

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 015 561**

51 Int. Cl.:

A23C 9/158 (2006.01)

A23C 9/152 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2014** **E 20216091 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.01.2025** **EP 3821713**

54 Título: **Productos de leche humana ricos en grasas**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361779781 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
06.05.2025

73 Titular/es:

PROLACTA BIOSCIENCE, INC. (100.00%)
757 Baldwin Park Blvd.
City of Industry, CA 91746, US

72 Inventor/es:

ELSTER, SCOTT;
FOURNELL, JOE y
EAKER, SCOTT

74 Agente/Representante:

BUENO FERRÁN, Ana María

ES 3 015 561 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

Productos de leche humana ricos en grasas

5 Campo de la invención

La presente descripción se refiere generalmente a productos de leche humana ricos en grasas, tales como composiciones de nata materna estandarizadas, a métodos para producir las composiciones y al uso de las composiciones.

10

Antecedentes de la invención

La leche materna humana se considera la nutrición preferida para los lactantes, que incluye aquellos de la unidad de cuidados intensivos neonatales (UCIN) (Academia Estadounidense de Pediatría, Sección sobre Lactancia Materna. Breastfeeding and the Use of Human Milk. Pediatrics, 115:496-506, 2005). Típicamente, la leche humana que se usa en la UCIN es de la propia madre del bebé, pero también puede provenir de una donante. En el caso de los lactantes de muy bajo peso al nacer (MBPN), la leche se suplementa a menudo con un fortificante de leche humana con el fin de proporcionar la nutrición adicional que estos bebés necesitan.

15

20

Si bien rara vez se analiza el contenido nutricional de leche humana, generalmente se ha asumido que la leche humana contiene aproximadamente 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/oz). Sin embargo, Wojcik y otros (JAm Diet Assoc, 109:137-140, 2009) mostró que a menudo este no es el caso con el 25 % de las muestras de una encuesta de 415 muestras de donación de leche materna humana que tienen por debajo de 58,5 kcal/100 ml (17,3 kcal/oz) y el 65 % de las muestras que tienen por debajo de 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/oz). Como resultado, el contenido de energía y nutrientes que se espera no se alcanza en un porcentaje significativo del tiempo. El resultado neto es que el lactante no obtiene el patrón de crecimiento que se desea, particularmente con respecto al peso. Las soluciones actuales a este problema incluyen la alimentación intravenosa de los lactantes a través del proceso de nutrición parenteral total (NPT). Si bien la NPT es efectiva al suministrar el nivel de nutrición que se requiere a los lactantes de MBPN, también se asocia con muchos efectos secundarios negativos que incluyen, por ejemplo, daño hepático.

25

30

Por tanto, se necesita una solución para resolver el problema de la producción de leche humana baja en calorías que evite los efectos secundarios perjudiciales que no se desean de la TPN. La invención actual resuelve el problema mediante la proporción de un producto de leche humana pasteurizada, rica en grasas que se puede administrar por vía enteral y aumentar el contenido calórico de leche humana mientras que no aumenta sustancialmente el volumen general con que se alimenta al lactante.

35

La WO2008/073888 A2 describe composiciones que comprenden lípidos humanos y métodos para producirlas. La US2008/124430 A1 describe una leche humana fortalecida y lista para formulaciones de alimentación humana que comprende al menos grasa, proteínas y carbohidratos.

40

Resumen de la invención

La invención es como se define reivindica en las reivindicaciones 1- 12.

45

Esta descripción facilita productos de leche humana ricos en grasas, por ejemplo composiciones de nata humana, así como también métodos de elaboración y uso de productos de leche humana rica en grasa.

50

En un aspecto, la descripción proporciona una composición de nata de leche humana que comprende nata pasteurizada derivada de leche humana, donde la composición comprende 2,0 – 3,0 kcal/ml y un 18 - 30% de grasa de leche humana tal como se define en la reivindicación 1. En otra realización, la composición comprende aproximadamente un 25% de grasa. En otra realización, la composición de nata humana comprende además un permeado de leche humana desnatada. En otra realización adicional, la composición de nata humana comprende además agua desionizada.

