad en la boca. En ciertas realizaciones, como con lactantes con un peso extremadamente bajo, prematuros o débiles, la alimentación se puede hacer directamente en el tracto gastrointestinal a través de una sonda gástrica, de gastrostomía o duodenal.

En ciertas realizaciones de la invención, la leche materna no fresca a la que se añade la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, es leche materna pasteurizada. En otras realizaciones, la leche materna se ha congelado, tal como después de la pasteurización. En realizaciones particulares, la leche materna utilizada en la presente invención procede de un banco de leche materna. Los bancos de leche materna pueden incluir el Banco Nacional de la Leche (NMB), una organización nacional que recoge leche humana donada, se garantiza la seguridad y la calidad de la leche y está disponible para recién nacidos que la necesitan, o la Asociación de Bancos de Leche Humana de América del Norte (HMBANA), una asociación sin ánimo de lucro de bancos de donantes de leche humana, establecida en 1985 para establecer normas y facilitar el establecimiento y el funcionamiento de los bancos de leche en América del Norte.

Como apreciará la persona experta, es particularmente adecuado que la leche materna utilizada en la presente invención sea leche materna humana. Sin embargo, en realizaciones alternativas, en particular con lactantes mayores, la leche materna se obtiene a partir de un animal grande domesticado, tal como una vaca, oveja, cabra o caballo. Tales realizaciones se pueden poner en práctica en ciertas culturas o países en donde no siempre se alimentan de leche materna o de fórmula de leche maternizada infantil, pero se puede alimentar a un lactante humano (al menos parcialmente) con leche obtenida a partir de un animal de este tipo. Tales leches no pueden incluir suficiente BSSL animal para ayudar a la digestión de la lipasa en un lactante humano - y ciertamente no contendrá BSSL humana -

independientemente de si la leche se ha pasteurizado. En consecuencia, la leche materna, cuando se utiliza en una realización de la invención de este tipo, puede comprender leche fresca de animales, es decir, leche que no se ha tratado térmicamente y/o congelado.

5 En otra realización alternativa de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se añade a una fórmula de leche maternizada infantil. El experto será consciente de muchas fórmulas de leche maternizada infantiles que están disponibles comercialmente, que incluyen: Enfamil<sup>®</sup>, Pregestimil<sup>®</sup>, Nutramigen<sup>®</sup> y Nutramigen AA<sup>®</sup> (todas ellas comercializadas o fabricadas por Mead Johnson); Similac<sup>®</sup>, Isomil<sup>®</sup>, Alimentum<sup>®</sup> y EleCare<sup>®</sup> (todas ellas comercializadas o fabricadas por Abbott Laboratories, división Ross); Nestlé: 12%, el mayor productor de fórmula de leche maternizada en el mundo, prepara GoodStart<sup>®</sup> (comercializada o fabricada por Nestlé/Gerber Products Company); Farex1<sup>®</sup> y Farex2<sup>®</sup> (comercializadas o fabricadas por Wockhardt Nutrition). Para los lactantes prematuros, otras fórmulas de leche maternizada infantil tales como Similac Neosure, Entramil Premature, Similac Special Care, Cow & Gate Nutriprem 2 y Entramil EnfaCare también están disponibles. Es común para todas las fórmulas de leche maternizada infantil que contienen una fuente de lípidos que son los sustratos para lipasas tales como rhBSSL. En una realización particular, la fórmula de leche maternizada infantil tiene la composición (antes de la adición de rhBSSL) generalmente de conformidad con, o sustancialmente como las descripciones que aparecen en el Anexo A, o como recomienda el Grupo de expertos de ESPGHAN Coordinated International (Koletzko et al., 2005; J Ped Gastro Nutr 41: 584-599). En ciertas realizaciones, la fórmula de leche maternizada infantil contiene uno o varios de los ingredientes, y con aproximadamente los niveles que se muestran en el Anexo B. En realizaciones particularmente ventajosas, la fórmula de leche maternizada infantil contiene al menos 0,5% (de la grasa total) que es DHA y/o AA, y en otras realizaciones de este tipo en donde la concentración de AA debe alcanzar al menos la concentración de DHA, y/o si se añade ácido eicosapentanoico (C20:5 n-3), su concentración no supera el contenido en DHA.

25 Por razones particulares, tales como por comodidad, seguridad y distribución eficaz, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se puede añadir al grueso de la leche materna (no fresca) en una ubicación central (tal como en un banco de leche) y después se almacena y/o se distribuye a los lactantes. De forma análoga, la rhBSSL se puede añadir al grueso de la fórmula de leche maternizada infantil en un lugar central, como un fabricante de fórmula de leche maternizada infantil, y luego se envasa y se distribuye (por ejemplo, para ser vendida) a los padres o cuidadores de los lactantes humanos. Esta realización particular tiene una utilidad particular cuando la fórmula de leche maternizada modificada (que incluye rhBSSL) se puede almacenar y enviar como un polvo seco. Alternativamente, y en particular, si es deseable una dosis específica para el lactante, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se puede añadir a la fórmula de leche maternizada infantil o a la leche materna poco antes de la alimentación y en cantidades suficientes para tal alimentación, o en una relación y cantidades específicas para ese lactante particular. Por ejemplo, una cantidad apropiada de rhBSSL se puede añadir a una cantidad de leche materna no fresca o de fórmula de leche maternizada infantil, ajustada al tamaño.

35 Una relación adecuada entre las cantidades de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares y los demás componentes en el alimento infantil de la presente invención, radica cuando se añade dicha lipasa a la fórmula de leche maternizada infantil o a la leche materna pasteurizada y/o congelada (previamente) hasta tener una concentración final de entre aproximadamente 0,03 y 0,5 g/L de fórmula de leche maternizada o de leche. Por ejemplo, dicha lipasa se puede añadir a la fórmula de leche maternizada infantil o a la leche materna no fresca hasta tener una concentración final de entre aproximadamente 0,05 y 0,3 g/L de fórmula de leche maternizada o leche. En realizaciones particulares, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se añade hasta tener una concentración final de entre aproximadamente 0,1 y 0,2 g/L de fórmula de leche maternizada o leche, por ejemplo aproximadamente 0,15 g/L de fórmula de leche maternizada o leche. Como se apreciará a partir de la descripción de ciertas realizaciones anteriores, se pueden adaptar concentraciones (absolutas) adecuadas para proporcionar una concentración dada de rhBSSL activa (estando las cantidades adecuadas dentro de los intervalos proporcionados anteriormente), y/o tales concentraciones se pueden expresar alternativamente en términos de las cantidades molares (activas) (o micromolares) de rhBSSL por unidad de volumen de leche, como la molaridad resultante (M) de la rhBSSL en dicha leche, o en términos de la actividad enzimática (U) por unidad de volumen de leche (por ejemplo, U/mL). En realizaciones particulares de la invención, la rhBSSL se administra entre aproximadamente 15 y 300 unidades, entre aproximadamente 50 y 150 unidades de rhBSSL por mL de fórmula de leche maternizada infantil o de leche (U/mL), entre aproximadamente 80 y 90 o aproximadamente 87 U/mL de fórmula de leche maternizada infantil o leche.

En la presente invención, el lactante humano es pequeño para la edad gestacional (PEG) (la masa está por debajo del percentil 10 del peso al nacer para la edad gestacional dada).

55 En la presente invención, dicho lactante humano es un lactante humano prematuro, es decir, aquel que nace antes de la duración normal del embarazo de aproximadamente 40 semanas, o en particular es uno nacido aproximadamente antes de que se haya cumplido la semana 37 de gestación. En algunas de tales realizaciones, dicho lactante prematuro humano es uno que ha nacido entre aproximadamente la semana 37 y aproximadamente la semana 32 de gestación. En realizaciones particulares de este tipo, dicho lactante prematuro humano es uno nacido entre aproximadamente la semana 32 y aproximadamente la semana 25 de gestación, o uno nacido entre aproximadamente la semana 25 y aproximadamente la semana 22 de gestación. En otras realizaciones particulares de este tipo, dicho lactante prematuro es uno nacido antes de aproximadamente la semana 37 pero después de aproximadamen-

te la semana 21, la semana 22 o la semana 23 de gestación.

Como apreciará la persona con experiencia ordinaria en la técnica, la edad gestacional se calcula comúnmente empezando a contar desde el primer día del último período menstrual de la madre (LMP), aunque en ciertas circunstancias, tales como la fertilización in vitro, la edad gestacional se puede calcular a partir de la fecha de concepción utilizando un método conocido como edad de fertilización, edad embrionaria, edad conceptual o edad de desarrollo intrauterino (DIU). Este método hace que un lactante parezca 2 semanas más joven que si la gestación se hubiera calculado por el método LMP más común.

En realizaciones particulares de la presente invención, dicho lactante humano tiene entre 0 y 200 días de edad postparto. Por ejemplo, la primera administración de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se puede realizar a partir del día después del nacimiento, al cabo de uno, dos, tres, cuatro, cinco o seis días después del nacimiento, o hasta aproximadamente el sexto mes después del nacimiento. En ciertas realizaciones de este tipo, dicho lactante humano tiene menos de cuatro semanas de edad, tal como menos de aproximadamente tres, dos o una semana de edad postparto en el momento de la primera administración de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares de acuerdo con la presente invención. En otras realizaciones de este tipo, dicho lactante humano tiene entre aproximadamente uno y dos meses de edad, o tiene entre aproximadamente dos y cuatro meses de edad, tal como aproximadamente cinco meses de edad, en el momento de la primera administración de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares de acuerdo con la presente invención.

Una vez administrada por primera vez, en ciertas realizaciones de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se administra al menos una vez al día (por ejemplo, con al menos una toma) durante más de un día. Por ejemplo, la rhBSSL se puede administrar al menos una vez al día de acuerdo con la presente invención con una duración de al menos aproximadamente 4 días. En ciertas realizaciones de este tipo, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se administra al menos una vez al día (por ejemplo, con al menos una toma), durante al menos aproximadamente 5 días, tal como con una duración de al menos aproximadamente 7 días. En realizaciones particulares de este tipo, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se administra con la mayoría de las tomas (o como parte de las mismas) dadas a dicho lactante en cualquier día dado, por ejemplo, entre aproximadamente 4 o 12 tomas por día, tal como entre aproximadamente 4 y 10 tomas por día, tal como aproximadamente 6, 7 u 8 tomas por día. En otra realización no limitativa, el lactante se puede alimentar a veces (tal como una, dos o tres veces por día), sin una (co)administración de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares. En tales realizaciones alternativas, al lactante se (co)administra lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares con cada toma dada a dicho lactante; es decir, al lactante se administra la rhBSSL en todas las tomas diarias.

El régimen de administración para la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares tiene una duración temporal que es al menos de aproximadamente 4 semanas. En realizaciones alternativas de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se administra como parte del curso de una terapia médica, hasta que el lactante humano sale de la unidad de cuidados intensivos, hasta que recibe el alta del hospital, hasta que ya no está bajo atención o supervisión médica o hasta que dicho lactante ha obtenido un peso médicamente aceptable.

Como apreciará la persona experta, el crecimiento de un lactante humano se puede supervisar a través de cualquier método común o aceptable, con el fin de investigar, supervisar, realizar un seguimiento y/o detectar un aumento, o de otro modo una mejora o incremento de la tasa de crecimiento. Por ejemplo, la tasa de crecimiento de un lactante humano es, o se puede supervisar para los fines de la presente invención, mediante una medición y un registro regulares (por ejemplo, diariamente) de la circunferencia de la cabeza, la masa corporal (peso), la altura corporal o la longitud de las piernas (como la longitud de la rodilla al talón). Generalmente se conocen otros métodos para medir la altura y/o el crecimiento de un lactante humano. Tales mediciones regulares se pueden convertir fácilmente a la tasa de crecimiento; es decir, una cantidad de crecimiento en una unidad de período (como de forma diaria). En ciertas realizaciones de la presente invención, dicho aumento de la tasa de crecimiento del lactante humano es, o se mide como (o se supervisa de otro modo), un aumento en la tasa de ganancia de peso de dicho lactante, tal como una tasa de crecimiento expresada como gramos por día, una tasa de crecimiento expresada como gramos por kg de peso corporal por día (g/kg/día), una tasa de crecimiento expresada como gramos por día por 100 kcal de energía consumida (g/día/100 kcal), o una tasa de crecimiento expresada como gramos por día por 100 mL de leche/fórmula de leche maternizada consumida (g/día/100 mL). La medición de la masa corporal (peso) es un método conveniente en particular para supervisar el crecimiento de un lactante, y un segundo método de este tipo para expresar la tasa de crecimiento (g/kg/día) tiene una utilidad particular ya que pretende normalizar la tasa de crecimiento absoluta para lactantes con distintos tamaños, ya que los lactantes más grandes generalmente aumentan de peso con una cantidad absoluta mayor que los lactantes más pequeños, durante el mismo período. Por consiguiente, en ciertas realizaciones de este tipo, la tasa de aumento de peso conseguida por, observada en o deseada para dicho lactante humano cuando se administra rhBSSL, está entre aproximadamente 10 y 30 g de aumento de peso por kg de peso corporal de dicho lactante por día (g/kg/día). En realizaciones particulares de este tipo, una tasa de aumento de peso está entre aproximadamente 15 y 25 g/kg/día, tal como aproximadamente 20 g/kg/día o aproximadamente 18 g/kg/día.

En otras realizaciones de la presente invención, el aumento de la tasa de crecimiento en el lactante humano al que

se administra lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares es una ganancia de peso que está entre 1 g/kg/día y 8 g/kg/día, tal como aproximadamente 2, 3, 4 o 5 g/kg/día más que un lactante humano al que no se administra rhBSSL. En una realización alternativa de la invención, el aumento de la tasa de crecimiento es un aumento de peso que es entre aproximadamente 5% y 40% superior al valor de la tasa de crecimiento de un lactante humano al que no se administra rhBSSL, tal como entre aproximadamente 10% y 30% superior o 15% y 25% superior, incluyendo aproximadamente 20% superior.

Como se apreciará, el peso de un lactante humano puede fluctuar de un día a otro, por diversas razones, incluyendo aquellas no relacionadas con la administración de rhBSSL. De acuerdo con ello, la tasa de crecimiento indicada en este documento como una cantidad al día (o una relación o porcentaje) no se puede lograr, observar o desear para dicho lactante humano cada día y todos los días, y solo se podrá lograr, observar o desear si se mide y se estima durante una serie de días, tal como más de 3, 5 o 7 días, o durante períodos más largos, tales como dos, tres o cuatro semanas o, por ejemplo, durante el período en el cual se está administrando al lactante rhBSSL o recibe atención médica como dentro de una UCIN.

En otras realizaciones de la presente invención, un aumento en el crecimiento se mide (o se supervisa de otro modo) como un aumento de la longitud de la pierna; por ejemplo, un aumento de la longitud de la rodilla al talón, que se puede expresar en mm de crecimiento en una unidad de tiempo, tal como una semana. En aún otra realización de la presente invención, la tasa de crecimiento del lactante humano se supervisa con relación a su propio tamaño, como mediante el uso de un porcentaje entre peso y altura del lactante (% de P/A) o una puntuación de la desviación estándar (SD) (también conocida como puntuación Z), que permite supervisar el crecimiento de un lactante con referencia a la base de datos mundial sobre crecimiento y malnutrición infantil de la OMS.

Como se describe en otra parte en este documento, los inventores observaron que la presente invención - tal y como se ejemplifica con dos ensayos clínicos controlados y un análisis de datos combinados de estos dos ensayos - daba como resultado un aumento de la tasa de crecimiento de los lactantes humanos a los que se administró lipasa recombinante estimulada por sales biliares, mientras que solo se observaba un aumento limitado del coeficiente de absorción global de ácidos grasos (es decir, la totalidad o los más abundantes), medido por el CFA global (coeficiente de absorción de grasa). Como se expone con más detalle dentro de la Ejemplificación a continuación, los lactantes en el grupo de datos según protocolo (PP) mostraron un aumento estadísticamente significativo de la tasa de crecimiento después de la administración de rhBSSL, en comparación con el placebo (diferencia entre la media de LS de 2,08 g/kg/día;  $p = 0,019$ ), pero con un aumento menos pronunciado y no significativo en el CFA global (diferencia entre la media de LS de 3,56%;  $p = 0,069$ ). En cuanto a los incrementos relativos (%) de los efectos (en el grupo de datos PP) en comparación con los efectos de la media de LS para el placebo, la administración de rhBSSL aumentaba la tasa de crecimiento en un 13,8% (17,15 en comparación con 15,06 g/kg/día), pero solo aumentaba el CFA global en un 5,4% (69,06 en comparación con 65,50% de CFA). Una observación de este tipo era más pronunciada en el subconjunto de lactantes alimentados con fórmula de leche maternizada infantil (PP); mostrando un aumento elevado y estadísticamente significativo de la tasa de crecimiento después de la administración de rhBSSL, en comparación con el placebo (diferencia entre la media de LS de 2,30 g/kg/día,  $p = 0,038$ ), pero con poco incremento concomitante (y no significativo) del CFA global (diferencia entre la media de LS del 2,08%;  $p = 0,462$ ); y el incremento relativo (%) en comparación con los efectos de la media de LS para el placebo, después de la administración de rhBSSL a un lactante alimentado con fórmula de leche maternizada, incrementaba la tasa de crecimiento con un aumento del 14,9% (17,75 en comparación con 15,45 g/kg/día), pero con un aumento en el CFA global de solo el 3,1% (69,46 en comparación con 67,38% de CFA). Por otra parte, y también expuesto con más detalle dentro de la Ejemplificación en este documento, había muy poca correlación (no significativa) entre las diferencias intraindividuales en la tasa de crecimiento (rhBSSL - placebo) de lactantes individuales frente a su correspondiente diferencia en el CFA global ( $R^2$  lineal = 0,041;  $p = 0,177$ ), con poca varianza observada en las diferencias intraindividuales en la tasa de crecimiento explicada por una varianza en el aumento individual correspondiente de los valores de CFA global (ANOVA después de la regresión lineal). Otras estrategias o metodologías de análisis se pueden utilizar para investigar y/o presentar adicionalmente los resultados de los dos ensayos clínicos descritos en este documento, incluyendo estrategias o metodologías de análisis que investigan y/o presentan resultados relacionados con la concomitancia limitada entre un aumento en la tasa de crecimiento y un aumento del CFA global para lactantes a los que se administra lipasa recombinante estimulada con sales biliares.

Las metodologías para medir la tasa de crecimiento se describen en otra parte en este documento. La absorción de grasa se puede investigar, supervisar u observar por varios medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, mediante inspección del equilibrio de grasas entre el aporte de grasa y la excreción de grasa de ácidos grasos totales, cuantificado mediante el uso de análisis gravimétrico de ácidos grasos, como utilizan Andersson y colaboradores (2007). Alternativamente, la cuantificación de ácidos grasos individuales se puede realizar usando métodos de cromatografía de gases, como se describen en la Ejemplificación en el presente documento. Sidisky y colaboradores (1996; The Reporter [Supelco/Sigma-Aldrich], 15(1):1-4) describen las propiedades de varias columnas capilares para ayudar a la selección de columnas apropiadas para separar y por lo tanto detectar ésteres metílicos de ácidos grasos esenciales. El grado de absorción de grasa puede expresarse cuantitativamente como un coeficiente de absorción de grasa (CFA) para cualquier ácido graso individual, subgrupo de ácidos grasos similares o afines, o para los ácidos grasos totales/generales sumando de forma adecuada los valores para ácidos grasos individuales, tal y como se describe con más detalle en la Ejemplificación más adelante. Como un ejemplo adicional de la metodología, para un lactante humano individual (o un grupo de los mismos), una mejora en la absorción de ácidos grasos, tal como la



absorción de DHA o AA, se puede investigar, supervisar, seguir y/o comprobar, por ejemplo, mediante un análisis del contenido absoluto o relativo en ácidos grasos, a lo largo del tiempo o durante el tratamiento, de fosfolípidos del plasma o de la membrana celular de glóbulos rojos (Carlson et al., 1996; *Pediatr Res*, 39: 882-888; Boehm et al., 1996; *Eur J Pediatr* 155: 410-416), incluyendo el uso de separación cromatográfica (CG) de ácidos grasos individuales, seguida de una identificación/cuantificación, por ejemplo, mediante el uso de espectrometría de masas.

