

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 633 922**

(51) Int. Cl.:

A23L 29/00 (2006.01)
A23L 33/00 (2006.01)
A23C 9/20 (2006.01)
A23L 2/52 (2006.01)
A23L 2/66 (2006.01)
A23L 33/15 (2006.01)
A23L 33/16 (2006.01)
A23L 33/19 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **29.11.2007 PCT/US2007/085969**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.06.2008 WO08067486**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.11.2007 E 07864921 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017 EP 2099321**

(54) Título: **Composiciones de leche humana y métodos para la preparación y uso de las mismas**

(30) Prioridad:

**29.11.2006 US 867748 P
30.08.2007 WO PCT/US2007/001923**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
26.09.2017

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**MEDO, ELENA M.;
LEE, MARTIN L.;
RECHTMAN, DAVID J. y
FOURNELL, JOSEPH**

(74) Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 633 922 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de leche humana y métodos para la preparación y uso de las mismas

5 Referencia cruzada a solicitudes relacionadas

Campo técnico

La presente divulgación se refiere a composiciones de leche humana, por ejemplo, fortificantes de leche humana y formulaciones de leche humana estandarizadas, y a métodos para preparar y utilizar tales composiciones.

Antecedentes

La leche humana es, por lo general, el alimento de elección para los recién nacidos prematuros o nacidos a término debido a su composición nutricional y beneficios para el sistema inmunitario. La fuente de leche humana puede ser, por ejemplo, una donante o la madre del recién nacido. Sin embargo, el valor nutricional de la leche cruda o convencionalmente procesada de la donante varía, y en la mayoría de los casos, no es suficiente para suplir las necesidades de los recién nacidos antes de término. Además, existe la posibilidad de que se produzca la contaminación bacteriana, vírica u otro tipo de contaminación de la leche cruda de la donante. Por esta y otras razones, el enfoque nutricional preferente en las unidades de cuidados intensivos neonatales (UCIN) modernas es el uso de la leche de la propia madre del recién nacido. Sin embargo, incluso la leche de la propia madre no es suficiente, en términos nutricionales, para el recién nacido prematuro. Normalmente es deseable amamantar a estos recién nacidos prematuros con leche que está fortificada con varios suplementos, por ejemplo, proteínas, energía añadida (calorías) y/o minerales.

Los documentos EP 1637043 y US 6 294 206 divulgan composiciones de leche humana.

El documento EP 1637043 divulga un fortificante de leche humana que contiene proteínas y lactosa, pero no grasa. La cantidad de proteínas es de 3,085 g/150 ml=20,5 mg/ml. El fortificante de leche humana contiene al menos un componente humano directa o indirectamente obtenido a partir de la secreción mamaria humana.

El documento US 6 294 206 divulga un fortificante de leche humana que comprende un componente de proteínas de aproximadamente 24 % p/p hasta aproximadamente 55 % p/p del polvo fortificado, un componente de grasa de aproximadamente 1 % p/p hasta aproximadamente 30 % p/p del polvo fortificado y un componente de hidratos de carbono presente desde aproximadamente el 15 % p/p hasta aproximadamente 75 % p/p del polvo fortificado.

Sumario

La invención se presenta en las reivindicaciones. La presente divulgación presenta composiciones de leche humana, por ejemplo, composiciones de leche humana pasteurizada, y métodos para preparar y utilizar tales composiciones.

Las composiciones incluyen fortificantes de leche humana (por ejemplo, fortificantes de leche humana PROLACTPLUS™, por ejemplo, PROLACT+4™, PROLACT+6™, PROLACT+8™, y/o PROLACT+10™), que se producen a partir de leche humana y contienen varias concentraciones de componentes nutricionales, por ejemplo, proteínas, grasas, hidratos de carbono, vitaminas y/o minerales. Estos fortificantes pueden añadirse a la leche de una madre lactante y proporcionar un contenido nutricional óptimo de la leche a, por ejemplo, un recién nacido prematuro. Dependiendo del contenido de la propia leche materna, pueden añadirse varias concentraciones de fortificantes a la leche materna. Por ejemplo, la concentración de proteínas de la leche materna puede aumentar con el uso del fortificante. Tal y como se ha mencionado anteriormente, los fortificantes de la presente divulgación se producen a partir de leche humana y, por lo tanto, proporcionan a los recién nacidos nutrientes de origen humano.

La divulgación también presenta formulaciones de leche humana estandarizadas (de las que se tienen como ejemplo PROLACT20™, NEO20™, y/o PROLACT24™), que se producen a partir de leche humana. También se describen en el presente documento los métodos para preparar y utilizar tales composiciones. Estas formulaciones de leche humana estandarizadas pueden utilizarse para amamantar a, por ejemplo, recién nacidos prematuros, sin mezclarlas con otros fortificantes o leche. Estas proporcionan una formulación nutricional de origen humano y pueden sustituir a la leche materna. Las formulaciones de leche humana pueden contener varios contenidos calóricos, por ejemplo, PROLACT24™ (un producto de leche entera de alimentación completa) puede contener aproximadamente 423 Cal/kg (24 Cal/oz) o aproximadamente 81 Cal/100 ml.

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

En un aspecto, la divulgación presenta una composición de leche humana pasteurizada que incluye:

un constituyente de proteínas humanas de 35-85 mg/ml; un constituyente de grasa humana de 60-110 mg/ml; y un constituyente de hidratos de carbono humanos de 60-140 mg/ml. El constituyente de hidratos de carbono

puede incluir lactosa. La composición puede incluir además IgA y/o uno o más constituyentes seleccionados del grupo que consiste en: calcio, cloruro, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc. La composición puede mezclarse con leche humana cruda para proporcionar una composición nutricional, en la que la leche humana cruda comprende aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 % de la composición nutricional.

Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes características.

En una realización, la composición puede incluir 55-65 mg/ml de constituyente de proteínas; 85-95 mg/ml de constituyente de grasa; y 70-120 mg/ml de constituyente de hidratos de carbono. El constituyente de hidratos de carbono puede incluir lactosa. La composición puede incluir además IgA y/o uno o más constituyentes seleccionados del grupo que consiste en:

calcio (por ejemplo, a una concentración de 4,0-5,5 mg/ml o a 2,00-2,90 mg/ml); cloruro (por ejemplo, a una concentración de 0,35-0,95 mg/ml o a 0,175-0,475 mg/ml); cobre (por ejemplo, a una concentración de 0,0005-0,0021 mg/ml o a 0,00025-0,001 mg/ml); hierro (por ejemplo, a una concentración de 0,001-0,007 mg/ml o a 0,0005-0,0025 mg/ml); magnesio (por ejemplo, a una concentración de 0,180-0,292 mg/ml o a 0,090-0,170 mg/ml); manganeso (por ejemplo, a una concentración de 0,010-0,092 mcg/ml o a aproximadamente 0,005-0,046 mcg/ml); fósforo (por ejemplo, a una concentración de 2,00-3,05 mg/ml o a 1,00-2,90 mg/ml), por ejemplo, a 1,00-1,50 mg/ml); potasio (por ejemplo, a una concentración de 1,90-2,18 mg/ml o a 0,95-1,41 mg/ml); sodio (por ejemplo, a una concentración de 0,75-0,96 mg/ml o a 0,375-0,608 mg/ml); y zinc (por ejemplo, a una concentración de 0,0200-0,0369 mg/ml o a 0,010-0,0198 mg/ml). En una realización, la composición puede mezclarse con leche humana cruda para proporcionar una composición nutricional, en la que la leche humana cruda comprende aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 60 %, o aproximadamente el 50 % de la composición nutricional.

En otro aspecto, la divulgación presenta una composición de leche humana pasteurizada que incluye: un constituyente de proteínas humanas de aproximadamente 11-20 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 11-13 mg/ml; un constituyente de grasa humana de aproximadamente 35-55 mg/ml; y un constituyente de hidratos de carbono humanos de aproximadamente 70-120 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 80-105 mg/ml. El constituyente de hidratos de carbono puede incluir lactosa. El contenido calórico de la composición puede ser de aproximadamente 0,64 a aproximadamente 1,10 Cal/ml.

Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes características.

En una realización, la composición de leche humana pasteurizada puede incluir además uno o más de los siguientes componentes: calcio (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,40-1,50 mg/ml); cloruro (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,30-0,80 mg/ml); cobre (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,0005-0,0021 mg/ml); hierro (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,001-0,005 mg/ml); magnesio (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,03-0,13 mg/ml); manganeso (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,01-0,092 mcg/ml); fósforo (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,15-0,631 mg/ml); potasio (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,60-1,20 mg/ml); sodio (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,20-0,60 mg/ml); y/o zinc (por ejemplo, a una concentración de aproximadamente 0,0025-0,0120 mg/ml).

La divulgación también presenta el método de preparación de varias composiciones de leche humana.

En un aspecto, la divulgación presenta un método para obtener una composición de leche humana pasteurizada. El método incluye: a) tamizar genéticamente leche humana en busca de uno o más virus; b) filtrar la leche; c) tratar la leche con calor, por ejemplo, a aproximadamente 63 °C o más durante aproximadamente 30 minutos; d) separar la leche en nata y leche desnatada; e) añadir una parte de la nata a la leche desnatada; y f) pasteurizarla.

Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes características.

En una realización, el método puede incluir además la filtración de la leche desnatada a través de filtros tras la etapa d), por ejemplo, para filtrar el agua de la leche desnatada. Tras filtrar la leche desnatada después de la etapa d), los filtros utilizados en la filtración pueden lavarse para obtener una solución de poslavado. La solución de poslavado puede añadirse a la leche desnatada.

El tamizaje genético de la etapa a) puede ser la reacción en cadena de la polimerasa y/o puede incluir el tamizaje en busca de uno o más virus, por ejemplo, VIH-1, VHB, y/o VHC. La leche puede filtrarse a través de un tamiz de aproximadamente 200 micrómetros en la etapa b). El método puede incluir además pasar la nata, por ejemplo, aproximadamente el 30-50 % de nata, a través de un separador, después de la etapa d). La composición de poslavado y de leche desnatada puede incluir aproximadamente el 7,0-7,2 % de proteínas.

El método puede incluir además la realización de un análisis mineral de la parte de la composición obtenida tras la

etapa e). El método puede incluir además añadir a la composición obtenida tras la etapa e) uno o más minerales seleccionados del grupo que consiste en: calcio, cloruro, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc. La adición del uno o más minerales puede incluir calentar la composición.

5 El método puede incluir también la refrigeración de la composición tras la etapa f), llevar a cabo el análisis biológico de una parte de la composición tras la etapa f), y/o llevar a cabo el análisis nutricional de una parte de la composición tras la etapa f).

10 La leche humana de la etapa a) puede ser leche humana mezclada. Los métodos presentados en el presente documento pueden llevarse a cabo con grandes volúmenes del material de partida, por ejemplo, leche humana, por ejemplo, leche humana mezclada. Los volúmenes pueden encontrarse en el intervalo de aproximadamente 75-2.000 litros/lote de material de partida.

15 La composición obtenida tras la etapa f) puede incluir aproximadamente un 8,5-9,5 % de grasa, aproximadamente un 6,3-7,0 % de proteínas y aproximadamente un 8,0-10,5 % de lactosa.

En otro aspecto, la divulgación presenta un método para obtener una composición de leche humana pasteurizada. El método incluye: a) tamizar genéticamente leche humana en busca de uno o más virus; b) filtrar la leche; c) añadir nata; y d) pasteurizar.

20 Las realizaciones pueden incluir una o más de las siguientes características.

En una realización, el tamizaje genético de la etapa a) puede ser la reacción en cadena de la polimerasa. El tamizaje genético puede incluir el tamizaje en busca de uno o más virus, por ejemplo, VIH-1, VHB, y/o VHC.