55

La composición se usa para la nutrición enteral. En una realización particular, la nutrición enteral es para un lactante de bajo peso al nacer.

60

En otro aspecto, la descripción proporciona un método de elaboración de una composición de nata de leche humana que comprende las etapas de: obtener una mezcla de leche humana, separar la mezcla de leche humana en una porción de nata y una porción de leche desnatada, formular la porción de nata para obtener una composición de nata que comprende 2,0 – 3,0 kcal/ml y un 19 - 20% de grasa de leche humana y pasteurizar la composición de nata tal como se define en la reivindicación 5. En una realización, la etapa de separación es por ultracentrifugación.

65

En una realización, el método de elaboración de una composición de nata de leche humana comprende además la ultrafiltración del agua de la porción de leche desnatada, obteniendo así un permeado de leche humana desnatada.

Aquí se describe que la etapa de formulación comprende añadir un volumen del permeado de leche humana desnatada a la porción de nata. Aquí se describe que la etapa de formulación comprende añadir un volumen de agua desionizada a la porción de nata.

5 En otra realización adicional, el método de elaboración de una composición de nata de leche humana comprende además una etapa para testar la mezcla de leche humana en busca de adulterantes, contaminantes, drogas y/o patógenos. En una realización, la etapa de testar comprende el uso de un panel de microorganismos. En otra realización, la etapa de testar comprende un análisis PCR para VIH, VHB y VHC. En una
10 realización, la etapa de testar detecta proteína bovina. En otra realización adicional, la etapa de testar comprende la prueba de una o más drogas. En una realización relacionada, las uno o más drogas se seleccionan de anfetaminas, benzodiazepinas, cocaína, metanfetaminas, opiáceos, opioides sintéticos (por ejemplo, oxicodona/oximorfona), THC y los principales metabolitos de los mismos.

15 En una realización del método, la mezcla de leche humana es de una o más donantes.

En otro aspecto, la descripción proporciona el uso de aumentar el contenido calórico de leche humana a un nivel de contenido calórico. El uso puede comprender las etapas de: obtener una muestra de leche humana, medir el contenido calórico de la leche humana, determinar el volumen de una composición de nata de leche humana necesaria para elevar el contenido calórico de la leche humana al nivel de contenido calórico que se desea y añadir el volumen de la
20 composición de nata de leche humana al contenedor de leche humana. En una realización, el contenido calórico que se desea es 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/oz).

En una realización del método para aumentar el contenido calórico de leche humana, la composición de nata de leche humana comprende aproximadamente 2,5 kcal/ml. En una realización relacionada, la composición de nata de leche humana comprende aproximadamente un 25% de grasa.
25

El uso de la leche humana es para nutrición enteral. En una realización relacionada, la nutrición enteral es para un lactante de bajo peso al nacer.

30 Descripción detallada de la invención

Las composiciones y métodos aquí presentados se refieren a productos de nata de leche humana. El fundamento detrás de la suplementación con leche humana (por ejemplo, de la madre o de la donante) se deriva del hallazgo de que la leche de madres que tienen un parto significativamente prematuro no tiene el contenido nutricional adecuado para satisfacer por completo la creciente necesidad metabólica y de crecimiento de sus lactantes en comparación con un lactante a término (Hawthorne y otros, *Minerva Pediatr*, 56:359-372, 2004; Lawrence y Lawrence, *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*, 6ta edición. Filadelfia: Elsevier Mosby, 2005; y Ziegler, *Human Milk for the Preterm Infant*, Congreso Internacional de la Asociación de Bancos de Leche Humana de América del Norte. Alexandria, VA, 2005).
35