También hay que destacar partiendo de los ensayos clínicos descritos en este documento que, a pesar de que el incremento promedio de la tasa de crecimiento es comparable con otros estudios de crecimiento infantil (por ejemplo, véase Andersson et al., 2007), los valores de CFA global medio de lactantes observados son más bajos (CFA global medio en el grupo de datos PP: 69,08% para rhBSSL y 65,66% para el placebo) que los que generalmente se han observado en otros estudios de CFA (para una revisión, véase Lindquist y Hernell, 2010). Sin embargo, la variación de los valores de CFA global para lactantes individuales (desviación estándar en el PP de 14,68% para rhBSSL, 16,13% para el placebo y 13,19% para la diferencia intraindividual) generalmente se ajustaba a los valores observados en otros estudios de CFA en lactantes (Williamson et al., 1978; Morgan et al., 1998; *Acta Paediatr* 87: 318-324; Andersson et al., 2007). BSSL se conoce como una lipasa de amplio espectro que puede hidrolizar muchos tipos de lípidos y moléculas similares a lípidos (para una revisión, véase Lindquist y Hernell, 2010), y puesto que más de la mitad de la energía disponible para un lactante proviene de los lípidos hidrolizados contenidos en la leche, una persona con experiencia ordinaria en la técnica puede esperar que el resultado más sorprendente sería un aumento del CFA global - y que cualquier aumento de la tasa de crecimiento no sería tan sorprendente como un aumento del CFA global (ya que se hubiera podido esperar que dependiera en gran medida).

Por consiguiente, en ciertos casos, el aumento de la tasa de crecimiento que se consigue, se observa o se desea en dicho lactante humano, se consigue, se observa o se desea de tal manera que no se observa y/o no se consigue un aumento concomitante en el coeficiente de absorción de grasa global (es decir, para todos o para los ácidos grasos más abundantes) en dicho lactante. En particular, dicho aumento en la tasa de crecimiento puede no ser concomitante, estar indicado y/o estar correlacionado con un aumento en el coeficiente de absorción de grasa global (es decir, para todos o para los ácidos grasos más abundantes). En otras realizaciones particulares de este tipo, el aumento de la tasa de crecimiento no es totalmente explicable (o está causada) por un aumento del CFA global. Por ejemplo, el aumento del CFA global puede ser menor que el que puede representar el aumento en la tasa de crecimiento, tal como el que se representa de modo energético, calorífico, numérico (como por aumentos porcentuales) o estadístico.

En otros ejemplos, cualquier diferencia en el CFA global para el lactante humano al que se ha administrado lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares (es decir, todos o los ácidos grasos más abundantes) es menor que aproximadamente 5 puntos porcentuales mayor que, tal como menor de aproximadamente 4, 3, 2 o 1 punto porcentual mayor que cualquier aumento del CFA global absoluto para un lactante humano al que no se ha administrado rhBSSL. En un ejemplo alternativo, cualquier aumento relativo del CFA global para el lactante humano al que se ha administrado rhBSSL, es un valor que es menor que aproximadamente 106% del valor del CFA de un lactante humano al que no se ha administrado rhBSSL, tal como menos de aproximadamente el 105%, 104%, 103 %, 102% o 101% del valor absoluto del CFA de un lactante humano al que no se ha administrado rhBSSL.

El aumento relativo (como un incremento del porcentaje) de la tasa de crecimiento del lactante humano al que se ha administrado lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, en comparación con la tasa de crecimiento de un lactante humano al que no se ha administrado rhBSSL, puede ser mayor que el aumento relativo (como un incremento del porcentaje) del CFA global (es decir, la totalidad o los ácidos grasos más abundantes) del lactante humano al que se ha administrado rhBSSL, en comparación con el CFA global de un lactante humano al que no se ha administrado rhBSSL. En ciertos ejemplos, el aumento relativo de la tasa de crecimiento del lactante humano al que se ha administrado rhBSSL (en comparación con el de un lactante al que no se ha administrado rhBSSL) es aproximadamente 10 veces, tal como aproximadamente 5 veces, 3 veces o 2 veces mayor que el del incremento relativo en CFA global (es decir, todos o los ácidos grasos más abundantes) del lactante humano al que se ha administrado rhBSSL (en comparación con el de un lactante al que no se ha administrado rhBSSL). Por ejemplo, en un ejemplo específico no limitante, el aumento relativo de la tasa de crecimiento del lactante humano al que se ha administrado rhBSSL puede ser de aproximadamente 15% (en comparación con la tasa de crecimiento absoluto de un lactante al que no se ha administrado rhBSSL), pero el aumento relativo del CFA global en el lactante al que se ha administrado rhBSSL puede ser solo aproximadamente un 3% (en comparación con el CFA absoluto de un lactante al que no se ha administrado rhBSSL).

Como se describe en otra parte en el presente documento, un estado patológico común padecido por lactantes prematuros y/o BPN es la necrosis transmucosa (NEC), que se caracteriza por una necrosis de la mucosa y transmucosa y una inflamación, que generalmente incluye el íleon terminal o el colon. La inflamación y la pérdida de integridad de la mucosa suele ir acompañada por una rotura de la pared intestinal y sepsis. A pesar de los avances en el diagnóstico y el tratamiento de esta enfermedad, NEC sigue siendo una causa importante de morbilidad y mortalidad en las unidades de cuidados de lactantes prematuros y de bajo peso al nacer (Foglia et al., 1995; *Curr Probl Surg*, 32: 757-823; Grosfeld et al., 1996; *Cirugía*, 120: 650-656; Uceda et al., *J Pediatr Surg*, 30: 1314-1316).

Ha habido sugerencias experimentales de que la importancia de la BSSL de la leche en lactantes puede que no solo sea para ayudar a la absorción de los ácidos grasos. Por ejemplo, Miller y Lowe (2008; *J Nutr* 138: 927-930) obser-

varon que en ratones carentes de CEL-(BSSL), solo la ausencia de la leche de la madre y CEL pancreática (BSSL) produce una malabsorción; la falta solo de leche materna CEL (BSSL) no afectaba a la eficacia de la absorción de grasas en la dieta, e incluso con un aumento de las grasas fecales, las crías de ratones carentes de CEL-(BSSL) tenían un aumento de peso normal. Además, y en particular, Howles y colaboradores (1999; Am J Physiol, 277: G653-G661) han especulado - después de experimentos utilizando ratones carentes de CEL-(BSSL) - que CEL (BSSL) puede prevenir la lesión intestinal producida por grasa en ratones neonatales, en particular, debido a la acumulación de exceso de lípidos en el epitelio del intestino delgado distal (véase también, Lindquist et al., 2007; J Pediatr Gastroenterol Nutr 44: E335, según lo informado por Lindquist y Hernell, 2010).

Se ha mostrado que la grasa de la dieta influye tanto en la morfología como en la función del epitelio intestinal. Varios investigadores han encontrado que el tipo y la cantidad de lípidos en fórmulas de leche maternizadas y leche afectan significativamente a las propiedades de transporte y a la permeabilidad del epitelio intestinal neonatal y la tasa con la que prolifera y madura (Neu et al., 1987; Pediatr Res 22: 330-334; Udall et al., 1981; Pediatr Res. 15: 245-249; Weaver et al., 1987; Pediatr Res, 22: 675-678). En un modelo en cerdo neonatal de necrosis transmucosa, Crissinger y colaboradores (Crissinger et al., 1994; Gastroenterology, 106: 1215-1222) mostraron que el grado de permeabilidad y lesión intestinal se relaciona directamente con la presencia y el tipo de grasa en diferentes fórmulas de leche maternizada neonatal. También se encontró que los lípidos lumenales exacerban la lesión intestinal en un modelo en rata de NEC (Bhatia et al., 1996; J Surg Res 63: 152-156).

De hecho, en los ensayos clínicos descritos en este documento se ha observado que lactantes (en el grupo de datos PP) alimentados con fórmula de leche maternizada infantil estaban expuestos a una mayor cantidad de grasa total (y excretaban más grasa en las heces) entre los marcadores de rastreo de alimentos de cada período de tratamiento (media de la exposición total de grasas: 29,12 g de grasa para rhBSSL y 28,50 g de grasa para el placebo) en comparación con los lactantes alimentados con leche materna (19,00 g de grasa para rhBSSL y 20,51 g de grasa para el placebo) [cifras no corregidas para ninguna diferencia en el peso corporal].

También se describe en el presente documento un método para proteger de lesiones la mucosa del intestino delgado de un lactante humano, comprendiendo dicho método la etapa de administración entérica de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a dicho lactante. También se describe en el presente documento un método para proteger un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de la grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso, comprendiendo dicho método la etapa de administración entérica de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a dicho lactante. Por otra parte, un método para limitar la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano se da a conocer en el presente documento, comprendiendo dicho método la etapa de administración entérica de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a dicho lactante. En algunos ejemplos de estos métodos, dicho lactante humano es un recién nacido prematuro, se alimenta por sonda entérica o gástrica y/o se alimenta con una fórmula de leche maternizada infantil.

El término "protección", en el contexto de esta descripción será entendido por la persona con experiencia ordinaria, e incluye ejemplos en los que la administración de dicha lipasa previene o reduce la probabilidad, la gravedad y/o la prevalencia de los efectos no deseados en dicho lactante. Los efectos protectores de la administración de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, o su efecto para limitar la acumulación de grasa y/o lípidos no digeridos completamente y/o en exceso, se pueden apoyar adicionalmente en resultados de estudios clínicos adicionales en lactantes humanos. Por ejemplo, la prevalencia o la mortalidad causada por lesiones intestinales en los lactantes - como la prevalencia o la mortalidad causada por enterocolitis necrotizante o perforación del íleo - se puede investigar mediante un análisis de los datos de seguridad procedentes de ensayos clínicos que administran rhBSSL a lactantes humanos. En otros estudios clínicos, estos efectos después de la administración de rhBSSL se pueden investigar más a fondo mediante análisis endoscópico, biopsia o post-mortem de los lactantes humanos. En metodologías alternativas, y menos invasivas, estos efectos ventajosos de rhBSSL se pueden investigar realizando un seguimiento de un biomarcador indicativo, por ejemplo uno que puede estar presente en la sangre o el plasma del lactante humano, y en donde la presencia/ausencia o el nivel/concentración de dicho biomarcador se correlaciona con el inicio, el diagnóstico, la presencia o la gravedad de uno o más de los efectos nocivos que se citan en el presente documento. El inicio, el diagnóstico, la presencia y/o la gravedad de esos efectos deletéreos, también se pueden supervisar utilizando otras técnicas médicas, tales como la manipulación de la región abdominal del lactante, la temperatura corporal y/o los patrones de comportamiento/sueño del lactante. En particular, la enterocolitis necrotizante, se puede diagnosticar y/o evaluar - ya sea como parte de un ensayo clínico, o como parte de un examen médico - mediante radiografía abdominal o utilizando el sistema de estadios de Bell para la enterocolitis necrotizante (Bell et al., 1978; Ann Surg, 187:1-7). Alternativamente, los patrones de heces, la presencia de sangre oculta o la presencia de patógenos específicos se pueden usar como indicadores de riesgo de NEC, o los residuos gástricos se pueden utilizar como un indicador de la enterocolitis necrotizante.

La descripción de los inventores en esta memoria - en donde en los ensayos clínicos en los que se administra la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a lactantes humanos, la tasa de crecimiento de dichos lactantes era más pronunciada que el aumento en el coeficiente de absorción de grasa global (es decir, todos o los ácidos grasos más abundantes) - sugería que mecanismos adicionales al de la digestión de lípidos a través de rhBSSL pueden ser factores para explicar estos resultados. Los lactantes humanos alimentados con fórmula de leche maternizada infantil fueron expuestos a una mayor cantidad de grasa total, en comparación con los alimenta-

- dos con leche materna, y la falta de concordancia entre un aumento de su tasa de crecimiento y un incremento de su CFA global tras la administración de rhBSSL, era más pronunciada. Como puede estar respaldado por la evidencia indirecta proporcionada a partir de estos datos de los ensayos clínicos (sobre todo en aquellos lactantes que ingerían más grasas en la fórmula de leche maternizada infantil), la administración de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a lactantes humanos puede permitir que se digieran más lípidos - lo que produce menos grasa/lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso, y por lo tanto produce menos lesión en sus intestinos gruesos, así como en las microvellosidades de los mismos, causada por grasa/lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso. Un intestino que está menos dañado será capaz de absorber mejor nutrientes del alimento infantil distintos de los ácidos grasos, tales como hidratos de carbono, proteínas y sus productos de digestión, incluyendo monosacáridos y aminoácidos. Los hidratos de carbono y las proteínas que, como las grasas también proporcionan una parte sustancial de las necesidades energéticas a un lactante humano, pueden ser absorbidos por tanto de forma más fácil después de la digestión y por ello estos lactantes pueden mostrar un aumento del crecimiento (por ejemplo, debido a un intestino grueso generalmente más sano) que no es explicable solamente por un aumento de la digestión de TG a través de rhBSSL y la absorción de los ácidos grasos resultantes.
- 5 En ciertos casos, la administración de una lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a dicho lactante protege la mucosa del intestino delgado de los efectos nocivos de grasa/lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso, como los que se obtienen a partir de una fórmula de leche maternizada infantil y/o de la leche materna pasteurizada.
- 10 En otros casos, dicho lactante humano se alimenta con una fórmula de leche maternizada infantil y/o leche materna pasteurizada, y en ciertas realizaciones de este tipo, el lactante no se alimenta de leche materna fresca.
- 15 En ejemplos particulares, la administración de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares protege la mucosa del yeyuno y/o del íleon de dicho lactante, y en particular, protege de lesiones el epitelio de las vellosidades del lactante.
- 20 En ejemplos más específicos, la administración de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares protege la mucosa del intestino delgado de necrosis y/o inflamación de la mucosa y/o transmucosa.
- 25 En un ejemplo más particular descrito en el presente documento, la administración de dicha lipasa protege a dicho lactante de ciertos estados patológicos tales como enterocolitis necrotizante y/o perforación del íleon. En algunos de tales ejemplos, la administración de rhBSSL previene o reduce la probabilidad, la gravedad y/o la prevalencia de enterocolitis necrotizante y/o perforación del íleon en dicho lactante.
- 30 Factores que predisponen de forma consistente a la ECN, son la prematuridad, BPN y alimentación entérica, lo que sugiere que las mucosas intestinales inmaduras de estos lactantes no son capaces de soportar el estrés asociado con el procesamiento de una dieta compleja (Kliegman et al., 1993; *Pediatr Res* 34: 701-708). Por consiguiente, en ciertos casos (y también para ciertas realizaciones de la invención), el lactante humano es alimentado por una sonda entérica (o gástrica). En particular, el lactante alimentado por sonda entérica (o gástrica) puede ser un lactante nacido prematuro y/o de bajo peso al nacer.
- 35 Como ahora será bastante evidente para la persona con experiencia normal, una o varias de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente - por ejemplo las que describen las diversas lipasas recombinantes humanas estimuladas con sales biliares, las cantidades de dosificación, los modos y/o los regímenes de administración, las subpoblaciones infantiles, y también que la administración de rhBSSL puede dar lugar a un aumento de la tasa de crecimiento y un aumento limitado del CFA global - también pueden caracterizar adicionalmente estos métodos de protección (o de limitación de la acumulación) descritos en este documento. Por ejemplo, tales métodos de protección (o de limitación de la acumulación) pueden utilizar una rhBSSL aislada a partir de un producto de expresión de una célula de ovario de hámster recombinante, y/o se puede administrar en una cantidad al día entre 1 y 100 mg de dicha lipasa por kg peso del lactante, tal como se administra en una fórmula de leche maternizada infantil a un lactante prematuro nacido antes de aproximadamente la semana 37 de gestación.
- 40 En ciertas realizaciones de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se administra antes, después o junto con al menos otro complemento alimenticio y/o enriquecimiento de la leche. Varios de estos complementos alimenticios o enriquecimientos de la leche están aprobados, vendidos o utilizados de otro modo para ayudar a aumentar el crecimiento, o beneficiar de otra manera, a lactantes humanos y serán bien conocidos por el experto. A modo de ejemplo no limitante, tales complementos alimenticios y/o enriquecimientos de la leche incluyen: Nutriprem, Milupa, Eoprotin, Enfamil Human Milk Fortifier y Similac Human Milk Fortifier. En ciertas otras realizaciones de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se administra antes, después o junto con al menos otra lipasa, tal como otra lipasa humana recombinante.
- 50 En realizaciones alternativas, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se administra sin una administración de complementos alimenticios adicionales y/o enriquecimientos de la leche (como los descritos o definidos en este documento), o sin la administración de ninguna otra lipasa.
- 55 Como se apreciará, la relativa facilidad con la que la presente invención se puede poner en práctica - en una realización, la administración es simplemente mediante la adición de la lipasa humana recombinante estimulada por sales

biliares a una fórmula de leche maternizada infantil para la alimentación oral del lactante humano - favorece que la invención se practique en el domicilio del lactante sin intervención, supervisión, apoyo o asesoramiento médico. Por ejemplo, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se puede vender generalmente como un complemento dietético para ayudar al crecimiento o a la salud general de los bebés, así como para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante cuando culturalmente es deseable que el lactante alcance su propio potencial de crecimiento, para la protección contra lesiones de la mucosa del intestino delgado o para limitar la acumulación de grasa/lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso. Como un ejemplo adicional no limitante, una fórmula de leche maternizada infantil se puede preparar y distribuir para uso doméstico, incluyendo ya una cantidad apropiada de rhBSSL.

Alternativamente, la presente invención se puede poner en práctica, o instruir para que se ponga en práctica, a través de personal médico cualificado, o de otro modo bajo o con intervención médica, supervisión o asesoramiento, como en un hospital o clínica médica, por ejemplo, en una unidad de cuidados intensivos de atención a lactantes humanos con bajo peso, BPN y/o prematuros. En tales casos, el lactante puede requerir atención médica para un aumento de la tasa de crecimiento, así como el peso corporal, puede necesitar protección contra una lesión de la mucosa del intestino delgado o necesita limitar la acumulación de grasa/lípidos digeridos de forma incompleta o en exceso, y la cantidad de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares puede ser una cantidad terapéuticamente eficaz.

También se describe en esta memoria un método terapéutico para el tratamiento de un lactante humano que padece bajo peso o nacimiento prematuro, comprendiendo dicho método la etapa de administración entérica de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a un lactante con necesidad médica de la misma. Los lactantes con una necesidad particular de tal intervención médica pueden ser pequeños para la edad gestacional (PEG), lactantes de bajo peso al nacer (BPN), los que padecen un retraso del crecimiento (RC) y/o lactantes nacidos antes de la semana 37 de gestación; en cada caso, tal y como se describen o se definen en este documento. Como alternativa, ejemplos de métodos terapéuticos para: (X) proteger de lesiones la mucosa del intestino delgado de un lactante humano; para (Y) proteger un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de grasa/lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso; y/o para (Z) limitar la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano, se describen en el presente documento; en cada caso comprendiendo dichos métodos la etapa de administración entérica de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a un lactante que la requiere.

En algunos casos, puede ser útil preparar primero un alimento para lactantes que contiene lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares. En consecuencia, un método para preparar una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada que comprende rhBSSL se describe en esta memoria, en donde dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada es útil para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano. En particular, tal método comprende las etapas de:

- i. proporcionar una primera cantidad de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares y una segunda cantidad de una fórmula de leche maternizada infantil no modificada o leche materna pasteurizada no modificada; y
- ii. añadir una cantidad de dicha lipasa a dicha fórmula de leche maternizada infantil no modificada o leche materna pasteurizada no modificada de manera que se forma una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada,

con el fin de producir una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada que incluye una cantidad de lipasa eficaz para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano, cuando con dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada se alimenta a dicho lactante durante un régimen de administración tal como se describe o se define en otra parte en este documento.

