

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 634 613**

51 Int. Cl.:

A23L 33/00 (2006.01)
B65B 55/00 (2006.01)
A23C 9/12 (2006.01)
A23L 33/10 (2006.01)
A23C 3/02 (2006.01)
A23C 9/142 (2006.01)
A23C 9/20 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.08.2007** **PCT/US2007/019234**
87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2008** **WO08027572**
96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.08.2007** **E 07811645 (6)**
97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.05.2017** **EP 2063722**

54 Título: **Métodos de obtención de leche estéril y composiciones de la misma**

30 Prioridad:

30.08.2006 US 841371 P
29.11.2006 US 867748 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.09.2017

73 Titular/es:

PROLACTA BIOSCIENCE, INC. (100.0%)
757 Baldwin Park Blvd.
City of Industry, CA 91746, US

72 Inventor/es:

MEDO, ELENA MARIA;
MONTOYA, ARMANDO;
LEE, MARTIN L. y
RECHTMAN, DAVID

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 634 613 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

Métodos de obtención de leche estéril y composiciones de la misma

5 **Campo técnico**

La invención se refiere a métodos de esterilización de leche entera al tiempo que se retiene una sustancial cantidad de agentes biológicos beneficiosos y se reduce la biocarga. La divulgación incluye asimismo productos lácteos obtenidos a través de los métodos de la divulgación.

10

Antecedentes

La leche materna humana constituye una valiosa terapia para el tratamiento de neonatos y niños prematuros, críticamente enfermos o inmunocomprometidos de otra forma. Sin embargo, para estos pacientes críticamente enfermos, la leche de donante humana tratada comporta riesgos en cierta medida, sobre todo, por *B. cereus*, una toxina alimentaria ubicua que se encuentra en aproximadamente un 4 % de las muestras de leche humana. *B. cereus* supone complicaciones sobre todo por su capacidad para formar una espora que no se puede eliminar a través de los procesos de pasteurización convencionales. Otras bacterias problemáticas incluyen *Clostridium perfringens*, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayatenesis*, *Escherichia coli*, *listeria monocytogenes*, *Salmonella* y *Staphylococcus aureus*.

20

A esto se suma que algunas donantes proporcionan LOTES "limpios" (sin *B. cereus* ni otros patógenos) y más adelante se contamina el lote. Cuando se agrupa la leche de donantes cualificadas, la leche infectada con *B. cereus* u otros patógenos termina contaminando otros lotes limpios causando así la destrucción de todo el depósito. Existen límites para el número de unidades que forman colonias de estas bacterias y aunque rara vez se alcanzan dichos límites, cualquier depósito que exceda dichos límites se descarta y no se puede utilizar para el procesado. Aunque resulta útil analizar la leche sin procesar antes de agruparla, la concentración de proteínas que se realiza para fabricar ciertos productos concentra de hecho todos los componentes de la leche, incluyendo estos patógenos. Mientras que otros patógenos se pueden eliminar con la pasteurización, el patógeno *B. cereus* no se puede eliminar con la pasteurización y, por tanto, es crucial certificar que el producto agrupado está desprovisto de *B. cereus* antes de la pasteurización y el rellenado. Asimismo, es deseable proporcionar depósitos de leche sin procesar sustancialmente desprovista de patógenos antes de la pasteurización para optimizar la uniformidad y seguridad del producto.

25

30

35

Roennholm K et al., 1984, Pediatrics, 74(5) 792-799 y Boehm et al., 1988, Acta Paediatr Scand 77: 642-646 divulgan composiciones de leche humana que comprenden proteína láctea humana, grasa y lactosa.

En el documento US6652900 se describe un método para producir un producto lácteo desprovisto que incluye etapas de filtración para reducir el contenido de microorganismos.

40

En la patente europea EP1637043 se describen métodos para procesar la leche de donantes individuales en los que se vuelve a añadir directamente a la leche proteína láctea concentrada derivada de la ultrafiltración.

45

Bernshaw: "Milk Banking: An Idea That Has Come Of Age", Non-Profit Milk Banking, 29 de agosto de 2006 describe una cronología de la historia de los bancos de leche humana los procedimientos utilizados hoy en día en los bancos de leche humana.

En la patente estadounidense US2005/100634 se describen métodos para enriquecer leche de donante con proteínas lácteas humanas.

50

Arnold, J. HUM. LACT., (1997) 13(3): 243-246 describe métodos utilizados en blancos de leche humana para la recogida y distribución de leche humana donada.

Sumario

55

La presente invención se define en las reivindicaciones. La invención proporciona el método de la reivindicación 1.

En otro aspecto, el método comprende además el análisis de una muestra de leche entera para determinar la presencia de VIH, VHB, VHC o cualquier combinación de los mismos antes de la filtración. En un aspecto más, la filtración de leche entera se lleva a cabo a través de un tamiz de filtro de 200 micrómetros. El tratamiento térmico de la leche entera se puede realizar a 63 °C durante 30 minutos. La porción desnatada tras la separación puede comprender aproximadamente 0,69 % de grasa, aproximadamente 1,07 % proteína y aproximadamente 7,14 % lactosa y la porción de grasa tras la separación puede comprender aproximadamente 46 % grasa, aproximadamente 2 % proteína y aproximadamente 10 % lactosa. En algunos aspectos, se procesa posteriormente la porción de grasa para obtener una porción desnatada adicional y se agrupa la porción desnatada adicional con la porción desnatada. El método puede comprender además el ajuste de la porción desnatada con una porción de crema antes de la

60

65

filtración de la porción desnatada para obtener una concentración de grasa en la porción desnatada de aproximadamente 55 % a aproximadamente 65 % del contenido de proteína de la porción desnatada. En otro aspecto, la porción desnatada rica en proteína comprende aproximadamente 8 % proteína. El método puede comprender además el lavado de uno o más filtros de la porción desnatada con la fracción permeada para obtener un lavado de proteína y la adición del lavado de proteína a la porción desnatada rica en proteína. La leche entera puede ser leche humana. El método puede incluir además la pasteurización del producto lácteo obtenido a través del método.

La divulgación proporciona asimismo una composición de leche humana de acuerdo con la reivindicación 13, composición de leche humana que comprende un constituyente de proteína de 20-70 mg/ml; un constituyente de grasa de 35 -85 mg/ml, un constituyente en hidratos de carbono de 70-115 mg/ml; y en la que la composición comprende opcionalmente IgA humana.

La divulgación proporciona asimismo un kit que comprende una composición de leche humana de la divulgación y un frasco graduado para mezclar la composición de leche humana con leche humana sin procesar para obtener una formulación mixta en la que la formulación mixta comprende aproximadamente 13 kcal/dl (4 cal/onza) más que la leche sin procesar sin la composición de leche humana de la divulgación.

La divulgación proporciona además un método de obtención de una composición de leche nutricional que comprende: medir el contenido nutricional de leche humana sin procesar; añadir una composición de leche humana de la divulgación a la leche sin procesar para aumentar el valor nutricional de la leche sin procesar aproximadamente 13 kcal/ml (4 cal/onza).

La divulgación proporciona un método para proporcionar nutrientes suplementarios a lactantes prematuros que comprende la adición de la composición de leche humana de la divulgación a leche humana sin procesar y la administración de leche humana mixta a un lactante prematuro.

Los detalles de uno o más de las realizaciones de la divulgación se exponen en los dibujos adjuntos y a lo largo de la descripción a continuación. Otros rasgos, objetos y ventajas se pondrán de manifiesto con la descripción y los dibujos, así como con las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra un proceso según la divulgación.

Descripción detallada

Tal como se utiliza en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "y" y "el/la" incluyen el plural a no ser que el contexto lo dicte claramente de otra forma. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia "una muestra" incluye una pluralidad de dichas muestras y la referencia a "la proteína" incluye la referencia a una o más proteínas conocidas entre las personas especializadas en la técnica, y así sucesivamente.

A no ser que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entienden generalmente las personas especializadas en la técnica habitual a la que pertenece la presente divulgación. Aunque se puedan utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica de los métodos y composiciones divulgados, en el presente documento se describen métodos, aparatos y materiales a modo ilustrativo.

Las publicaciones que se han mencionado, así como las que se citen a lo largo del texto se proporcionan únicamente por su divulgación antes de la fecha de registro de la presente solicitud. No ha de interpretarse en absoluto en el presente documento como una admisión de que los autores de la invención no tienen derecho a anteceder dicha divulgación en virtud de la divulgación anterior.