Curiosamente, la denominada "leche pretérmino" puede contener niveles más altos de proteína que la leche de una madre que tiene un parto a término (Hawthorne y otros, *Minerva Pediatr*, 56:359-372, 2004; Lawrence y Lawrence, *Breastfeeding: A Guide for the Medical Profession*, 6ª edición. Filadelfia: Elsevier Mosby, 2005; y Ziegler, *Human Milk for the Preterm Infant*, Congreso Internacional de la Asociación de Bancos de Leche Humana de América del Norte. Alexandria, VA, 2005). Sin embargo, estos niveles siguen siendo inadecuados para asegurar niveles iniciales apropiados de crecimiento y desarrollo y además, particularmente en lactantes de un tamaño destinado a no sobrevivir en los días anteriores a los cuidados intensivos neonatales. También se da el caso de que estos niveles de nutrición elevados tienen una vida relativamente corta, y la "leche pretérmino" se vuelve rápidamente indistinguible de la leche a término. Por tanto, es fundamental que el contenido nutricional de la alimentación diaria de estos lactantes alcance niveles aceptables de componentes clave tales como calorías y proteínas.
40
45
50

Sin embargo, el contenido calórico de leche humana que se suministra a los lactantes rara vez se mide. Como se demuestra por el estudio realizado por Wocjik y otros (*J Am Diet Assoc*, 109:137-140, 2009), es probable que la leche humana que se suministra a los lactantes de BPN y MBPN a menudo no proporcione una cantidad suficiente de calorías para alcanzar las necesidades nutricionales de un lactante pretérmino. Las composiciones de leche humana rica en grasas que se describen en la presente descripción proporcionan una solución a este problema y se pueden usar, por ejemplo, para suplementar la leche humana con el fin de aumentar el contenido calórico al nivel que se desea sin aumentar el volumen con que se debe alimentar el lactante, por ejemplo, un lactante de BPN. Esto es particularmente útil cuando todo lo que se necesita es aumentar la ingesta calórica y no aumentar el contenido de proteínas. Las composiciones de la invención actual resuelven este problema mediante el aumento de las calorías sin aumentar las proteínas y, por lo tanto, proporcionan una solución de costo más efectivo al problema.
55
60

La nutrición parenteral total (NPT), un proceso para proporcionar nutrición por vía intravenosa y evitar el tracto gastrointestinal, a menudo se usa para alimentar a los lactantes de BPN. Sin embargo, la NPT se asocia con varias complicaciones potenciales que incluyen, por ejemplo, hiperglucemia, hipoglucemia, lipogénesis, complicaciones
65

hepáticas (por ejemplo, hígado graso y colestasis), sepsis, y coágulos de sangre. En particular, los altos requisitos de grasas y proteínas del lactante de BPN tienden a resultar en una disfunción hepática cuando la nutrición se recibe por vía parenteral. En consecuencia, es conveniente proporcionar a un lactante nutrición enteral tan pronto como sea posible en lugar de NPT, con el fin de evitar los efectos negativos que se asocian con la NPT. Las composiciones de leche humana rica en grasas que se describen en la presente descripción se pueden usar para aumentar el contenido calórico y el contenido de grasa de leche humana, que proporciona de esta manera medios para el suministro enteral de grasa de leche humana. Mantener una dieta que se basa completamente en la leche humana reduce la incidencia de complicaciones tales como la enterocolitis necrotizante y, por lo tanto, se contempla que se puedan usar alimentos enterales de leche humana que se suplementan con productos de leche humana rica en grasas en lugar de NTP.

Los términos lactantes "prematuros", "pretérmino" y "de bajo peso al nacer (BPN)" se usan indistintamente y se refieren a lactantes que nacen con menos de 37 semanas de edad gestacional y/o con un peso al nacer menor de 2500 g. En particular, el término lactante de "muy bajo peso al nacer (MBPN)" se refiere a un lactante con un peso al nacer de 1250 g o menos. En consecuencia, el término "lactantes de BPN" incluye lactantes de MBPN.

El término "leche entera" se refiere a la leche humana de la que no se ha eliminado la grasa.

Por "carga biológica" se entiende contaminantes microbiológicos y patógenos (generalmente vivos) que se pueden presentar en la leche, por ejemplo, virus, bacterias, moho, hongos y similares.

Todas las patentes, solicitudes de patente y referencias aquí citadas se incorporan en su totalidad por referencia. A menos que se defina de cualquier otra manera, los términos técnicos y científicos que se usan aquí tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica.