25 La leche puede filtrarse a través de un tamiz de aproximadamente 200 micrómetros en la etapa b). El método puede incluir además la ultrafiltración de la leche entera tras la etapa b) a través de filtros. Los filtros utilizados durante la ultrafiltración pueden lavarse posteriormente.

30 La composición puede refrigerarse tras la etapa d). El análisis biológico y/o nutricional de la composición puede llevarse a cabo tras la etapa d).

35 La leche humana de la etapa a) puede ser leche humana mezclada. Los métodos presentados en el presente documento pueden llevarse a cabo con grandes volúmenes del material de partida, por ejemplo, leche humana, por ejemplo, leche humana mezclada. Los volúmenes pueden encontrarse en el intervalo de aproximadamente 75-2.000 litros/lote de material de partida.

40 El método puede incluir además añadir a la composición obtenida tras la etapa c) uno o más minerales seleccionados del grupo que consiste en: calcio, cloruro, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc. En una realización, la composición obtenida tras la etapa d) puede incluir aproximadamente 11-20 mg/ml de proteínas, aproximadamente 35-55 mg/ml de grasa y aproximadamente 70-120 mg/ml de hidratos de carbono.

45 En otro aspecto, la divulgación presenta un kit que incluye las composiciones de la leche humana pasteurizada presentadas en el presente documento (por ejemplo, un fortificante) y un recipiente graduado (por ejemplo, un frasco, una jeringa, y un bote) para mezclar las composiciones presentadas con leche humana cruda.

50 En otro aspecto más, la divulgación presenta un método para obtener una composición nutricional de leche. El método incluye añadir las composiciones de la leche humana pasteurizada presentadas en el presente documento (por ejemplo, fortificantes) a la leche humana cruda, aumentando de este modo la concentración nutricional de la leche humana cruda. La composición calórica de la leche humana cruda puede aumentar en aproximadamente 70-353 Cal/kg (2-10 Cal/oz).

55 En otro aspecto, la divulgación presenta un método para proporcionar nutrientes complementarios a un recién nacido humano prematuro, comprendiendo el método la adición de las composiciones (fortificantes) presentadas en el presente documento a la leche humana cruda para obtener una mezcla y administrar dicha mezcla al recién nacido prematuro.

60 Los términos para los recién nacidos "prematuros", "nacidos antes de término" y "de bajo peso al nacer (BPN)" se utilizan indistintamente y se refieren a los recién nacidos que nacen con menos de 37 semanas de edad gestacional y/o con un peso de nacimiento menor de 2500 g.

Por "leche entera" se entiende la leche a la que no se le ha eliminado la grasa.

65 Por "grado de contaminación microbiana" se entiende los contaminantes y patógenos microbiológicos (generalmente vivos) que pueden estar presentes en la leche, por ejemplo, virus, bacterias, moho, hongos y similares.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 es una gráfica de una realización de un método para preparar un fortificante de leche humana.
 La figura 2 es una gráfica de una realización de un método para preparar leche humana estandarizada.

5

Descripción detallada

La invención se presenta en las reivindicaciones. La presente divulgación presenta composiciones de leche humana, por ejemplo, composiciones de leche humana pasteurizada y métodos para preparar y utilizar tales composiciones.

10 Las composiciones incluyen fortificantes de leche humana (por ejemplo, fortificantes de leche humana PROLACTPLUS™, por ejemplo, PROLACT+4™, PROLACT+6™, PROLACT+8™, y/o PROLACT+10™), que se producen a partir de leche humana y contienen varias concentraciones de componentes nutricionales, por ejemplo, vitaminas y/o minerales. Estos fortificantes pueden añadirse a la leche de una madre lactante para proporcionar un contenido nutricional óptimo de la leche a, por ejemplo, un recién nacido prematuro. Dependiendo del contenido de 15 la propia leche materna, pueden añadirse varias concentraciones de fortificantes a la leche materna. Por ejemplo, la concentración de proteínas y/o el contenido calórico de la leche materna puede aumentar con el uso del fortificante. En una realización, los fortificantes presentados pueden proporcionar desde aproximadamente 3,3 hasta aproximadamente 5,5 g de proteínas/kg/día al recién nacido que recibe una alimentación completa de 150 ml y/o de 20 3,2 a 4,1 gramos de proteínas por 120 Cal/kg/día.

20 La divulgación también presenta formulaciones de leche humana estandarizadas (de las que se tienen como ejemplo PROLACT20™, NEO20™, y/o PROLACT24™), que se producen a partir de leche humana. También se describen en el presente documento los métodos para preparar y utilizar tales composiciones. Estas formulaciones de leche humana estandarizadas pueden utilizarse para amamantar a, por ejemplo, recién nacidos prematuros, sin mezclarlas 25 con otros fortificantes o leche. Así, las composiciones proporcionan a un recién nacido una formulación nutricional de origen humano que puede sustituir a la leche materna. Las formulaciones de leche humana pueden contener varios contenidos calóricos, por ejemplo, PROLACT24™ (una formulación de leche entera de alimentación completa) puede contener aproximadamente (24 Cal/oz) 840 Cal/kg o aproximadamente 81 Cal/100 ml.

30 Las composiciones de la presente divulgación se preparan a partir de leche de donante humana, por ejemplo, leche mezclada, que se somete a un tamizaje genético riguroso, a un procesamiento (por ejemplo, para concentrar los nutrientes en las composiciones de fortificantes y/o para reducir el grado de contaminación microbiana), y a la pasteurización. La leche puede estar complementada con varios minerales y/o vitaminas. Así, la divulgación también presenta los métodos para obtener y procesar la leche a partir de donantes humanas.

35 Los métodos de la presente divulgación pueden utilizarse para procesar grandes volúmenes de leche de donante, por ejemplo, aproximadamente 75-2.000 litros/lote de material de partida.

Requisitos nutricionales de los recién nacidos prematuros

40 Existen muchos factores que pueden afectar al resultado clínico de un recién nacido, por ejemplo, el nacimiento prematuro del recién nacido. Los recién nacidos antes de término presentan sistemas inmunitarios vulnerables, sistemas digestivos inmaduros y necesidades calóricas totales mayores y de nutrientes específicos (cuando, por lo general, se comparan con los recién nacidos a término). Así, la nutrición proporcionada a tales recién nacidos es un factor importante en su crecimiento y desarrollo. La leche humana se identifica desde hace tiempo como el alimento ideal para los recién nacidos prematuros o nacidos a término debido a su composición nutricional y beneficios para el sistema inmunitario. Sin embargo, no todas las madres pueden o darán el pecho a sus bebés (o utilizarán un sacaleches y guardarán la leche). Por ejemplo, las madres que tienen ciertas enfermedades, por ejemplo, tuberculosis activa, o las que están recibiendo terapia con radioisótopos, antimetabolitos o quimioterapia, es posible que no den el pecho a sus recién nacidos. Además, es posible que la propia leche materna no contenga los nutrientes suficientes para amamantar al recién nacido antes de término. El uso de leche de donante también puede ser problemático, pues es posible que tal leche no contenga el contenido nutritivo adecuado para un recién nacido prematuro.

55 La presente divulgación presenta composiciones de leche humana y los métodos para preparar y utilizar tales composiciones para alimentar y/o aumentar el valor nutricional de la leche que se da a los recién nacidos, por ejemplo, recién nacidos prematuros. Los fortificantes descritos en el presente documento (por ejemplo, PROLACTPLUS™) pueden proporcionar un alto nivel de, por ejemplo, proteínas y/o calorías a la leche y, por lo tanto, al recién nacido. Pueden utilizarse las formulaciones de leche humana estandarizadas (por ejemplo, PROLACT20™ y NEO20™) en lugar de la propia leche materna. Las composiciones pueden estar complementadas con varias vitaminas y/o minerales. Las composiciones también pueden contener IgA (por ejemplo, IgA secretora) y varios componentes descritos en el presente documento.

Obtener leche humana a partir de donantes seleccionadas y que cumplen con los requisitos

65 Las composiciones de la presente divulgación se preparan a partir de leche de donante humana. Se utilizan varias

- técnicas para identificar y certificar las cualidades de las donantes adecuadas. Una posible donante ha de obtener un permiso de su médico y del pediatra de su bebé como parte del proceso de selección. Esto ayuda a garantizar, entre otras cosas, que la donante no tiene ninguna enfermedad crónica y que su bebé no sufrirá como resultado de la(s) donación(es). Los métodos y los sistemas para certificar las cualidades y supervisar la extracción de leche y su distribución se describen, por ejemplo, en la solicitud de patente estadounidense N.º 11/526.127 (U.S. 2007/0098863).
- En general, el proceso de selección de donantes incluye entrevistas y el análisis de muestras biológicas. Cualquier muestra de sangre que en dichos análisis de positivo en, por ejemplo, contaminación vírica, elimina a la donante del proceso de selección.
- Una vez que la donante cumple con los requisitos y comienza a enviar la leche, se analiza la leche de cada una de las cantidades que envía para buscar, por ejemplo, la bacteria *B. cereus* y signos de consumo de drogas (por ejemplo, cocaína, opiáceos, metanfetaminas, benzodiacepinas, anfetaminas y THC). Cualquier hallazgo positivo exige que la donante sea expulsada del programa y que se deseche toda la leche de la misma que se haya recogido hasta ese momento.
- Pueden certificarse las cualidades de las donantes de manera periódica. Por ejemplo, si las donantes desean continuar con el programa, puede que sea necesario que cada cuatro meses las donantes se sometan al tamizaje realizado mediante el protocolo utilizado en la fase inicial de selección. Una donante que no se someta a este nuevo tamizaje o que no cumpla con los requisitos, será expulsada del programa hasta el momento en el que vuelva a someterse al mismo, o será expulsada de manera permanente si así lo exigen los resultados del nuevo tamizaje. En el caso de esta última posibilidad, toda la leche restante que haya proporcionado tal donante se retirará del inventario y se desechará.
- Una donante que cumple con los requisitos puede donar en una instalación determinada (por ejemplo, un banco de leche) o, normalmente, sacarse la leche en su casa. La donante que cumple con los requisitos puede recibir material útil de un banco de leche o directamente de una procesadora de leche (el banco de leche y la procesadora pueden ser la misma o distinta entidad) para llevárselo a casa. Estos materiales comprenden normalmente un código legible por ordenador (por ejemplo, una etiqueta de código de barras) en los recipientes y pueden incluir también un sacaleches. Así, la donante puede sacarse la leche y congelarla en casa a una temperatura de aproximadamente -20°C o menos. La leche de la donante se acepta, siempre y cuando la donante cumpla con los requisitos, y si los resultados son satisfactorios, se concierta una cita para que la donante lleve la leche al centro o para recogerla de su casa. La donante también puede enviar la leche directamente al centro del banco de leche o a la procesadora de leche en recipientes aislados proporcionados por el banco de leche o la procesadora de leche. La leche y el recipiente se examinan para determinar su estado y la información del código de barras se comprueba en la base de datos. Si el resultado es satisfactorio, las unidades se colocan en el congelador del centro de donación de leche o del centro de procesamiento (a -20°C o menos) hasta que están listas para someterse a otras pruebas y procesamiento.
- Debido a que en algunas realizaciones de los presentes métodos, la donante se saca la leche en casa y no se extrae en la instalación del banco de leche, la leche de las donantes se muestrea en busca de marcadores genéticos, por ejemplo, marcadores de ADN, para garantizar que la leche es realmente de la donante registrada. Estas técnicas de identificación de sujetos son conocidas en la materia (véase, por ejemplo, la solicitud internacional con N.º de serie PCT/LTS2006/36827). La leche puede almacenarse (por ejemplo, a -20°C o menos) y ponerse en cuarentena hasta que se reciben los resultados de las pruebas. A lo largo de todo el proceso anterior, se descartan todas las muestras de leche que no cumplen con los requisitos, y la donante es expulsada del programa. El acceso a toda la información confidencial de la donante, incluyendo los datos de las pruebas de sangre, está controlado cuidadosamente y cumple con las normas de la Health Insurance Portability and Accountability Act (HIPAA) (Ley de transferencia y responsabilidad de los seguros médicos).
- Procesamiento de la leche humana donada
- La leche humana donada recogida se procesa para obtener, por ejemplo, un fortificante de leche humana y/o una formulación de leche humana estandarizada.
- Métodos para obtener fortificantes de leche humana*
- La figura 1 es una gráfica que muestra una realización para preparar un fortificante de leche humana (por ejemplo, PROLACTPLUS™). Más adelante se comenta una realización detallada en el ejemplo 1. Tal y como se ha comentado anteriormente, la leche de la donante se analiza cuidadosamente con fines identificativos y para evitar la contaminación. La leche de la donante se congela y, cuando se deseé, se descongela y se mezcla. Despues se realiza el tamizaje (etapa 1 de la figura 1), por ejemplo, el tamizaje genético, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El tamizaje genético se realiza para identificar cualquier contaminante, por ejemplo, vírico, por ejemplo, VIH-1, VHB, y/o VHC. Despues, la leche se somete a filtración, por ejemplo, a través de un filtro de aproximadamente 200 micrómetros (etapa 2), y al tratamiento con calor (etapa 3). Por ejemplo, la composición