También se describen métodos análogos al método anterior, en donde la fórmula de leche maternizada infantil modificada o la leche materna modificada es útil para, y la cantidad de rhBSSL en la misma es eficaz para, respectivamente: (X) proteger de lesiones la mucosa del intestino delgado de un lactante humano; para (Y) proteger un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso; y/o para (Z) limitar la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano.

En ciertas realizaciones de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se proporciona en una forma que es adecuada para el almacenamiento, distribución y/o incorporación en la fórmula de leche maternizada infantil modificada o la leche modificada como se describe en esta memoria. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, dicha lipasa se proporciona como una formulación liofilizada. Típicamente, la formulación liofilizada de dicha lipasa se proporcionará en un recipiente de tamaño conveniente, tal como en un vial, y puede comprender una cantidad apropiada de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares. En ciertas realizaciones de este tipo, el recipiente es un recipiente estéril, incluyendo un vial estéril. Cuando se proporciona como una formulación liofilizada, la rhBSSL se puede solubilizar, como con agua estéril, antes de la adición a la fórmula de leche maternizada infantil o a la leche, o, alternatively, la formulación liofilizada de rhBSSL puede solubilizarse

directamente en dicha fórmula de leche maternizada infantil o en la leche.

Para una mayor comodidad o por otras razones, tales como la esterilidad o la seguridad, en ciertas realizaciones de la presente invención la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se proporciona como una dosis unitaria. Una dosis unitaria puede proporcionar suficiente (o un poco más) rhBSSL que la que se requiere para una administración aislada en una unidad o recipiente discreto. Alternativamente, un pequeño número de tales unidades o recipientes independientes juntos, tal como entre 2 y 5 de tales unidades o recipientes independientes, proporciona suficiente (o ligeramente más) rhBSSL que la que se requiere para una administración aislada. En ciertas realizaciones de este tipo, la forma de dosis unitaria comprende una cantidad de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares que está entre 1,5 y 75 mg de lipasa. En realizaciones particulares de este tipo, la cantidad de rhBSSL está entre 5 y 45 mg o aproximadamente 20 mg de dicha lipasa.

En otra realización, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se proporciona como una solución. La concentración de rhBSSL en tal solución puede ser entre 1,5 y 150 mg/mL, y en ciertas realizaciones de este tipo puede tener una concentración de entre 7,5 y 30 mg/mL, tal como una concentración de aproximadamente 15 mg/mL.

En realizaciones particulares de la presente invención, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se proporciona como una composición o como una formulación farmacéutica, tal como una composición liofilizada o solución, que incluye uno o varios vehículos farmacéuticamente aceptables, así como la rhBSSL. Los vehículos farmacéuticamente aceptables adecuados, si son necesarios, serán conocidos por una persona con conocimientos ordinarios e incluyen los descritos en otra parte en este documento.

El método de preparación de una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada que comprende rhBSSL puede incluir además la etapa de alimentar con dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada (preparada de este modo por el método) a un lactante humano, administrando así la rhBSSL a dicho lactante mediante administración entérica. En tales ejemplos, dicho lactante puede ser alimentado con la fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada durante un régimen de administración tal y como se describe o se define en este documento.

Los inventores han descrito en este documento que un alimento infantil (fórmula de leche maternizada o leche materna pasteurizada) que incluye rhBSSL, muestra en condiciones de ensayos clínicos controlados, el efecto de aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano. En consecuencia, también se describe en esta memoria una fórmula de leche maternizada infantil modificada que incluye lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares en una cantidad eficaz para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano; por ejemplo, cuando con dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada se alimenta a dicho lactante durante un régimen de administración que se describe o define en este documento.

En ciertos ejemplos, la fórmula de leche maternizada para lactantes modificada ya está preparada para la alimentación. En otros ejemplos, la fórmula de leche maternizada para lactantes modificada se somete a un procesamiento antes de alimentar a dicho lactante. Por ejemplo, la fórmula de leche maternizada se puede disolver en agua y/o calentar hasta una temperatura apropiada para una toma, tal como 37°C. En ejemplos particulares de este tipo, la fórmula de leche maternizada infantil modificada se proporciona como un polvo o gránulos, o como un líquido listo para el uso o como una suspensión o una solución concentrada.

También se describe una leche materna pasteurizada modificada que incluye lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares en una cantidad eficaz para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano; por ejemplo cuando se alimenta con dicha leche materna pasteurizada modificada a dicho lactante durante al menos una toma al día durante al menos aproximadamente 4 días, por lo menos una toma al día durante un régimen de administración tal como se describe o define en este documento.

Tal leche materna modificada puede estar ya preparada para la alimentación. En otros ejemplos, la leche materna modificada se somete a un procesamiento antes de dar la toma a dicho lactante. Por ejemplo, la leche materna modificada se puede descongelar desde un estado congelado y/o calentar hasta una temperatura apropiada para la toma, tal como 37°C.

También se describe en esta memoria: una leche materna pasteurizada modificada que incluye lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares; una fórmula de leche maternizada infantil modificada que incluye lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares; una composición farmacéutica que incluye lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares; o se refiere a una lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares *per se*; en cada caso para uso en: (X) la protección de la mucosa del intestino delgado de un lactante humano frente a lesiones; en (Y) la protección de un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso; y/o para uso en (Z) la limitación de la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano. Realizaciones particulares de tales aspectos son en cada caso para uso en: (V) la protección de la mucosa del intestino delgado de dicho lactante frente a una necrosis de la mucosa y/o transmucosa, y/o una inflamación; y/o para uso en (W) la protección de un lactante humano frente a enterocolitis necrotizante y/o perforación del íleon, y/o la preven-

ción o la reducción de la probabilidad, la gravedad y/o la prevalencia de una enterocolitis necrotizante y/o perforación del íleo en dicho lactante. En ciertas realizaciones de tales aspectos, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se adapta para una administración entérica a dicho lactante. En ciertas realizaciones adicionales de todos estos aspectos, el lactante humano es alimentado por sonda entérica (o gástrica) y/o ha nacido de forma pre-  
5  
matura.

Además, en el presente documento se da a conocer el uso de una lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares para la preparación de un medicamento, siendo dicho uso para: (X) la protección de la mucosa del intestino delgado de un lactante humano frente a lesiones; para (Y) la protección de un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso; y/o  
10 para (Z) la limitación de la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano. Ejemplos particulares son en cada caso para: (V) la protección de la mucosa del intestino delgado de dicho lactante frente a una necrosis de la mucosa y/o transmucosa, y/o una inflamación; y/o para (W) la protección de un lactante humano frente a enterocolitis necrotizante y/o perforación del íleon, y/o la prevención o la reducción de la probabilidad, la gravedad y/o la prevalencia de una enterocolitis necrotizante y/o perforación del íleo  
15 en dicho lactante. En un cierto ejemplo de tal uso, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se adapta para una administración entérica a dicho lactante. En ciertos ejemplos adicionales de todos esos usos, el lactante humano es alimentado por sonda entérica (o gástrica) y/o ha nacido de forma prematura.

Para la persona de conocimientos ordinarios será ahora claramente evidente, basándose en la descripción anterior, que una o varias de cualquiera de las realizaciones descritas anteriormente - por ejemplo las que describen las di-  
20 versas lipasas humanas recombinantes estimuladas por sales biliares, las cantidades de dosificación, los modos y/o regímenes de administración, las subpoblaciones de lactantes, y también que la administración junto con rhBSSL puede producir un aumento de la tasa de crecimiento y un aumento limitado del CFA global - también pueden caracterizar mejor esta composición y/o ejemplos de uso de la descripción. Por ejemplo, tal composición y/o uso puede emplear una rhBSSL aislada a partir de un producto de expresión de una célula de ovario de hámster recombinante,  
25 y/o se puede administrar en una cantidad al día de entre 1 y 100 mg de dicha lipasa por kg de lactante, así como administrada en una fórmula de leche maternizada infantil a un lactante prematuro nacido antes de aproximadamen- te haber llegado a término la semana 37 de gestación.

Un ejemplo particularmente práctico tal y como se describe en el presente documento se refiere a un kit para la  
30 preparación de una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna modificada que comprende rhBSSL, siendo dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada útil para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano. En ciertas realizaciones dicho kit comprende los componentes:

a. al menos un primer recipiente que incluye una primera cantidad de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, tal como en una formulación liofilizada o en solución; y

35 b. al menos un segundo recipiente, que es distinto del primer recipiente, que incluye una segunda cantidad de fórmula de leche maternizada infantil sin modificar o leche materna pasteurizada sin modificar,

en donde dicha lipasa y dicha fórmula de leche maternizada infantil sin modificar o leche materna pasteurizada sin  
40 modificar, están cada una en una cantidad suficiente para preparar una fórmula de leche maternizada infantil modifi- cada o leche materna pasteurizada modificada, respectivamente, que incluye una cantidad de dicha lipasa eficaz para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano; por ejemplo cuando con dicha fórmula de leche mater- nizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada se alimenta a dicho lactante durante un régimen de administración tal como se describe o define en este documento.

También se describen kits análogos al kit anterior, en donde la fórmula de leche maternizada infantil modificada o la  
45 leche materna modificada es útil, y la cantidad de rhBSSL en la misma es eficaz para, respectivamente: (X) la pro- tección de la mucosa del intestino delgado de un lactante humano frente a lesiones; para (Y) la protección de un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso; y/o para (Z) la limitación de la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incom- pleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano.

En ciertos casos, el kit comprende además instrucciones. Tales instrucciones pueden describir cómo utilizar el kit o  
50 componentes particulares de dicho kit. Por ejemplo, dichas instrucciones pueden describir las etapas de:

i. preparar una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada, tal como mediante la adición de una cantidad de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a una fórmula de leche maternizada infantil no modificada o leche materna pasteurizada no modificada con el fin de producir una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modifica-  
55 da, respectivamente;

ii. alimentar con dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modifi- cada a un lactante humano; por ejemplo a través de un régimen de administración tal como se describe o de- fine en este documento.

En otros ejemplos, dichas instrucciones describen además que el lactante humano al que ha de administrarse la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, es un lactante con bajo peso o BPN, que nació prematuro y/o uno que es alimentado mediante sonda entérica (o gástrica). Por ejemplo, un lactante puede ser uno que entra en cualquiera de las clases de bajo peso o prematuros, descritas y definidas previamente en este documento.

5 Un método para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano se describe adicionalmente en este documento, en donde dicho método comprende las etapas de:

i. preparar o proporcionar de otro modo una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada en cada caso que comprende rhBSSL o preparada por el método o empleando el kit anterior;

10 ii. alimentar con la fórmula de leche maternizada infantil modificada o la leche materna pasteurizada modificada preparada de este modo o proporcionada de otro modo a dicho lactante; y

iii. repetir las etapas anteriores durante un régimen de administración tal como se describe o se define en esta memoria.

15 Por otra parte, un método para: (X) la protección de la mucosa del intestino delgado de un lactante humano frente a lesiones; para (Y) la protección de un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso; y/o para (Z) la limitación de la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano, se describe en el presente documento; en cada caso, dicho método comprende las tres etapas establecidas en el método anterior.

20 De particular utilidad para las aplicaciones médicas o terapéuticas proporcionadas en el presente documento es una composición farmacéutica en una dosis unitaria que incluye entre 0,1 y 100 mg de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares. Una dosis unitaria la entenderá fácilmente la persona experta en la técnica, e incluye, por ejemplo, las descritas o definidas en otro lugar en este documento. En ciertas realizaciones, la dosis unitaria incluye entre 1,5 y 75 mg de rhBSSL. En particular, la dosis unitaria incluye entre 5 y 45 mg de dicha rhBSSL, tal como aproximadamente 10, 15, 20 o 25 mg de dicha lipasa.

25 Como se apreciará de la exposición anterior sobre cantidades de enzima, en ciertas realizaciones, la dosis unitaria de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se puede expresar de varias maneras, incluyendo términos de masa absoluta de rhBSSL, o en términos de masa de rhBSSL activa. Alternativamente (o además), la cantidad de rhBSSL se puede expresar en términos de unidades (U) de enzima. En consecuencia, la dosis unitaria puede incluir una cantidad de entre aproximadamente 2.000 y 20.000 unidades de rhBSSL (U), entre aproximadamente 5.000 y aproximadamente 15.000, tal como entre aproximadamente 7.000 y 10.000 unidades de rhBSSL.

30 En ciertos ejemplos, la composición farmacéutica está adaptada para la administración entérica, y/o para la administración a un lactante humano, de modo que dicha dosis unitaria está adaptada específicamente para la administración entérica a un lactante humano. Por ejemplo, dicha dosis unitaria es una cantidad liofilizada, solubilizada o congelada de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares en una cantidad y/o formulación adecuada para la adición o la preparación como alimento de fórmula de leche maternizada infantil o de leche materna. En otros ejemplos, la dosis unitaria se puede proporcionar en una forma, un recipiente o una cantidad de rhBSSL tal y como se describe o se define en este documento.

35 En este documento se describe además una composición farmacéutica que incluye entre 0,1 y 100 mg de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, en donde dicha lipasa no está aislada a partir de leche de una oveja transgénica.

40 Como apreciará ahora una persona con experiencia ordinaria en la técnica, la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares que está comprendida en cualquiera de los kits o composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, puede ser cualquiera de las lipasas humanas recombinantes estimuladas con sales biliares, descritas o definidas en este documento.

45 En un ejemplo relacionado, se describe un producto farmacéutico envasado que comprende una composición farmacéutica que incluye una cantidad de lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, en donde dicho producto farmacéutico envasado comprende además instrucciones que describen las etapas de:

50 i. preparación de una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada que contiene rhBSSL en una cantidad eficaz para aumentar la tasa de crecimiento de un lactante humano cuando con dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada se alimenta a dicho lactante durante al menos una toma al día durante al menos aproximadamente 4 días, por lo menos una toma al día durante al menos aproximadamente 5 días, o por lo menos una toma al día durante al menos aproximadamente 7 días; y

55 ii. administración entérica de dicha cantidad de rhBSSL alimentando con dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada a un lactante humano con un régimen de admi-

nistración tal como se describe o se define en esta memoria.

5 En un ejemplo alternativo, se describen productos farmacéuticos envasados análogos, en donde las instrucciones en los mismos describen la etapa (i.) como la preparación de una fórmula de leche maternizada infantil modificada o  
 10 leche materna pasteurizada modificada que contiene rhBSSL en una cantidad eficaz para: (X) la protección de la mucosa del intestino delgado de un lactante humano frente a lesiones; para (Y) la protección de un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso; y/o para (Z) la limitación de la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano; en cada caso cuando con dicha fórmula de leche maternizada infantil modificada o  
 15 leche materna pasteurizada modificada se alimenta a dicho lactante durante al menos una toma al día durante al menos aproximadamente 4 días, por lo menos una toma al día durante al menos aproximadamente 5 días, o por lo menos una toma al día durante al menos aproximadamente 7 días

20 En otros ejemplos, un producto farmacéutico envasado puede comprender además una fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada. Dicha fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada se puede incluir en el producto farmacéutico envasado como un componente distinto de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares; es decir, puede ser una fórmula de leche maternizada para lactantes sin modificar o una leche materna pasteurizada sin modificar. En una realización alternativa de este tipo, el producto farmacéutico envasado puede incluir la fórmula de leche maternizada infantil o la leche materna pasteurizada que ya comprenda la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares; es decir, puede ser una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada sin modificar. En cualquiera de tales realizaciones, la  
 25 fórmula de leche maternizada infantil se puede proporcionar como un granulado o polvo seco para solubilizar, o se puede proporcionar como un líquido (ya sea en una concentración apropiada o como un concentrado) en un recipiente adecuado o como una muestra congelada.

En ciertos casos, la composición farmacéutica es una descrita o definida en otra parte en este documento.

30 En otros ciertos casos, las instrucciones de un producto farmacéutico envasado describen que el lactante humano al que ha de administrarse la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares padece, o debería padecer, tener bajo peso, tener BPN, ser un nacimiento prematuro y/o estar alimentado por sonda entérica (o gástrica). Por ejemplo, dicho lactante puede tener uno o varios alimentos para el peso o prematuros o indicaciones como se describen en otra parte en este documento.

35 En particular, las instrucciones de los productos farmacéuticos envasados o los kits pueden describir que la fórmula de leche maternizada infantil modificada o la leche materna pasteurizada modificada, o la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares, es para, es eficaz para o se ha mostrado/demostrado que es eficaz y segura en un ensayo clínico y para: (A) incrementar la tasa de crecimiento de un lactante humano; y/o (B) para: (X) proteger la mucosa del intestino delgado de un lactante humano frente a lesiones; para (Y) proteger un epitelio intestinal inmaduro de un lactante humano de los efectos nocivos de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso; y/o para (Z) limitar la acumulación de grasa y/o lípidos digeridos de forma incompleta y/o en exceso en el íleon de un lactante humano.

40 En cualquiera de los métodos tal y como se describen en el presente documento que requieren la preparación o el suministro de una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada, o sus kits o productos farmacéuticos envasados que incluyen instrucciones que describen tal preparación o suministro, puede ser necesario que la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares y/o la fórmula de leche maternizada infantil no modificada o la leche materna pasteurizada no modificada se tenga que descongelar y/o solubilizar antes de que se prepare la fórmula de leche maternizada infantil modificada o la leche materna pasteurizada modificada. Tal preparación o suministro puede incluir que la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares se añada a una fórmula de leche maternizada infantil sin modificar (por ejemplo, proporcionada como una mezcla pre-  
 45 via seca) o a la leche materna pasteurizada congelada sin modificar. En otros casos, tal preparación o suministro puede incluir que una fórmula de leche maternizada infantil modificada o leche materna pasteurizada modificada se descongele y/o caliente primero hasta una temperatura apropiada para la alimentación de un lactante humano, por ejemplo a 37°C. En otros casos, la leche materna congelada sin modificar se descongela primero, después se añade la rhBSSL, y después, por ejemplo, se solubiliza si dicha lipasa se proporciona como un polvo liofilizado o en forma de granulado.

50 Como apreciará la persona con experiencia ordinaria en la técnica, la fórmula de leche maternizada infantil modificada o la leche materna pasteurizada modificada tal y como se describe en esta memoria, o el kit, el producto farmacéutico envasado, la rhBSSL o la composición farmacéutica no tienen que estar en una cuantía, tamaño o cantidad que satisfaga las necesidades de todo un régimen de tratamiento. Por ejemplo, una cantidad de nuevo aporte de  
 55 fórmula de leche maternizada infantil modificada o de leche materna pasteurizada modificada se puede preparar, por ejemplo, a partir de un kit, o de composiciones farmacéuticas de la presente invención para cada administración para el lactante humano, de manera que múltiples kits o composiciones farmacéuticas se utilizan durante el curso del régimen de tratamiento.

Se ha de entender que la aplicación de las enseñanzas de la presente invención a un problema o ambiente especifi-



co, estará dentro de las capacidades de un experto ordinario en la técnica de cara a las enseñanzas contenidas en este documento. Ejemplos de los productos, composiciones, envases o kits de la presente invención y métodos o procedimientos representativos para su preparación o uso, se presentan a continuación.

5 Todas las referencias, patentes y publicaciones citadas en este documento se incorporan como referencia en su totalidad.

**EJEMPLIFICACIÓN**

La siguiente ejemplificación que incluye los experimentos realizados y los resultados obtenidos, también ilustra diversas realizaciones actualmente particulares de la presente invención, y se proporcionan solamente con fines ilustrativos y no deben interpretarse como limitantes de la presente invención.

10 Sección 1: Sustancia farmacéutica, su caracterización y preparación del producto farmacéutico en fase de investigación.