Composiciones de nata humana

Las composiciones de leche humana rica en grasas, o las composiciones de nata humana, que se describen aquí se producen a partir de leche humana entera. De acuerdo con la invención, las composiciones de nata humana comprenden 2,0 kcal/ml a 3,0 kcal/ml. En una realización preferente, la composición de nata humana tiene aproximadamente un 25% de grasa.

Se contempla que las composiciones de nata humana aquí descritas puedan comprender uno o más componentes adicionales con el fin de tener el contenido calórico que se desea y/o el porcentaje de grasa que se desea. En consecuencia, en una realización, la composición de nata humana comprende un permeado de leche humana desnatada añadido. El permeado de leche desnatada ("permeado") es el líquido que se produce por la ultrafiltración de leche humana desnatada que tradicionalmente se consideraba un producto de desecho en la fabricación de fortificantes de leche humana. En otra realización, la composición de nata humana comprende agua desionizada (DI) además de leche humana rica en grasas.

Generalmente, la composición de nata humana se congela para su almacenamiento y/o envío y se descongela antes de su uso.

Métodos para elaborar composiciones de nata humana

Las composiciones de nata humana aquí descritas se producen a partir de leche humana entera. La leche humana puede ser de la propia madre de un lactante o de una o más donantes. La leche humana se mezcla para proporcionar una mezcla de leche humana. Por ejemplo, una mezcla de leche humana comprende leche de dos o más (por ejemplo, diez o más) donantes. Como otro ejemplo, una mezcla de leche humana comprende dos o más donaciones de una donante.

Obtener leche de la donante

Generalmente, la leche humana se proporciona por donantes y las donantes se criban previamente y se aprueban antes de procesar cualquier leche. Se usan varias técnicas para identificar y calificar las donantes adecuadas. Una donante potencial debe obtener una autorización de su médico y del pediatra de su niño como parte del proceso de aprobación. Esto ayuda a asegurar, entre otras cosas, que la donante no tiene una enfermedad crónica y que su hijo no sufrirá como resultado de la donación(es). Los métodos y sistemas para calificar y monitorear la recolección y distribución de leche se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de Estados Unidos Número 12/728,811 (documento U.S. 2010/0268658). Las donantes pueden ser o no compensadas por su donación.

Usualmente, el cribado de donantes incluye un cuestionario integral de estilo de vida e historial médico que incluye una evaluación de medicamentos que se recetan y que no se recetan, pruebas de drogas de abuso, y pruebas de determinados patógenos. La donante se puede cribar, por ejemplo, para el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1), VIH-2, virus linfotrópico T humano tipo 1 (HTLV-I), HTLV-II, virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), y sífilis.

Las donantes se pueden recalificar periódicamente. Por ejemplo, se requiere que una donante se someta a un cribado por el protocolo que se usa en su calificación inicial cada cuatro meses, si la donante desea continuar donando. Una donante que no recalifica o falla en la calificación se aplaza hasta el momento en que lo haga, o se aplaza permanentemente si lo justifican los resultados del cribado de recalificación. En el caso de esta última situación, toda la leche restante que se proporciona por esa donante se elimina del inventario y se destruye o se usa solo con fines de investigación.

Una donante puede donar en una instalación que se designa (por ejemplo, una oficina de un banco de leche) o, en una realización preferida, se extrae leche en casa. Si la donante va a extraer leche en casa, ella medirá la temperatura en su refrigerador, por ejemplo, con un termómetro que se suministra para confirmar que es lo suficientemente frío para almacenar leche humana con el fin de que se apruebe.

Prueba de identidad de la donante

Una vez que la donante se ha aprobado, la identificación de la donante se puede realizar en la leche humana que se dona debido a que la leche se puede extraer por una donante en su casa y no se recolecta en una instalación de un banco de leche. En una realización particular, se pueden tomar muestras de leche de cada donante en busca de marcadores genéticos, por ejemplo, marcadores de ADN, para garantizar que la leche sea verdaderamente de la donante que se aprueba. Tales técnicas de identificación de sujetos son conocidas en la técnica (ver, por ejemplo, la Solicitud Internacional con Número de serie PCT/US2006/36827). La leche se puede almacenar (por ejemplo, a -20 °C o más frío) y se pone en cuarentena hasta que se reciban los resultados de la prueba.