puede tratarse a aproximadamente 63 °C o más durante aproximadamente 30 minutos o más. En la etapa 4, la leche se transfiere a un separador, por ejemplo, un centrifugador, para separar la nata de la leche desnatada. La leche desnatada puede transferirse a un segundo depósito de procesamiento donde permanece a aproximadamente 2 a 8 °C hasta la etapa de filtración (etapa 5).

- 5 Opcionalmente, la nata separada de la leche desnatada en la etapa 4, puede someterse de nuevo a la separación para producir más leche desnatada.
- 10 Después de la separación de la nata y la leche desnatada (etapa 4), se añade una cantidad deseada de nata a la leche desnatada, y la composición se somete a otra filtración (etapa 5), por ejemplo, ultrafiltración. Este proceso concentra los nutrientes en la leche desnatada filtrando el agua. El agua obtenida durante la concentración se denomina permeado. Los filtros utilizados durante la ultrafiltración pueden someterse a un poslavado y la solución resultante se añade a la leche desnatada para maximizar la cantidad de nutrientes obtenida, por ejemplo, obteniendo una concentración de proteínas de aproximadamente 7 % a 7,2 %. La leche desnatada se mezcla después con la nata (etapa 6) y se recogen muestras para su análisis. En este punto del proceso, la composición generalmente contiene: aproximadamente de 8,5 % a 9,5 % de grasa; aproximadamente de 6,3 % a 7,0 % de proteínas; y aproximadamente de 8 % a 10,5 % de hidratos de carbono, por ejemplo, lactosa.
- 15 Después de la separación de la nata y la leche desnatada en la etapa 4, la nata fluye hacia un depósito de contención, por ejemplo, un recipiente de acero inoxidable. La nata puede analizarse para obtener su contenido en calorías, proteínas y grasa. Cuando se conoce el contenido nutricional de la nata, puede añadirse una parte de la nata a la leche desnatada que se ha sometido a la filtración, por ejemplo, ultrafiltración, (etapa 5) para conseguir el contenido en calorías, proteínas y grasa requerido para el producto específico que se está preparando. Antes de la pasteurización pueden añadirse minerales a la leche.
- 20 Después de la separación de la nata y la leche desnatada en la etapa 4, la nata fluye hacia un depósito de contención, por ejemplo, un recipiente de acero inoxidable. La nata puede analizarse para obtener su contenido en calorías, proteínas y grasa. Cuando se conoce el contenido nutricional de la nata, puede añadirse una parte de la nata a la leche desnatada que se ha sometido a la filtración, por ejemplo, ultrafiltración, (etapa 5) para conseguir el contenido en calorías, proteínas y grasa requerido para el producto específico que se está preparando. Antes de la pasteurización pueden añadirse minerales a la leche.
- 25 En este punto, en una realización, la composición procesada puede congelarse antes de añadir los minerales y descongelarse posteriormente para seguir procesándola. Cualquier cantidad de nata adicional que no se haya utilizado también puede almacenarse, por ejemplo, congelarse. Opcionalmente, antes de congelar la composición procesada, se recogen muestras para analizar los minerales. Una vez se conoce el contenido de minerales de la leche procesada, la composición puede descongelarse (si estaba congelada) y puede añadirse una cantidad deseada de minerales para conseguir los valores objetivo.
- 30 Después de la etapa 6 y/o de la congelación opcional y/o de la adición de minerales, la composición se somete a la pasteurización (etapa 7). Por ejemplo, la composición puede colocarse en un depósito de procesamiento que está conectado al pasteurizador de alta temperatura durante corto tiempo (HTST o rápido) a través de tubos de silicona curada con platino. Después de la pasteurización, la leche puede recogerse en un segundo depósito de procesamiento y mezclarse. También pueden utilizarse otros métodos de pasteurización conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la pasteurización lenta, la leche del depósito se calienta a un mínimo de 63 °C y se mantiene a esa temperatura durante un mínimo de treinta minutos. El aire, que se encuentra por encima de la leche, se calienta con vapor hasta al menos tres grados Celsius por encima de la temperatura de la leche. En una realización, la temperatura del producto es de aproximadamente 66 °C o más, la temperatura del aire que se encuentra por encima del producto es de aproximadamente 69 °C o más, y el producto se pasteuriza durante aproximadamente 30 minutos o más. En otra realización, se realizan tanto la pasteurización HTST (rápida) como la lenta.
- 35 Después de la etapa 6 y/o de la congelación opcional y/o de la adición de minerales, la composición se somete a la pasteurización (etapa 7). Por ejemplo, la composición puede colocarse en un depósito de procesamiento que está conectado al pasteurizador de alta temperatura durante corto tiempo (HTST o rápido) a través de tubos de silicona curada con platino. Después de la pasteurización, la leche puede recogerse en un segundo depósito de procesamiento y mezclarse. También pueden utilizarse otros métodos de pasteurización conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la pasteurización lenta, la leche del depósito se calienta a un mínimo de 63 °C y se mantiene a esa temperatura durante un mínimo de treinta minutos. El aire, que se encuentra por encima de la leche, se calienta con vapor hasta al menos tres grados Celsius por encima de la temperatura de la leche. En una realización, la temperatura del producto es de aproximadamente 66 °C o más, la temperatura del aire que se encuentra por encima del producto es de aproximadamente 69 °C o más, y el producto se pasteuriza durante aproximadamente 30 minutos o más. En otra realización, se realizan tanto la pasteurización HTST (rápida) como la lenta.
- 40 Después de la etapa 6 y/o de la congelación opcional y/o de la adición de minerales, la composición se somete a la pasteurización (etapa 7). Por ejemplo, la composición puede colocarse en un depósito de procesamiento que está conectado al pasteurizador de alta temperatura durante corto tiempo (HTST o rápido) a través de tubos de silicona curada con platino. Después de la pasteurización, la leche puede recogerse en un segundo depósito de procesamiento y mezclarse. También pueden utilizarse otros métodos de pasteurización conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la pasteurización lenta, la leche del depósito se calienta a un mínimo de 63 °C y se mantiene a esa temperatura durante un mínimo de treinta minutos. El aire, que se encuentra por encima de la leche, se calienta con vapor hasta al menos tres grados Celsius por encima de la temperatura de la leche. En una realización, la temperatura del producto es de aproximadamente 66 °C o más, la temperatura del aire que se encuentra por encima del producto es de aproximadamente 69 °C o más, y el producto se pasteuriza durante aproximadamente 30 minutos o más. En otra realización, se realizan tanto la pasteurización HTST (rápida) como la lenta.
- 45 La composición de fortificante resultante generalmente se procesa asépticamente. Después de refrigerarse a aproximadamente 2 a 8 °C, el producto se introduce en los recipientes con los volúmenes deseados, y se obtienen varias muestras del fortificante para realizar el análisis nutricional y determinar el grado de contaminación microbiana. El análisis nutricional garantiza que la composición tenga un contenido apropiado. Se elabora una etiqueta que refleja el análisis nutricional de cada recipiente. Las pruebas para analizar el grado de contaminación microbiana en busca de contaminantes, por ejemplo, el recuento total de aerobios, *B. cereus*, *E. coli*, Coliforme, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, levadura y/o moho. Las pruebas de grado de contaminación microbiana pueden ser pruebas genéticas. El producto es envasa y se envía una vez se ha completado el análisis y se han obtenido los resultados deseados.
- 50 La composición de fortificante resultante generalmente se procesa asépticamente. Después de refrigerarse a aproximadamente 2 a 8 °C, el producto se introduce en los recipientes con los volúmenes deseados, y se obtienen varias muestras del fortificante para realizar el análisis nutricional y determinar el grado de contaminación microbiana. El análisis nutricional garantiza que la composición tenga un contenido apropiado. Se elabora una etiqueta que refleja el análisis nutricional de cada recipiente. Las pruebas para analizar el grado de contaminación microbiana en busca de contaminantes, por ejemplo, el recuento total de aerobios, *B. cereus*, *E. coli*, Coliforme, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, levadura y/o moho. Las pruebas de grado de contaminación microbiana pueden ser pruebas genéticas. El producto es envasa y se envía una vez se ha completado el análisis y se han obtenido los resultados deseados.
- 55 *Métodos para obtener formulaciones de leche humana estandarizadas*
- La figura 2 y los ejemplos 3 y 4 de más adelante muestran algunas realizaciones de los métodos para obtener formulaciones de leche humana estandarizadas (por ejemplo, PROLACT20™ y NEO20™).
- 60 Tal y como se ha comentado anteriormente, la leche de la donante se tamiza para garantizar la identidad de la donante y reducir la posibilidad de contaminación. La leche de la donante se mezcla y se vuelve a tamizar (etapa 1 de la figura 2), por ejemplo, tamizaje genético (por ejemplo, mediante PCR). El tamizaje puede identificar, por ejemplo, virus, por ejemplo, VIH-1, VHB, y/o VHC. La leche que da resultados positivos se descarta. Tras el tamizaje, la composición se somete a filtración (etapa 2). La leche se filtra a través de aproximadamente un tamiz de 200 micrómetros y después se ultrafiltra. Durante la ultrafiltración, el agua se filtra y separa de la leche (denominada permeado) y los filtros se poslan utilizando el permeado. La solución de poslavado se añade a la leche para
- 65

recuperar cualquier proteína perdida y para aumentar la concentración de la proteína, por ejemplo, aproximadamente un 1,2 % hasta aproximadamente un 1,5 %. Haciendo referencia a la figura 2, la nata de otro lote (por ejemplo, la nata excedente de un lote de fortificante anterior) se añade en la etapa 3 para aumentar el contenido calórico. En esta fase del proceso, la composición generalmente contiene: aproximadamente de 3,5 % a 5,5 % de grasa; aproximadamente de 1,1 % a 1,3 % de proteínas; y aproximadamente de 8 % a 10,5 % de hidratos de carbono, por ejemplo, lactosa.