Desde hace mucho tiempo se reconoce que la leche humana es el alimento ideal para lactantes prematuros y a término por su composición nutritiva y sus beneficios inmunológicos. La leche humana es la fuente más deseable de dichos beneficios nutricionales e inmunológicos. Sin embargo, el valor nutricional de la leche de donante varía y existe además el problema de la contaminación bacteriana, vírica y de otro tipo de la leche de donante. Para los lactantes, pero en particular para los lactantes prematuros, la situación nutricional ideal comprende la leche de la madre. Alternativamente, o adicionalmente, la madre puede extraerse la leche utilizando una bomba sacaleches y guardarla para posterior uso. No obstante, existen algunas contraindicaciones para la lactancia materna, entre las que se incluyen que el lactante presente galactosemia y los casos en los que la madre tiene tuberculosis activa, es HTLV I o II positiva, se le está administrando radioisótopos, antimetabolitos o quimioterapia o presenta un cuadro de abuso de drogas. En lo que se refiere a infección VIH, la situación es más complicada y será el profesional quien evalúe el equilibrio entre los beneficios y los riesgos.

A pesar de los efectos positivos de la lactancia, perfectamente documentados, la tasa actual de iniciación en el hospital en Estados Unidos es tan solo de un 64 por ciento y la tasa de prolongación 6 meses después del parto es de aproximadamente 29 por ciento. Las alternativas a la lactancia consisten en el uso de leche de donante humana, ya sea como una fórmula suplemento de la toma de la leche humana o como la fórmula sola. El enriquecimiento de la leche extraída está indicado para muchos lactantes que nacen con un peso muy bajo.

Las recomendaciones de la Academia de Pediatría Norteamericana indican que la leche humana depositada en bancos puede ser una alternativa de la toma de alimento adecuada para lactantes cuyas madres no pueden o no desean (p.ej., por razones sociales) proporcionar su propia leche. La Asociación Norteamericana de Bancos de Leche Humana (HMBANA), establecida en 1985, ha publicado directrices de alcance nacional para el establecimiento y funcionamiento de bancos de leche humana de donantes. Dichas directrices son análogas a las utilizadas para proteger los suministros de los bancos de sangre humana.

Por lo general, se alimenta a los neonatos prematuros o bien con una fórmula para lactantes comercial diseñada específicamente para dichos lactantes o bien con la leche de la propia madre. Las investigaciones siguen en curso en lo que se refiere a los requisitos nutricionales de estos lactantes. Sin embargo, existen numerosos estudios que documentan que la leche pretérmino sin suplementar y la leche a término depositada en banco proporcionan cantidades inadecuadas de varios nutrientes como para satisfacer las necesidades de dichos lactantes (Davies, D. P., "Adequacy of expressed breast milk for early growth of preterm infants". ARCHIVES OF DISEASE IN CHILDHOOD, 52, p. 296-301, 1997). Los requisitos de energía estimados de los lactantes con bajo peso al nacer en desarrollo son aproximadamente 120 Cal/kg/día; las necesidades de energía exactas varían en función de las diferencias en la actividad, el gasto de energía basal, la eficacia de la absorción de nutrientes, enfermedad y la capacidad para utilizar la energía para sintetizar tejido. Aproximadamente un 50 % del consumo de energía se deriva de las necesidades metabólicas basales, la actividad y el mantenimiento de la temperatura corporal. Aproximadamente 12,5 % se emplea para sintetizar nuevo tejido y 25 % se almacena. El 12,5 % restante es excretado. La leche humana pretérmino suele carecer de un aspecto nutricional en particular. Por ejemplo, la leche humana pretérmino suele carecer de calcio, fósforo y proteína. Por lo tanto, se ha recomendado que cuando se alimenta a los neonatos prematuros con leche humana pretérmino, conviene enriquecer la leche humana para satisfacer mejor las necesidades nutricionales del lactante prematuro.

Los enriquecedores de la leche humana Similac Natural Care® y Enfamil® son enriquecedores de la leche humana disponibles en el mercado. Los enriquecedores difieren en cuanto a su forma, el origen de los ingredientes y la composición energética y de nutrientes. Por otra parte, estos productos son artificiales por naturaleza. En las unidades de cuidados intensivos de neonatales (UCIN) existe la necesidad de contar con enriquecedores de la leche humana tanto en polvo como líquidos. El enriquecedor más idóneo sería uno de origen humano. Actualmente, no se dispone de ningún enriquecedor de la leche humana.

La secreción de fluido de las glándulas mamarias femeninas incluye una serie de constituyentes que se englobarán en adelante bajo el término leche simplemente. La leche extraída normalmente no es estéril y contiene bacterias incluso cuando se obtiene en condiciones asépticas. En cambio, los microorganismos del entorno (el aire, aparatos de extracción, contacto con las manos y otros objetos no esterilizados, el tanque o receptáculo de la leche y similares) contaminan muy rápidamente la leche y patógenos específicos como *B. cereus* se propagan a gran velocidad incluso en la leche pasteurizada.

Dada su composición de hidratos de carbono, proteínas, grasas, minerales y vitaminas, la leche constituye un medio de cultivo ideal para prácticamente todos los microorganismos y la leche se estropea en un breve período de tiempo. La refrigeración de la leche retrasa ligeramente el crecimiento bacteriano y prolonga su capacidad de conservación unos días.

Además de las bacterias que agrían la leche, como los lactobacilos, las bacterias patógenas humanas constituyen sobre todo un verdadero problema. Entre ellas se incluyen cepas patógenas de *salmonella*, *campylobacter*, *listeria* y *staphylococci*, que pueden aparecer sobre todo en la leche no pasteurizada, o también las especies *clostridium* o *bacillus*, que gracias a sus esporas termorresistentes pueden sobrevivir a la pasteurización a 62-74 °C.

Normalmente, se esteriliza la leche a través del llamado tratamiento UHT, es decir, tratamiento térmico a entre 120 °C y 145 °C durante unos segundos. Además del "sabor a hervido", el calentamiento extremo tiene como resultado la pérdida de la actividad biológica, por ejemplo, a través de la desnaturalización de las proteínas por el calor. Dichas proteínas incluyen componentes inmunológicamente activos valiosos presentes en la leche, entre los que se incluyen por ejemplo inmunoglobulinas y otras sustancias inmunoestimulantes, así como otras proteínas importantes, tales como lactoferrina, lactoperoxidasa, factores de crecimiento y similares. Por ejemplo, se ha demostrado que la leche calostroal biológicamente activa es útil en trastornos gastrointestinales, entre otros.

Por otra parte, es posible que se liberen toxinas desde bacterias por activación térmica. Por ejemplo, las endotoxinas de bacterias gram-negativas no se destruyen con la pasteurización. En la esterilización UHT, la eliminación de las bacterias gram-negativas puede aumentar las endotoxinas en un factor de 6 a 7 (Motter, J., Neth. Milk Dairy Journal, Vol. 41, 137-145, 1987).

Los métodos actuales para tratar leche entera tienen como resultado una reducción de las proteínas y otras moléculas biológicamente activas beneficiosas. Por ejemplo, la liofilización, el tratamiento a altas temperaturas y similares reducen, por ejemplo por degradación y desnaturalización, proteínas, lípidos y otros agentes biológicamente activos. Por otra parte, cuando se utiliza menos calor en la pasteurización, se obtienen productos lácteos con una mayor biocarga y, por tanto, con un mayor riesgo para el consumidor. Existen ciertas etapas de filtración que se utilizan actualmente para reducir el contenido de proteínas y para filtrar la lactosa y las sales.

La presente divulgación proporciona un enriquecedor de leche humana para lactantes prematuros que requieren un mayor aporte de nutrientes para favorecer su desarrollo. La divulgación comprende un enriquecedor derivado de leche humana obtenido a través de los métodos de la divulgación. En algunos aspectos, se puede añadir a la leche humana productos suplemento derivados de leche humana/enriquecedor de leche humana, en virtud de lo cual se suplementa el nivel de proteínas, grasas, vitaminas y minerales. La divulgación proporciona además un método para proporcionar un valor nutricional suplementario a un lactante prematuro que requiere más nutrientes para su crecimiento.

Los términos lactante "prematuro", "pretérmino" y "bajo peso al nacer (BPN)" se utilizan indistintamente y se refieren a lactantes nacidos a una edad gestacional inferior a 37 semanas y/o con pesos al nacer por debajo de 2500 g. Las necesidades del lactante prematuro son particularmente agudas. Para los lactantes con un peso muy bajo al nacer (<1500 g), la mortalidad antes de cumplir 1 año es del 25 %. Para los bebés con un bajo peso al nacer (<2500 g), la mortalidad antes de cumplir 1 año es 2 por ciento; una cifra que sigue siendo considerablemente más alta que el 0,25 % por ciento que corresponde a los lactantes con un peso normal al nacer (>2500 g).