La sustancia farmacéutica, una lipasa humana estimulada por sales biliares, que tiene una secuencia de aminoácidos prevista tal y como se muestra en SEQ ID. NO. 1, fue producida mediante expresión a partir de células recombinantes de ovario de hámster chino (CHO) que contenían un sistema de expresión de ácido nucleico que comprendía la secuencia de nucleótidos que codificaba BSSL humana, de acuerdo con procedimientos convencionales. Brevemente, la secuencia de ADNc de 2,3 kb que codificaba hBSSL de longitud completa que incluía la secuencia líder (como se describe por Nilsson et al., 1990; Eur J Biochem, 192: 543-550) se obtuvo a partir de pS146 (Hansson et al., 1993; J Biol Chem, 268: 26692-26698) y se clonó en el vector de expresión pAD-CMV 1 (Boehringer Ingelheim) - un plásmido basado en pBR que incluye el promotor de CMV/la señal poliA de SV40 para la expresión génica y el gen dhfr para la selección/amplificación - para formar pAD-CMV-BSSL. A continuación, pAD-CMV-BSSL se utilizó para la transfección de células CHOss negativas para DHFR (Boehringer Ingelheim) - junto con la cotransfección del plásmido pBR3127 SV/Neo pA que codificaba la resistencia a neomicina para seleccionar mediante resistencia a geneticina (G418) - para generar células CHO que producían BSSL, positivas para DHFR. Las células CHO resultantes fueron cultivadas en condiciones y a escala para expresar grandes cantidades de rhBSSL. Por ejemplo, las células del banco de células primario (BCP) se descongelaron, se expandieron en matraces de agitación usando medio Ex-Cell 302 sin glutamina y glucosa (SAFC), más tarde complementado con glutamina y glucosa, seguido por crecimiento en biorreactores de 15 y 100 L, antes de inocular el biorreactor de 700 L de producción, en donde BSSL se expresaba de forma constitutiva y se producía en un proceso de alimentación por lotes. El cultivo se recoge como un único lote y el polipéptido maduro de rhBSSL (es decir, sin la secuencia líder) se purifica a partir de las células, restos celulares y otros contaminantes a través de una variedad de etapas aguas abajo, incluyendo una etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Los virus contaminantes se pueden inactivar mediante tratamiento a pH bajo y una etapa de tratamiento con calor seco. La sustancia farmacéutica (SF) a granel de rhBSSL se filtra por diálisis y se concentra hasta la formulación apropiada. Después de la formulación, el material se divide en uno a tres lotes para liofilización y tratamiento térmico, generando de uno a tres lotes de SF.

35 La producción de rhBSSL en este sistema de expresión de células de mamífero produce rhBSSL que tiene una secuencia de aminoácidos prevista como la que se muestra en SEQ ID. NO. 1 y una estructura representada esquemáticamente en la Figura 1.1, también marcando los sitios de glicosilación potencial.

Esta forma de rhBSSL parece mostrar una glicosilación que es diferente a la de hBSSL natural, encontrada en la leche humana (BSSL-MAM) y también a la de rhBSSL-OVI (producida a partir de ovejas transgénicas). Por ejemplo, usando cromatografía de intercambio aniónico a pH elevado con detección amperiométrica pulsada (HPAEC-PAD), se determinó el nivel de glicosilación de los monosacáridos y el ácido siálico para la rhBSSL derivada de CHO producida y utilizada para los ensayos clínicos descritos en la presente memoria (rhBSSL-CHO), y se encontró que tenía un nivel de glicosilación total que era menor que el de BSSL-MAM, pero mayor que el de rhBSSL-OVI (véase la Tabla 1.1). Estos niveles globales de glicosilación se correlacionaban con las masas moleculares globales de cada forma de BSSL, las cuales determinadas por MALDI-MS, se encontró que eran aproximadamente de 85 kDa para rhBSSL-CHO en comparación con 100 kDa y 78 kDa para BSSL-MAM y rhBSSL-OVI, respectivamente. Como se muestra en la Tabla 1.1, el patrón o el perfil de glicosilación (de monosacáridos y ácido siálico) en los posibles sitios de glicosilación, en particular el de O-glicanos, es diferente para rhBSSL-CHO en comparación con rhBSSL-MAM y rhBSSL-OVI (detección utilizando electroforesis capilar con detección mediante fluorescencia inducida por láser [CE-LIF] y/o HPAEC-PAD).

Tabla 1.1: Contenido en monosacáridos y ácido siálico [moles/(mol de BSSL)] para rhBSSL-CHO, rhBSSL-OVI y hBSSL-MAM

	rhBSSL-CHO	hBSSL-MAM	rhBSSL-OVI
Contenido en monosacáridos			
Fucosa	2,0	30,6	1,3
Galactosamina	16,6	15,8	3,0

	rhBSSL-CHO	hBSSL-MAM	rhBSSL-OVI
Glucosamina	2,1	37,6	0,0*
Galactosa	17,5	51,8	3,4
Glucosa	0,0	0,0	0,0
Manosa	5,0	9,8	2,5
Total	43,2	145,6	10,2**
Contenido en ácido siálico			
Ácido N-acetil neuramínico	27,9	16,4	0,5
Ácido N-glicosil neuramínico	0,0	0,0	5,0
Total	27,9	16,4	5,5
* Cuando se analizaba la glucosamina en el material de rhBSSL-OVI, se observaba un pequeño pico en el cromatograma. Sin embargo no se notificó ningún valor ya que dicha cantidad baja se calculó como un valor negativo debido a un mayor punto de intersección de la curva de calibración, que se restó. Un valor absoluto/no corregido estimado era de 1,8 moles de glucosamina/mol de BSSL.			
** La suma total incluyendo glucosamina (absoluta/no corregida) era de 12 moles/mol de BSSL.			

No solo es diferente el grado y la distribución de la glicosilación de rhBSSL-CHO frente a BSSL-MAM y rhBSSL-OVI, sino que a través de la secuencia de aminoácidos C-terminal (determinada, por ejemplo, por cartografiado del péptido Glu-C de la endoproteína y la identificación de secuencias utilizando cromatografía líquida en combinación con espectrometría de masas con ionización por electroespray [LC-ESI-MS-MS]) se encontró que una gran proporción de las moléculas de lipasa están acortadas en un (ocasionalmente dos) aminoácidos, en comparación con las moléculas de polipéptido de longitud completa (previstas). Para cada molécula con un extremo C-terminal de longitud completa secuenciado, se detectan aproximadamente tres moléculas que tienen un extremo C-terminal truncado en el último aminoácido. En una pequeña proporción de las secuencias C-terminales, se detecta que se truncaron en los 2 últimos aminoácidos. Por ejemplo, en esta población de moléculas de lipasa (aproximadamente de longitud completa), aproximadamente el 25% son de longitud completa, aproximadamente el 75% son más cortas en un aminoácido y menos del 1% son más cortas en dos aminoácidos.

Las diferencias en las propiedades funcionales se observan entre rhBSSL-CHO y BSSL-MAM y en rhBSSL-OVI. La actividad específica de rhBSSL-CHO se observa que es mayor que la de las otras formas de BSSL. Las actividades específicas de BSSL-MAM y rhBSSL-OVI son solo el 80% de la de rhBSSL-CHO basada en la masa. Cada muestra se purifica específicamente mediante HA-HPLC y SE-HPLC antes de la determinación de la actividad específica. La actividad específica se determina usando butirato de 4-nitrofenilo (PNPB) como sustrato para BSSL, y la detección de la liberación de 4-nitrofenol. Brevemente, se prepara una serie de diluciones de rhBSSL (por ejemplo, de 20 a 160 ng de actividad/mL) en PBS con 0,1% de BSA. Se añaden 200 µl de estas soluciones de rhBSSL a 25 µl de una solución de activación que contiene colato de sodio 20 mM (como activador de las sales biliares) en PBS con 0,1% de BSA. Estas soluciones se incuban previamente en un espectrofotómetro a 27°C durante 5 minutos. Justo antes de la medición, se añaden 25 µl de una solución de sustrato bien mezclada que contiene PNPB 5 mM en PBS-Tween. La formación de 4-nitrofenol se puede detectar por su absorbancia a 400 nm y el incremento de la absorbancia se mide durante 90 segundos. La cantidad activa de BSSL se determina utilizando una curva estándar de un patrón de referencia de rhBSSL.

El producto en fase de investigación clínica se preparó a partir de la sustancia farmacéutica liofilizada que se disuelve en agua para inyección. La solución se filtra previamente (10 µm), y se ajusta a la concentración final (activa) con agua para inyección. El producto se filtra a través de un filtro de 0,22 µm y se envasa en viales de vidrio de 10 mL esterilizados previamente. Los viales se tapan con tapones esterilizados y se sellan con tapas de aluminio.

## 30 Sección 2: Informe resumido sobre los datos combinados de dos estudios en fase II con rhBSSL

Número de protocolo: BVT.BSSL-020

Número de EUDRACT: 2007-002423-33

Identificador de Clinicaltrials.gov: NCT00658905

35 **Un estudio prospectivo, aleatorizado, cruzado, de doble ciego que compara 0,15 g/L de rhBSSL añadidos a la fórmula de leche maternizada infantil frente a placebo durante una semana de tratamiento en lactantes prematuros nacidos antes de la semana 32 de edad gestacional y**

Número de protocolo: BVT.BSSL-021

Número de EUDRACT: 2007-002434-10

Identificador de Clinicaltrials.gov: NCT00659243

5 **Un estudio prospectivo, aleatorizado, cruzado, de doble ciego que compara 0,15 g/L de rhBSSL añadidos a leche materna pasteurizada frente a placebo durante una semana de tratamiento en lactantes prematuros nacidos antes de la semana 32 de edad gestacional**

**LISTA DE ABREVIATURAS**

	AA	Ácido araquidónico
	AE	Evento adverso
10	ANCOVA	Análisis de la covarianza
	ANOVA	Análisis de la varianza
	BSSL	Lipasa estimulada con sales biliares
	CFA	Coeficiente de absorción de grasa
	CRF	Cuaderno de recogida de datos
15	DHA	Ácido docosahexaenoico
	FA	Ácido graso
	FAS	Grupo completo de análisis
	g	Gramo
	ICH	Conferencia Internacional de Armonización
20	kg	Kilogramo
	MedDRA	Medical Dictionary for Regulatory Activities
	mm	milímetro
	N/A	No se aplica
	PP	Según protocolo
25	PT	Término preferido
	rhBSSL	lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares
	SAE	Evento adverso severo
	SAP	Plan de Análisis Estadístico
	SAS®	Programa informático de Análisis Estadístico
30	SD	Desviación estándar
	SOC	Grupo de órganos y sistemas
	TEAE	Evento adverso surgido durante el tratamiento
	TLFs	Tablas, listas de datos y cifras

**1. Introducción**

35 Se realizaron dos estudios de fase II con rhBSSL en lactantes prematuros, los estudios BVT.BSSL-020 y -021. El objetivo principal en ambos estudios era comparar la absorción de grasa (coeficiente de absorción de grasa, CFA) en lactantes prematuros después del tratamiento con rhBSSL, con la de un placebo cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada (estudio-020) o en la leche materna pasteurizada (estudio-021). Los objetivos secundarios eran comparar la longitud y el peso corporal en lactantes prematuros después del tratamiento con rhBSSL, con los del placebo cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil/leche materna pasteurizada,

40

y estudiar la seguridad de rhBSSL cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil y leche materna pasteurizada.

La estimación del tamaño de la muestra en cada estudio se basó en una diferencia estimada del 10% en unidades de CFA entre los períodos de tratamiento y una desviación estándar del 15%, con un poder del 90% y un nivel de significación del 5%. Se anticipó que una diferencia del 10% en CFA produciría una diferencia de 2 g/kg/día en la tasa de crecimiento. Sin embargo, se esperaba que ninguno de los estudios tuviera un poder suficiente para demostrar una mejora en el crecimiento, debido al pequeño número de pacientes (32) en cada estudio y la corta duración del tratamiento (1 semana). Por lo tanto, un análisis combinado predefinido de los dos estudios, siendo el objetivo primario demostrar la mejora del crecimiento después del tratamiento con rhBSSL, en comparación con el placebo cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada, se describió en un plan de análisis estadístico independiente (SAP). El SAP para los datos combinados se desarrolló y finalizó antes del bloqueo de la base de datos y el desenmascaramiento de la base de datos clínicos en cualquiera de los dos estudios.

Además, algunos análisis retrospectivos, no descritos en ningún SAP, se realizaron también y se describen en este documento.

El presente informe es un resumen del diseño y los resultados de los dos estudios, centrándose en el análisis combinado, pero también en muchos casos que presentan resultados por estudio. Se basa en la información proporcionada en los informes de estudios individuales, el informe estadístico del análisis combinado y un informe estadístico del análisis retrospectivo.

Ambos estudios se llevaron a cabo según las directrices de ICH GCP y la Declaración de Helsinki. Ambos ensayos fueron aprobados por los Comités de ética independientes apropiados y la autorización por escrito fue firmada por los representantes de todos los pacientes incluidos.

## 2 Objetivos analíticos del análisis combinado

### 2.1 Objetivo Primario

El objetivo primario del análisis combinado era demostrar una mejora del crecimiento después del tratamiento con lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares (rhBSSL) en comparación con un placebo cuando se administraba en una fórmula de leche maternizada infantil o en leche materna pasteurizada.

### 2.2 Objetivos secundarios

Los objetivos secundarios eran los siguientes:

- Demostrar una mejora de la absorción de grasa en lactantes prematuros después del tratamiento con rhBSSL, en comparación con el placebo cuando se administraba en una fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada.
- Comparar la longitud de la rodilla al talón en lactantes prematuros después del tratamiento con rhBSSL, con la del placebo cuando se administraba en una fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada.
- Evaluar la seguridad y la tolerabilidad de rhBSSL en lactantes prematuros cuando se administraba en una fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada.

## 3 Diseño del estudio

Los diseños de los estudios y los procedimientos de los dos estudios fueron los mismos, con la excepción del régimen de alimentación (la fórmula de leche maternizada fue utilizada en el estudio BVT.BSSL-020 y la leche pasteurizada en el estudio BVT.BSSL-021), por lo que la combinación de los datos de los dos estudios es apropiada. Cada estudio planeaba incluir a 32 pacientes con el fin de obtener 26 pacientes evaluables.

Los pacientes fueron asignados al azar a la fórmula de leche maternizada infantil/leche materna pasteurizada complementadas con rhBSSL, con una concentración final de 0,15 g/L, o a la fórmula de leche maternizada infantil/leche materna pasteurizada "complementadas" con agua estéril para inyección (como placebo) durante los primeros 7 días. Después de un período de reposo farmacéutico de 2 días, el paciente se "intercambió" al otro régimen de tratamiento durante un segundo período de tratamiento de 7 días. La recogida de muestras de heces para evaluar el CFA se llevó a cabo durante los últimos 3 días (72 horas) de cada período de tratamiento.

Los pacientes se inscribieron y se asignaron al azar a estos estudios en la unidad de cuidados intensivos neonatales, después de cumplir con la totalidad de los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión. Los lactantes que estaban recibiendo otra fórmula de leche maternizada infantil antes de la inscripción en el estudio 020, debían cambiar su fórmula de leche maternizada actual por la fórmula de leche maternizada del estudio el día de la

inclusión. Para los pacientes en el estudio 021 que estaban recibiendo un enriquecimiento de la leche distinto de Eoprotin, era necesario suspender el enriquecimiento de la leche y/o a cambiar a Eoprotin al menos 2 días antes de la primera dosis.

El diseño del estudio se presenta en la Figura 2.1.

- 5 La pauta de evaluaciones del estudio se proporciona a continuación en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1. Pauta de evaluaciones del estudio

Visita	1* Selección	2* Inicio	Reposo								10 Reposo	11	12	13	14	15	16	17	18 Seguimiento 23 ± 3	
			3	4	5	6	7	8	9											
Día	-7 a -1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	
Autorización por escrito	x																			
Historial médico	x																			
Inclusión/Exclusión	x																			
Datos demográficos	x																			
Laboratorio de rutina, si está disponible #	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>
Examen físico	x							x										x		x
Aleatorización		x																		
Peso corporal (gramos)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Crecimiento de rodilla a talón (milímetros)	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Temperatura corporal	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Presión arterial/frecuencia cardíaca	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ECG, si está disponible #	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>	x <sup>#</sup>
Comprobar dermatitis del pañal		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Medicamento concomitante	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Administración del fármaco del estudio		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Documentación de la ingesta de alimentos		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Peso de vómitos				x	x	x	x	x						x	x	x	x	x		
Colorante trazador				x				x						x				x		
Recogida de heces**				x	x	x	x	x						x	x	x	x	x		
Evaluaciones de la tolerabilidad (consistencia de las heces/color, regurgitación)		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Evento adverso		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x

\* La visita 1 y la visita 2 podían tener lugar al mismo tiempo. Todas las evaluaciones iniciales debían ser realizadas y documentadas en el CRF antes del estudio de la administración del fármaco.

\*\* La recogida de heces se inició con la aparición del primer colorante y continuó hasta que apareció el segundo colorante. No se recogió materia fecal que contenía el segundo marcador.

\*\*\* La ingesta de fórmula de leche maternizada o de leche del estudio continuó hasta que apareció el segundo colorante en las heces.

# Registrado solo cuando está disponible dentro de la atención de rutina. No hay muestras de sangre adicionales o ECG tomados para el estudio.

## La visita 17 se extendía más allá del día 16, si era necesario, hasta que aparecía el segundo colorante trazador.

### Signos vitales recogidos diariamente hasta que apareció el segundo colorante

**4 Selección de los pacientes**

Los pacientes seleccionados para estos estudios eran lactantes nacidos antes de la semana 32 de edad gestacional y que tenían  $\leq 32$  semanas y 6 días de gestación (edad extrapolada) en el momento de la inscripción. Los lactantes incluidos en estos estudios no recibieron nutrición por vía parenteral (con excepción de glucosa).

5 **4.1 Criterios de inclusión**

Un paciente debe cumplir los siguientes criterios con el fin de ser incluido en el estudio:

1. Lactantes prematuros nacidos antes de la semana 32 de gestación y que tenían  $\leq 32$  semanas y 6 días de gestación (edad extrapolada) en el momento de la inscripción
2. Lactantes prematuros apropiados para la edad gestacional (cada centro debe utilizar sus propias curvas o procedimientos de crecimiento y guardar una copia de las utilizadas en el archivo del investigador. La misma curva de crecimiento se debe utilizar para todos los pacientes en un centro)
3. Lactantes prematuros que reciben fórmula de leche maternizada infantil cuyas madres no tienen intención de proporcionar leche materna
4. Lactantes prematuros que reciben nutrición oral o entérica (biberón o sonda nasal)

15 **4.2 Criterios de exclusión**

La presencia de cualquiera de los siguientes criterios excluirá a un paciente de su inclusión en el estudio:

1. Lactantes que reciben nutrición por vía parenteral (excepto glucosa)
2. Para BVT.BSSL-020: Lactantes que reciben enriquecimientos de la leche (por ejemplo, Enfamil, Nutriprem, Eoprotin<sup>®</sup> de Milupa)
  - O si no, los lactantes elegibles que reciben enriquecimientos de la leche, se pueden inscribir si el uso de productos para el enriquecimiento se suspende 2 días antes de la primera dosis
- 20 Para BVT.BSSL-021: Lactantes que reciben enriquecimientos de la leche distinto de Eoprotin<sup>®</sup> (por ejemplo, Enfamil, Nutriprem).
  - O si no, los lactantes elegibles que reciben enriquecimientos de la leche distintos de Eoprotin<sup>®</sup> se podían inscribir si el uso de enriquecimientos se interrumpía 2 días antes de la primera dosis;
3. Lactantes que requieren ventilación mecánica
4. Lactantes pequeños para su edad gestacional (PEG)
5. Lactantes que requieren  $\geq 30\%$  de O<sub>2</sub>
6. Lactantes que reciben fototerapia (bebés que han completado la fototerapia y que están capacitados por lo demás para el estudio, se pueden admitir)
- 30 7. Lactantes con enfermedad cerebral grave, incluyendo hemorragia periventricular o intraventricular de grado III o IV, meningitis o hidrocefalia, hemorragia intracraneal de grado III o IV, leucomalacia periventricular
8. Dismorfología grave o anomalías congénitas que pueden afectar al crecimiento y al desarrollo
9. Lactantes con conducto arterioso persistente (PDA) hemodinámicamente significativo
- 35 10. Evidencia clínica de sepsis (incluyendo un recuento bajo o alto de glóbulos blancos y/o un recuento bajo de plaquetas, y pruebas comprobadas bacteriológicamente de infección sistémica)
11. Infección congénita comprobada (por ejemplo CMV)
12. Presencia de enterocolitis necrotizante
13. Eventos hemorrágicos pulmonares
- 40 14. Tratamiento previo o concomitante con corticoides, excepto hidrocortisona
15. Cualquier afección que, en opinión del investigador, hace que el paciente no sea apto para su inclusión
16. Inscripción en otro estudio clínico concurrente 2 días después de la visita de selección a través de la realización de la visita de seguimiento



**4.3 Eliminación de sujetos de la terapia o la evaluación**

Un paciente se debía retirar del fármaco en estudio si, en opinión del investigador, era necesario por razones médicas o si era el deseo de los padres del paciente o del tutor legal.