- 5 En esta fase, la composición puede congelarse y descongelarse para su procesamiento adicional posterior.
- 10 Opcionalmente, si la formulación de la leche humana ha de fortificarse con minerales, se lleva a cabo un análisis mineral de la composición después de la etapa 3. Una vez se conoce el contenido de minerales, puede añadirse una cantidad deseada de minerales para conseguir los valores objetivo.
- 15 En la etapa 4, la composición se pasteriza. Dichos métodos de pasterización son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el producto puede pasterizarse en un depósito que está encamisado. Puede utilizarse glicol caliente para calentar el depósito. La temperatura del producto puede ser de aproximadamente 63 °C o más y la temperatura del aire puede estar por encima de la del producto, a aproximadamente 66 °C o más. El producto se pasteriza durante un mínimo de aproximadamente 30 minutos. En la técnica también se conocen otras técnicas de pasterización.
- 20 Despues de refrigerarse hasta aproximadamente los 2 a 8 °C, el producto se introduce en los recipientes con los volúmenes deseados y se obtienen varias muestras de la formulación de la leche humana para realizar un análisis nutricional y de grado de contaminación microbiana. El análisis nutricional garantiza que la composición tenga un contenido apropiado. Se elabora una etiqueta para cada recipiente que refleja dicho análisis nutricional. Las pruebas para analizar el grado de contaminación microbiana en busca de contaminantes, por ejemplo, el recuento total de aerobios, *B. cereus*, *E. coli*, Coliforme, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, levadura y/o moho. El producto es envasa y se envía una vez se ha completado el análisis y se han obtenido los resultados deseados.

Efectos de los métodos presentados en los componentes y grado de contaminación microbiana de la leche humana

- 30 La leche humana comprende aproximadamente 100.000 entidades moleculares distintas: proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y oligoelementos. Ciertos componentes específicos incluyen la inmunoglobulina A monomérica (IgA) y la IgA secretora dimérica (s[IgA]₂), lisozima y lactoferrina. En consecuencia, los métodos presentados en el presente documento (que incluyen la pasterización), aunque ayudan a garantizar la inocuidad del producto de leche, deberían también preservar las cantidades adecuadas de tales componentes, que son potencialmente termolábiles. Tal y como se describe en el ejemplo 5 de a más adelante y en la tabla 3, los métodos de pasterización presentados en el presente documento pueden preservar una gran cantidad de IgA, lisozima y vitamina B6 en la leche procesada. Tal y como se describe en el ejemplo 5 y en la tabla 2 de más adelante, los métodos presentados son capaces de reducir cualquier grado de contaminación microbiana en la leche humana.

Composiciones de la leche humana

- 40 Las composiciones presentadas en el presente documento contienen varias cantidades de nutrientes, por ejemplo, proteínas, hidratos de carbono, grasas, vitaminas y minerales, así como otros componentes de la leche, tales como IgA y lisozima. Los fortificantes de leche humana proporcionan una cantidad concentrada de nutrientes y calorías que pueden añadirse a, por ejemplo, la leche materna. Las formulaciones de leche humana estandarizadas pueden estar complementadas con vitaminas y/o minerales, si se desea, y se puede alimentar directamente a un recién nacido con las mismas, por ejemplo, a un recién nacido prematuro. Los métodos para preparar estas composiciones están diseñados para optimizar la cantidad de nutrientes y calorías de las composiciones. Por ejemplo, las composiciones presentadas en el presente documento pueden proporcionar desde aproximadamente 3,3 hasta aproximadamente 5,5 gramos de proteínas/kg/día a un recién nacido que recibe una alimentación completa de 150 ml al día y/o de 3,2 a 4,1 gramos de proteínas/kg/día hasta recién nacidos que reciben 120 Cal/kg/día.

Fortificantes de leche humana

- 55 Los fortificantes de leche humana del presente documento contienen cantidades concentradas de nutrientes. En una realización, el fortificante puede contener un constituyente de proteína humana de aproximadamente 35-85 mg/ml; un constituyente de grasa humana de aproximadamente 60-110 mg/ml; y un constituyente de hidratos de carbono humanos de aproximadamente 60-140 mg/ml. El contenido calórico total del fortificante puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,92 hasta aproximadamente 1,89 Cal/ml. En particular, una realización puede incluir 55-65 mg/ml de constituyente de proteínas; 85-95 mg/ml de constituyente de grasa; y aproximadamente 70-120 mg/ml de constituyente de hidratos de carbono humanos.

- 65 Si se desea, el fortificante puede estar complementado con minerales. En una realización, los minerales pueden incluir: concentración de calcio de aproximadamente 4,0-5,5 mg/ml; concentración de cloruro de aproximadamente 0,35-0,95 mg/ml; concentración de cobre de aproximadamente 0,0005-0,0021 mg/ml; concentración de hierro de aproximadamente 0,001-0,700 mg/ml; concentración de magnesio de aproximadamente 0,180-0,292 mg/ml;

concentración de manganeso de aproximadamente 0,010-0,092 mcg/ml; concentración de fósforo de aproximadamente 2,00-3,05 mg/ml; concentración de potasio de aproximadamente 1,90-2,18 mg/ml; concentración de sodio de aproximadamente 0,75-0,96 mg/ml; y concentración de zinc de aproximadamente 0,0200-0,0396 mg/ml. En otra realización, los minerales pueden incluir concentración de calcio de aproximadamente 2,00-2,9 mg/ml; 5 concentración de cloruro de aproximadamente 0,175-0,475 mg/ml; concentración de cobre de aproximadamente 0,00025-0,001 mg/ml; concentración de hierro de aproximadamente 0,0005-0,0025 mg/ml; concentración de magnesio de aproximadamente 0,090-0,170 mg/ml; concentración de manganeso de aproximadamente 0,005-0,046 mcg/ml; concentración de fósforo de aproximadamente 1,00-1,50 mg/ml; concentración de potasio de 10 aproximadamente 0,95-1,41 mg/ml; concentración de sodio de aproximadamente 0,375-0,608 mg/ml; y concentración de zinc de aproximadamente 0,010-0,0198 mg/ml.

Un fortificante a modo de ejemplo (por ejemplo, PROLACT+4TM y PROLACT+6TM) puede incluir los siguientes componentes: leche humana, carbonato de calcio, fosfato de potasio, fosfato de calcio, glicerofosfato de calcio, gluconato de calcio, citrato de sodio, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, fosfato de magnesio, sulfato de zinc, sulfato de cobre y sulfato de manganeso. Un fortificante a modo de ejemplo puede tener las siguientes 15 características por cada 100 ml: aproximadamente 135-155 Cal; aproximadamente 8,5-9,5 g de grasa total; aproximadamente 75-96 mg de sodio; aproximadamente 190-218 mg de potasio; aproximadamente 7,0-12,0 g de hidratos de carbono totales; aproximadamente 5,5-10,0 g de azúcares; aproximadamente 5,5-6,5 g de proteínas; 20 aproximadamente 1000-5000 UI de vitamina A; menos de aproximadamente 1 mg de vitamina C; aproximadamente 400-550 mg de calcio; aproximadamente 0,1-0,5 mg de hierro; aproximadamente 200-305 mg de fósforo; aproximadamente 18-29,2 mg de magnesio; aproximadamente 35-95 mg de cloruro; aproximadamente 2,0-4,0 mg de zinc; aproximadamente 0,05-0,21 mcg de cobre; y menos de aproximadamente 9,2 mcg de manganeso; con una osmolalidad de ~343 mOsm/Kg de H₂O (cuando se mezcla con leche humana cruda a una proporción de 25 aproximadamente 80 % de leche cruda y 20 % de fortificante).

En la presente divulgación se engloban los fortificantes con otros constituyentes y los constituyentes con diferentes concentraciones.

Los fortificantes presentados en el presente documento pueden mezclarse con la leche materna en varias 30 concentraciones, dependiendo del contenido nutricional de la leche materna y las necesidades del recién nacido. Por ejemplo, puede analizarse la leche cruda de la madre para determinar el valor nutricional de la leche cruda. La leche cruda normal comprende, de media, 1,1 g de proteínas, 3,2 g de grasa, 7,7 g de hidratos de carbono (principalmente lactosa) y proporciona aproximadamente 64 kcal de energía por cada 100 ml. Después de su análisis, la leche materna puede regularse añadiendo una composición de fortificante comentada en el presente documento. Por 35 ejemplo, los fortificantes pueden añadir desde aproximadamente 70-353 Cal/kg (de 2 hasta aproximadamente 10 Cal/oz) y/o desde 3,3 a 5,5 g/proteína/kg/día cuando se considera una alimentación completa de 150 ml/día y/o de 3,2 a 4,1 gramos de proteína/kg/día a recién nacidos que reciben 120 Cal/kg/día. Si se necesita una dosis menor de fortificante y nutrientes, la mezcla puede incluir aproximadamente 20 % de fortificante y aproximadamente 80 % de leche humana cruda (añadiendo aproximadamente 140 Cal/kg (4 Cal/oz)) (por ejemplo, la mezcla con 40 PROLACT+4TM). Si se necesita una dosis más alta de nutrientes, la mezcla puede incluir aproximadamente 50 % de leche humana cruda y aproximadamente 50 % de fortificante (por ejemplo, la mezcla con PROLACT+10TM). La presente divulgación también engloba otras proporciones de las mezclas, incluyendo (pero no limitándose a): 45 aproximadamente 30 % de fortificante con aproximadamente 70 % de leche humana cruda (por ejemplo, la mezcla con PROLACT+6TM) y aproximadamente 40 % de fortificante con aproximadamente 60 % de leche humana cruda (por ejemplo, la mezcla con PROLACT+8TM). El ejemplo 2 y la tabla 2 de más adelante muestran algunas realizaciones de las mezclas y su información nutricional.

Formulaciones de leche humana estandarizadas

En lugar de la propia leche materna, pueden utilizarse las formulaciones de leche humana estandarizadas 50 presentadas en el presente documento para alimentar a los recién nacidos, por ejemplo, recién nacidos prematuros. Estas incluyen varios componentes nutricionales para el crecimiento y desarrollo del recién nacido.

En una realización, la formulación de leche humana estandarizada puede incluir: un constituyente de proteínas 55 humanas de aproximadamente 11-20 mg/ml; un constituyente de grasa humana de aproximadamente 35-55 mg/ml; y un constituyente de hidratos de carbono humanos de aproximadamente 70-120 mg/ml. En una realización particular, la formulación puede contener: un constituyente de proteínas humanas de aproximadamente 11-13 mg/ml; un constituyente de grasa humana de aproximadamente 35-55 mg/ml; y un constituyente de hidratos de carbono humanos de aproximadamente 80-105 mg/ml. El contenido calórico total de las formulaciones puede ser, por 60 ejemplo, de aproximadamente 0,68 Cal/ml hasta aproximadamente 0,96 Cal/ml.

La formulación de la leche puede estar complementada con vitaminas y/o minerales. En una realización, la 65 composición puede incluir: una concentración de calcio de aproximadamente 0,40-1,50 mg/ml; una concentración de cloruro de aproximadamente 0,30-0,80 mg/ml; una concentración de cobre de aproximadamente 0,0005-0,0021 mg/ml; una concentración de hierro de aproximadamente 0,001-0,005 mg/ml; una concentración de magnesio de aproximadamente 0,03-0,13 mg/ml; una concentración de manganeso de aproximadamente 0,01-

0,092 mg/ml; una concentración de fósforo de aproximadamente 0,15-0,631 mg/ml (por ejemplo, aproximadamente 0,15-0,60 mg/ml); una concentración de potasio de aproximadamente 0,60-1,20 mg/ml; una concentración de sodio de aproximadamente 0,20-0,60 mg/ml; y una concentración de zinc de aproximadamente 0,0025-0,0120 mg/ml.