Por ejemplo, los métodos aquí descritos pueden incluir una etapa de obtener una muestra biológica de referencia de una donante potencial de leche materna humana. Tal muestra se puede obtener mediante métodos conocidos en la técnica tales como, pero que no se limitan a, una muestra de células con frotis de mejilla, o una muestra de sangre que se extrae, leche, saliva, raíces de cabello, u otro tejido conveniente. Las muestras de ácidos nucleicos de la donante de referencia (por ejemplo, ADN genómico) se pueden aislar de cualquier muestra biológica conveniente que incluye, pero no se limita a, leche, saliva, células bucales, raíces de cabello, sangre, y cualquier otra muestra de célula o tejido adecuada con núcleos de interfase intacta o células en metafase. La muestra se etiqueta con un número de referencia único. La muestra se puede analizar en el momento o cerca del momento de obtener la muestra en busca de uno o más marcadores que puedan identificar a la donante potencial. Los resultados del análisis se pueden almacenar, por ejemplo, en un medio legible por computadora. Alternativamente, o además, la muestra se puede almacenar y analizar para identificar marcadores en un momento posterior.

Se contempla que la muestra biológica de referencia puede ser ADN tipificado mediante métodos conocidos en la técnica tales como el análisis de STR de loci STR, el análisis de HLA de loci HLA o el análisis de genes múltiples de genes/alelos individuales. El perfil del ADN que se tipifica de la muestra de referencia se registra y se almacena, por ejemplo, en un medio legible por computadora.

Se contempla además que la muestra biológica de referencia se puede ensayar en busca de autoantígenos mediante el uso de anticuerpos conocidos en la técnica u otros métodos para determinar un perfil de autoantígeno. El perfil de antígeno (u otro péptido) se puede registrar y almacenar, por ejemplo, en un medio legible por computadora.

Se toma una muestra de prueba de leche humana para identificar uno o más marcadores de identidad. La muestra de leche humana que se dona se analiza para el mismo marcador o marcadores que la muestra de referencia de la donante. Se comparan los perfiles de marcadores de la muestra biológica de referencia y de leche que se dona. La coincidencia entre los marcadores (y la falta de cualquier marcador adicional no coincidente) indicaría que la leche que se dona proviene del mismo individuo que donó la muestra de referencia. La falta de una coincidencia (o la presencia de marcadores adicionales no coincidentes) indicaría que la leche que se dona proviene de una donante que no se prueba o se ha contaminado con fluido de una donante que no se prueba.

La muestra de leche humana que se dona y la muestra biológica de referencia que se dona se pueden ensayar en busca de más de un marcador. Por ejemplo, cada muestra se puede probar en busca de múltiples marcadores de ADN y/o marcadores de péptidos. Ambas muestras, sin embargo, se necesitan probar para detectar al menos algunos de los mismos marcadores con el fin de comparar los marcadores de cada muestra.

Por tanto, la muestra de referencia y la muestra de leche humana que se dona se pueden ensayar en busca de la presencia de diferentes perfiles de marcadores de identidad. Si no existen perfiles de marcadores de identidad distintos del perfil de marcadores de identidad del sujeto que se espera, generalmente indica que no existió fluido (por ejemplo, leche) de otros humanos o animales que contaminen la leche humana que se dona. Si existen señales distintas de la señal que se espera para ese sujeto, los resultados son indicativos de contaminación. Tal contaminación resultará en que la leche falle la prueba.

El testeado de la muestra de referencia y de la leche humana que se dona se puede llevar a cabo en la instalación de donación y/o en la instalación de procesamiento de leche. Los resultados de las pruebas de las muestras de

referencia se pueden almacenar y comparar frente a cualquier donación futura de la misma donante.