Otras razones para la retirada del tratamiento podrían incluir las siguientes:

- 5 • entrada incorrecta en el estudio
- incumplimiento importante del protocolo
- evento adverso

**5 Tratamientos**

**5.1 Tratamientos administrados**

10 La cantidad de fórmula de leche maternizada o de leche administrada se basaba en el peso corporal del paciente según lo registrado en el CRF cada mañana. La concentración de rhBSSL en la fórmula de leche maternizada o la leche materna pasteurizada se mantuvo constante a 0,15 g/L. Los pacientes que recibieron la fórmula de leche maternizada (estudio 020) o la leche materna pasteurizada (estudio 021) con o sin rhBSSL durante 7 días, dependían de la pauta de aleatorización. Se añadió una cantidad igual de agua estéril para inyección (WFI) a la leche materna  
15 pasteurizada sin rhBSSL cuando el paciente fue asignado a placebo. La cantidad de fórmula de leche maternizada/leche administrada cada día se registró en el CRF.

Tratamiento		Fármaco	Forma de dosificación	Vía	Dosis de rhBSSL en la fórmula de leche maternizada/leche	Régimen de alimentación
A	BSSL	rhBSSL	Solución líquida	Oral	0,15 g/L*	Según el peso corporal*
B	Placebo	agua estéril para inyección	Solución líquida	Oral	Volumen que coincide con rhBSSL	Según el peso corporal*

\* Los lactantes estaban recibiendo aproximadamente 150 a 180 mL de leche/kg de peso corporal al día. La cantidad de alimento en una base de mL/kg mL para un lactante en particular tenía que permanecer constante durante ambos períodos de tratamiento.

**5.2 Identidad del producto en fase de investigación**

20 La sustancia farmacéutica BSSL humana recombinante y el producto en fase de investigación clínica (IMP) se prepararon como se describe en la Sección 1 de la Ejemplificación (arriba).

BSSL humana recombinante se entregó como una solución oral congelada en un vial de vidrio de 10 mL. La fuerza era 15 mg/mL y el volumen de llenado de 1,3 mL. El fármaco del estudio se tenía que almacenar congelado (-25°C a -15°C) en el centro del estudio en un lugar inaccesible para personas no autorizadas.

25 Antes de la administración, la solución congelada se descongeló y una parte alícuota de 0,9 mL de la solución de rhBSSL, se transfirió a 90 mL de fórmula de leche maternizada (estudio 020) o de leche materna pasteurizada (estudio 021) para proporcionar una concentración final en el alimento de 0,15 g/L. La fórmula de leche/placebo se preparó de la misma manera, en donde 0,9 mL de agua estéril sustituyeron a la solución de rhBSSL.

Se utilizaron dos lotes de IMP en ambos estudios.

30 La adición del enriquecimiento Eoprotin® como complemento solo se permitió a lo largo del estudio 021 (leche materna); sin embargo, la cantidad de Eoprotin® debía permanecer constante durante la fase de tratamiento.

**5.3 Selección de la concentración**

La concentración de rhBSSL que se iba a añadir a la leche pasteurizada y a la fórmula de leche maternizada se ha seleccionado en base a los niveles presentes normalmente en la leche materna que están en el intervalo de 0,1 - 0,2 g/L.

**5.4 Enmascaramiento**

35 Las pautas de aleatorización se mantuvieron en un lugar seguro, bajo llave por la persona designada de Biovitrum y no fueron reveladas a ningún miembro del personal del hospital, investigadores, personal de BioVitrum o padres hasta después del cierre de la base de datos. La adición de rhBSSL/placebo a la fórmula de leche maternizada o a la leche materna pasteurizada la llevó a cabo un farmacéutico o una persona designada que conocía el tratamiento

asignado y no estaba involucrada en la evaluación de los pacientes.

### **5.5 Terapia previa y concomitante**

5 Otra terapia considerada necesaria para el bienestar del paciente se podía proporcionar si el investigador lo consideraba oportuno. Todas esas terapias debían registrarse en el CRF. La administración concomitante de una nutrición parenteral (con excepción de glucosa), enriquecimientos de la leche (con excepción de Eoprotin en el estudio 021, tal como se ha descrito más arriba) en los 2 días siguientes a la primera dosis del medicamento en estudio, hasta 2 días después de la última dosis, y corticosteroides, excepto hidrocortisona, estaba prohibida durante el estudio. No se podía utilizar ningún otro fármaco en investigación de forma concomitante con el fármaco del estudio. A los pacientes no se les permitió participar simultáneamente en otro estudio clínico.

10 Los lactantes prematuros experimentan frecuentemente complicaciones que requieren una intervención terapéutica. Esto era aceptable siempre y cuando el medicamento no interfiriera con la alimentación. Si el medicamento concomitante daba lugar a una necesidad de alimentación parenteral, el paciente debía ser retirado del estudio. Del mismo modo, el desarrollo de complicaciones que afectaban a la absorción de la nutrición entérica, tales como enterocolitis necrotizante u obstrucción abdominal, requería que el paciente suspendiera su participación en el estudio.

15 El uso de ungüentos para el tratamiento de irritación de la piel estaba prohibido durante el período de 72 horas de recogida de heces. Los pañales se debían cambiar con frecuencia durante el período de recogida de 72 horas para mantener la piel seca. Los pacientes con erupciones graves en la piel que provocaban una interrupción de la recogida de heces, debían ser retirados del estudio.

## **6 Evaluaciones del estudio para el análisis de datos combinados**

### **20 6.1 Evaluaciones de eficacia en cada estudio**

#### **6.1.1 Peso corporal**

El peso del paciente en gramos se registró cada día usando una balanza con una precisión de al menos +/- 5 gramos y se introdujo en el CRF. En la medida de lo posible, el peso corporal se midió a aproximadamente la misma hora cada día.

#### **25 6.1.2 Recogida de muestras**

En el estudio BVT.BSSL-021, se tomaron partes alícuotas de la leche materna antes de la adición de rhBSSL o placebo los Días 4-7 y los Días 13-16.

30 La recogida de heces para la determinación del CFA se llevó a cabo durante un período que correspondía a la ingestión de grasa, es decir, la fórmula de leche maternizada o leche, durante 72 horas hasta el final de cada período de tratamiento. Los pañales suministrados a cada centro se utilizaron para la recogida de heces. Durante los dos períodos de tratamiento, un colorante trazador de rojo carmín se proporcionó como marcador junto con una comida (aproximadamente al mediodía) el Día 4 y el Día 13, respectivamente, y la recogida de heces se inició con la aparición del primer marcador de rojo carmín en las heces. Se recogieron las heces que contenían el primer marcador y la fecha y la hora de las primeras heces recogidas se registró en el CRF. A las 72 horas después de la administración del primer marcador rojo, se administró el segundo marcador de carmín, y la recogida de las heces continuó hasta que apareció el segundo marcador de carmín. No se recogieron las heces que contenían el segundo marcador, pero se registró la fecha y la hora de la aparición del segundo marcador en el CRF. Los pañales se pesaron antes de la colocación y después de retirarlos y la diferencia de peso se registró en el CRF. Los tiempos de cada recogida y la duración de todo el período de recogida, también se registró en el CRF. El uso de ungüentos para el tratamiento de la irritación de la piel estaba prohibido durante el período de recogida de heces. Los pañales se debían cambiar con frecuencia durante el período de recogida para mantener la piel seca. Los pacientes con erupciones graves en la piel que provocaban una interrupción de la recogida de heces, se debían retirar del estudio. Los métodos de recogida específicos se proporcionaron en un manual de laboratorio independiente. Si procedía, se pesó el vómito de los períodos de recogida de heces de ambos períodos de tratamiento. Se pesó un pequeño paño/sábana y se colocó debajo de la cabeza de cada lactante. Cuando el paño/sábana estaba manchado de vómito, se retiraba y se volvía a pesar. Si se había utilizado un paño adicional para eliminar el vómito del lactante, ese paño también se pesaba antes y después del uso. El peso del vómito (peso total menos el peso del paño/sábana) se registró en el CRF. Todas las otras pérdidas de alimento, por ejemplo, la fórmula de leche maternizada o leche que quedaba en el biberón, se midieron y la cantidad se incluyó en el cálculo del volumen de la fórmula de leche maternizada consumida en cada toma.

Se recogieron todos los pañales y servilletas de papel usados durante cada período de recogida. Se colocaron en una bolsa sellada, con la etiqueta de identificación del paciente y la fecha y la hora, y se almacenaron a -20°C hasta su envío al laboratorio analítico.

#### **6.1.3 Análisis de las muestras**

Las muestras de heces, partes alícuotas de la fórmula de leche maternizada (estudio 020) y de leche (estudio 021) fueron analizadas en un laboratorio central. Ácidos grasos individuales, incluyendo los ácidos grasos poliinsaturados de cadena larga DHA y AA, se cuantificaron en las heces y en el alimento mediante un método de cromatografía de gases después de la extracción por el método de Folch. En ambos estudios, se utilizó la columna Omegawax 250 (Supelco) para la separación de los ácidos grasos. Sin embargo, debido a la coelución de DHA con ácido nervónico (C24:1), que solo estaba presente en la leche materna, las muestras procedentes de pacientes del grupo análisis según protocolo, procedentes del estudio 021, también se analizaron utilizando una columna SP-2380 (Supelco) con el fin de cuantificar el DHA para las muestras procedentes del estudio 021. Esta columna proporciona una buena separación de DHA y C24:1, pero es menos adecuada para la separación total de otros ácidos grasos en la fórmula de leche maternizada y la leche; por lo tanto, los ácidos grasos individuales de estas muestras procedentes del estudio 021 (leche materna) fueron separados y analizados utilizando (por separado) la columna SP-2380 (para DHA) y la columna Omegawax 250 (para todos los demás ácidos grasos). Los lípidos totales se calcularon como la suma de los ácidos grasos individuales. (Véase la Sección 7.5.1). Se utilizó el mismo principio analítico para determinar los lípidos en cada uno de los lotes de fórmula de leche maternizada y partes alícuotas de leche materna utilizadas en el estudio.

#### 6.1.4 Longitud de rodilla a talón

La longitud de la pierna del paciente se midió desde la rodilla hasta el talón utilizando un knemómetro en los centros. La longitud de la rodilla al talón se registró en milímetros en el CRF. En la medida posible, se midió la longitud aproximadamente a la misma hora cada día y por la misma persona. Se realizaron tres mediciones y se introdujo el valor medio en el CRF.

#### 6.2 Evaluaciones de seguridad: Eventos adversos

El período de notificación de eventos adversos (AEs) en cada estudio se inició después de la administración de la primera dosis (Día 1) del medicamento en fase de investigación y terminó con la visita de seguimiento (1 semana  $\pm$  3 días después de la última dosis ingerida del fármaco del estudio). Todos los AEs que se producían en un paciente durante el período de notificación de eventos adversos se tenían que notificar, se considerara o no que el evento estaba relacionado con la medicación/producto. Además, cualquier evento inadecuado conocido que se produjera con posterioridad al período de notificación de AEs, que el investigador evaluara como posible, probable o definitivamente relacionado con el producto en fase de investigación, también se tenía que notificar como un AE.

### 7 Metodología estadística

#### 7.1 Análisis de las poblaciones

- **Grupo de análisis de seguridad:** Todos los pacientes aleatorizados que recibieron al menos una dosis del medicamento en estudio aleatorizado (rhBSSL o placebo). El análisis de las variables de seguridad se llevó a cabo utilizando el grupo de análisis de seguridad.
- **Grupo completo de análisis (FAS):** Todos los pacientes aleatorizados que recibieron al menos una dosis del medicamento en estudio aleatorizado, y tenían una evaluación inicial y al menos una evaluación posterior a la inicial del peso en ambos períodos de tratamiento.
- **Grupo de análisis según protocolo (PP):** Todos los pacientes incluidos en el FAS que tenían un cumplimiento razonable del tratamiento y no tenían otros incumplimientos importantes del protocolo.

La evaluación de los pacientes que eran idóneos para el grupo de análisis PP dentro de cada estudio se llevó a cabo antes del bloqueo de la base de datos y el desenmascaramiento del estudio respectivo. Para FAS y PP, los grupos de datos combinados incluyen exactamente los mismos pacientes que en los estudios individuales.

#### 7.2 Objetivo estadístico del análisis combinado

##### 7.2.1 Objetivo primario de eficacia e hipótesis

El objetivo primario del análisis de los datos combinados procedentes de los dos estudios era demostrar una mejora del crecimiento después del tratamiento con rhBSSL, en comparación con el placebo cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada.

La hipótesis nula suponía que no había ninguna diferencia entre los tratamientos con respecto a la tasa de crecimiento. La hipótesis alternativa era la siguiente: rhBSSL mejora la tasa de crecimiento en comparación con el placebo cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil o la leche materna pasteurizada.

##### 7.2.2 Objetivos secundarios la eficacia

Los objetivos secundarios de eficacia del análisis de los datos combinados procedentes de los dos estudios eran los siguientes:

- Demostrar la mejora de la absorción de grasa en lactantes prematuros después del tratamiento con rhBSSL, en comparación con el placebo cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil o la leche materna pasteurizada.
- Comparar la longitud de rodilla a talón en lactantes prematuros después del tratamiento con rhBSSL con la del placebo cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil o la leche materna pasteurizada.

Con respecto al CFA, la hipótesis nula no presuponía ninguna diferencia entre los tratamientos. La hipótesis alternativa era la siguiente: rhBSSL mejora la absorción de grasa en comparación con el placebo cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil o la leche materna pasteurizada.

No se ha realizado una prueba estadística de la hipótesis con respecto a la longitud de la rodilla al talón.

### 7.2.3 Objetivo de seguridad

Los objetivos de seguridad del análisis de los datos combinados procedentes de los dos estudios eran evaluar la seguridad y la tolerabilidad de rhBSSL en lactantes prematuros cuando se administraba en la fórmula de leche maternizada infantil o la leche materna pasteurizada.

### 7.3 Situación de los pacientes

La situación de los pacientes se resumió mediante la secuencia de tratamiento y se basó en todos los pacientes aleatorizados en ambos estudios. La tabla resumen incluía el número de pacientes aleatorizados, el número (%) de pacientes que completaron cada estudio, el número (%) de pacientes que abandonaron cada estudio y el número (%) de pacientes para cada motivo de abandono. La tabla resumen también informaba del número (%) de pacientes incluidos en los grupos de análisis de seguridad, FAS y PP, y el número (%) de pacientes que completaron cada período de tratamiento.

### 7.4 Características demográficas e iniciales de los pacientes

Las características demográficas incluían la edad real y la edad gestacional extrapolada el día de la primera dosis del medicamento en estudio, la edad gestacional en el momento del nacimiento, el género, la raza y la etnia. Las características iniciales incluían la longitud de la rodilla al talón y el peso corporal. Se proporcionaron dos tablas resumen de las características demográficas e iniciales. La primera tabla proporcionaba un resumen de los datos combinados mediante secuencia de tratamiento, y la segunda tabla proporcionaba resúmenes de las características demográficas e iniciales por estudio. Las variables continuas se resumieron por el número de pacientes, la media, la desviación estándar (SD), la mediana, los valores mínimos y máximos. Las variables cualitativas se resumieron por el número y el porcentaje de pacientes en cada categoría.

### 7.5 Análisis de eficacia

Todos los datos de eficacia recogidos en estos dos estudios se resumieron para cada estudio y para el análisis combinado utilizando estadísticas descriptivas. Los análisis de eficacia de los ensayos individuales se llevaron a cabo de acuerdo con sus objetivos de eficacia, tal como se describen en la Introducción (los resultados de estos análisis no se presentan en este informe).

El análisis primario del análisis de los datos combinados de los dos estudios se basó en una prueba bilateral utilizando un nivel alfa de significación de 0,05. Se utilizó un procedimiento de ensayo secuencial por etapas para asegurar un nivel múltiple de significación de 0,05.

- 1ª etapa: La hipótesis nula de no diferencia entre los tratamientos con respecto a la tasa de crecimiento se sometió a ensayo usando un nivel alfa de significación de 0,05. Si se rechazaba la hipótesis nula, entonces se debía realizar la 2ª etapa del procedimiento de evaluación secuencial.
- 2ª etapa: La hipótesis nula de no diferencia entre los tratamientos con respecto a CFA se sometió a ensayo usando un nivel alfa de significación de 0,05. Si se rechazaba la hipótesis nula, entonces había que realizar una petición de confirmación con respecto a CFA.

Este procedimiento de comparación múltiple controla que el nivel de significación múltiple no sea superior al 5%.

Los análisis primario y secundario de eficacia describían estimaciones puntuales e intervalos de confianza del 95% en torno a las estimaciones para cada tratamiento y la diferencia estimada entre los tratamientos acompañados con el correspondiente intervalo de confianza del 95%. No se realizaron pruebas de hipótesis para variables distintas de la tasa de crecimiento y el CFA como se ha indicado anteriormente.

Las variables continuas se resumieron empleando n, media, SD, mediana, valores mínimos y máximos. Las variables cualitativas se resumieron empleando el número y el porcentaje de pacientes en cada categoría.

Si no estaba disponible una evaluación final cuando se calculaba la tasa de crecimiento durante un período, la tasa

de crecimiento se calculaba en la última evaluación disponible y seguía adelante hasta el último día. Por lo demás, no se realizó una imputación de datos ausentes.

### 7.5.1 Variables de eficacia para análisis

*La variable primaria de eficacia era:*

- 5
- Tasa de crecimiento (g/kg/día): la tasa de crecimiento se definió, para el primer período, (el peso en la última evaluación en el primer período, menos el peso el Día 1) dividido por [el peso el Día 1 y (el día de la última evaluación en el primer período menos 1)], y para el segundo período, (el peso en la última evaluación en el segundo período, menos el peso el Día 10) dividido por [el peso el Día 10 y (el día de la última evaluación en el segundo período, menos 10)].

10 *Las variables secundarias de eficacia eran:*

- CFA medido en muestras de alimento y de heces recogidas entre los marcadores de trazador durante los últimos 3 días (72 horas) de cada período de tratamiento.

El CFA se calculó como  $[\text{Grasa (g/período) en el alimento} - \text{Grasa (g/período) en las heces}] / [\text{Grasa (g/período) en el alimento}] * 100$ .

- 15 La grasa en el alimento se calculó como  $([\text{Alimento (mL)} - \text{Vómito (mL)}] * [\text{Contenido en grasa en el alimento (g/100 mL)}]) / 100$ . Esta fórmula se basaba en los siguientes supuestos: (a) el contenido en grasa en el vómito es el mismo que el contenido en grasa en el alimento; (b) la densidad del vómito es la misma que la densidad del alimento.

20 El contenido en grasa del alimento (fórmula de leche maternizada o leche materna pasteurizada) se determinó usando el mismo método que para el análisis de las heces y se llevó a cabo en el mismo laboratorio. El alimento (mL) y el vómito (mL) se calcularon como la cantidad total de alimento o vómito registrada en o después de la primera ingestión de trazador, y antes de la segunda ingestión de trazador. El vómito se registró en gramos en el CRF. Por lo tanto, el vómito (mL) se calculó como  $\text{vómito (g)} / \text{densidad}$ .

25 Había una diferencia en el cálculo de la grasa (g/período) en las heces y el contenido en grasa en el alimento (g/100 mL) entre los dos estudios. Esa diferencia se refiere a diferentes contenidos en ácidos grasos en la leche y la fórmula de leche maternizada, como se describe a continuación:

#### BVT.BSSL-020:

La grasa (g/período) en las heces se calculó como una suma de los siguientes ácidos grasos dividida por 1000, ya que el laboratorio proporcionó cada ácido graso en mg: C12:0, C14:0, C16:0, C18:0, C18:1, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C20:4 n-6 y C22:6 n-3.