Suscita una particular preocupación la enterocolitis necrosante (ECN), una grave enfermedad gastrointestinal de etiología desconocida en los neonatos. ECN se caracteriza por necrosis mucosal o transmucosal de parte del intestino. Un lactante muy pequeño y enfermo que nazca antes de término es muy susceptible de ECN. La creciente incidencia de ECN se debe en parte a una mejor tasa de supervivencia en el grupo de lactantes prematuros de alto riesgo.

La divulgación proporciona métodos para obtener y procesar leche humana desde una donante o un grupo de donantes. Los métodos de la divulgación incluyen procesos que reducen la biocarga al mismo tiempo que mantienen el valor nutricional en una preparación enriquecida. Generalmente, los métodos incluyen medidas para identificar y cualificar las donantes adecuadas. Normalmente es el médico de cabecera quien recomienda a las donantes como tales donantes. Entre otras razones, esto sirve para asegurar que las donantes no están crónicamente enfermas. Los métodos y sistemas para cualificar y supervisar la recogida y distribución de leche se describen en la solicitud de patente estadounidense N° 11/526.127.

Se realiza un proceso de selección a través de entrevistas, así como el tratamiento de una muestra biológica. Se explora la muestra biológica en busca de patógenos virales (p.ej. VIH 1 y 2, HTLV I y II, VHB y VHC) y sífilis, así como otros patógenos procariotas (p.ej., *B. cereus*) y se descarta a las donantes que dan positivo en el análisis.

Cualquier muestra posible hallada positiva en la exploración elimina dicha muestra del procesado y a la donante para futuras donaciones. Se realiza una medición más que comprende el análisis de una muestra o un agrupamiento de leche del donador para determinar el abuso de drogas.

Se puede volver a cualificar las donantes de forma periódica. Por ejemplo, es posible que se requiera de la donante que vuelva a pasar el mismo protocolo de selección utilizado en la cualificación inicial cada cuatro meses. La donante que no se someta de nuevo o que no pase los protocolos de cualificación quedará pospuesta hasta el momento en el que pueda ser cualificada de nuevo adecuadamente. En algunos casos, la donante quedará permanentemente pospuesta si así lo justifican los resultados de la selección de recalificación. En el caso de que se dé esta situación, se eliminará del inventario y será destruida toda la leche que quede facilitada por dicha donante.

Una donante cualificada puede donar en una instalación diseñada para ello (p.ej., una agencia del banco de leche) o, normalmente, extraerse la leche en su domicilio. En un aspecto, el banco de leche o un centro procesador de leche facilitará los suministros a la donante calificada (el banco y el centro procesador de leche puede ser la misma identidad o identidades diferentes) para llevárselos a su domicilio. Los suministros comprenderán normalmente un código legible por ordenador (p.ej., código de barras-etiqueta) sobre los recipientes y posiblemente incluyan también una bomba sacaleches. La donante puede entonces bombear y congelar la leche en su domicilio, preferentemente, a una temperatura de -20 °C. En uno de sus aspectos, se acepta la leche de la donante siempre y cuando los resultados del análisis de sangre sean satisfactorios 10-14 días después de la última visita al centro de leche de donantes; si dichos resultados son satisfactorios, se cita a la donante para que deposite la leche en el centro o la tenga recogida desde su domicilio. Se examina el estado de la leche y el recipiente y se verifica la información del código de barras con respecto a la base de datos. Si todo es satisfactorio, se guardan las unidades en el congelador del centro de leche de donantes o el centro de procesado (-20 °C) hasta que estén listas para posterior análisis y procesado.

En otro proceso, la donante extrae la leche en su domicilio y no se recoge la leche en las instalaciones el banco de leche; el proceso de la divulgación implica un muestreo de cada lote de leche de la donante en busca de marcadores que garanticen que la leche es realmente de la donante registrada. Dichas técnicas de identificación de la persona son conocidas dentro de la técnica (p.ej. véase la serie de solicitudes internacionales No. PCT/US2006/36827). La leche se puede almacenar (p.ej. a -20 °C) y mantener en cuarentena hasta recibir los resultados del análisis. A lo largo de todo el proceso mencionado, se descarta cualquier muestra de leche que no cumpla los requisitos. Al igual que en los centros de donación de sangre, el acceso a toda la información confidencial sobre la donante, incluyendo los datos del análisis de sangre, está estrictamente controlado.

Se procesa la leche recogida y aprobada (p.ej., que haya pasado el análisis de factores de riesgo) o bien por filtración estéril o bien por pasteurización, o una combinación de ambos (u otro método para reducir la biocarga). Tal como se ha señalado anteriormente, la presente invención queda definida con las reivindicaciones.

En un proceso, se eleva la temperatura de la leche entera antes de la filtración por encima de 70 °C durante un período de tiempo aceptable (HTST). Por ejemplo, se descongela el contenido de los recipientes diseñados para un lote de producción en particular a 65 °C y se agrupan en un tanque de proceso aislado. El tanque lleva incorporado un dispositivo de control de temperatura continua y una funda que contiene un refrigerante de etilen glicol en circulación. El glicol se enfría a entre 2 y 8 °C durante el proceso de agrupamiento y se agita la mezcladora de tanque sin vórtice y sin que la leche forme espuma que pudiera dañar constituyentes importantes de proteína. Se puede analizar la leche agrupada para determinar la biocarga.

En otro proceso más, se conecta la formulación de leche entera en el tanque de proceso a una pasteurizadora de alta temperatura y período corto (HTST) a través de un tubo silástico curado con platino. Tras la pasteurización, se recoge la leche en un segundo tanque de procesado y se enfría. Se pueden aplicar otros métodos de pasteurización (p.ej. pasteurización lenta o vat), conociéndose dichas técnicas en la especialidad. Por ejemplo, en la pasteurización vat, se calienta la leche en el tanque a un mínimo de 62,5 grados Celsius y se mantiene a esa temperatura durante aproximadamente treinta minutos. Se calienta con vapor el aire que está encima de la leche cinco grados Celsius más por encima de la temperatura de la leche. En otro proceso, se llevan a cabo la pasteurización tanto HTST como vat.

En un proceso (tal como se representa en la Figura 1), se calienta **110** leche humana entera **100** tal como se describe en el presente documento. A continuación, se separa la leche entera calentada en porción desnatada y crema (es decir grasa) **120**. Se desgrasa la leche para obtener leche desnatada a través de métodos convencionales, como centrifugación. Opcionalmente, esta separación de grasa y leche desnatada no incluye la eliminación de iones divalentes (p.ej., calcio y similares). En un proceso, se bombea la leche agrupada a una centrífuga para separar la grasa (crema) del resto de la leche al mismo tiempo que se transfiere la leche desnatada a un segundo tanque de procesado en el que permanece a 2 to 8 °C hasta una etapa de filtración opcional. Tras la centrifugación, la crema fluye hacia un recipiente de acero inoxidable pequeño. Opcionalmente, se pasteuriza a continuación la crema, seguido de la determinación del contenido calórico, grasa y proteínas. Una vez completada la separación, se puede determinar el volumen y el contenido de grasa y proteína de la crema y volver a añadir una porción de la crema a la leche desnatada para conseguir el contenido calórico, de proteínas y grasas que favorezca la filtración para la obtención del producto específico. Se pueden añadir minerales a la leche antes o después de la pasteurización y/o filtración.

Se filtra **140** la porción desnatada **130** para aumentar la concentración de factores biológicos en la fracción retenida **150** (p.ej. porción desnatada enriquecida con proteína). A continuación, se determina el contenido calórico de la porción desnatada enriquecida y se ajusta **160**, si es necesario, mediante la adición de crema **170**, obtenida previamente. En un aspecto, se recoge y se vuelve a filtrar **190** la fracción permeada **180** obtenida de la primera filtración para obtener una segunda fracción retenida **200** que comprende factores biológicos adicionales que puedan haber pasado a través de la fracción permeada **180** durante la primera filtración **140**. Se puede añadir esta segunda fracción retenida **200** a la primera fracción retenida **150** para aumentar la concentración del agente biológico (p.ej. concentración de proteína). Se puede seguir procesando **220** la crema **170** de una primera separación **120** para obtener una porción desnatada adicional **230**. Por ejemplo, se puede volver a separar **220** la crema **170** para obtener mantequilla **240** y leche desnatada **230**. Se puede añadir la porción desnatada adicional **230** a la porción desnatada **130**.

Se entiende por "leche entera" la leche de la que no se ha separado la grasa. Se entiende por "porción desnatada" o "leche desnatada" la leche entera menos todo o parte del contenido de grasa. Por lo tanto, se puede apreciar que "leche desnatada" incluye variantes como "leche baja en grasa" de las que se ha separado sustancialmente todo el contenido de grasa. Se entiende por "crema" o "porción grasa" la porción de la leche entera separada de la leche desnatada. Normalmente, la crema comprende ácidos grasos de cadena larga, cadena mediana y cadena corta a una concentración superior a la de la leche desnatada obtenida desde la misma preparación.