Cribado de contaminantes

5 Después, la leche se testea en busca de patógenos. La leche se puede cribar genéticamente, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para identificar, por ejemplo, virus, tales como VIH-1, VHB y VHC. También se puede usar un panel de microorganismos que criba varias especies bacterianas, hongos y mohos mediante el cultivo para detectar contaminantes. Por ejemplo, se puede ensayar un panel de microorganismos para e
10 recuento aeróbico, de Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella, Pseudomonas, coliformes, Staphylococcus aureus, levaduras y mohos. En particular, B. cereus es una bacteria patógena que no se puede eliminar mediante pasteurización. El cribado de patógenos se puede realizar tanto antes como después de la pasteurización.

Además de cribar en busca de patógenos, la leche de la donante también se puede ensayar en busca de drogas de abuso (por ejemplo, cocaína, opiáceos, opioides sintéticos (por ejemplo, oxicodona/oximorfona) metanfetaminas, benzodiazepinas, anfetaminas, y THC) y/o adulterantes tales como proteínas no humanas. Por ejemplo, un ELISA se
15 puede usar para testar la leche en busca de una proteína no humana, tal como proteínas bovinas, para asegurar, por ejemplo, que no se ha añadido a la leche humana leche de vaca o la fórmula infantil de leche de vaca, por ejemplo para aumentar el volumen de donaciones cuando las donantes son compensadas por las donaciones.

20 Procesamiento de la leche humana

Una vez que se ha cribado la leche humana, se procesa para producir un producto rico en grasas, por ejemplo una composición de nata humana. La instalación de donación y la instalación de procesamiento de leche pueden ser la
25 misma instalación o una diferente. El procesamiento de leche se puede llevar a cabo con grandes volúmenes de leche humana, por ejemplo de aproximadamente 75 litros/lote a aproximadamente 2.000 litros/lote de material de partida.

Los métodos para obtener composiciones que incluyen lípidos de leche humana para proporcionar nutrición a los pacientes se describen en la solicitud PCT PCT/US07/86973 que se presentó el 10 de diciembre de 2007 (documento
30 WO 2008/073888).

Después de analizar cuidadosamente la leche humana tanto con propósitos de identificación como para evitar la contaminación como se describe anteriormente, la leche se somete entonces a filtración, por ejemplo a través de un
35 filtro de aproximadamente 200 micrones, y tratamiento térmico. Por ejemplo, la composición se puede tratar a aproximadamente 63 °C o más durante aproximadamente 30 minutos o más. A continuación, la leche se transfiere a un separador, por ejemplo una centrífuga, para separar la nata (es decir, la porción de grasa) de la desnatada. El desnatado se puede transferir a un segundo tanque de procesamiento donde permanece de aproximadamente 2 a 8 °C hasta una etapa de filtración. Opcionalmente, la nata que se separa del desnatado se puede volver a someter a separación para eliminar más desnatado.

40 Seguido de la separación de la nata y el desnatado, la porción desnatada se somete a una filtración adicional, por ejemplo ultrafiltración. Este proceso concentra los nutrientes en la leche desnatada mediante la filtración del agua. El agua que se obtiene durante la concentración se denomina como permeada. La porción desnatada resultante se puede procesar adicionalmente para producir fortificantes de leche humana y/o formulaciones de leche humana estandarizadas.

45 Procesamientos de leche humana para obtener 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 de leche humana y contienen varias concentraciones de componentes nutricionales) y composiciones de fortificantes se describen en la Solicitud de Patente de los Estados Unidos con Número de serie 11/947,580, presentó
50 el 29 de noviembre de 2007, (documento U.S. 2008/0124430). Estos fortificantes se pueden añadir a la leche de una madre lactante para potenciar el contenido nutricional de la leche, por ejemplo, para un lactante pretérmino.

Los métodos para obtener formulaciones de leche humana estandarizadas (que se ejemplifican por PROLACT20™, NEO20™ y/o PROLACT24) y las formulaciones en sí mismas también se discuten en la Solicitud de Patente de los
55 Estados Unidos con Número de serie 11/947,580, presentó el 29 de noviembre de 2007, (documento U.S. 2008/0124430). Estas formulaciones de leche humana estandarizadas se pueden usar para alimentar, por ejemplo, lactantes pretérmino. Proporcionan una formulación nutricional que se deriva de humanos y pueden sustituir a la leche de la madre.