- 5 Las formulaciones de leche humana pueden contener diversos contenidos calóricos, por ejemplo, 67 Kcal/dl 700 Cal/kg (20 calorías por onza) y 81 Kcal/dl 840 Cal/kg (24 calorías por onza). Una formulación de leche humana a modo de ejemplo (por ejemplo, PROLACT24TM) puede incluir los siguientes constituyentes: leche humana, glicerofosfato de calcio, citrato de potasio, gluconato de calcio, carbonato de calcio, fosfato de magnesio, cloruro de sodio, citrato de sodio, sulfato de zinc, sulfato de cobre y sulfato de manganeso. Esta composición a modo de ejemplo puede tener las siguientes características por cada 100 ml: aproximadamente 81 Cal; aproximadamente 4,4 g de grasa total; aproximadamente 20,3 mg de sodio; aproximadamente 60,3 mg de potasio; aproximadamente 8 g de hidratos de carbono totales; aproximadamente 5-9 g de azúcares; aproximadamente 2,3 g de proteínas; aproximadamente 180-250 UI de vitamina A; menos de aproximadamente 1,0 mg de vitamina C; aproximadamente 40,0-150,0 mg de calcio; aproximadamente 100-150 mcg de hierro; aproximadamente 15-50 mg de fósforo; aproximadamente 3-10 mg de magnesio; aproximadamente 25-75,0 mg de cloruro; aproximadamente 1,2 mcg de zinc; aproximadamente 140-190 mcg de cobre; menos de aproximadamente 60,2 mcg de manganeso; y osmolalidad de aproximadamente 322 mOsm/Kg de H₂O. En la presente divulgación se engloban las formulaciones de leche con otros constituyentes y los constituyentes a diferentes concentraciones.
- 10
- 15
- 20 Componentes específicos de las composiciones presentadas

Un componente de las composiciones de leche y fortificantes presentados en el presente documento es proteína. En el cuerpo humano, la proteína se necesita para el crecimiento, la síntesis de enzimas y hormonas, y para suplir las proteínas que se pierden por la piel, la orina y las heces. Estos procesos metabólicos determinan que sea necesario, tanto la cantidad total de proteínas en la alimentación, como las cantidades relativas de aminoácidos específicos. La idoneidad de la cantidad y tipo de proteína en la alimentación de los recién nacidos viene determinada por la medición del crecimiento, la absorción y retención de nitrógeno, los aminoácidos en plasma, ciertos analitos sanguíneos y respuestas metabólicas. Algunas proteínas presentes en las composiciones presentadas, beneficiosas por otras razones que no son puramente nutricionales, incluyen IgA humana, lisozima y lactoferrina.

30 Otro constituyente de las composiciones de leche descrito en el presente documento es la grasa. La grasa es, por lo general, una fuente de energía para los recién nacidos con BPN, no solo por su alta densidad calórica, sino también debido a su baja actividad osmótica en solución. Así, opcionalmente, las composiciones de leche de la invención pueden estar complementadas con constituyentes de grasa. Tales constituyentes de grasa heterólogos incluyen ácidos grasos específicos, tales como ácido docosahexaenoico (DHA) y ácido araquidónico.

35 Las vitaminas y minerales son importantes para la nutrición y el desarrollo adecuados de un recién nacido. Un recién nacido prematuro o con BPN requiere electrolitos, por ejemplo, sodio, potasio y cloruro para su crecimiento y el equilibrio ácido base. También se necesita el consumo suficiente de estos electrolitos para suplir las pérdidas que se producen a través de la piel, la orina y las heces. El calcio, el fósforo y el magnesio se necesitan para la mineralización y crecimiento adecuados de los huesos.

40 Los oligoelementos están asociados a la división celular, a las funciones inmunitarias y al crecimiento. En consecuencia, son necesarias cantidades suficientes de oligoelementos para el crecimiento y desarrollo del recién nacido. Entre algunos oligoelementos que son importantes se incluyen, por ejemplo, cobre, magnesio y hierro (que es importante, por ejemplo, para la síntesis de la hemoglobina, la mioglobina y las enzimas que contienen hierro). El zinc es necesario, por ejemplo, para el crecimiento, para la actividad de numerosas enzimas, y para el ADN, ARN y la síntesis de proteínas. El cobre es necesario, por ejemplo, para la actividad de varias enzimas importantes. El manganeso es necesario, por ejemplo, para el desarrollo de los huesos y cartílagos y tiene un papel importante en la síntesis de los polisacáridos y glucoproteínas. En consecuencia, las formulaciones de leche humana y las composiciones de fortificante de la invención pueden estar complementadas con vitaminas y minerales, tal y como se describe en el presente documento.

45

50

55

60

La vitamina A es una vitamina liposoluble esencial en, por ejemplo, el crecimiento, la diferenciación celular, la visión y el funcionamiento adecuado del sistema inmunitario. La vitamina D y el fósforo, aunque este último en menor grado, son importantes, por ejemplo, para la absorción del calcio y para el desarrollo de los huesos. La vitamina E (tocoferol) previene la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en las células, previniendo así el daño tisular. El ácido fólico juega un papel importante en, por ejemplo, el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos. Las concentraciones séricas de folato han demostrado caer por debajo de lo normal después de las 2 primeras semanas de vida de los recién nacidos con BPN y consumo de ácido fólico bajo. Adicionalmente, hay presentes varias vitaminas B a bajas concentraciones en la leche de antes de término.

65 Tal y como se ha descrito anteriormente, la variabilidad de las concentraciones de vitaminas y minerales en la leche humana y las necesidades tan considerables que tienen los recién nacidos prematuros suelen hacer necesaria la fortificación, y así garantizar que el recién nacido en desarrollo esté recibiendo las cantidades adecuadas de vitaminas y minerales. Entre los ejemplos de vitaminas y minerales que pueden añadirse a las composiciones de

leche humana presentadas en el presente documento, se incluyen: vitamina A, vitamina B1, vitamina B2, vitamina B6, vitamina B12, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K, biotina, ácido fólico, ácido pantoténico, niacina, mioinositol, calcio, fósforo, magnesio, zinc, manganeso, cobre, sodio, potasio, cloruro, hierro y selenio. Las composiciones también pueden estar complementadas con: cromo, molibdeno, yodo, taurina, carnitina y colina, que 5 también pueden requerir su complementación.

La osmolalidad de los fortificantes de leche humana y de las formulaciones de leche estandarizadas presentadas en el presente documento puede afectar a la adsorción, absorción y digestión de las composiciones. La alta 10 osmolalidad, por ejemplo, por encima de aproximadamente 400 mOsm/Kg de H₂O, se ha asociado a los mayores índices de enterocolitis necrosante (ECN), una enfermedad gastrointestinal que afecta a los neonatos (véase, por ejemplo, Srinivasan *et al.*, Arch. Dis. Child Fetal Neonatal Ed. 89:514-17, 2004). La osmolalidad de la composición y fortificante de leche humana (una vez mezclados con la leche cruda) de la divulgación, suele ser menor que 15 aproximadamente 400 mOsm/Kg de H₂O. Normalmente, la osmolalidad se encuentra desde aproximadamente los 310 mOsm/Kg de agua hasta aproximadamente los 380 mOsm/Kg de agua. La osmolalidad puede ajustarse mediante los métodos conocidos en la técnica.

Kits

La presente divulgación también presenta kits que incluyen los fortificantes de leche humana descritos en el 20 presente documento y los recipientes para mezclar los fortificantes con leche humana cruda. Los recipientes pueden incluir frascos, por ejemplo, frascos graduados, para ayudar en la dilución adecuada, jeringas, botes y otros recipientes conocidos en la técnica.

Procesamiento de las composiciones presentadas en las UCIN

La preparación de los fortificantes y de los productos de leche estandarizados, por ejemplo, en las UCIN, se ajusta dependiendo de las necesidades de los pacientes y de las políticas de los diversos hospitales. Así, la cantidad de leche preparada, por ejemplo, con los fortificantes, se determinará en el momento. Los ejemplos 3, 4 y 5 son 25 ejemplos de referencia.

Ejemplo 1. Producción y composiciones del fortificante de leche humana (FLH) PROLACTA™ Bioscience

El fortificante de leche humana (FLH) PROLACTA™ Bioscience (PROLACPLUS™) se produjo utilizando las 30 siguientes etapas. El procesamiento se realizó en una sala limpia de clase 100.000 (ISO clase 8), y el llenado se realizó en una sala limpia de clase 10.000 (ISO clase 7):

1. La leche de la donante se mezcló.
2. Se obtuvo una muestra para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en busca de los siguientes virus:

- 40 a) VIH-1
- b) VHB - Hepatitis B
- c) VHC - Hepatitis C

3. La leche de la donante se filtró a través de un tamiz de 200 micrómetros.

4. La leche de la donante se trató con calor a 63 °C o más durante 30 minutos.

5. La leche se separó en leche desnatada y nata, que presentaban las siguientes concentraciones:

- a) Leche desnatada: 0,3 %-0,69 % de grasa, 0,9 %-1,2 % de proteínas, 6 %-10 % de lactosa
- b) Nata: 25 %-46 % de grasa, 0,5 %-2 % de proteínas, 8-10 % de lactosa

- 50 6. Si se desea, se puede obtener la nata y pasarla a través del separador:

- a) Esta etapa produce más leche desnatada, lo que aumenta la producción, pues cuanta más leche desnatada se produce, puede producirse más FLH.

- 55 b) El producto que sale del lado del separador no desnatado en ese momento, se considera producto de desecho.

7. Se añadió la nata a la leche desnatada para realizar una mejor ultrafiltración durante la etapa de concentración. La grasa de la leche desnatada era de un 55 % a un 65 % del contenido de proteínas.

8. La leche desnatada se sometió a ultrafiltración. En esta etapa se filtró el agua de la leche desnatada. Esta agua se denomina permeado. La concentración final durante esta etapa fue de 7 %-10 % de proteínas.

9. Se llevó a cabo el poslavado de los filtros, utilizando el permeado, para recuperar cualquier proteína que quedase atrapada sobre los filtros durante el proceso de ultrafiltración. El poslavado se añadió a la leche desnatada concentrada hasta que la concentración de proteína alcanzó el 7,0 %-7,2 %.

- 65 10. Durante la formulación del conjunto, se añadió la nata a la leche desnatada concentrada después de que se añadiera el poslavado. Esta etapa aumentó las calorías hasta llegar al objetivo correcto. En este punto, el

producto era:

- 5 a) grasa: 8,5 %-9,5 %;
- b) proteínas: 6,3 %-7,0 %; y
- c) lactosa: 8 %-10,5 %.

11. Se envió una muestra del conjunto para el análisis de minerales. Este análisis del contenido de minerales inicial posibilitó que posteriormente se determinase la cantidad de minerales necesarios que habrían de añadirse al producto (véase, por ejemplo, la etapa 14).