- 30 Cada uno de los ácidos grasos en el alimento se proporcionó en g/100 mL. El contenido en grasa en el alimento (g/100 mL) se calculó como la suma de los mismos ácidos grasos que en las heces.

#### BVT.BSSL-021:

35 La grasa (g/período) en las heces se calculó como una suma de los siguientes ácidos grasos dividida por 1000, ya que el laboratorio proporcionó cada ácido graso en mg: C12:0, C14:0, C16:0, C16:1, C18:0, C18:1, C18:2 n-6, C18:3 n-3, C18:3 n-6, C20:1, C20:2 n-3, C20:3 n-6, C20:4 n-6, C22:6 n-3 y C24:1.

Cada uno de los ácidos grasos en el alimento se proporcionó en g/100 mL. El contenido en grasa en el alimento (g/100 mL) se calculó como la suma de los mismos ácidos grasos que en las heces.

#### Análisis combinado:

40 El análisis estadístico combinado de los datos de CFA empleaba los valores de CFA globales como se habían calculado para cada lactante/período de tratamiento en cada uno de los dos estudios individuales.

- Cambio en la longitud (mm): Cambio en la longitud se define como el cambio en la longitud desde la rodilla hasta el talón desde el Día 1 hasta el Día 7 en el primer período y desde el Día 10 hasta el Día 16 en el segundo período.

### 7.5.2 Metodología del análisis de eficacia

45 Los análisis primario y secundario de eficacia se basaron en el FAS de los datos combinados de los dos estudios. Los análisis de eficacia de apoyo se basaban en el grupo de análisis PP de datos combinados de los dos estudios. Además, los análisis de cada variable de eficacia fueron proporcionados por estudio para el grupo de análisis FAS y PP.

El resultado primario de eficacia, la tasa de crecimiento, se analizó mediante un análisis de varianza (ANOVA) con tratamiento, régimen (leche materna pasteurizada o fórmula de leche maternizada infantil), período, secuencia y paciente anidados dentro de régimen y secuencia como factores. Todos los efectos principales se sometieron a ensayo frente al cuadrado medio residual del modelo ANOVA.

- 5 El supuesto de normalidad de la distribución de la tasa de crecimiento basada en los datos combinados, se sometió a ensayo usando la prueba de Shapiro-Wilk. Si no se cumplía el supuesto de normalidad, entonces los valores clasificados se tenían que utilizar para el ANOVA.

- 10 El resultado secundario de eficacia, CFA de los tres últimos días de cada período de tratamiento, se analizó de la misma manera que la tasa de crecimiento mediante un análisis de varianza (ANOVA) con tratamiento, régimen (leche materna pasteurizada o fórmula de leche maternizada infantil), período, secuencia y paciente anidados dentro de régimen y secuencia como factores.

Las estadísticas descriptivas para la cantidad total de grasa en el alimento y la cantidad total de grasa en las heces fueron proporcionadas por tratamiento.

- 15 Otro de los resultados secundarios de eficacia, cambio en la longitud de la rodilla al talón, se analizó mediante un análisis de covarianza (ANCOVA) con tratamiento, régimen, período, secuencia y paciente anidados dentro de régimen y secuencia como factores, utilizando el valor inicial como una covariable.

### 7.6 Análisis de Seguridad: Eventos Adversos

- 20 Todos los análisis de eventos adversos (AE) se basaban en el grupo de análisis de seguridad de los datos combinados de ambos estudios. Los resultados se presentaron empleando estadísticas descriptivas. No se realizó una prueba de hipótesis.

- 25 El diccionario MedDRA, versión 10.0 se utilizó para clasificar todos los AEs reportados durante cada estudio mediante grupo de órganos y sistemas (SOC) y término preferido (PT). Todas las tablas de resumen incluyen recuentos de pacientes con eventos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAEs). La evaluación de TEAEs se hizo en cada estudio individual. Los TEAEs se definieron como aquellos AEs que o bien tenían un inicio en o después del comienzo del fármaco en estudio y no más de 14 días (30 días para los AEs severos) después de la última dosis del fármaco en estudio, o estaban en curso en el momento de la iniciación del fármaco en estudio y se incrementó la gravedad o llegaron a tener una relación más estrecha con el fármaco en estudio durante el período de tratamiento. Todos los TEAEs, los TEAEs relacionados con el tratamiento (definitivos, probables y posibles), SAEs y TEAEs que conducían a la retirada del fármaco en estudio estaban resumidos por MedDRA SOC, PT y tratamiento. Tanto la incidencia (porcentaje de pacientes) como el número de cada TEAE se resumieron. Además, los TEAEs se resumieron por gravedad máxima (leve, moderada o grave). Un resumen global de los TEAEs se presentó para cada secuencia de tratamiento y el total y se presentó el número (%) de pacientes con TEAEs para cada secuencia de tratamiento asignada a (1) solo BSSL; (2) solo placebo; (3) BSSL y placebo; y (4) ningún tratamiento.

## 8 Resultados

### 35 8.1 Situación de pacientes

Un resumen de la situación de pacientes en los dos estudios por secuencia de tratamiento se muestra en la Tabla 2.2. La situación de pacientes por estudio también se ha recogido y resumido (no se muestra en este informe).

**Tabla 2.2. Situación de los pacientes**

	rhBSSL/Placebo	Placebo/rhBSSL	Total
Número de pacientes aleatorizados	32	33	65
Grupo de análisis de seguridad <sup>a</sup>	31 (100,0%)	32 (100,0%)	63 (100,0%)
Grupo completo de análisis (FAS) <sup>b</sup>	30 (96,8%)	30 (93,8%)	60 (95,2%)
Grupo de análisis según protocolo (PP) <sup>c</sup>	24 (77,4%)	22 (68,8%)	46 (73,0%)
Período 1 completado <sup>d</sup>	30 (96,8%)	31 (96,9%)	61 (96,8%)
Período 2 completado <sup>d</sup>	29 (93,5%)	30 (93,8%)	59 (93,7%)
Completado el estudio	29 (93,5%)	30 (93,8%)	59 (93,7%)
Estudio abandonado	2 (6,5%)	2 (6,3%)	4 (6,3%)
Evento(s) adverso(s)	2 (6,5%)	2 (6,5%)	4 (6,3%)

	rhBSSL/Placebo	Placebo/rhBSSL	Total
Incumplimiento(s) del protocolo	0	0	0
Retirada del consentimiento	0	0	0
Pérdida durante el seguimiento	0	0	0
Solicitud del promotor	0	0	0
Investigador principal	0	0	0
Decisión			
Otro	0	0	0
<sup>a</sup> El grupo de análisis de seguridad incluye a todos los pacientes que recibieron al menos una dosis del medicamento en estudio aleatorizado.			
<sup>b</sup> El grupo completo de análisis incluye todos los pacientes aleatorizados que recibieron al menos una dosis del medicamento en estudio aleatorizado y tenían un valor inicial y al menos una evaluación del peso posterior al valor inicial en ambos períodos de tratamiento.			
<sup>c</sup> El grupo de análisis según protocolo incluye pacientes en el FAS que tenían un cumplimiento razonable y no había otros incumplimientos graves del protocolo.			
<sup>d</sup> Período completado definido como pacientes que recibieron el medicamento en estudio durante 7 días en el período de tratamiento.			

- Un total de 65 pacientes fueron aleatorizados en ambos estudios: 33 pacientes en BVT.BSSL-020 y 32 pacientes en BVT.BSSL-021. Un total de 63 pacientes recibieron al menos una dosis del medicamento en estudio aleatorizado y se incluyeron en el grupo de análisis de seguridad: 33 pacientes en BVT.BSSL-020 y 30 en BVT.BSSL-021. El FAS incluía un total de 60 pacientes que se encontraban en el grupo de análisis de seguridad y que tenían una evaluación del peso inicial y al menos una posterior a la inicial en ambos períodos de tratamiento: 33 pacientes en BVT.BSSL-020 y 27 pacientes en BVT. BSSL-021. Un total de 46 pacientes fueron incluidos en el grupo de análisis PP: 26 pacientes en BVT.BSSL-020 y 20 pacientes en BVT.BSSL-021. Había 14 pacientes que no estaban incluidos en el grupo de análisis PP debido a una recogida de heces incompleta o incorrecta.
- De los 63 pacientes en el grupo de análisis de seguridad, 31 pacientes fueron aleatorizados a la secuencia de tratamiento rhBSSL/placebo y 32 pacientes a placebo/rhBSSL. Un total de 61 pacientes completaron el Período 1 y un total de 59 pacientes completaron el Período 2. Todos menos cuatro pacientes completaron los estudios; esos cuatro pacientes interrumpieron el tratamiento debido a AEs.

## 8.2 Características demográficas e iniciales

- Las características demográficas e iniciales para los datos combinados en los dos estudios por secuencia de tratamiento se muestran a continuación en la Tabla 2.3. Las características demográficas e iniciales por estudio también se recogieron y se resumieron (no se muestran en este informe).

**Tabla 2.3. Características demográficas e iniciales**

Característica	rhBSSL/Placebo (N=31)	Placebo/rhBSSL (N=32)	Total (N=63)
Edad (semanas) <sup>a</sup>			
N	31	32	63
Media (SD)	4,14 (1,553)	3,60 (1,393)	3,87 (1,487)
Edad gestacional al nacer (semanas)			
N	31	32	63
Media (SD)	28,39 (1,575)	28,96 (1,542)	28,68 (1,572)
Edad gestacional extrapolada (semanas) <sup>a</sup>			
N	31	32	63
Media (SD)	32,53 (,447)	32,58 (,541)	32,56 (,494)
Género			
Macho	15 (48,4%)	18 (56,3%)	33 (52,4%)

Característica	rhBSSL/Placebo (N=31)	Placebo/rhBSSL (N=32)	Total (N=63)
Hembra	16 (51,6%)	14 (43,8%)	30 (47,6%)
Grupo étnico			
Hispano o Latino	13 (41,9%)	13 (40,6%)	26 (41,3%)
Ni Hispano ni Latino	18 (58,1%)	19 (59,4%)	37 (58,7%)
Raza			
Blanca	25 (80,6%)	27 (84,4%)	52 (82,5%)
Negra	1 (3,2%)	2 (6,3%)	3 (4,8%)
Asiática	1 (3,2%)	1 (3,1%)	2 (3,2%)
Nativo de Hawai u otra isla del Pacífico	1 (3,2%)	0	1 (1,6%)
Otra	3 (9,7%)	2 (6,3%)	5 (7,9%)
Longitud de la rodilla al talón (mm) <sup>b</sup>			
N	31	32	63
Media (SD)	100,09 (5,490)	99,78 (6,573)	99,93 (6,017)
Peso (g)			
N	31	32	63
Media (SD)	1463,4 (169,28)	1469,6 (216,25)	1466,6 (193,02)
<sup>a</sup> Edad el día de la primera dosis.			
<sup>b</sup> Medida con un knemómetro.			

En el análisis combinado, la edad media el día de la primera dosis era mayor para los pacientes aleatorizados a rhBSSL/Placebo (4,14 semanas) en comparación con la edad media de los pacientes aleatorizados a placebo/rhBSSL (3,60 semanas). Otras características demográficas e iniciales eran comparables entre las secuencias de tratamiento.

5

Una diferencia en la edad media el día de la primera dosis también era evidente entre los dos estudios: la edad media era menor para los pacientes en BVT.BSSL-020 (3,39 semanas) en comparación con la media de edad en BVT.BSSL-021 (4,39 semanas). La edad media gestacional al nacer era de aproximadamente una semana más en BVT.BSSL-020 (29,18 semanas) frente a BVT.BSSL-021 (28,13 semanas). Sin embargo, la edad gestacional el día de la primera dosis era similar en los dos estudios. Una diferencia en el origen étnico también se observó entre los dos estudios: el porcentaje de pacientes hispanos o latinos era mayor en BVT.BSSL-020 (63,6%) en comparación con BVT.BSSL-021 (16,7%). Otras características demográficas e iniciales eran comparables entre los estudios.

10

### 8.3 Cumplimiento del tratamiento

El cumplimiento del tratamiento en el estudio BVT.BSSL-020 se resume a continuación en la Tabla 2.4 y para el estudio BVT.BSSL-021 en la Tabla 2.5.

15

**Tabla 2.4 Cumplimiento del tratamiento por estudio terapéutico BVT.BSSL.020**

Variable Estadística	rhBSSL (N=33)	Placebo (N=33)
n	33	33
Cumplimiento del tratamiento (%)		
<60	0	0
≥ 60, <70	0	0
≥ 70, <80	0	1 (3,0%)
≥ 80, <90	0	1 (3,0%)
≥ 90, <100	28 (84,8%)	25 (75,8%)
≥ 100	5 (15,2%)	6 (18,2%)



Variable Estadística	rhBSSL (N=33)	Placebo (N=33)
Media	98,79	97,24
Desv Std	1,639	4,967
Mediana	99,34	98,56
Mínimo	92,6	73,0
Máximo	100,7	101,8

**Tabla 2.5 Cumplimiento del tratamiento por estudio terapéutico BVT.BSSL.021**

Variable Estadística	rhBSSL (N=28)	Placebo (N=29)
n	28	29
Cumplimiento del tratamiento (%)		
<60	0	0
≥ 60, <70	1 (3,6%)	0
≥ 70, <80	0	0
≥ 80, <90	2 (7,1%)	1 (3,4%)
≥ 90, <100	16 (57,1%)	19 (65,5%)
≥ 100	9 (32,1%)	9 (31,0%)
Media	95,97	97,52
Desv Std	7,033	3,820
Mediana	98,17	97,75
Mínimo	66,7	87,2
Máximo	101,8	103,7

5 **8.4 Análisis de Eficacia**

**8.4.1 Variable primaria de eficacia**

La variable primaria de eficacia en el análisis combinado era la tasa de crecimiento. Los resultados combinados para la tasa de crecimiento basados en los análisis combinados de los dos estudios clínicos en los grupos de análisis FAS y PP se muestran en la Tabla 2.6. Los resultados del análisis de la tasa de crecimiento por estudio basados en los grupos de análisis FAS y PP, se muestran en las Tablas 2.7a y 2.7b respectivamente.

10

**Tabla 2.6. Análisis de la tasa de crecimiento (g/kg/día) en los grupos de análisis FAS y PP**

Grupo de análisis por estudio y estadísticas	Grupo de análisis FAS		Grupo de análisis PP	
	rhBSSL (N=60)	Placebo (N=60)	rhBSSL (N = 46)	Placebo (N=46)
n	60	60	46	46
Media (SD)	16,92 (4,540)	14,00 (5,942)	17,08 (4,424)	15,04 (5,048)
Mediana	16,84	14,95	16,84	15,09
Mínimo	7,5	-4,5	8,3	0,0
Máximo	26,5	26,4	26,5	26,4

Grupo de análisis por estudio y estadísticas	Grupo de análisis FAS		Grupo de análisis PP	
	rhBSSL (N=60)	Placebo (N=60)	rhBSSL (N = 46)	Placebo (N=46)
Media de LS	16,86	13,93	17,15	15,06
95% de CI (intervalo de confianza)	(15,73, 17,98)	(12,80, 15,05)	(15,92, 18,38)	(13,83, 16,29)
Diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo)	2,93		02:08	
95% de CI de la diferencia entre la media de LS	(1,35, 4,51)		(0,36, 3,81)	
valor de p para la diferencia entre la media de LS	<0,001		0,019	

5 Los resultados combinados de los dos estudios clínicos mostraron un aumento significativo en la tasa de crecimiento durante el tratamiento con rhBSSL, en comparación con durante el tratamiento con placebo en ambos grupos de análisis FAS y PP. En el FAS, las medias de LS de la tasa de crecimiento eran 16,86 g/kg/día con rhBSSL y 13,93 g/kg/día con placebo. La diferencia en la tasa de crecimiento entre rhBSSL y el placebo era estadísticamente significativa: diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo) era 2,93 g/kg/día ( $p < 0,001$ ). En el grupo de análisis PP, la diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo) de 2,08 g/kg/día también era estadísticamente significativa ( $p = 0,019$ ).

10 La Tabla 2.7a siguiente muestra los resultados de la tasa de crecimiento en el grupo de análisis FAS para cada uno de los dos estudios clínicos, y la Tabla 2.7b muestra lo mismo para el grupo de análisis PP.

**Tabla 2.7a. Análisis de la tasa de crecimiento (g/kg/día) por estudio en el grupo de análisis FAS**

Estadísticas	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021	
	rhBSSL (N=33)	Placebo (N=33)	rhBSSL (N=27)	Placebo (N=27)
n	33	33	27	27
Media (SD)	18,06 (3,964)	14,29 (6,493)	15,54 (4,880)	13,63 (5,292)
Mediana	18,39	15,51	15,95	13,98
Mínimo	9,2	-4,5	7,5	-3,1
Máximo	25,5	23,3	26,5	26,4
Media de LS	18,05	14,31	15,58	13,63
95% de CI	(16,52, 19,58)	(12,78, 15,84)	(13,82, 17,33)	(11,87, 15,39)
Diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo)	3,74		1,95	
95% de CI de la diferencia entre la media de LS	(1,58, 5,90)		(-0,54, 4,43)	
valor de p para la diferencia entre la media de LS	0,001		0,119	

15 La mejora en la tasa de crecimiento durante el tratamiento con rhBSSL, en comparación con el placebo era más pronunciada en el estudio BVT.BSSL-020 que en el estudio BVT.BSSL-021. Basándose en el FAS, en el estudio BVT.BSSL-020, la diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo) era 3,74 g/kg/día ( $p = 0,001$ ), mientras que en el estudio BVT.BSSL-021, era 1,95 g/kg/día ( $p = 0,119$ ). Se observaron resultados similares por estudio en el grupo de análisis PP (véase la Tabla 2.7b).

20 Otra observación de la Tabla 2.7a era que los pacientes tratados con fórmula de leche maternizada ganaron peso más rápidamente que los pacientes tratados con leche materna pasteurizada. En el FAS, la tasa de crecimiento media durante el tratamiento con rhBSSL era 18,06 y 15,54 g/kg/día en BVT.BSSL-020 y BVT.BSSL-021, respectivamente, y durante el tratamiento con placebo era 14,29 y 13,63 g/kg/día en los estudios respectivos. Se observaron resultados similares en el grupo de análisis PP (véase la Tabla 2.7b).

25 El supuesto de normalidad de la distribución de la tasa de crecimiento basada en los datos combinados, se sometió a ensayo usando la prueba de Shapiro-Wilk. La prueba de normalidad era significativa en el FAS (valor de  $p < 0,001$ ), lo que indica que el supuesto de normalidad no se cumplió. (Un resultado similar se observó para el grupo de análisis PP.) Por lo tanto, también se realizó un análisis de la tasa de crecimiento utilizando los valores clasificados. El

resultado de este análisis de sensibilidad era coherente con el análisis primario con un valor de p resultante de <0,001, lo que demuestra una mejora significativa en el crecimiento durante el tratamiento con rhBSSL, en comparación con el placebo.

**Tabla 2.7b. Análisis de la tasa de crecimiento (g/kg/día) por estudio en el grupo de análisis PP**

Estadísticas	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021	
	rhBSSL (N = 26)	Placebo (N=26)	HBSSL (N=20)	Placebo (N=20)
n	26	26	20	20
Media (SD)	17,79 (4,013)	15,39 (5,412)	16,16 (4,856)	14,59 (4,630)
Mediana	17,98	16,08	16,80	14,95
Mínimo	9,2	0,0	8,3	3,4
Máximo	24,0	23,3	26,5	24,6
Media de LS	17,75	15,45	16,47	14,76
95% de CI	(16,22, 19,28)	(13,92, 16,98)	(14,23, 18,71)	(12,51, 17,00)
Diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo)	2,30		1,71	
95% de CI de la diferencia entre la media de LS	(0,14, 4,47)		(-1,46, 4,88)	
valor de p para la diferencia entre la media de LS	0,038		0,271	

5

#### 8.4.2 Variables secundarias de eficacia

Las variables secundarias de eficacia eran CFA, y el cambio en la longitud de la rodilla al talón entre el inicio y el final de cada período de tratamiento.