60 Formulación de composiciones de nata humana

Una vez que la porción de nata se ha separado de la porción desnatada, se mide el contenido calórico de la porción de nata. En una realización preferida, si el contenido calórico o el porcentaje de grasa de la porción de nata está por encima del nivel que se desea, se puede añadir un volumen del permeado de la ultrafiltración de la porción desnatada
65 a la porción de nata, proporcionando así una composición de nata humana formulada que tiene el contenido calórico

que se desea. Alternativamente, en otra realización preferida, se puede añadir agua desionizada a la porción de nata con el fin de proporcionar la composición de nata humana que se formula. El contenido calórico deseado de la composición de nata humana según la invención es de 2,0 a 3,0 kcal/ml. En una realización preferente, con tenido calórico deseado es de aproximadamente 2,5 kcal/ml. En otro ejemplo, el porcentaje de grasa de la composición de nata humana deseado es de aproximadamente un 20% a un 30% de lípidos. En ciertas realizaciones, el porcentaje de grasa deseado es del 25% de lípidos.

Envase y pasteurización

Después de añadir opcionalmente el permeada o agua desionizada a la nata, la composición de nata se somete a pasteurización. Por ejemplo, la composición se puede colocar en un tanque de proceso que se conecta al pasteurizador de alta temperatura de ciclo tiempo (HTST) mediante un tubo Silastic curado con platino. Después de la pasteurización, la composición de nata se puede recolectar en un segundo tanque de proceso y enfriar. Se pueden usar otros métodos de pasteurización conocidos en la técnica. Por ejemplo, en la pasteurización en cubeta, la composición de nata en el tanque se calienta a un mínimo de 63 °C y se mantiene a esa temperatura por un mínimo de treinta minutos. El aire por encima de la composición de nata se calienta con vapor a al menos tres grados Celsius por encima de la temperatura de la composición de nata. En una realización, la temperatura del producto es aproximadamente 66 °C o superior, la temperatura del aire por encima del producto es aproximadamente 69 °C o superior, y el producto se pasteuriza por aproximadamente 30 minutos o más. En otra realización, se realizan tanto la pasteurización HTST como en cubeta.

La composición de nata pasteurizada generalmente se procesa asépticamente. Después de enfriar de a aproximadamente 2 a 8 °C, el producto se carga en recipientes de los volúmenes que se desean y se toman varias muestras de la composición de nata para análisis nutricional y de carga biológica. El análisis nutricional asegura el contenido apropiado de calorías y grasas de la composición de nata. Para cada recipiente se genera una etiqueta que refleja el análisis nutricional. Las pruebas de análisis de carga biológica en busca de la presencia de contaminantes, por ejemplo, el conteo aeróbico total, *B. cereus*, *E. coli*, Coliforme, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, levadura y/o moho. Las pruebas de carga biológica pueden ser pruebas genéticas. El producto se empaqueta y se envía una vez que se completa el análisis y se obtienen los resultados que se desean.

La composición de nata humana resultante comprende de 2,0 a 3,0 kcal/ml. En una realización preferente, la composición de nata humana comprende aproximadamente 2,5 kcal/ml, Se contempla que la composición de nata resultante comprenda entre un 20 y un 30% de grasa. En una realización, la composición de nata humana tiene aproximadamente un 25% de grasa.

Uso de las composiciones de nata humana

Las composiciones de nata humana aquí descritas se pueden usar como nutrición suplementaria. En consecuencia, las composiciones de nata humana aquí descritas se pueden administrar vía enteral u oral (por ejemplo, alimentación con biberón). El uso de lípidos humanos para la nutrición parenteral, una práctica de alimentación intravenosa (por ejemplo, nutrición parenteral total), para un paciente que lo necesita se describe en la solicitud PCT PCT/US07/86973 que se presentó el 10 de diciembre de 2007 (documento WO 2008/073888).