12. El conjunto se congeló a -20 °C o menos.

13. Cuando llegaron del laboratorio los resultados del análisis mineral, el conjunto se descongeló.

14. En función de la concentración de minerales en el material de partida (determinada en la etapa 11 anterior), se calculó qué cantidad de minerales había que añadir. A continuación se exponen los valores objetivo finales. En las mezclas con leche humana se utilizan los fortificantes PROLACT+4™, PROLACT+6™, PROLACT+8™ y PROLACT+10™ y además se comentan en el ejemplo 2 de más adelante.

a) PROLACT+4™ y PROLACT+6™

- 20 i. Calcio: 400,0 mg/dl a 550,0 mg/dl
- ii. Cloruro: 35 mg/dl a 95,0 mg/dl
- iii. Cobre: 0,05 mg/dl a 0,21 mg/dl
- iv. Hierro: 0,1 mg/dl a 0,7 mg/dl
- v. Magnesio: 18,0 mg/dl a 29,2 mg/dl
- vi. Manganese: 1,0 mcg/dl a 9,2 mcg/dl
- vii. Fósforo: 200,0 mg/dl a 305,0 mg/dl
- viii. Potasio: 190,0 mg/dl a 218,0 mg/dl
- ix. Sodio: 75 mg/dl a 96 mg/dl
- x. Zinc: 2,0 mg/dl a 3,96 mg/dl

30 b) PROLACT+8™ y PROLACT+10™

- 35 i. Calcio: 200,0 mg/dl a 290 mg/dl
- ii. Cloruro: 17,5 mg/dl a 47,5 mg/dl
- iii. Cobre: 0,025 mg/dl a 0,1 mg/dl
- iv. Hierro: 0,05 mg/dl a 0,25 mg/dl
- v. Magnesio: 9,0 mg/dl a 14,6 mg/dl
- vi. Manganese: 0,5 mcg/dl a 4,6 mcg/dl
- vii. Fósforo: 100,0 mg/dl a 150,0 mg/dl
- viii. Potasio: 95,0 mg/dl a 141,0 mg/dl
- ix. Sodio: 37,5 mg/dl a 60,8 mg/dl
- x. Zinc: 1,0 mg/dl a 1,98 mg/dl

c) PROLACT+6™ también se preparará con la siguiente formulación:

- 45 i. Calcio: 250,0 mg/dl a 425,0 mg/dl
- ii. Cloruro: 15 mg/dl a 75,0 mg/dl
- iii. Cobre: 0,05 mg/dl a 0,21 mg/dl
- iv. Hierro: 0,1 mg/dl a 0,5 mg/dl
- v. Magnesio: 10,0 mg/dl a 25,0 mg/dl
- vi. Manganese: 1,0 mcg/dl a 9,2 mcg/dl
- vii. Fósforo: 125,0 mg/dl a 225,0 mg/dl
- viii. Potasio: 60,0 mg/dl a 105,0 mg/dl
- ix. Sodio: 50,0 mg/dl a 90 mg/dl
- x. Zinc: 2,0 mg/dl a 3,96 mg/dl

55 15. El conjunto final se calentó a 50 °C-55 °C y los minerales se mezclaron en el conjunto final.

16. Después de haber mezclado los minerales, el producto se pasterizó en un depósito. El depósito estaba encamisado y se utilizó glicol caliente para calentar el depósito. Se siguieron los siguientes parámetros:

60 a) la temperatura del producto era de 66 °C o más;

b) la temperatura del aire que se encuentra por encima del producto era de aproximadamente 69 °C o más; y
c) el producto se pasterizó durante un mínimo de 30 minutos.

65 17. Se hizo descender la temperatura del producto hasta los 2 °C-8 °C utilizando glicol frío en el depósito encamisado.

18. El producto se introdujo en los frascos utilizando una máquina de llenado Watson-Marlow en la sala limpia de

clase 10.000. Los tamaños de llenado fueron los siguientes:

- 5 a) PROLACT+4™ 10 ml
- b) PROLACT+4™ 20 ml
- c) PROLACT+4™ 100 ml
- d) PROLACT+6™ 15 ml
- e) PROLACT+6™ 30 ml
- f) PROLACT+8™ 20 ml
- 10 g) PROLACT+8™ 40 ml
- h) PROLACT+10™ 25 ml
- i) PROLACT+10™ 50 ml

19. Cuando el llenado finalizó, los frascos se utilizaron de la siguiente forma:

- 15 a) muestras de grado de contaminación microbiana: 2 frascos al comienzo, mitad y finalización del ciclo de llenado, haciendo un total de 6 jarros obtenidos para su análisis;
- b) muestras nutricionales: 1 frasco al comienzo, mitad y finalización del ciclo de llenado, haciendo un total de 3 frascos obtenidos para su análisis; y
- c) muestras de retención: se retuvieron 120 ml del producto.

20. El análisis se realizó sobre las muestras de grado de contaminación microbiana para lo siguiente:

- a) recuento total de aerobios: <100 unidad formadora de colonias/ml;
- b) *Bacillus cereus*: <10 unidad formadora de colonias/ml;
- 25 c) *E. coli*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- d) coliforme: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- e) *Pseudomonas*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- f) *Salmonella*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- 30 g) *Staphylococcus*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- h) levadura: <100 unidad formadora de colonias/ml; y
- i) moho: <100 unidad formadora de colonias/ml.

21. Se llevó a cabo el siguiente análisis nutricional.

- 35 a) PROLACT+4™ o PROLACT+6™
 - i. Calorías totales: 1,35 Cal/ml a 1,55 Cal/ml
 - ii. Proteínas: 5,5 g/dl a 6,5 g/dl
 - iii. Grasa: 8,5 g/dl a 9,5 g/dl
 - 40 iv. Lactosa: 7,0 g/dl a 12,0 g/dl
 - v. Calcio: 400,0 mg/dl a 550,0 mg/dl
 - vi. Cloruro: 35 mg/dl a 95,0 mg/dl
 - vii. Cobre: 0,05 mg/dl a 0,21 mg/dl
 - viii. Hierro: 0,1 mg/dl a 0,7 mg/dl
 - 45 ix. Magnesio: 18,0 mg/dl a 29,2 mg/dl
 - x. Manganese: 1,0 mcg/dl a 9,2 mcg/dl
 - xi. Fósforo: 200,0 mg/dl a 305,0 mg/dl
 - xii. Potasio: 190,0 mg/dl a 218,0 mg/dl
 - xiii. Sodio: 75 mg/dl a 96 mg/dl
 - 50 xiv. Zinc: 2,0 mg/dl a 3,96 mg/dl

- b) PROLACT+8™ o PROLACT+10™

- 55 i. Calorías totales: 1,35 Cal/ml a 1,55 Cal/ml
- ii. Proteínas: 5,5 g/dl a 6,5 g/dl
- iii. Grasa: 8,5 g/dl a 9,5 g/dl
- iv. Lactosa: 7,0 g/dl a 12,0 g/dl
- v. Calcio: 200,0 mg/dl a 275 mg/dl
- 60 vi. Cloruro: 17,5 mg/dl a 47,5 mg/dl
- vii. Cobre: 0,025 mg/dl a 0,1 mg/dl
- viii. Hierro: 0,05 mg/dl a 0,25 mg/dl
- ix. Magnesio: 9,0 mg/dl a 14,6 mg/dl
- x. Manganese: 0,5 mcg/dl a 4,6 mcg/dl
- 65 xi. Fósforo: 100,0 mg/dl a 150,0 mg/dl
- xii. Potasio: 95,0 mg/dl a 141,0 mg/dl
- xiii. Sodio: 37,5 mg/dl a 60,8 mg/dl

xiv. Zinc: 1,0 mg/dl a 1,98 mg/dl

c) PROLACT+6™ también se preparará con la siguiente formulación:

- 5 i. Calorías totales: 1,35 Cal/ml a 1,55 Cal/ml
 - ii. Proteínas: 5,5 g/dl a 6,5 g/dl
 - iii. Grasa: 8,5 g/dl a 9,5 g/dl
 - iv. Lactosa: 7,0 g/dl a 12,0 g/dl
 - v. Calcio: 250,0 mg/dl a 425,0 mg/dl
 - vi. Cloruro: 35 mg/dl a 75,0 mg/dl
 - vii. Cobre: 0,05 mg/dl a 0,21 mg/dl
 - viii. Hierro: 0,1 mg/dl a 0,5 mg/dl
 - ix. Magnesio: 10,0 mg/dl a 25,0 mg/dl
 - x. Manganeso: 1,0 mcg/dl a 9,2 mcg/dl
 - xi. Fósforo: 125,0 mg/dl a 225,0 mg/dl
 - xii. Potasio: 190,0 mg/dl a 218,0 mg/dl
 - xiii. Sodio: 50 mg/dl a 90 mg/dl
 - xiv. Zinc: 2,0 mg/dl a 3,96 mg/dl
- 20 22. Una vez se completó el análisis nutricional, se elaboró una etiqueta con los valores reales del laboratorio. En general, el procedimiento normal para los productos alimenticios es indicar un valor medio en la etiqueta. Sin embargo, estos productos Prolact muestran específicamente lo que hay en cada frasco.
23. El producto se envió a los clientes en refrigeradores aislados sobre hielo seco. También pueden utilizarse bloques fríos en lugar de hielo seco para el traslado.
- 25

Ejemplo 2. Producción y composiciones de varios tipos de productos de leche humana PROLACTA™ en función del fortificante de leche humana

30 Los fortificantes de leche humana (FLH) producidos, por ejemplo, tal y como se describe en el ejemplo 1 mencionado anteriormente, se mezclaron en varias concentraciones con leche humana cruda (por ejemplo, la leche de la madre del recién nacido prematuro). Dependiendo del contenido nutricional de la propia leche materna y las necesidades del recién nacido, el FLH puede mezclarse en varias proporciones. PROLACT+4™ es una composición destinada a mezclarse en una proporción de aproximadamente 80 % de leche cruda con 20 % de FLH. PROLACT+6™ es una composición destinada a mezclarse en una proporción de aproximadamente 70 % de leche cruda con 30 % de FLH. PROLACT+8™ es una composición destinada a mezclarse en una proporción de aproximadamente 60 % de leche cruda con 40 % de FLH. PROLACT+10™ es una composición destinada a mezclarse en una proporción de aproximadamente 50 % de leche cruda con 50 % de FLH. La mezcla la realizaron los clientes, y no se realizó en las instalaciones PROLACTA™. La tabla de a continuación muestra una comparación nutricional a modo de ejemplo de nutrientes en la leche cruda y de las cuatro composiciones de PROLACTPLUS™ mezcladas en varias proporciones con leche cruda.

35

40

*Tabla 1. Comparación nutricional de leche humana cruda y cuatro composiciones PROLACTPLUS de fortificante de leche humana por 100 ml**

Nutrientes	Unidad	Leche para recién nacido prematuro +	PROLACT+4™	PROLACT+6™	PROLACT+8™	PROLACT+10™
Proporciones de mezcla: materna y fortificante		100 %	80:20	70:30	60:40	50:50
Volumen	ml	100	100	100	100	100
Energía	cal	68	84	91	99	107
Proteínas (humanas)	g	1,3	2,2	2,7	3,2	3,7
Hidratos de carbono	g	7,0	7,6	7,9	8,2	8,5
Grasa (humana)++	g	3,9	4,9	5,4	5,9	6,5
Minerales **						
Sodio	mg	46	54	58	54	56
Potasio	mg	66,3	71,1	73,5	71,1	72,3
Calcio	mg	28	128	178	128	153

Fósforo	mg	14	63,1	87,7	63,1	75,4
Magnesio	mg	3,3	8	10,4	8	9,2
Cloruro	mg	78,1	83,4	86,1	83,4	84,7
Manganeso	mcg	0,4	2,36	3,2	2,36	2,79
Cobre	mg	0,08	0,1	0,1	0,1	0,1
Zinc	mg	0,5	0,7	1,1	0,7	0,9
Hierro	mg	0,1	0,2	0,2	0,2	0,2
Osmolalidad	mOsm/kg de H ₂ O	≈290	<335	<360	<325	<350

+ calculada en función de varios estudios publicados en el archivo de Prolacta Bioscience ++ los datos de la leche para recién nacido prematuro no están disponibles; la grasa está calculada en función de las calorías totales
 * los valores nutricionales están basados en los valores mínimos de la memoria descriptiva de fabricación del producto de la gama de fortificantes PROLACTPLUS™
 ** en función de la media de lotes producidos

Ejemplo 3. Producción y composiciones de las formulaciones de leche humana estandarizadas

5 NEO20™ de PROLACTA™ Bioscience es una formulación de leche humana estandarizada que se produjo mediante las siguientes etapas. El procesamiento se realizó en una sala limpia de clase 100.000 (ISO clase 8), y el llenado se realizó en una sala limpia de clase 10.000 (ISO clase 7):

- 10 1. La leche de la donante se mezcló.
 2. Se obtuvo una muestra para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en busca de los siguientes virus:

- a) VIH-1
 b) VHB - Hepatitis B
 c) VHC - Hepatitis C

15 3. La leche de la donante se filtró a través de un tamiz de 200 micrómetros.