#### CFA

10 Solo los pacientes en el grupo de análisis PP tenían una recogida de heces completa/correcta, esencial para la determinación del CFA. Por lo tanto, la presentación en el presente informe se limita a datos para el grupo de análisis PP, con la excepción de la Tabla 2.8a siguiente que muestra resultados del CFA del análisis combinado de los dos estudios clínicos, tanto para el grupo de análisis FAS como PP. Los resultados del análisis de CFA por estudio basado en los grupos de análisis PP, se proporcionan en la Tabla 2.8b.

15

**Tabla 2.8a. Análisis de CFA (%) en los grupos de análisis FAS y PP**

Grupo de análisis por estudio y estadísticas	Grupo de análisis FAS		Grupo de análisis PP	
	rhBSSL (N=60)	Placebo (N=60)	BSSL (N=46)	rhBSSL (N=46)
n	59*	59*	46	46
Media (SD)	67,80 (16,663)	64,06 (16,319)	69,08 (14,683)	65,66 (16,126)
Mediana	71,09	66,50	71,83	67,15
Mínimo	11,7	25,7	31,2	25,7
Máximo	93,2	93,0	93,2	93,0
Media de LS	67,78	64,08	69,06	65,50
95% de CI	(64,73, 70,83)	(61,03, 67,13)	(66,31, 71,80)	(62,75, 68,25)
Diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo)	3,70		3,56	
95% de CI de la diferencia entre la media de LS	(-0,60; 8,00)		(-0,29, 7,40)	

Grupo de análisis por estudio y estadísticas	Grupo de análisis FAS		Grupo de análisis PP	
	rhBSSL (N=60)	Placebo (N=60)	BSSL (N=46)	rhBSSL (N=46)
valor de p de la diferencia entre la media de LS	0,090		0,069	
* Un paciente en el estudio 020 retirado antes del período de recogida de heces.				

5 Los resultados combinados de los dos estudios clínicos mostraron un incremento numérico en el CFA en rhBSSL, en comparación con el placebo, tanto en los grupos de análisis FAS como PP. En el grupo de análisis PP, la media de LS de CFA era 69,1% durante el tratamiento con rhBSSL y 65,5% para el placebo; la diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo) era 3,56% (p = 0,069).

La mejora del CFA durante el tratamiento con rhBSSL en comparación con el placebo era mayor en BVT.BSSL-021 que en comparación con BVT.BSSL-020. En el PP, la diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo) era 4,86% (p = 0,073) en BVT.BSSL-021 y 2,08% (p = 0,462) en BVT.BSSL-020. Se observaron resultados similares en el grupo de análisis FAS por estudio (véase la Tabla 2.8b).

10

**Tabla 2.8b. Análisis de CFA (%) por estudio en el grupo de análisis PP**

Estadística	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021	
	rhBSSL (N=26)	Placebo (N=26)	HBSSL (N=20)	Placebo (N=20)
n	26	26	20	20
Media (SD)	69,55 (14,452)	67,07 (14,849)	68,46 (15,333)	63,82 (17,875)
Mediana	70,99	67,15	75,41	67,09
Mínimo	36,8	25,7	31,2	35,9
Máximo	89,0	93,0	93,2	91,3
Media de LS	69,46	67,38	68,56	63,70
95% de CI	(65,40, 73,53)	(63,31, 71,45)	(64,78, 72,35)	(59,92, 67,49)
Diferencia entre la media de LS (rhBSSL - Placebo)	2,8		4,86	
95% de CI de la diferencia entre la media de LS	(-3,67, 7,84)		(-0,50, 10,22)	
valor de p para la diferencia entre la media de LS	0,462		0,073	

15 La Tabla 2.9a proporciona la cantidad total de grasa en el alimento consumido entre los marcadores trazadores del alimento y la cantidad total de grasa en las heces, a partir de muestras de heces recogidas entre los marcadores trazadores en heces por estudio en el análisis combinado (grupo de análisis PP). Los datos por tratamiento para el análisis combinado se proporcionan en la Tabla 2.9b.

**Tabla 2.9a. Cantidad total de grasa en el alimento y cantidad total de grasa en heces por estudio en el grupo de análisis PP.**

Estadística	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021	
	rhBSSL (N=26)	Placebo (N=26)	HBSSL (N=20)	Placebo (N=20)
Cantidad total de grasa en el alimento (g)				
n	26	26	20	20
Media (SD)	29,12 (5,037)	28,50 (5,047)	19,00 (5,110)	20,51 (6,718)
Mediana	29,11	27,98	18,27	18,70
Mínimo	21,1	17,7	12,1	13,3
Máximo	44,0	39,3	29,1	43,7
Cantidad total de grasa en heces (g)				

Estadística	BVT.BSSL-020		BVT.BSSL-021	
	rhBSSL (N=26)	Placebo (N=26)	HBSSL (N=20)	Placebo (N=20)
n	26	26	20	20
Media (SD)	8,53 (3,416)	8,97 (3,278)	6,16 (3,550)	7,56 (4,785)
Mediana	8,63	9,6	4,99	6,09
Mínimo	3,2	2,0	0,9	2,0
Máximo	15,0	14,7	13,3	18,0

5 Los pacientes tratados con la fórmula de leche maternizada consumían más grasa del alimento que los pacientes con leche materna pasteurizada. En el PP, la cantidad media total de grasa en el alimento consumido durante el tratamiento con rhBSSL (período de recogida de 72 horas) era de 29,12 g y 19,00 g en BVT.BSSL-020 y BVT.BSSL-021, respectivamente, y durante el tratamiento con placebo era de 28,50 g y 20,51 g en los estudios respectivos. Los pacientes tratados con fórmula de leche maternizada también excretaban más grasa en las heces que los pacientes con leche materna pasteurizada. La cantidad media total de grasa excretada en las heces durante el tratamiento con rhBSSL era de 8,53 g y 6,16 g en BVT.BSSL-020 y BVT.BSSL-021, respectivamente, y con el placebo era de 8,97 g y 7,56 g en los respectivos estudios.

10 La Tabla 2.9b resume la cantidad total de grasa en el alimento y la cantidad total de grasa en las heces, durante el intervalo de recogida de 72 horas, para los resultados combinados en el grupo de análisis PP. La ingesta de grasa y la excreción de grasa eran comparables en los dos tratamientos. En los datos combinados de los dos estudios, en el PP, la cantidad media de grasa en el alimento consumido durante el tratamiento con rhBSSL era de 24,72 g, y la cantidad media consumida con el placebo era de 25,03 g. La cantidad de grasa excretada en las heces era de 7,50 g y 8,36 g, respectivamente.

**Tabla 2.9b. Cantidad total de grasa en el alimento y cantidad total de grasa en heces, datos combinados, en el grupo de análisis PP.**

Estadística	Grupo de análisis PP	
	HBSSL (N=46)	HBSSL (N=46)
Cantidad total de grasas en el alimento (g)		
n	46	46
Media (SD)	24,72 (7,133)	25,03 (7,018)
Mediana	25,28	24,35
Mínimo	12,1	13,3
Máximo	44,0	43,7
Cantidad total de grasa en heces (g)		
n	46	46
Media (SD)	7,50 (3,635)	8,36 (4,018)
Mediana	7,5	8,34
Mínimo	0,9	2,0
Máximo	15,0	18,0

20 Había poca diferencia entre el volumen medio ingerido de fórmula de leche maternizada infantil o de leche materna entre los diferentes estudios, o el volumen ingerido entre períodos de tratamiento con rhBSSL o con placebo.

Correlación entre la tasa de crecimiento y la absorción de grasa

La Figura 2.2 presenta la diferencia en la tasa de crecimiento (rhBSSL - placebo) frente a la diferencia en CFA (rhBSSL - placebo) en el análisis combinado de datos procedentes de los grupos de análisis PP de los dos estudios.

25 Como se observa en esta gráfica, no había una correlación estadísticamente significativa (valor de p 0,177) entre el efecto de rhBSSL sobre la tasa de crecimiento y la absorción de grasa (CFA).

Cambio en la longitud de la rodilla al talón

Los resultados del cambio en la longitud de la rodilla al talón para el análisis combinado de los dos estudios en el análisis FAS y PP se recogieron y se resumieron (no se muestra en este informe).

5 No se observaron diferencias evidentes entre los tratamientos con respecto al cambio medio en las mediciones de la longitud de la rodilla al talón en ninguno de los grupos de análisis FAS o PP en los datos combinados de ambos estudios, o por estudio.

**8. 5 Análisis de seguridad: Eventos adversos**

**8.5.1 Grado de Exposición**

Un resumen de la exposición al tratamiento, como número de días de tratamiento, se proporciona en la Tabla 2.19 a continuación.

10 **Tabla 2.19. Grado de exposición al tratamiento - Grupo de análisis de seguridad**

Variable Estadística	rhBSSL (N=61)	Placebo (N=62)
<b>Número de días de tratamiento [1]</b>		
<b>1</b>	0	0
<b>2</b>	0	
<b>3</b>	1 (1,6%)	1 (1,6%)
<b>4</b>	0	
<b>5</b>	0	
<b>6</b>	0	1 (1,6%)
<b>7</b>	60 (98,4%)	60 (96,8%)
<b>n</b>	61	62
<b>Media</b>	6,9	6,9
<b>Desv Sta</b>	0,51	0,52
<b>Mediana</b>	7,0	7,0
<b>Mínimo</b>	3	3
<b>Máximo</b>	7	7
[1] Número de días de tratamiento = Último día del período de tratamiento - Primer día del período de tratamiento + 1.		

15 El grado de exposición al tratamiento era comparable entre los tratamientos. Un 98,4% de los pacientes tenía 7 días de tratamiento con rhBSSL y un 96,8% de los pacientes tenía 7 días de tratamiento con placebo. Uno de los pacientes interrumpió BVT.BSSL-020 después de 3 días de tratamiento con placebo durante el segundo período. Tres (3) pacientes de BVT.BSSL-021 lo interrumpieron durante el primer período de tratamiento: 2 pacientes lo interrumpieron después de 6 y 7 días de tratamiento con placebo, respectivamente, y un paciente lo interrumpió después de 3 días de tratamiento con rhBSSL.

Un resumen de la exposición a rhBSSL se proporciona en la Tabla 2.20 a continuación.

**Tabla 2.20. Grado de exposición a rhBSSL - Grupo de análisis de seguridad**

Variable Estadística	Total (N=63)
Cantidad total de rhBSSL (g) [1]	
<b>n</b>	61
<b>Media</b>	0,2717

Variable Estadística	Total (N=63)
Desv Sta	0,05172
Mediana	0,2682
Mínimo	0,063
Máximo	0,397
[1] Cantidad total de rhBSSL (g) = 0,15 g/L* (cantidad total de alimento (L) ingerido durante el período de tratamiento con rhBSSL - Cantidad total de vómito (L) durante el período de tratamiento con rhBSSL). El vómito no se recogió los días 1, 2, 3, 10, 11 y 12.	
Nota: La concentración de rhBSSL en el alimento es de 0,15 g/L de acuerdo con los protocolos.	

En los resultados del análisis combinado, la cantidad media (SD) de rhBSSL consumida era de 0,27 g (0,052 g).

### 8.5.2 Breve resumen de los eventos adversos

La tasa de incidencia global de TEAEs se muestra a continuación en la Tabla 2.21.

5 **Tabla 2.21. Resumen global de eventos adversos surgidos durante el tratamiento - Grupo de análisis de seguridad**

	rhBSSL (N=61)		Placebo (N=62)		Total (N=63)	
	n (%) de pacientes	AEs total (n)	n (%) de pacientes	AEs total (n)	n (%) de pacientes	AEs total (n)
Pacientes con cualquier TEAE	29 (47,5%)	56	32 (51,6%)	78	45 (71,4%)	134
Pacientes con cualquier TEAE severo	0	0	2 (3,2%)	2	2 (3,2%)	2
Pacientes con cualquier TEAE que conduce a la interrupción del estudio	1 (1,6%)	1	3 (4,8%)	3	4 (6,3%)	4
Pacientes con cualquier TEAE relacionado	5 (8,2%)	6	4 (6,5%)	6	8 (12,7%)	12
Pacientes con cualquier TEAE grave	1 (1,6%)	1	6 (9,7%)	16	6 (9,5%)	17
Pacientes que murieron	0	0	1 (1,6%)	1	1 (1,6%)	1
Relacionado incluye relacionado de forma definitiva, probable o posible con el medicamento en estudio.						

10 Un total de 134 eventos adversos surgidos durante el tratamiento (TEAEs) se presentaron en 45 de 63 (71,4%) de los pacientes en estos dos estudios. No había ninguna diferencia evidente observada en la proporción de pacientes con TEAEs entre los tratamientos. Las proporciones de pacientes con TEAEs eran comparables entre los estudios: 23 (69,7%) pacientes experimentaron AEs en BVT.BSSL-020 y 22 (73,3%) en BVT.BSSL-021. Sin embargo, el número total de TEAEs era mayor en BVT.BSSL.021 (81 eventos) en comparación con BVT.BSSL.020 (53 eventos). (Los datos del estudio en forma de tabla no se muestran en este informe.)

15 A lo largo de los dos estudios, 2 (3,2%) pacientes informaron de un TEAE severo durante el tratamiento con placebo, 4 (6,3%) pacientes informaron de un TEAE que llevó a una interrupción del estudio (1 paciente durante el tratamiento con rhBSSL y 3 pacientes durante el tratamiento con placebo), 8 (12,7%) pacientes informaron de al menos un TEAE considerado relacionado con el tratamiento (5 pacientes lo tenían durante el tratamiento con rhBSSL, 4 pacientes durante el tratamiento con placebo, en donde uno de estos pacientes tenía un TEAE relacionado durante ambos períodos), y un paciente murió durante el tratamiento con placebo.

### 20 8.5.3 Exposición de los eventos adversos

Un resumen de los TEAEs notificados más frecuentemente (notificados en  $\geq 4\%$  de los pacientes) se proporciona a continuación en la Tabla 2.22. Se recogieron en una síntesis todos los TEAEs notificados y se resumieron (no se muestra en este informe).

25 **Tabla 2.22. Eventos adversos surgidos durante el tratamiento notificados más frecuentemente - Grupo de análisis de seguridad**

Término preferido	rhBSSL (N = 61)		Placebo (N=62)		Total (N=63)	
	n (%) de pacientes	AEs total (n)	n (%) de pacientes	AEs total (n)	n (%) de pacientes	AEs total (n)
Dermatitis del pañal	13 (21,3%)	20	13 (21,0%)	15	21 (33,3%)	35
Anemia	3 (4,9%)	3	6 (9,7%)	6	8 (12,7%)	9
Soplo cardiaco	4 (6,6%)	4	2 (3,2%)	2	6 (9,5%)	6
Bradicardia	1 (1,6%)	2	5 (8,1%)	15	5 (7,9%)	17
Hipocaliemia	3 (4,9%)	3	2 (3,2%)	2	5 (7,9%)	5
Anemia neonatal	2 (3,3%)	2	1 (1,6%)	1	3 (4,8%)	3
Trombocitemia	0	0	3 (4,8%)	3	3 (4,8%)	3
Infección del tracto urinario	1 (1,6%)	1	2 (3,2%)	2	3 (4,8%)	3

Nota: Esta tabla incluye los AEs notificados en  $\geq 4\%$  de los pacientes. Si un paciente tenía más de un recuento para un término particular preferido, el paciente se contó una vez para ese término preferido.

El TEAE más común en los resultados combinados para los dos estudios era la dermatitis del pañal, notificado por 21 (33,3%) pacientes. La incidencia de este evento era comparable entre los tratamientos. Otros TEAEs notificados con mayor frecuencia eran anemia en 8 (12,7%) pacientes, soplo cardiaco en 6 (9,5%) pacientes, bradicardia e hipocaliemia, cada uno notificado por 5 (7,9%) pacientes, y anemia neonatal, trombocitemia e infección del tracto urinario, cada uno notificado por 3 (4,8%) pacientes. Todos los TEAEs más comunes se notificaron en ambos tratamientos, con la excepción de trombocitemia que se notificó solamente en el placebo. Además, todos los TEAEs más comunes fueron notificados en ambos estudios, con la excepción de la infección del tracto urinario que se notificó solamente en BVT.BSSL-020 y la hipocaliemia que se notificó solo en BVS.BSSL-021.

## 10 9 Conclusiones

Los resultados del análisis combinado son coherentes con los resultados de los estudios individuales que apoyan a las siguientes conclusiones:

- La rhBSSL mejora significativamente el crecimiento en comparación con el placebo en lactantes prematuros que recibieron leche materna pasteurizada o fórmula de leche maternizada infantil.
- Existe una mejora numérica pero no significativa en la absorción de grasa después del tratamiento con rhBSSL en comparación con el placebo.
- No se observaron diferencias con respecto al cambio en la longitud de la rodilla a talón después de una semana de tratamiento con rhBSSL en comparación con el placebo.
- La rhBSSL añadida a la fórmula de leche maternizada infantil o a la leche materna pasteurizada fue bien tolerada.
- No se observó ninguna diferencia aparente en el perfil de seguridad durante el tratamiento con rhBSSL en comparación con el placebo.
- Los pacientes con fórmula de leche maternizada consumían más grasa y ganaban más peso que los pacientes tratados con leche materna pasteurizada.

25

## ANEXO A

Requerimientos de composición propuestos para la fórmula de leche maternizada infantil - normas recomendadas por ESPGHAN (adaptadas por Koletzko et al. 2005):

Componente	Unidad	Mínimo	Máximo
Energía	kcal/100 mL	60	70
Proteínas			
Proteína de leche de vaca	g/100 kcal	1,8*	3
Aislados de proteína de soja	g/100 kcal	2,25	3



ES 2 603 328 T3

Requerimientos de composición propuestos para la fórmula de leche maternizada infantil - normas recomendadas por ESPGHAN (adaptadas por Koletzko et al. 2005):

Componente	Unidad	Mínimo	Máximo
Proteína de leche de vaca hidrolizada	g/100 kcal	1,8†	3
Lípidos	g/100 kcal		
Grasa total	g/100 kcal	4,4	6
Ácido linoleico	g/100 kcal	0,3	1,2
Ácido $\alpha$ -linolénico	mg/100 kcal	50	NS
Relación entre ácidos linoleico/ $\alpha$ -linolénico		5:1	15:1
Ácidos láurico + mirístico	% de grasa	NS	20
Ácidos grasos trans	% de grasa	NS	3
Ácido erúcico	% de grasa	NS	1
Carbohidratos			
Carbohidratos totales	g/100 kcal	9	14
Vitaminas			
Vitamina A	ug de RE/100kcal§	60	180
Vitamina D3	ug/100 kcal	1	2,5
Vitamina E	mg de $\alpha$ -TE/100 kcal&	0,5{	5
Vitamina K	ug/100 kcal	4	25
Tiamina	ug/100 kcal	60	300
Riboflavina	ug/100 kcal	80	400
Niacina#	ug/100 kcal	300	1500
Vitamina B6	ug/100 kcal	35	175
Vitamina B12	ug/100 kcal	0,1	0,5
Ácido pantoténico	ug/100 kcal	400	2000
Ácido fólico	ug/100 kcal	10	50
Vitamina C	mg/100 kcal	8	30
Biotina	ug/100 kcal	1,5	7,5
Minerales y oligoelementos			
Hierro (fórmula de leche maternizada a base de proteína de leche de vaca e hidrolizado de proteína)	mg/100 kcal	0,3**	1,3
Hierro (fórmula de leche maternizada a base de aislado de proteína de soja)	mg/100 kcal	0,45	2
Calcio	mg/100 kcal	50	140
Fósforo (fórmula de leche maternizada a base de proteína de leche de vaca e hidrolizado de proteína)	mg/100 kcal	25	90
Fósforo (fórmula de leche maternizada a base de aislado de proteína de soja)	mg/100 kcal	30	100
Relación calcio/fósforo	mg/mg	1:1	2:1
Magnesio	mg/100 kcal	5	15
Sodio	mg/100 kcal	20	60
Cloruro	mg/100 kcal	50	160
Potasio	mg/100 kcal	60	160

## ES 2 603 328 T3

Requerimientos de composición propuestos para la fórmula de leche maternizada infantil - normas recomendadas por ESPGHAN (adaptadas por Koletzko et al. 2005):

Componente	Unidad	Mínimo	Máximo
Manganeso	ug/100 kcal	1	50
Fluoruro	ug/100 kcal	NS	60
Yodo	ug/100 kcal	10	50
Selenio	ug/100 kcal	1	9
Cobre	ug/100 kcal	35	80
Zinc	mg/100 kcal	0,5	1,5
Otras sustancias			
Colina	mg/100 kcal	7	50
Mioinositol	mg/100 kcal	4	40
L-carnitina	mg/100 kcal	1,2	NS

\* La determinación del contenido en proteínas de la fórmula de leche maternizada a base de proteína de leche de vaca no hidrolizada con una proteína debe basarse en la medición del contenido real en proteína entre 1,8 y 2,0 g/100 kcal ([N total menos NPN] x 6,25)

† Fórmula de leche maternizada basada en proteína de leche hidrolizada con un contenido en proteína menor de 2,25 g/100 kcal se debe analizar clínicamente.