De acuerdo con un modo de realización, el tamaño de la membrana de ultrafiltración utilizada para filtrar la leche desnatada será el adecuado para impedir el paso de cualquier sustancia con un peso molecular por encima de 40 kDa. Entre dichas sustancias excluidas se pueden mencionar, sin limitarse solo a ellas, proteína láctea y grasa

láctea. Alternativamente, se pueden emplear las membranas de ultrafiltración que impidan el paso de cualquier sustancia con un peso molecular por encima de 1-40 kDa y cualquier intervalo intermedio. Normalmente, se pueden utilizar filtros que comprenden 0,45 µm o inferiores (p.ej., 0,2 µm). Normalmente, se utilizará un filtro de 0,2 µm. En algunas realizaciones, se puede aplicar una filtración graduada (p.ej., una primera filtración a 0,45 µm y una segunda filtración a 0,3 µm y una tercera a 0,2 µm, o cualquier combinación de las mismas). La separación de grasa desde la porción desnatada tiene como resultado una mayor facilidad de filtración. La esterilización se puede llevar a cabo a través de métodos conocidos tales como filtración o filtración tangencial utilizando filtros o membranas de filtro de la profundidad adecuada.

Con la membrana de ultrafiltración se pueden retener las siguientes proteínas lácteas (los pesos moleculares se señalan entre paréntesis): lactoalbúmina (~14 kDa); caseína (~23 kDa); lactoglobulina (~37 kDa); albúmina (~65 kDa); e inmunoglobulinas (>100 kDa).

Las membranas de ultrafiltración que tienen un límite del peso molecular de 3,5 kDa o menos están disponibles por ejemplo por Advanced Membrane Technology, San Diego, Calif. y Dow Dinamarca, Naskov, Dinamarca, respectivamente. Se pueden emplear también membranas de ultrafiltración fabricadas con materiales cerámicos. Los filtros cerámicos tienen una ventaja con respecto a los filtros sintéticos. Los filtros cerámicos se pueden esterilizar con vapor vivo.

Normalmente, se aplica un gradiente de presión a través de la membrana de ultrafiltración para facilitar la filtración. Normalmente, se ajusta el gradiente de presión para mantener un flujo de filtro a través de la membrana deseado. En un aspecto, se prepara primero la membrana de ultrafiltración con una pequeña cantidad de leche y se descarta la fracción permeada antes de comenzar la filtración. Se cree que la preparación del filtro de esta manera es ventajosa para la eficiencia del filtrado.

Tras la pasteurización, se procesa el producto de leche asépticamente. Tras el enfriamiento a entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 °C, se puede analizar la leche pasteurizada para determinar su contenido nutricional, su contenido de proteínas y factores específicos y ajustarse al nivel deseado. En un aspecto, se mide la porción desnatada/retenida enriquecida para determinar su contenido nutricional, su contenido de proteína y factores específicos y se ajusta al nivel deseado, por ejemplo, volviendo a añadir crema pasteurizada para obtener el contenido calórico deseado. Se bombea el producto desde el tanque de proceso en una unidad de rellenado dispensándolo en jeringuillas o frascos. Se analiza el producto final en cuanto a la contaminación viral o bacteriana antes del envasado y la distribución.

Los métodos y las composiciones de la divulgación mantienen las actividades deseables de importantes proteínas y vitaminas al mismo tiempo que reducen la biocarga. Se analizan diversos organismos para determinar su presencia en las distintas etapas del procesado de la leche hasta el producto final. Los organismos utilizados en los estudios de validación para determinar la contaminación incluyen las bacterias: *E. coli*, *S. aureus* y *S. agalactiae* y los virus: virus de inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis A (VHA), virus de la diarrea viral bovina (VDVB) y virus pseudorrabia (VS), éste último utilizado como marcador para CMV. VIH y VHA son conocidos como potenciales contaminantes de la leche humana y, por tanto, fueron seleccionados como virus pertinentes. El virus de la hepatitis C (VHC) también es conocido como potencial contaminante de la leche humana. Al aplicar los métodos de la presente divulgación se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 1. Valores de reducción Log₁₀ de Organismos de ensayo

Patógeno	Reducción Log ₁₀ (HTST)	Reducción Log ₁₀ (vat)
<i>E. coli</i>	>32	Sin hacer
<i>S. aureus</i>	~15	Sin hacer
<i>S. agalactiae</i>	>26	Sin hacer
VDVBa	~6,1	~6,13
VIHb	~6,7	~5,97
VSc	~6,8	~6,05
VHAd	>2,6, <5,5	~2

Estos valores de reducción log viral no representan la reducción máxima que se puede conseguir a través de los procesos de la presente divulgación. Cabe destacar la eliminación del virus de la hepatitis A (VHA), un virus pequeño, resistente, de cubierta no lipídica al que no afectan las condiciones de pasteurización (62,5 ± 1,0 °C durante 15 minutos) tradicionalmente utilizadas en la industria de la leche. Asimismo, aunque *S. aureus* es bastante resistente al tratamiento térmico, este organismo presentó una reducción ~15 log con el proceso de la presente divulgación.

La divulgación proporciona asimismo una composición de enriquecedor. El enriquecedor se obtiene llevando a cabo el proceso de recogida y filtración y/o pasteurización descritos en el presente documento. El enriquecedor de la divulgación comprende importantes proteínas y factores biológicos.

La leche humana comprende aproximadamente 100.000 factores biológicos diferentes - proteínas, lípidos, hidratos de carbono, vitaminas y minerales traza. Entre los componentes que son clave se incluyen la inmunoglobulina monomérica A (IgA) y la inmunoglobulina secretora dimérica (s[IgA]₂), lisozima y lactoferrina. Por consiguiente, aunque el proceso de pasteurización ayuda a garantizar la seguridad del producto de leche, debería preservar también cantidades adecuadas de los componentes esenciales potencialmente inestables térmicamente.

Se determinaron cuantitativamente la inmunoglobulina A (IgA) y la IgA secretora (s[IgA]₂) en muestras de leche humanas utilizando procedimientos ELISA tipo sándwich. Tras la pasteurización utilizando el proceso HTST de Prolacta, la concentración de IgA descendió aproximadamente un 27 % (p.ej. de aproximadamente 7 % a aproximadamente 47 %), por término medio y los niveles de IgA secretora descendieron un 17 % (p.ej. de aproximadamente 7 % a aproximadamente 27 %), por término medio en comparación con los valores correspondientes en muestras de leche humana sin tratar.

Se determinó la actividad de lisozima por ensayo de microtitulación utilizando una suspensión de *Micrococcus lysodeikticus* como sustrato. La actividad de lisozima en la leche humana tras la pasteurización fue aproximadamente 22.000 IU/ml, 57 % (p.ej. de aproximadamente 47 % a aproximadamente 67 % o más) de la actividad inicial (39.000 IU/ml) en leche humana sin procesar.

Se determinó la concentración de lactoferrina por técnicas de ELISA. El contenido de lactoferrina de la leche humana tras la pasteurización aplicando los métodos de la divulgación fue aproximadamente 0,033 g/100 ml, aproximadamente 14 % (p.ej., de aproximadamente 4-24 %) de la concentración inicial (0,24 g/100 ml) en leche humana sin procesar.

Se realizaron análisis de las vitaminas por procedimientos de HPLC validados. Los niveles de vitamina A, vitamina C y α -, γ - y δ -tocoferol se mantuvieron sin cambios tras la pasteurización. El contenido de vitamina B6 de leche humana descendió ligeramente a aproximadamente 7,8 μ g/100 ml, aproximadamente 89 % de la concentración inicial de 8,8 μ g/100 ml. En la Tabla 2 se muestran estos resultados.

Tabla 2. Efecto de la pasteurización en constituyentes de leche humana

Constituyente	Leche sin tratar	Leche pasteurizada	% Restante
Inmunoglobulina A (mg/ml)	315	230	73
IgA secretora (mg/ml)	462	379	82
Lisozima (IU/ml)	39,000	22,000	57
Lactoferrina (g/100 ml)	0,24	0,033	14
Vitamina B6 (μ g/100 ml)	8,8	7,8	89

El constituyente proteína de las composiciones de leche y los enriquecedores de la divulgación proporcionan la fuente de proteína. La proteína es necesaria para crecer, para la síntesis de enzimas y hormonas y para el reemplazamiento de la pérdida de proteínas desde la piel, en la orina y las heces. Estos procesos metabólicos determinan la necesidad tanto de la cantidad total de proteína en la alimentación como la cantidad relativa de aminoácidos específicos. La adecuación de la cantidad y el tipo de proteína en la alimentación para lactantes se determinan midiendo el crecimiento, la absorción y retención de nitrógeno, los aminoácidos en plasma, ciertos análisis de la sangre y las respuestas metabólicas. Una ventaja en particular de la divulgación es la presencia de proteínas IgA humanas, lisozima y lactoferrina en las composiciones.