4. La leche entera se sometió a ultrafiltración. En esta etapa se filtró el agua de la leche entera. Esta agua se denomina permeado. La concentración final de proteínas durante esta etapa fue de 1,2 %-1,3 %.

5. Se llevó a cabo el poslavado de los filtros, utilizando el permeado, para recuperar cualquier proteína que quedase atrapada sobre los filtros durante el proceso de ultrafiltración. El poslavado se añadió a la leche entera concentrada hasta que la concentración de proteínas alcanzó el 1,2 %-1,5 %.

20 6. Durante la formulación del conjunto, la nata de los lotes de fortificante anteriores se añadió a la leche entera concentrada después de añadir el poslavado para aumentar las calorías hasta el valor objetivo correcto. En este punto, el producto era:

- 25 a) grasa: 3,5 %-5,5 %;
 b) proteínas: 1,1 %-1,3 %; y
 c) lactosa: 8 %-10,5 %.

30 7. A continuación, el producto se pasterizó en un depósito. El depósito se encamisó y se utilizó glicol caliente para calentar el depósito. Se siguieron los siguientes parámetros:

- 35 a) la temperatura del producto era de 63 °C o más;
 b) la temperatura del aire que se encuentra por encima del producto era de aproximadamente 66 °C o más; y
 c) el producto se pasterizó durante un mínimo de 30 minutos.

35 8. Se hizo descender la temperatura del producto hasta los 2 °C-8 °C utilizando glicol frío en el depósito encamisado.

9. El producto se introdujo en los frascos utilizando una máquina de llenado Watson-Marlow en la sala limpia de clase 10.000. Los tamaños de llenado fueron los siguientes:

- 40 a) NEO20™ 30 ml;
 b) NEO20™ 40 ml;
 c) NEO20™ 50 ml;
 d) NEO20™ 148 ml; y
 e) NEO20™ 200 ml.

10. Cuando el llenado finalizó, se realizaron las siguientes pruebas de los frascos:

- 5 a) muestras de grado de contaminación microbiana: 2 frascos al comienzo, mitad y finalización del ciclo de llenado, haciendo un total de 6 frascos;
- b) Muestras nutricionales: 1 frasco al comienzo, mitad y finalización del ciclo de llenado, haciendo un total de 3 frascos; y
- c) muestras de retención: se retuvieron 120 ml de producto.

10 11. Se analizaron los siguientes parámetros en las muestras de grado de contaminación microbiana:

- 10 a) recuento total de aerobios: <100 unidad formadora de colonias/ml;
- b) *Bacillus cereus*: <10 unidad formadora de colonias/ml;
- c) *E. coli*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- d) coliforme: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- e) *Pseudomonas*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- f) *Salmonella*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- 15 g) *Staphylococcus*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
- h) levadura: <100 unidad formadora de colonias/ml; y
- i) moho: <100 unidad formadora de colonias/ml.

20 12. Se llevó a cabo el análisis nutricional de todos los tamaños de llenado de NEO20™. Los valores de concentración se encontraban en los siguientes intervalos:

- 25 i. Calorías totales: 0,69 Cal/ml a 0,74 Cal/ml;
- ii. Proteínas: 1,1 g/dl a 1,3 g/dl;
- iii. Grasa: 3,5 g/dl a 5,5 g/dl; y
- iv. Lactosa: 8,0 g/dl a 10,5 g/dl.

30 13. Una vez se completó el análisis nutricional, se elaboró una etiqueta con los valores reales del laboratorio. En general, el procedimiento normal para los productos alimenticios es indicar un valor medio en la etiqueta. Sin embargo, estos productos Prolact muestran lo que hay específicamente en cada frasco.

14. El producto se envió a los clientes en refrigeradores aislados sobre hielo seco. En lugar de hielo seco, pueden utilizarse bloques fríos.

35 Ejemplo 4. Producción y composiciones del fortificante de leche humana estandarizado con minerales

PROLACT20™ de PROLACTA™ Bioscience es un producto de leche humana estandarizado fortificado con minerales. Se produjo utilizando las siguientes etapas en una sala limpia de clase 100.000 (ISO clase 8). El llenado se realizó en una sala limpia de clase 10.000 (ISO clase 7).

40 1. La leche de la donante se mezcló.

2. Se obtuvo una muestra para el análisis de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en busca de los siguientes virus:

- 45 a) VIH-1
- b) VHB - Hepatitis B
- c) VHC - Hepatitis C

3. La leche de la donante se filtró a través de un tamiz de 200 micrómetros.

50 4. Se ultrafiltró la leche entera. En esta etapa se filtró el agua de la leche entera. Esta agua se denomina permeado. La concentración final de proteínas durante esta etapa fue de 1,2 %-1,3 %.

5. Se llevó a cabo el poslavado de los filtros, utilizando el permeado, para recuperar cualquier proteína que quedase atrapada sobre los filtros durante el proceso de ultrafiltración. El poslavado se añadió a la leche entera concentrada hasta que la concentración de proteínas alcanzó el intervalo 1,2 %-1,5 %.

55 6. Durante la formulación del conjunto, después de añadir el poslavado, se añadió la nata de los lotes de fortificante anteriores a la leche entera concentrada, y así aumentaron las calorías hasta llegar al objetivo correcto. En este punto, el producto era:

- 60 a) grasa: 3,5 %-5,5 %;
- b) proteínas: 1,1 %-1,3 %; y
- c) lactosa: 8 %-10,5 %.

7. En esta fase, el producto puede congelarse y después descongelarse para continuar procesándolo.

8. En función del análisis de los minerales de partida, se calculó qué cantidad de minerales había que añadir. Los valores objetivo finales fueron:

- 5 a) calcio: 40 mg/dl a 150 mg/dl;
 b) cloruro: 30 mg/dl a 80 mg/dl;
 c) cobre: 0,05 mg/dl a 0,21 mg/dl;
 d) hierro: 0,1 mg/dl a 0,5 mg/dl;
 e) magnesio: 3,0 mg/dl a 13 mg/dl;
 f) manganeso: 1,0 mcg/dl a 9,2 mcg/dl;
 g) fósforo: 15 mg/dl a 60 mg/dl;
 h) potasio: 60 mg/dl a 120 mg/dl;
 i) sodio: 20 mg/dl a 60 mg/dl; y
 j) zinc: 0,25 mg/dl a 1,2 mg/dl.

10 9. Después de añadir los minerales (y descongelar el producto, si estaba congelado), el producto se pasterizó en un depósito. El depósito estaba encamisado y se utilizó glicol caliente para calentarla. Se siguieron los siguientes parámetros:

- 15 a) la temperatura del producto era de 63 °C o más;
 b) la temperatura del aire que se encuentra por encima del producto era de aproximadamente 66 °C o más; y
 c) el producto se pasterizó durante un mínimo de 30 minutos.

20 10. Se hizo descender la temperatura del producto hasta los 2 °C-8 °C utilizando glicol frío en el depósito encamisado.

11. El producto se introdujo en los frascos utilizando una máquina de llenado Watson-Marlow en la sala limpia de clase 10.000. Los tamaños de llenado fueron los siguientes:

- 25 a) PROLACT20™ 30 ml
 b) PROLACT20™ 40 ml
 c) PROLACT20™ 50 ml

30 12. Cuando el llenado finalizó, se realizaron las siguientes pruebas de los frascos:

- 35 a) muestras de grado de contaminación microbiana: 2 frascos al comienzo, mitad y finalización del ciclo de llenado, haciendo un total de 6 frascos;
 b) muestras nutricionales: 1 frasco al comienzo, mitad y finalización del ciclo de llenado, haciendo un total de 3 frascos; y
 c) muestras de retención: se retuvieron 120 ml de producto.

40 13. Se analizaron los siguientes parámetros en las muestras de grado de contaminación microbiana:

- 45 a) recuento total de aerobios: <100 unidad formadora de colonias/ml;
 b) *Bacillus cereus*: <10 unidad formadora de colonias/ml;
 c) *E. coli*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
 d) coliforme: <1 unidad formadora de colonias/ml;
 e) *Pseudomonas*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
 f) *Salmonella*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
 g) *Staphylococcus*: <1 unidad formadora de colonias/ml;
 h) levadura: <100 unidad formadora de colonias/ml; y
 i) moho: <100 unidad formadora de colonias/ml.

50 14. Se llevó a cabo el análisis nutricional de todos los tamaños de PROLACT20™ después de haber añadido los minerales. Los intervalos incluían:

- 55 i. Calorías totales: 0,69 Cal/ml a 0,74 Cal/ml;
 ii. Proteínas: 1,1 g/dl a 1,3 g/dl;
 iii. Grasa: 3,5 g/dl a 5,5 g/dl;
 iv. Lactosa: 8,0 g/dl a 10,5 g/dl;
 v. Calcio: 40 mg/dl a 150 mg/dl;
 vi. Cloruro: 30 mg/dl a 80 mg/dl;
 vii. Cobre: 0,05 mg/dl a 0,21 mg/dl;
 viii. Hierro: 0,1 mg/dl a 0,5 mg/dl;
 ix. Magnesio: 3,0 mg/dl a 13 mg/dl;
 x. Manganeso: 1,0 mcg/dl a 9,2 mcg/dl;
 xi. Fósforo: 15 mg/dl a 60 mg/dl;
 xii. Potasio: 60 mg/dl a 120 mg/dl;
 xiii. Sodio: 20 mg/dl a 60 mg/dl; y
 xiv. zinc: 0,25 mg/dl a 1,2 mg/dl.

15. Una vez se completó el análisis nutricional, se elaboró una etiqueta con los valores reales del laboratorio. En los procedimientos alimentarios generales la etiqueta indica un valor medio. Sin embargo, estos productos PROLACTA™ muestran específicamente lo que hay en cada frasco.

5 16. El producto se envió a los clientes en refrigeradores aislados sobre hielo seco. En lugar de hielo seco, también pueden utilizarse bloques fríos.

Ejemplo 5. Validación de los métodos de pasteurización

10 Los métodos y composiciones de la divulgación mantienen las actividades deseables de las proteínas y vitaminas importantes de las composiciones descritas y eliminan el grado de contaminación microbiana, por ejemplo, Terpstra *et al.*, Breastfeeding Med. 2(1):27-33, 2007).

A. Validación del grado de contaminación microbiana

15 Se llevó a cabo una validación de los efectos de la pasteurización rápida (HTST) y de la pasteurización lenta sobre el grado de contaminación microbiana de la leche humana. Los organismos del análisis que utilizaron en los estudios de validación fueron las siguientes bacterias y virus: *E. coli*, *S. aureus* y *S. agalactiae*, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la hepatitis A (VHA), el virus de la diarrea vírica bovina (BVDV) y el virus de la pseudorrabia (PSR). El VIH y VHA se conocen por ser posibles contaminantes de la leche humana, y por lo tanto, se seleccionaron como virus relevantes. El virus de la hepatitis C (VHC) también se conoce por ser un posible contaminante de la leche humana. Sin embargo, este virus no puede cultivarse eficazmente en sistemas de líneas celulares de laboratorio, por lo que se utiliza el modelo específico del BVDV. Por la misma razón técnica, el virus de la hepatitis B (VHB), que es también un posible contaminante de la leche humana, se sustituye por el virus de la pseudorrabia del modelo general que, como el VHB, es un virus envuelto con lípidos. Usando los métodos descritos 20 en el presente documento, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 2. Valores de reducción log₁₀ de los organismos del análisis

Patógeno	Reducción log ₁₀ (HTST o rápida)	Reducción log ₁₀ (lenta)
<i>E. coli</i>	>32	No realizado
<i>S. aureus</i>	15	No realizado
<i>S. agalactiae</i>	>26	No realizado
BVDV	>5,84	>6,1
VIH	>7,27	>6,7
PSR	>7,68	>6,8
VHA	~2	~1,7

Estos valores de reducción log víricos no representan la reducción máxima que puede conseguirse mediante los métodos de la divulgación. A pesar de que el *S. aureus* es muy resistente al tratamiento con calor, este organismo mostró una reducción log₁₅ con el proceso de la divulgación.