‡ Sacarosa (sacarosa) y fructosa no se deben añadir a la fórmula de leche maternizada infantil.

§ 1 mg de RE (equivalente de retinol) = 1 mg de retinol todo-trans = 3,33 UI de vitamina A. El contenido en retinol se debe proporcionar en retinol preformado, pero no se debe incluir ningún contenido en carotenoides en el cálculo y la declaración de la actividad de vitamina A.

& 1 mg de a-TE (equivalente de a-tocoferol) = 1 mg de d-a-tocoferol.

{El contenido en vitamina E será al menos 0,5 mg de a-TE por g de PUFA, utilizando los siguientes factores de equivalencia para adaptar el contenido mínimo en vitamina E al número de dobles enlaces de ácidos grasos en la fórmula: 0,5 mg de a-TE/g de ácido linoleico (18:2n-6); 0,75 mg de a-TE/g de ácido  $\alpha$ -linolénico (18:3n-3); 1,0 mg de a-TE/g de ácido araquidónico/(20:4n-6); 1,25 mg de a-TE/g de ácido eicosapentaenoico (20:5n-3); 1,5 mg de a-TE/g de ácido docosahexaenoico (22:6n-3).

# Niacina se refiere a niacina preformada.

\*\* En poblaciones en las que los lactantes tienen riesgo de carencia de hierro, contenidos en hierro más altos que el nivel mínimo de 0,3 mg/100 kcal pueden ser apropiados y recomendados a nivel nacional.

NS: no especificado.

### ANEXO B

Niveles propuestos de ingredientes opcionales, si se añaden - normas recomendadas por ESPGHAN (adaptadas por Koletzko et al. 2005):

Ingredientes opcionales	Unidad	Mínimo	Máximo
Taurina	mg/100 kcal	0	12
Nucleótidos totales añadidos	mg/100 kcal	0	5
Citidina 5#-monofosfato (CTP)	mg/100 kcal	0	1,75
Uridina 5#-monofosfato (UMO)	mg/100 kcal	0	1,5
Adenosina 5#-monofosfato (AMP)	mg/100 kcal	0	1,5
Guanosina 5#-monofosfato (GMP)	mg/100 kcal	0	0,5
Inosina 5#-monofosfato (IMP)	mg/100 kcal	0	1
Fosfolípidos	mg/100 kcal	0	300
Ácido docosahexaenoico*	% de grasa	0	0,5

\*Si se añade ácido docosahexaenoico (22:6n-3) a la fórmula de leche maternizada infantil, el contenido en ácido araquidónico (20:4n-6) deberá alcanzar por lo menos la misma concentración que DHA. El contenido en ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) no debe exceder el contenido en ácido docosahexaenoico.

**LISTADO DE SECUENCIAS**

5 <110> Swedish Orphan Biovitrum AB  
 <120> MÉTODO PARA INCREMENTAR LA ABSORCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS INSATURADOS EN  
 LACTANTES HUMANOS  
 <130> BVM13666PCT2  
 <160> 2  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 10 < 211> 722  
 < 212> PRT  
 < 213> Homo sapiens  
 <300>  
 15 < 301> desconocido  
 < 302> bucelipasa alfa (página 62)  
 < 303> Información farmacéutica OMS  
 < 304> 21  
 < 305> 1  
 < 306> 62  
 20 < 307> 2007-01-01  
 < 313> (1)..(722)  
 <400> 1  
 Ala Lys Leu Gly Ala Val Tyr Thr Glu Gly Gly Phe Val Glu Gly Val  
 1 5 10 15  
 Asn Lys Lys Leu Gly Leu Leu Gly Asp Ser Val Asp Ile Phe Lys Gly  
 20 25 30  
 Ile Pro Phe Ala Ala Pro Thr Lys Ala Leu Glu Asn Pro Gln Pro His  
 35 40 45  
 Pro Gly Trp Gln Gly Thr Leu Lys Ala Lys Asn Phe Lys Lys Arg Cys  
 50 55 60  
 Leu Gln Ala Thr Ile Thr Gln Asp Ser Thr Tyr Gly Asp Glu Asp Cys  
 65 70 75 80  
 Leu Tyr Leu Asn Ile Trp Val Pro Gln Gly Arg Lys Gln Val Ser Arg  
 85 90 95  
 Asp Leu Pro Val Met Ile Trp Ile Tyr Gly Gly Ala Phe Leu Met Gly  
 100 105 110  
 Ser Gly His Gly Ala Asn Phe Leu Asn Asn Tyr Leu Tyr Asp Gly Glu  
 115 120 125  
 Glu Ile Ala Thr Arg Gly Asn Val Ile Val Val Thr Phe Asn Tyr Arg

ES 2 603 328 T3

130 135 140

Val Gly Pro Leu Gly Phe Leu Ser Thr Gly Asp Ala Asn Leu Pro Gly  
 145 150 155 160

Asn Tyr Gly Leu Arg Asp Gln His Met Ala Ile Ala Trp Val Lys Arg  
 165 170 175

Asn Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Asn Asn Ile Thr Leu Phe Gly  
 180 185 190

Glu Ser Ala Gly Gly Ala Ser Val Ser Leu Gln Thr Leu Ser Pro Tyr  
 195 200 205

Asn Lys Gly Leu Ile Arg Arg Ala Ile Ser Gln Ser Gly Val Ala Leu  
 210 215 220

Ser Pro Trp Val Ile Gln Lys Asn Pro Leu Phe Trp Ala Lys Lys Val  
 225 230 235 240

Ala Glu Lys Val Gly Cys Pro Val Gly Asp Ala Ala Arg Met Ala Gln  
 245 250 255

Cys Leu Lys Val Thr Asp Pro Arg Ala Leu Thr Leu Ala Tyr Lys Val  
 260 265 270

Pro Leu Ala Gly Leu Glu Tyr Pro Met Leu His Tyr Val Gly Phe Val  
 275 280 285

Pro Val Ile Asp Gly Asp Phe Ile Pro Ala Asp Pro Ile Asn Leu Tyr  
 290 295 300

Ala Asn Ala Ala Asp Ile Asp Tyr Ile Ala Gly Thr Asn Asn Met Asp  
 305 310 315 320

Gly His Ile Phe Ala Ser Ile Asp Met Pro Ala Ile Asn Lys Gly Asn  
 325 330 335

Lys Lys Val Thr Glu Glu Asp Phe Tyr Lys Leu Val Ser Glu Phe Thr  
 340 345 350

Ile Thr Lys Gly Leu Arg Gly Ala Lys Thr Thr Phe Asp Val Tyr Thr  
 355 360 365

Glu Ser Trp Ala Gln Asp Pro Ser Gln Glu Asn Lys Lys Lys Thr Val  
 370 375 380

ES 2 603 328 T3

Val Asp Phe Glu Thr Asp Val Leu Phe Leu Val Pro Thr Glu Ile Ala  
 385 390 395 400

Leu Ala Gln His Arg Ala Asn Ala Lys Ser Ala Lys Thr Tyr Ala Tyr  
 405 410 415

Leu Phe Ser His Pro Ser Arg Met Pro Val Tyr Pro Lys Trp Val Gly  
 420 425 430

Ala Asp His Ala Asp Asp Ile Gln Tyr Val Phe Gly Lys Pro Phe Ala  
 435 440 445

Thr Pro Thr Gly Tyr Arg Pro Gln Asp Arg Thr Val Ser Lys Ala Met  
 450 455 460

Ile Ala Tyr Trp Thr Asn Phe Ala Lys Thr Gly Asp Pro Asn Met Gly  
 465 470 475 480

Asp Ser Ala Val Pro Thr His Trp Glu Pro Tyr Thr Thr Glu Asn Ser  
 485 490 495

Gly Tyr Leu Glu Ile Thr Lys Lys Met Gly Ser Ser Ser Met Lys Arg  
 500 505 510

Ser Leu Arg Thr Asn Phe Leu Arg Tyr Trp Thr Leu Thr Tyr Leu Ala  
 515 520 525

Leu Pro Thr Val Thr Asp Gln Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly  
 530 535 540

Asp Ser Glu Ala Thr Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala  
 545 550 555 560

Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr  
 565 570 575

Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala  
 580 585 590

Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro  
 595 600 605

Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly  
 610 615 620

Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro  
 625 630 635 640

ES 2 603 328 T3

Pro Thr Gly Asp Ala Gly Pro Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser  
645 650 655

Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Gly Ala Pro Pro Val  
660 665 670

Thr Pro Thr Gly Asp Ser Glu Thr Ala Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp  
675 680 685

Ser Gly Ala Pro Pro Val Pro Pro Thr Gly Asp Ser Glu Ala Ala Pro  
690 695 700

Val Pro Pro Thr Asp Asp Ser Lys Glu Ala Gln Met Pro Ala Val Ile  
705 710 715 720

Arg Phe

<210> 2

<211> 2428

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<300>

<308> Genbank/X54457.1

<309> 2008-10-07

<313> (1)..(2428)

<400> 2

5

10

```

accttctgta tcagttaagt gtcaagatgg aaggaacagc agtctcaaga taatgcaaag      60
agtttattca tccagaggct gatgctcacc atggggcgcc tgcaactggt tgtgttgggc      120
ctcacctgct gctgggcagt ggcgagtgcc gcgaagctgg gcgccgtgta cacagaaggt      180
gggttcgtgg aaggcgtcaa taagaagctc ggcctcctgg gtgactctgt ggacatcttc      240
aagggcatcc ccttcgcagc tcccaccaag gccctggaaa atcctcagcc acatcctggc      300
tggcaaggga ccctgaaggc caagaacttc aagaagagat gcctgcaggc caccatcacc      360
caggacagca cctacgggga tgaagactgc ctgtacctca acatttgggt gccccagggc      420
aggaagcaag tctcccggga cctgcccgtt atgatctgga tctatggagg cgccttcctc      480
atggggtccg gccatggggc caacttcctc aacaactacc tgtatgacgg cgaggagatc      540
gccacacgcg gaaacgtcat cgtggtcacc ttcaactacc gtgtcggccc ccttgggttc      600
ctcagcactg gggacgcaa tctgccaggt aactatggcc ttcgggatca gcacatggcc      660
attgcttggg tgaagaggaa tatcgcggcc ttcggggggg accccaacaa catcacgctc      720
ttcggggagt ctgctggagg tgccagcgtc tctctgcaga ccctctcccc ctacaacaag      780
ggcctcatcc ggcgagccat cagccagagc ggcgtggccc tgagtccctg ggtcatccag      840

```

ES 2 603 328 T3

aaaaaccac tcttctgggc caaaaaggtg gctgagaagg tgggttgccc tgtgggtgat	900
gcccagga tggccagtg tctgaaggtt actgatcccc gagccctgac gctggcctat	960
aaggtgccgc tggcaggcct ggagtacccc atgctgcaact atgtgggett cgtccctgtc	1020
attgatggag acttcatccc cgctgaccog atcaacctgt acgccaacgc cgccgacatc	1080
gactatatag caggcaccaa caacatggac ggccacatct tcgccagcat cgacatgcct	1140
gccatcaaca agggcaaca gaaagtacg gaggaggact tctacaagct ggtcagtgag	1200
ttcacaatca ccaaggggct cagaggcgcc aagacgacct ttgatgtcta caccgagtcc	1260
tgggcccagg acccatccca ggagaataag aagaagactg tgggtggactt tgagaccgat	1320
gtcctcttcc tggtgccac cgagattgcc ctagcccagc acagagccaa tgccaagagt	1380
gccaagacct acgcctacct gttttcccat ccctctogga tgcccgtcta ccccaaatgg	1440
gtgggggccc accatgcaga tgacattcag tacgttttcg ggaagccctt cgccaccccc	1500
acgggctacc ggcccaaga caggacagtc tctaaggcca tgatcgcta ctggaccaac	1560
tttgccaaaa caggggaccc caacatgggc gactcggtg tgccacaca ctgggaaccc	1620
tacactacgg aaaacagcgg ctacctggag atcaccaaga agatgggcag cagctccatg	1680
aagcggagcc tgagaaccaa ctctctgcgc tactggacce tcacctatct ggcgctgccc	1740
acagtgaccg accaggaggc caccctgtg cccccacag gggactccga ggccactccc	1800
gtgccccca cgggtgactc cgagaccgcc cccgtgcccgc ccacgggtga ctccggggcc	1860
ccccccgtgc cgcccacggg tgactccggg gccccccccg tgccgcccac gggtgactcc	1920
ggggcccccc ccgtgcccgc caagggtgac tccggggccc cccccgtgccc gccacgggt	1980
gactccgggg cccccccgt gccgcccacg ggtgactccg gggccccccc cgtgcccgcc	2040
acgggtgact ccggcgcccc ccccgtgccc cccacgggtg acgcccgggc ccccccggtg	2100
ccgcccacgg gtgactccgg cgcccccccc gtgcccacca cgggtgactc cggggcccccc	2160
cccgtgaccc ccacgggtga ctccgagacc gcccccggtc cgcccacggg tgactccggg	2220
gccccccctg tgccccccac gggtgactct gaggtgccc ctgtgcccc cacagatgac	2280
tccaaggaag ctccagatgcc tgcagtcatt aggttttagc gtcccatgag ccttggtatc	2340
aagaggccac aagagtggga ccccaggggc tcccctcca tcttgagctc ttctgaata	2400
aagcctcata ccctaaaaa aaaaaaaaa	2428

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares (rhBSSL) para uso en el incremento de la tasa de crecimiento de un lactante humano prematuro, comprendiendo dicho uso la etapa de administración entérica de la lipasa humana recombinante estimulada por sales biliares a dicho lactante, en donde dicha lipasa se administra en una cantidad al día entre 1 y 100 mg de dicha lipasa por kg de peso del lactante, entre 5 y 50 mg de dicha lipasa por kg del lactante, o entre 15 y 40 mg de dicha lipasa por kg del lactante, durante un período de al menos aproximadamente 4 semanas, en donde dicho lactante es pequeño para la edad gestacional.
2. RhBSSL para uso según la reivindicación 1, en donde dicha lipasa se aísla a partir de un producto de expresión de una línea celular de ovario de hámster chino recombinante.
- 10 3. RhBSSL para uso según la reivindicación 2, en donde dicha lipasa se define adicionalmente por una o varias características seleccionadas a partir de:
- 15 a. dicha lipasa está exenta de otras proteínas de la leche o de componentes de la leche, tales como caseína de la leche y proteínas del suero de leche, tal como lactoferrina, o exenta de otros contaminantes naturales de la leche, en particular cuando tales proteínas obtenidas a partir de la leche u otros contaminantes se obtienen a partir de la leche de seres humanos, ovejas o ratones;
- b. dicha lipasa tiene una pureza superior a aproximadamente 70%, tal como una pureza superior a aproximadamente 80%, 90% o 95%;
- c. dicha lipasa tiene un nivel de glicosilación que es menor que el de BSSL-MAM y/o mayor que el de rhBSSL-OVI;
- 20 d. dicha lipasa tiene un patrón de glicosilación que es diferente al de BSSL-MAM y/o diferente al de rhBSSL-OVI;
- e. dicha lipasa tiene una masa molecular entre 90 kDa y 75 kDa, entre aproximadamente 84 y 86 kDa o aproximadamente 85 kDa; y/o
- 25 f. la cantidad de moléculas de lipasa que están presentes en una forma que es más corta en el extremo C-terminal en 1 o 2 aminoácidos en comparación con la forma de longitud completa representada por la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1 es mayor que el 50%, tal como entre aproximadamente 100% y 500%, entre aproximadamente 200% y 400% o aproximadamente 300% de la cantidad de moléculas de lipasa presentes en la forma de longitud completa representada por la secuencia mostrada en SEQ ID NO: 1.
- 30 4. RhBSSL para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde dicha rhBSSL se proporciona como una formulación liofilizada.
5. RhBSSL para uso según la reivindicación 4, en donde dicha formulación liofilizada de rhBSSL se añade primero a una fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada con la que luego se alimenta a dicho lactante, administrando de forma entérica dicha lipasa.
- 35 6. RhBSSL para uso según la reivindicación 5, en donde dicha formulación liofilizada de rhBSSL se solubiliza, por ejemplo, con agua estéril, antes de la adición a dicha fórmula de leche maternizada infantil o leche materna pasteurizada.
7. RhBSSL para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en donde dicha rhBSSL está comprendida en una composición farmacéutica.
- 40 8. RhBSSL para uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en donde dicho lactante prematuro ha nacido antes de la semana 37 de gestación, dicho lactante prematuro ha nacido preferentemente entre aproximadamente la semana 37 y aproximadamente la semana 32 de gestación.



Figura 1.1

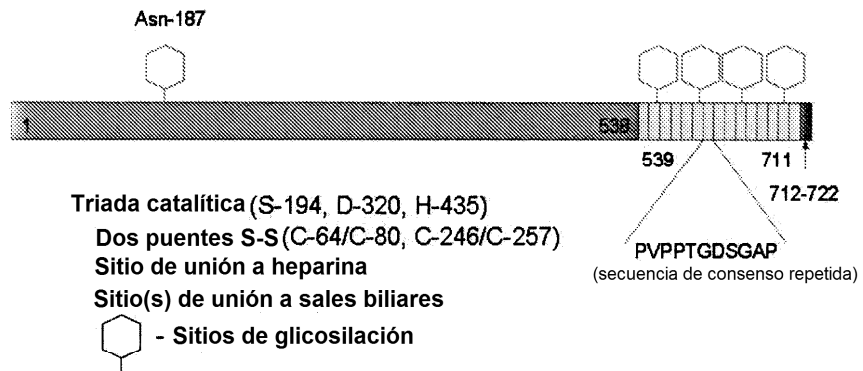
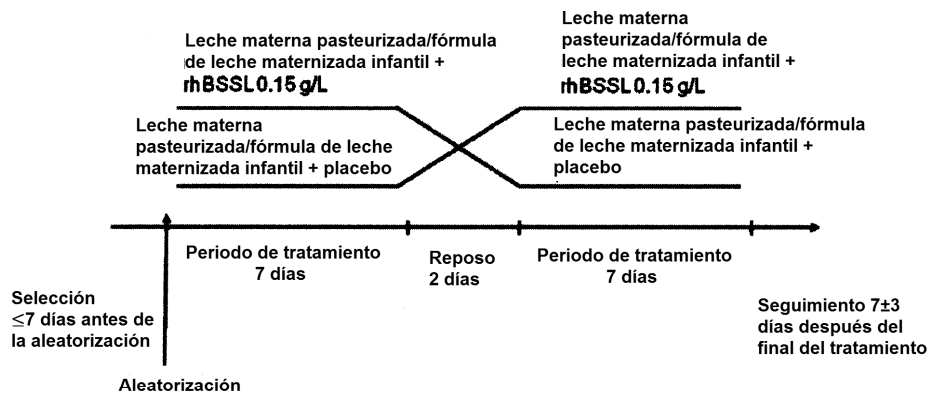


Figura 2.1



**Figura 2.2**