Aunque no es necesario, se reconocerá que las composiciones de leche humana de la divulgación se pueden modificar o suplementar con constituyentes no naturales o heterólogos/heterogéneos. Por ejemplo, el contenido de proteína se puede ajustar o modificar utilizando una fuente de nitrógeno adecuada para el consumo humano. Dichas proteínas son muy conocidas entre las personas especializadas en la técnica y se pueden seleccionar fácilmente al preparar dicha composición. Entre los ejemplos de constituyentes de proteína adecuados que se pueden añadir se incluyen caseína, suero, leche desnatada condensada, leche no grasa, soja, guisante, arroz, maíz, proteína hidrolizada, aminoácidos libres, fuentes de proteína que contienen calcio en una suspensión coloidal con la proteína y mezclas de los mismos.

Otro constituyente de las composiciones de leche de la divulgación comprende una fuente de grasa. La grasa es por lo general una fuente de energía para lactantes de BPN, no solamente por su alta densidad calórica, sino también por su baja actividad osmótica en solución. También en este caso, aunque no es necesario, las composiciones de leche de la presente divulgación se pueden suplementar con constituyentes de grasa. Dichos constituyentes de grasa heterólogos/heterogéneos incluyen aceite de cártamo con alto contenido oleico, aceite de soja, aceite de coco fraccionado (triglicéridos de cadena media, aceite MCT), aceite de girasol con alto contenido oleico, aceite de maíz, aceite de canola, aceites de coco, palma y semilla de palma, aceite marino, aceite de semilla de algodón y aceites grasos específicos como ácido docosahexaénico (DHA) y ácido araquidónico.

El ácido docosahexaénico es un ácido graso omega-3. DHA es el PUFA omega-3 de 20 carbonos más abundante en la leche humana. Sin embargo, el contenido de DHA en la leche humana variará en gran medida dependiendo de la dieta de la madre. Si la madre come pescado con un alto contenido de DHA, por lo general, su leche contendrá

mayores niveles de DHA, en cambio, una madre que tenga un menor acceso al pescado, tendrá niveles más bajos de DHA en su leche. En consecuencia, la leche humana puede requerir suplementación de DHA para asegurar que el lactante prematuro recibe suficientes cantidades de DHA. La suplementación con DHA va acompañada normalmente de suplementación de ácido araquidónico. En la patente estadounidense No. 5.492.938 para Kyle et al., se describe un método de obtención de DHA desde dinoflagelados y su uso en una composición farmacéutica y suplementos de la dieta.

Los hidratos de carbono son otro constituyente de las composiciones de la divulgación. Los hidratos de carbono proporcionan una fuente de energía fácilmente asequible que ayuda al crecimiento y reduce el riesgo de catabolismo del tejido propio de lactantes que se desarrollan rápidamente malnutridos. En la leche humana y en la mayoría de las fórmulas normales para lactantes a base de leche la mayor parte de los hidratos de carbono es lactosa. Los lactantes con BPN pueden presentar una incapacidad para digerir completamente la lactosa debido a que la actividad de la lactasa en el intestino fetal no se desarrolla totalmente hasta el último período de la gestación (36 a 40 semanas). Por otra parte, la actividad de la sacarasa es máxima a las 32 semanas de gestación y la actividad de la glucoamilasa, que digiere los sólidos de jarabe de maíz (polímeros de glucosa), aumenta el doble de rápido que la actividad de la lactasa durante el tercer trimestre. Las composiciones de leche humana de la divulgación se pueden suplementar con hidratos de carbono. Entre los ejemplos de hidratos de carbono que se pueden utilizar para suplementar las composiciones de leche humana de la divulgación se incluyen, sin limitarse a ellas, almidón de maíz hidrolizado, maltodextrina, polímeros de glucosa, sacarosa, jarabe de maíz, sólidos de jarabe de maíz, jarabe de arroz, glucosa, fructosa, lactosa, jarabe de maíz con alto contenido de fructosa y oligosacáridos no digeribles, como fructooligosacáridos (FOS).

Las vitaminas y los minerales son importantes para una nutrición y desarrollo apropiados de un lactante. Un lactante prematuro o un lactante con BPN requieren electrolitos como sodio, potasio y cloruro para crecer y para el equilibrio ácido base. El consumo suficiente de dichos electrolitos es necesario también para el reemplazamiento de las pérdidas en la orina y las heces y a través de la piel. El calcio, fósforo y magnesio son necesarios para una mineralización ósea apropiada. Para que los huesos crezcan deben estar presentes cantidades adecuadas de estos minerales en la alimentación.

Los minerales traza están asociados a la división celular, la función inmune y el crecimiento. En consecuencia, la provisión de cantidades suficientes de minerales traza es necesaria para el crecimiento y desarrollo del lactante. Los minerales traza que son importantes incluyen cobre, magnesio y hierro (que es importante para la síntesis de hemoglobina, mioglobina y enzimas que contienen hierro). El zinc es necesario para el crecimiento, para la actividad de numerosas enzimas y para la síntesis de ADN, ARN y proteína. El cobre es necesario para la actividad de varias enzimas importantes. El manganeso es necesario para el desarrollo de los huesos y el cartílago y es importante para la síntesis de polisacáridos y glicoproteínas. Por consiguiente, la leche humana y las composiciones enriquecidas de la divulgación se pueden suplementar con vitaminas y minerales.

La vitamina A es una vitamina liposoluble esencial para el crecimiento, la diferenciación celular, la visión y el sistema inmune. La vitamina D es importante para la absorción del calcio y, en menor medida, el fósforo, así como para el desarrollo del hueso. La vitamina E (tocoferol) impide la peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados en la célula, impidiendo así el daño del tejido. El ácido fólico es importante en el metabolismo de aminoácidos y nucleótidos. Se ha demostrado que las concentraciones de folato en suero caen por debajo de lo normal transcurridas 2 semanas de vida en los lactantes de BPN con bajo consumo de ácido fólico. Adicionalmente, varias vitaminas B están presentes en concentraciones bajas en la leche pretérmino.

Tal como se ha descrito, la variabilidad de las concentraciones de vitamina y minerales en la leche humana y la mayor necesidad de los lactantes prematuros requiere un enriquecimiento mínimo para asegurar que el lactante en desarrollo reciba cantidades adecuadas de vitaminas y minerales. Entre los ejemplos de vitaminas y minerales suplemento en la composición de leche humana y el enriquecedor de la divulgación 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, m-inositol, calcio, fósforo, magnesio, zinc, manganeso, cobre, sodio, cloruro potásico, hierro y selenio. Es posible que también se requiera suplementación de otros nutrientes como cromo, molibdeno, yodo, taurina, carnitina y colina.

Se divulgan composiciones que comprenden 67 Kcal/dl (20 calorías por onza) de producto de leche entera, 80 Kcal/dl (24 calorías por onza) de producto de leche entera y un enriquecedor de leche humana. Las composiciones enriquecedoras de leche comprenden aproximadamente 20-70 mg/ml de proteína, aproximadamente 35 -85 mg/ml de grasa, aproximadamente 70-115 mg/ml de hidratos de carbono y contiene IgA humana. Aplicando los métodos de la divulgación se pueden obtener varias composiciones calóricas. Un ejemplo de composición es una composición de leche y una composición de leche enriquecedora de 24 calorías.