B. Validación de los componentes de la leche

35 También se llevó a cabo una validación del nivel de los diversos componentes de la leche humana tras la pasteurización.

40 La inmunoglobulina A (IgA) y la IgA secretora (s[IgA₂]) se cuantificaron en muestras de leche humana utilizando procedimientos ELISA de tipo sándwich. Después de la pasteurización utilizando el proceso HTST (o rápido) presentado en el presente documento, la concentración de IgA disminuyó aproximadamente un 27 % (por ejemplo, un intervalo de aproximadamente del 7 % a aproximadamente el 47 %), de media, y los niveles de IgA secretora disminuyeron un 17 % (por ejemplo, un intervalo de aproximadamente del 7 % a aproximadamente el 27%), de media, en comparación con los valores correspondientes de las muestras de leche humana sin tratar.

45 La actividad de la lisozima se determinó mediante ensayo de micropocillos utilizando una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. La actividad de la lisozima en la leche humana después de la pasteurización fue de aproximadamente 22.000 UI/ml, el 57 % (por ejemplo, un intervalo desde aproximadamente el 47 % hasta aproximadamente el 67 % o más) de la actividad inicial (39.000 UI/ml) en leche humana cruda.

50 La concentración de lactoferrina se determinó mediante la técnica ELISA. El contenido de lactoferrina de la leche humana después de la pasteurización, utilizando los métodos de la divulgación, fue de aproximadamente 0,033 g/100 ml, aproximadamente el 14 % (por ejemplo, un intervalo de aproximadamente 4-24 %) de la concentración inicial (0,24 g/100 ml) en leche humana cruda.

Los análisis de las vitaminas se realizaron mediante procedimientos de HPLC (cromatografía de líquidos) validados.

Los niveles de vitamina A, vitamina C y α -, γ - y δ -tocoferol permanecieron sin cambios después de la pasteurización. El contenido de vitamina B6 de la leche humana disminuyó ligeramente a aproximadamente 7,8 mcg/100 ml, aproximadamente el 89 % de la concentración inicial de 8,8 mcg/100 ml. Estos resultados se presentan en la tabla 3.

Tabla 3. Efecto de la pasteurización en los constituyentes de la leche humana

Constituyente	Leche sin tratar	Leche pasteurizada	% restante
Inmunoglobulina A (mg/ml)	315	230	73
IgA secretoria (mg/ml)	462	379	82
Lisozima (UI/ml)	39.000	22.000	57
Lactoferrina (g/100 ml)	0,24	0,033	14
Vitamina B6 (mcg/100 ml)	8,8	7,8	89

REIVINDICACIONES

1. Una composición de leche humana pasteurizada que comprende:

- 5 un constituyente de proteínas humanas de 35-85 mg/ml;
 un constituyente de grasas humanas de 60-110 mg/ml; y
 un constituyente de hidratos de carbono humanos de 60-140 mg/ml;

en donde la composición es opcionalmente una composición en la que,

- 10 el constituyente de proteínas humanas es de 55-65 mg/ml;
 el constituyente de grasas humanas es de 85-95 mg/ml; y
 el constituyente de hidratos de carbono humanos es de 70-120 mg/ml;

15 en donde la composición comprende opcionalmente uno o más constituyentes seleccionados del grupo que consiste en calcio, cloruro, cobre, hierro, magnesio, manganeso, fósforo, potasio, sodio y zinc
y en donde la composición comprende opcionalmente IgA humana.

20 2. La composición de la reivindicación 1, en la que:

- 20 la concentración de calcio es de 4,0-5,5 mg/ml, preferentemente 2,00-2,90 mg/ml; y/o
la concentración de cloruro es de 0,35-0,95 mg/ml, preferentemente 0,175-0,475 mg/ml; y/o
la concentración de cobre es de 0,0005-0,0021 mg/ml, preferentemente 0,00025-0,001 mg/ml; y/o
la concentración de hierro es de 0,001-0,007 mg/ml, preferentemente 0,0005-0,0025 mg/ml; y/o
25 la concentración de magnesio es de 0,180-0,292 mg/ml, preferentemente 0,090-0,170 mg/ml; y/o
la concentración de manganeso es de 0,010-0,092 mcg/ml, preferentemente 0,005-0,046 mcg/ml; y/o
la concentración de fósforo es de 2,00-3,05 mg/ml, preferentemente 1,00-1,50 mg/ml; y/o
la concentración de potasio es de 1,90-2,18 mg/ml, preferentemente 0,95-1,41 mg/ml; y/o
30 la concentración de sodio es de 0,75-0,96 mg/ml, preferentemente 0,375-0,608 mg/ml; y/o
la concentración de zinc es de 0,0200-0,0369 mg/ml, preferentemente 0,010-0,0198 mg/ml.

3. La composición de la reivindicación 1, en la que el constituyente de hidratos de carbono comprende lactosa.

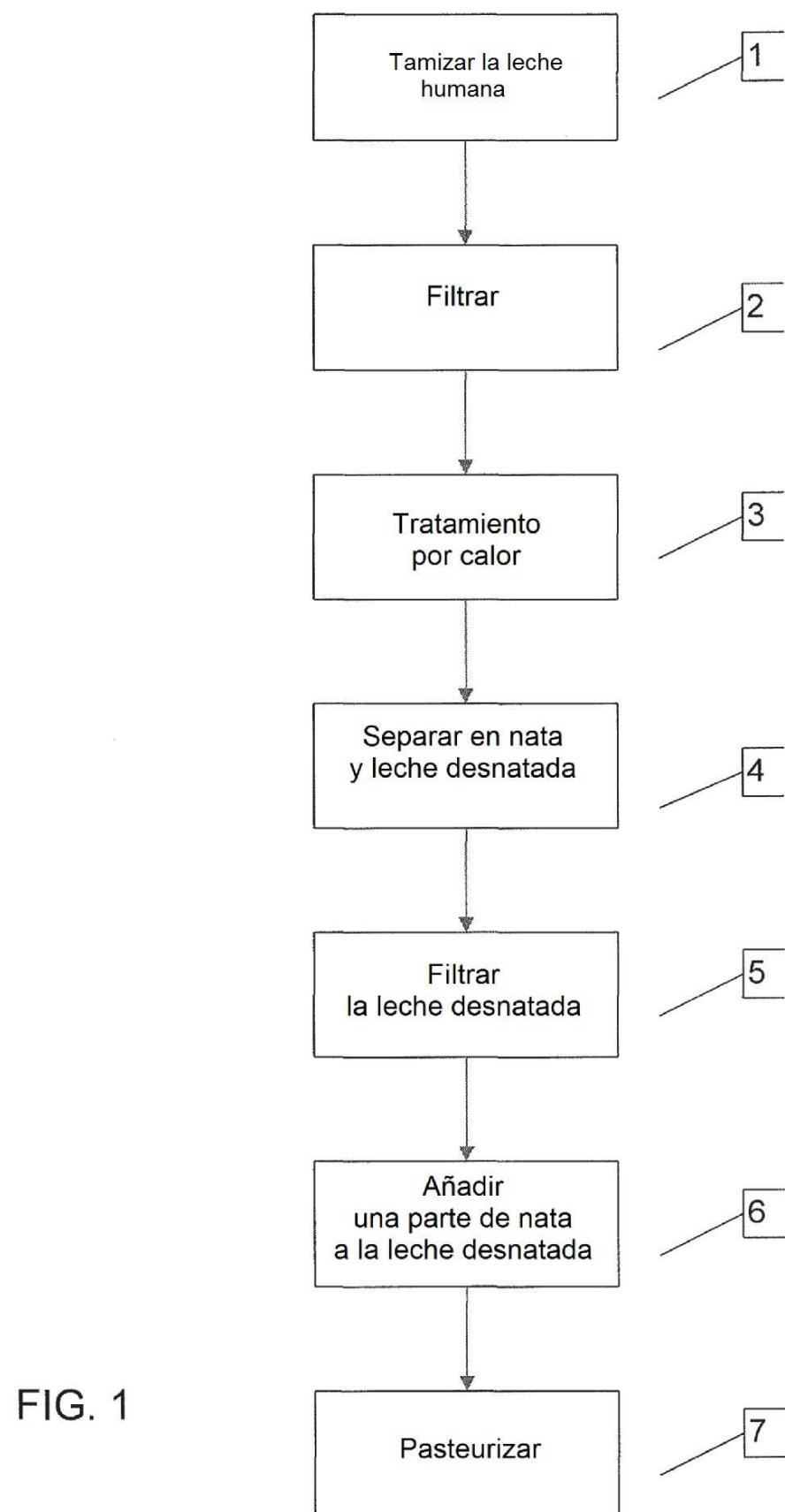


FIG. 1

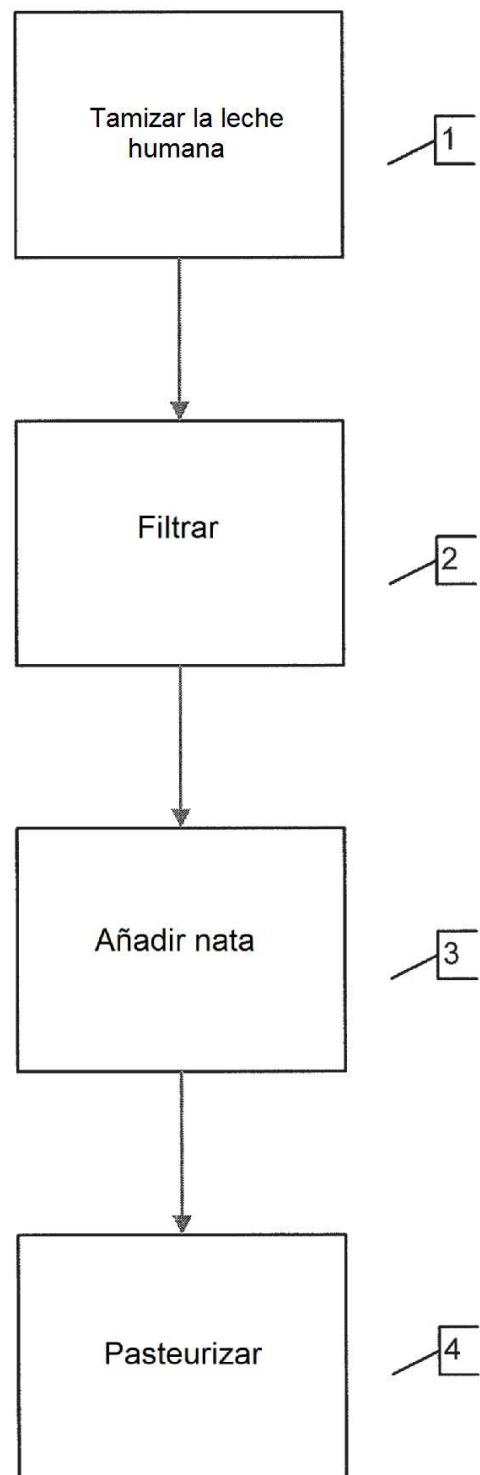


FIG. 2