La composición de leche entera de 24 calorías comprende los siguientes constituyentes: leche humana, glicerofosfato cálcico, citrato potásico, gluconato cálcico, carbonato cálcico, fosfato de magnesio, cloruro sódico, citrato sódico, sulfato de zinc, sulfato cúprico y sulfato de manganeso. La composición de 24 calorías tiene las

siguientes características por ración unitaria (10 ml) (Adviértase que los valores son aproximaciones y, como se podrá apreciar en la técnica, variarán dependiendo del método de análisis, la máquina que se utilice y similares):

5	Calorías	8,5
	Total de grasas	0,44 g
	Sodio	2,3 mg
	Potasio	6,3 mg
	Total hidratos carbono	0,79 g
10	Azúcares	0,64 g
	Proteínas	0,31 g
	Vitamina A	21,1 IU
	Vitamina C	<0,10 mg
	Calcio	8,0 mg
15	Hierro	13,3 mcg
	Fósforo	3,8 mg
	Magnesio	0,74 mg
	Cloro	5,0 mg
	Zinc	0,12 mcg
20	Cobre	17,3 mcg
	Manganeso	<6,2 mcg
	Osmolaridad	-322 mOsm/Kg H ₂ O

La composición enriquecedora comprende los siguientes constituyentes: leche humana, carbonato cálcico, fosfato potásico, fosfato cálcico, glicerofosfato cálcico, gluconato cálcico, citrato sódico, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, fosfato de magnesio, sulfato de zinc, sulfato cúprico y sulfato de manganeso. La composición enriquecedora tiene las siguientes características por ración unitaria (2 ml) (Adviértase que los valores son aproximaciones y se podrá apreciar dentro de la técnica que variarán dependiendo del método de análisis, la máquina utilizada y similares);

30	Calorías	2,7
	Total de grasa	0,15 g
	Sodio	1,2 mg
	Potasio	2,3 mg
	Total hidratos de carbono	0,21 g
35	Azúcares	0,15 g
	Proteínas	0,10 g
	Vitamina A	5,5 IU
	Vitamina C	<0,02 mg
	Calcio	8,9 mg
40	Hierro	0,01 mg
	Fósforo	3,6 mg
	Magnesio	0,38 mg
	Cloro	0,4 mg
	Zinc	0,05 mg
45	Cobre	2,7 mcg
	Manganeso	<1,3 mcg
	Osmolaridad	-343 mOsm/Kg H ₂ O (cuando se mezcla con leche sin procesar)

La osmolaridad de las composiciones de leche humana y el enriquecedor de la divulgación son importantes para la adsorción, absorción y digestión de las composiciones. Una osmolaridad inapropiada puede derivar en distensión abdominal y en que el lactante vomite. La osmolaridad de la composición de leche humana y el enriquecedor (una vez mezclados con la leche sin procesar) según la divulgación es normalmente menos de aproximadamente 400 mOsm/Kg H₂O. Normalmente, la osmolaridad es de aproximadamente 310 mOsm/Kg de agua a aproximadamente 380 mOsm/Kg de agua. Cuando la composición de la divulgación se suplementa con un constituyente de hidratos de carbono o grasa, se deberá ajustar la osmolaridad de las composiciones. Por ejemplo, el tipo de constituyente (p.ej. hidrato de carbono o grasa) afecta a la osmolaridad de la leche humana enriquecida. Cuanto más hidrolizado esté el hidrato de carbono, mayor actividad osmótica. Asimismo, las fuentes de hidratos de carbono parcialmente hidrolizadas pueden aumentar aún más la osmolaridad cuando se reconstituyen con leche humana como consecuencia de una mayor hidrólisis de la amilasa de la leche humana. Las personas especializadas en la técnica podrán seleccionar fácilmente los hidratos de carbono o la combinación de hidratos de carbono que tenga como resultado la osmolaridad deseada de la composición de leche humana/enriquecedor reconstituida.

Normalmente, se mezcla el enriquecedor con leche humana para añadir 13 kcal/dl (4 cal/onza). Normalmente, esto es una mezcla 80:20 de leche sin procesar: enriquecedor (p.ej. 8 ml de leche sin procesar y 2 ml de enriquecedor)

5 indicada como "Plus 4" en la tabla a continuación. Otras mezclas incluyen 70:30 ("Plus 6"); 60:40 ("Plus 8"); y 50:50 ("Plus 10"), si bien en la presente invención se contempla cualquiera o todas las proporciones o cantidades relativas de leche sin procesar y enriquecedor. En la Tabla 3 se exponen ejemplos de la mezcla de leche humana sin procesar (p.ej. leche de la propia madre) combinada con composiciones de leche humana de la divulgación. La tabla 4 presenta cálculos calóricos ilustrativos para una mezcla de leche humana sin procesar y una composición de leche de la divulgación.

TABLA 3

	Proteína de la madre (gramos)								100 ml	120 k-cal				
	Proteína de la madre (gramos)		Porcentaje	Proteína de la madre		Proteína de	Total de proteína			Volumen	Total de proteína		Porcentaje de proteína	
	Bajo	Alto	Leche materna	Bajo	Alto	Enriquecedor	Bajo	Alto	Porcentaje	ml	Bajo	Alto	Bajo	Alto
Leche materna	1,4	1,8	100%	1,4	1,8	0,0	1,4	1,8		177,5	2,5	3,2		
Plus 4	1,4	1,8	80%	1,1	1,4	1,1	2,2	2,5	2,54%	147,9	3,3	3,8	2,22%	2,54%
Plus 6	1,4	1,8	70%	1,0	1,3	1,7	2,6	2,9	2,91%	136,5	3,6	4,0	2,63%	2,91%
Plus 8	1,4	1,8	60%	0,8	1,1	2,2	3,0	3,3	3,28%	126,8	3,9	4,2	3,04%	3,28%
Plus10	1,4	1,8	50%	0,7	0,9	2,8	3,5	3,7	3,65%	118,3	4,1	4,3	3,45%	3,65%

TABLA 4

	Leche materna					
	Bajo	Alto	Plus 4	Plus 6	Plus 8	Plus 10
Cal/oz	17	22	24	26	28	30
ml/oz	29,58	29,58	29,58	29,58	29,58	29,58
Cal/ml	0,57	0,74	0,81	0,88	0,95	1,01
ml requeridos para 120 Cal	209	161	148	137	127	118
Gramos de proteína por ml	0,014	0,018	0,024	0,028	0,032	0,036
Proteína/120 cal	2,9	2,9	3,5	3,8	4,0	4,2
Se calcula cal/ml en 20 cal/oz						
Se calcula que la proteína en la leche materna es 1,6 ml/dl						

El enriquecedor se presenta normalmente en jeringuillas de 10 ml o en frascos de 20 ml. Se pueden incluir jeringuillas con el frasco. Tanto en el caso de un kit de jeringuilla (p.ej. jeringuilla y frasco) como con frascos de 20 ml, los frascos pueden comprender marcas graduales para ayudar a efectuar la dilución apropiada. Por ejemplo, se puede analizar una leche materna sin procesar para determinar el valor nutricional de la leche sin procesar. La leche sin procesar normal comprende por término medio 1,1 % proteína, 4,2 % grasa, 7,0 % lactosa (un azúcar) y proporciona 72 kcal de energía por cada 100 gramos. Se puede analizar una leche materna sin procesar para determinar el valor nutricional y ajustarlo después utilizando una composición enriquecedora según la divulgación para añadir 13 kcal/ml (4 cal/onza) de la leche materna sin procesar.

"Dosis unitaria" se refiere a paquetes individuales de enriquecedor que contienen la cantidad de enriquecedor que se ha de utilizar en una preparación de leche para el lactante. La cantidad de leche humana enriquecida preparada para un lactante prematuro oscilará normalmente entre 25 ml y 150 ml al día. En consecuencia, una sola dosis unitaria es la cantidad apropiada de enriquecedor para enriquecer una preparación de 8 a 40 ml de leche sin procesar. Se pueden añadir dosis unitarias adicionales para volúmenes más grandes. Así pues, una dosis unitaria es de 2 ml de enriquecedor por 8 ml de leche sin procesar o 10 ml de enriquecedor por 40 ml de leche sin procesar. En un aspecto, la dosis unitaria comprende una jeringuilla de 10 ml y puede comprender marcas graduadas de 2 ml suficientes para preparar varias preparaciones de leche.

Normalmente la cantidad de leche humana preparada se basa en la cantidad de leche necesaria para proporcionar a un lactante un suministro nutricional de 24 horas. Por ejemplo, se alimentará a un lactante de 1500 gr con 150 ml de leche al día. Si se utiliza leche congelada, se colocará la leche congelada en agua caliente hasta que se descongele completamente. Se debe dedicar una especial atención al mezclado de los enriquecedores. Se requiere un mezclado suave para evitar que se rompa el glóbulo de grasa de la leche, que puede aumentar la adherencia de la grasa de leche a las paredes de los recipientes de alimentación y causar una pérdida importante de grasa (energía). Se prepara la cantidad prescrita de leche enriquecida introduciéndola en jeringuillas que se etiquetan para su identificación. Una vez completada la preparación de la leche, se suministran las porciones de alimentación repartidas en partes alícuotas a las unidades de neonatología y se colocan en refrigeradores para que el personal de enfermería pueda acceder a ellas fácilmente. Normalmente, se temple la leche enriquecida refrigerada antes de su uso. Por ejemplo, se temple la leche enriquecida en una incubadora de laboratorio de calor seco a una temperatura ajustada en aproximadamente 35-45 °C durante aproximadamente 15 minutos, gracias a lo cual se lleva a la temperatura ambiente la temperatura de la leche enriquecida. La leche enriquecida se puede administrar al lactante como una alimentación de bolo o a través de una bomba de infusión con jeringuilla para alimentación continua. Cuando se utilice una bomba de infusión, la punta de la jeringuilla deberá estar vertical para permitir la infusión continua de la grasa y se unirá directamente la jeringuilla al tubo de alimentación para reducir la posible área superficial que se puede formar por adhesión de los componentes de grasa e inmunológicos.

La divulgación proporciona una leche humana y una composición enriquecedora que no es xenogénica y proporciona proteínas humanas que promueven el desarrollo inmunológico y el crecimiento del lactante de forma probada. Asimismo, la leche humana y las composiciones enriquecedoras de la divulgación se toleran bien y consiguen el máximo potencial de los beneficios para la salud de la leche humana al mismo tiempo que atienden a la variabilidad de la leche humana como fuente de energía, proteínas, calcio, fósforo, sodio y otros micronutrientes.

Normalmente, se emplean envases de un tamaño de dosis unitaria individual en lugar de envases a granel. Dado el pequeño volumen de leche que se administra a los lactantes prematuros en el transcurso de la alimentación diaria, se preparan pequeños volúmenes de leche humana enriquecida. En el entorno hospitalario, resulta siempre problemática la esterilización del recipiente a granel que ha de ser abierto, repartido y almacenado de forma repetida. Las dosis unitarias individuales permiten añadir pequeñas cantidades de enriquecedor a la leche humana esquivando una posible contaminación del enriquecedor restante.

Existen numerosos tipos de envases fácilmente aseptables y conocidos entre los técnicos en la especialidad. Entre los ejemplos de tipos de envases útiles en los métodos y composiciones de la divulgación se incluyen frascos, jeringuillas y botes (p.ej. de metal, de vidrio o de plástico).

Tal como se ha señalado, la presente divulgación se refiere también a un método para satisfacer la nutrición a lactantes prematuros mediante la adición de un enriquecedor de la divulgación a la leche humana para ajustar el contenido nutricional de la leche humana sin procesar deseado y la administración de la leche humana enriquecida al lactante prematuro. La divulgación proporciona además un método para promover el crecimiento de un lactante prematuro a través de la administración de leche humana enriquecida a dicho lactante prematuro.

La leche obtenida de seres humanos o de origen bovino puede procesarse aplicando los métodos de la divulgación. En un aspecto, la leche comprende leche calostroal. Normalmente, se puede diluir la leche calostroal según sea apropiado en agua estéril (p.ej. 1:1 con agua).

La leche obtenida a través del proceso de la divulgación es sustancialmente idéntica a la leche sin procesar que, sin embargo, comprende una reducida cantidad de biocarga o no contiene patógenos, tales como *B. cerus*. El producto de leche estéril resultante comprende actividades biológicas (p.ej. comprende proteínas y composiciones de anticuerpo) pero está desprovista de las bacterias, los hongos y las esporas que se encuentran en la leche sin procesar.

La porción de leche desnatada obtenida está desprovista de bacterias, hongos y esporas. La porción desnatada filtrada se almacena a continuación por separado o se vuelve a combinar con la porción de grasa tras la filtración. Cuando se almacena la porción desnatada por separado, es posible volverla a combinar más adelante con la porción grasa antes de consumirla. Alternativamente, se puede consumir la porción desnatada. Se puede almacenar la porción desnatada y/o leche recombinada durante períodos de tiempo prolongados, preferentemente, por debajo de la temperatura ambiente y, más preferentemente, a 4 °C.

Los ejemplos que se exponen a continuación sirven para ilustrar mejor la divulgación, pero no son exhaustivos.

Ejemplos

El procesamiento de la leche se realiza en una sala limpia Clase 100.000 y el rellenado, en una sala limpia Clase 10.000. Se agrupa la leche de las donantes y se toma una muestra para determinar los factores de riesgo (p.ej. se realiza PCR para detectar contaminación e infección VIH, VHB, VHC). Se filtra la leche de las donantes a través de un tamiz de 200 micrómetros para eliminar los grumos y la materia en partículas grandes.

A continuación, se trata térmicamente la leche entera filtrada durante 30 minutos a aproximadamente 63 °C o se trata a aproximadamente 73 °C durante 16 segundos (p.ej., HTST). Dicho tratamiento térmico es para reducir la biocarga, así como para preparar la leche para su separación. Se separa la leche filtrada y calentada en una porción desnatada y grasa (crema). El análisis de la porción desnatada y la crema tras la separación comprende: (a) porción desnatada - aproximadamente 0,69 % grasa, aproximadamente 1,07 % proteína, aproximadamente 7,14 % lactosa; y (b) crema - aproximadamente 46 % grasa, aproximadamente 2 % proteína, aproximadamente 10 % Lactosa.

Se extrae aproximadamente 50 % de la crema y se hace pasar una segunda vez por el separador. Este proceso produce más leche desnatada con un incremento del rendimiento de proteína. El producto que sale del lado contrario al de la porción desnatada del separador es mantequilla, que se puede retener y volver a utilizar para otros procesos.

Se añade una porción de crema o grasa a la porción desnatada para ajustar el contenido de la porción desnatada para una mejor ultrafiltración. Por ejemplo, la grasa en la porción desnatada debe ser entre aproximadamente 55 % y aproximadamente 65 % del contenido de proteína. Uno de los fines de la etapa de ultrafiltración es eliminar el exceso de agua y concentrar la proteína. El filtro utilizado en la ultrafiltración tiene un límite de aproximadamente 40 kDa. Se hace referencia al agua como fracción permeada. El análisis de la porción desnatada recogida tras la ultrafiltración es aproximadamente 8 % proteína. Se puede realizar un post-lavado o filtrado utilizando la fracción permeada para recuperar las proteínas que pudieran haber quedado retenidas en los filtros durante el proceso de ultrafiltración. El post lavado se añade a la leche desnatada concentrada para proporcionar un contenido de proteínas de aproximadamente 7,2 %.

Se añade crema a la leche desnatada concentrada tras el post lavado para aumentar las calorías correctas según objetivos. En este punto, el producto tiene aproximadamente 9,2 % grasa, aproximadamente 6,3 % proteína y aproximadamente 10,5 % lactosa. Se envía una muestra del volumen final para el análisis mineral, que sirve para medir los minerales en el volumen. Se congela el volumen final a -20 °C o una temperatura más fría. Una vez que llegan los resultados de los minerales del laboratorio, se descongela el volumen final. Sobre la base del contenido de minerales de partida del volumen final, se calcula la cantidad de los minerales adicionales que se tuvieran que añadir, si es necesario. El objetivo final es aproximadamente: (a) calcio - 471,6 mg/dl; fósforo - 225,2 mg/dl; sodio - 75 mg/dl; potasio - 208,1 mg/dl; magnesio - 24,4 mg/dl; cloruro - 69,1 mg/dl; zinc - 3,1 mg/dl; cobre - 0,1 mg/dl; y

manganeso - 9,2 microgramos/l para productos a granel con un bajo contenido calórico (p.ej., Prolact™+4, también conocido como Plus 4, o Prolact™+6, también conocido como Plus 6); (b) calcio – 235,8 % mg/dl; fósforo - 112,6 mg/dl; sodio - 37,5 mg/dl; potasio - 104 mg/dl; magnesio - 12,2 mg/dl; cloruro - 34,6 mg/dl; zinc - 1,6 mg/dl; cobre – 0,05 mg/dl; and manganeso - 4,6 microgramos/dl para Prolact™+8, también conocido como Plus 8 y Prolact™+10, también conocido como Plus 10. Se calienta el volumen final a 50 °C y se mezclan lo minerales con el volumen final.

Una vez mezclados os minerales, se pasteuriza el producto en un tanque. El tanque está enchaquetado y se utiliza glicol caliente para calentarlo (la temperatura de producto es aproximadamente 67 °C, la temperatura del aire por encima del producto es aproximadamente 70 °C) y el producto se pasteuriza durante 30 minutos. Se baja la temperatura del producto a aproximadamente 5 °C utilizando glicol frío en el tanque enchaquetado. A continuación, se puede distribuir el producto en partes alicuotas en recipientes recargables, según sea necesario. Por ejemplo, los tamaños de carga incluyen: Prolact™+4 10 ml; Prolact™+4 20 ml; Prolact™+6 15 ml; Prolact™+6 30 ml; Prolact™+8 20 ml; Prolact™+8 40 ml; Prolact™+10 25 ml; and Prolact™+10 50 ml. Una vez realizado el rellenado, se puede tomar al azar algunos frascos para analizar el valor nutricional y la biocarga. Se pueden analizar los siguientes patógenos en cuanto al recuento aeróbico total - <10 UFC/ml; *Bacillus cereus* - 1 UFC/ml; *E. coli* - 1 UFC/ml; coliforme - 1 UFC/ml; *Pseudomonas* - 1 UFC/ml; *Salmonella* - 1 UFC/ml; *Staphylococcus* - 1 UFC/ml; levadura - 1 UFC/ml; moho - 1 UFC/ml. El producto generado a través de los métodos descritos puede incluir el siguiente contenido: Para (a) Prolact+4 y Prolact+6 (i) El total de calorías es de aproximadamente 1,35 Cal/ml a aproximadamente 1,55 Cal/ml; (ii) la proteína es de aproximadamente 5,5 g/dl a aproximadamente 6,5 g/dl; (iii) la grasa es de aproximadamente 8,5 g/dl a aproximadamente 9,5 g/dl; (iv) el calcio es aproximadamente 417,6 mg/dl; (v) el cloruro es aproximadamente 69,1 mg/dl; (vi) el cobre es aproximadamente 0,1 mg/dl (vii) el magnesio es aproximadamente 24,4 mg/dl; (viii) el manganeso es aproximadamente 9,2 microgramos/dl; (ix) el fósforo es aproximadamente 225,2 mg/dl; (x) el potasio es aproximadamente 208,1 mg/dl; (xi) el sodio es aproximadamente 75 mg/dl; y (xii) el zinc es aproximadamente 3,1 mg/dl; (b) Prolact+8 y Prolact+10 (i) El total de calorías es de aproximadamente 1,35 Cal/ml a aproximadamente 1,55 Cal/ml; (ii) la proteína es de aproximadamente 5,5 g/dl a aproximadamente 6,5 g/dl; (iii) la grasa es de aproximadamente 8,5 g/dl a aproximadamente 9,5 g/dl; (iv) el calcio es aproximadamente 208,8 mg/dl; (v) el cloruro es aproximadamente 34,6 mg/dl; (vi) el cobre es aproximadamente 0,05 mg/dl; (vii) el magnesio es aproximadamente 12,2 mg/dl; (viii) el manganeso es aproximadamente 4,6 microgramos/dl; (ix) el fósforo es aproximadamente 112,6 mg/dl; (x) el potasio es aproximadamente 104,1 mg/dl; (xi) el sodio es aproximadamente 37,5 mg/dl; y (xii) el zinc es aproximadamente 1,6 mg/dl.

REIVINDICACIONES

1. Un método para la obtención de una composición de leche humana que comprende:
 - (a) filtración de leche entera agrupada a través de un filtro de 100-400 micrómetros;
 - (b) tratamiento térmico de la leche entera a 58-65 °C durante 20-40 minutos;
 - (c) separación de la leche entera en una porción desnatada y una porción de grasa;
 - (d) ultrafiltración de la porción desnatada a través de uno o más ultrafiltros para obtener una porción permeada y una fracción retenida desnatada rica en proteínas;
 - (e) mezclado de una fracción de la porción de grasa con la fracción retenida desnatada rica en proteínas para obtener una composición de leche humana.
2. El método de la reivindicación 1, que comprende además el análisis de una muestra de la leche entera para determinar la presencia de VIH1, VIH2, VHB, VHC, HTLV1, HTLV2, sífilis y *B. cereus* antes de la filtración.
3. El método de la reivindicación 1, en el que el filtrado de la leche entera en la etapa (a) se realiza a través de un tamiz de filtro de 200 micrómetros.
4. El método de la reivindicación 1, en el que el tratamiento térmico de la leche entera en la etapa (b) se realiza a 63 °C durante 30 minutos.
5. El método de la reivindicación 1 en el que la porción de grasa obtenida en la etapa (c) se sigue procesando para obtener una porción de leche desnatada adicional.
6. El método de la reivindicación 5, en el que la porción desnatada adicional se agrupa con la porción desnatada obtenida en la etapa (c).
7. El método de la reivindicación 1, que comprende además recoger y filtrar la fracción permeada obtenida en la etapa (d) para obtener una segunda fracción retenida.
8. El método de la reivindicación 7 en el que la segunda fracción retenida se añade a la primera fracción retenida obtenida en la etapa (d) de la reivindicación 1.
9. El método de la reivindicación 1 en el que la ultrafiltración utiliza una membrana de ultrafiltración que impide el paso de cualquier sustancia con un peso molecular superior a 1-40 kDa.
10. El método de las reivindicaciones 1 o 7 que comprende además el lavado de los ultrafiltros con la fracción permeada obtenida en la etapa (d) de la reivindicación 1 para obtener un lavado de proteína y la adición del lavado de proteína a la fracción retenida desnatada rica en proteína obtenida en la etapa (d).
11. El método de la reivindicación 1 en el que tras la pasteurización, se analiza la leche pasteurizada para determinar el contenido nutricional, el contenido de proteínas, los factores específicos y se ajusta a un nivel deseado.
12. El método de la reivindicación 1, en el que se pasteuriza la composición de leche humana obtenida en la etapa (e).
13. Una composición de leche humana obtenida según el método de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores que comprende:
 - (a) un constituyente de proteína de 20-70 mg/ml;
 - (b) un constituyente de grasa de 35-85 mg/ml,
 - (c) un constituyente de hidratos de carbono de 70-115 mg/ml.

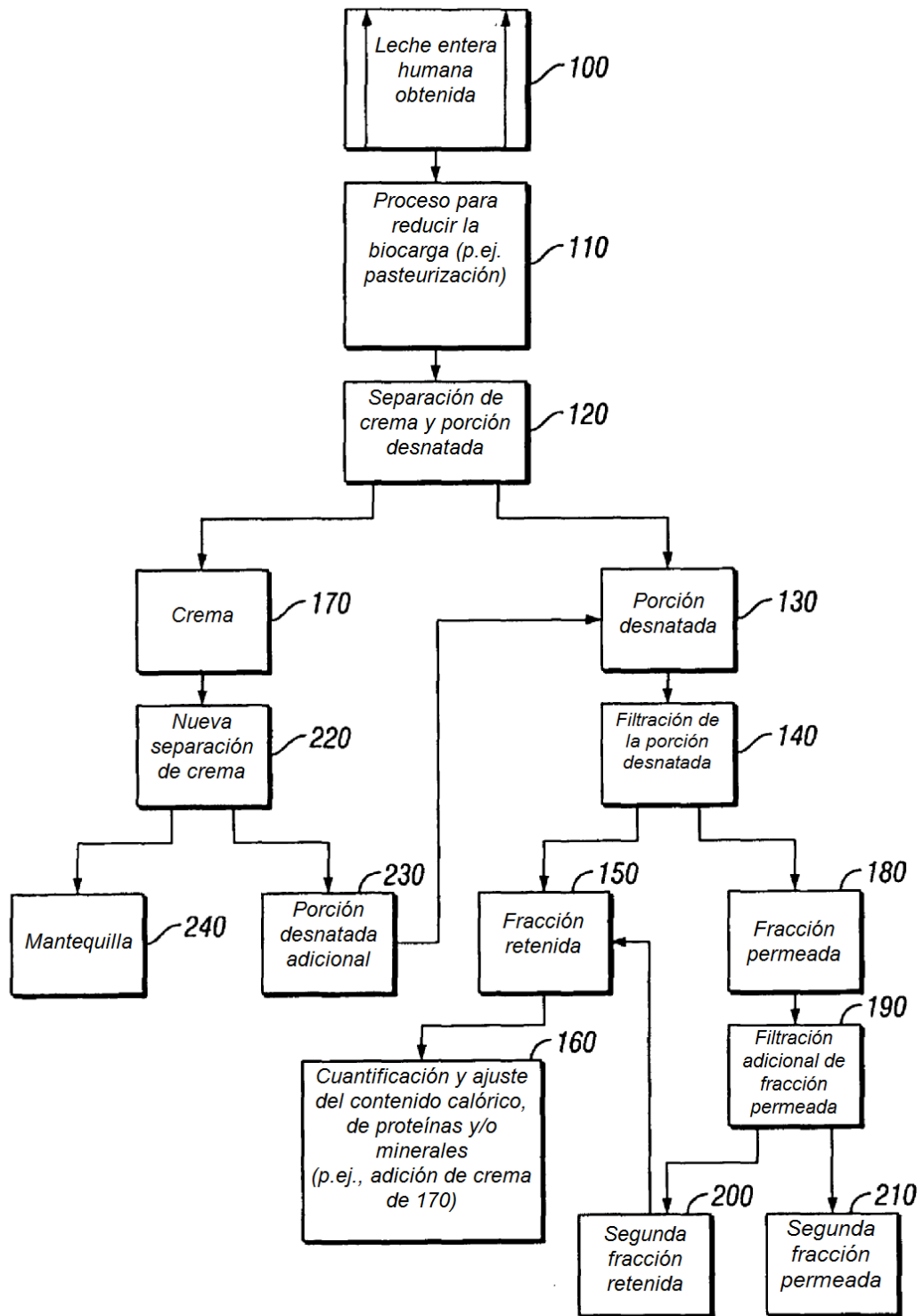


FIG. 1