Las composiciones de nata humana descritas son particularmente útiles para suplementar la leche humana para lactantes, especialmente lactantes de BPN, con el fin de elevar el contenido calórico de leche humana a un nivel que se desea. La leche humana a menudo se administra por vía enteral a los lactantes pretérmino en la UCIN. La nutrición enteral es una práctica de alimentación por sonda, por ejemplo nasogástrica, transpilórica, y percutánea. La leche humana (por ejemplo, de la madre o de la donante) a menudo no alcanza los requisitos calóricos de un lactante de BPN (Wocjik y otros JAm Diet Assoc, 109:137-140, 2009). Por lo tanto, en una realización, la composición de nata humana de esta invención se puede añadir a la leche humana, aumentando así el contenido calórico a la vez que también mantiene la dieta de leche enteramente humana del lactante y evita complicaciones asociadas con la NPT. En una realización, la nutrición enteral que comprende la composición de nata humana es para un lactante pretérmino o de BPN.

En un aspecto, se proporciona el uso de la composición reivindicada para aumentar el contenido calórico de leche humana a un nivel de contenido calórico que se desea. La composición empleada es la composición de la reivindicación 1 y puede obtenerse mediante un método que comprende las etapas de obtener una muestra de leche humana (por ejemplo, de la propia madre o de la donante o de una mezcla de leche que se deriva de la madre y/o de las donantes), medir el contenido calórico de leche humana, determinar el volumen de la composición de una nata de leche humana necesario para elevar el contenido calórico de leche humana al nivel de contenido calórico que se desea y añadir el volumen de la composición de nata de leche humana al contenedor de leche humana. Por ejemplo, el contenido calórico que se desea es 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/oz) o más. En otra realización, el objetivo de calorías deseado es 81,2 kcal/100 ml (24 kcal/oz) o más. En otra realización, el objetivo de calorías deseado es 87,9 kcal/100 ml (26 kcal/oz) o más. La composición de nata de leche humana usada para aumentar el contenido calórico de leche humana comprende por ejemplo, aproximadamente 2,5 kcal/ml y/o aproximadamente un 25% de grasa.

En algunos casos, puede ser conveniente reducir la cantidad de leche humana a la que se añade la composición de nata humana con el fin de mantener el mismo volumen total que se administra o se alimenta al lactante. Por ejemplo, se puede eliminar un volumen igual de leche humana antes de la adición de la composición de nata.

5 **Ejemplo**

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar la descripción.

10 Ejemplo 1 Producto de nata de leche humana estandarizado

15 Con el fin de proporcionar un suplemento nutricional que pueda añadir las cantidades que se desean de calorías a la leche de la propia madre o de la donante sin añadir una cantidad significativa de volumen, se produjo una composición de nata humana que puede suministrarse vía enteral, evitando así los efectos negativos que se asocian con la NPT. La leche humana de donantes que se cribaron previamente y se aprobaron se mezcló para generar una mezcla de busca de patógenos específicos y proteínas bovinas. Específicamente, se usó la prueba de PCR para cribar la presencia de VIH-1, VHB, y VHC en la leche. También se realizó un panel microbiológico que prueba, por ejemplo, el recuento aeróbico, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella, Pseudomonas, coliformes, Staphylococcus aureus, levadura y moho.

20 La mezcla de leche de donantes se ultracentrifugó para generar una porción de nata y una porción de leche desnatada. La porción de nata se formuló después para alcanzar las especificaciones específicas de grasas y calorías mediante la adición de una cantidad de agua ultrafiltrada de la porción desnatada, el permeado de ultrafiltración de leche humana desnatada. Específicamente, la porción de nata se estandarizó al 25% de lípidos y contenía aproximadamente 2,5 kcal/ml.

25 La composición de nata estandarizada se pasteurizó después siguiendo las pautas que se establecen por la Ordenanza de Leche Pasteurizada de la FDA. Después de la pasteurización, la composición de nata estandarizada se cargó en biberones de polietileno de alta densidad y se congelaron. Los biberones se pesaron para asegurar la carga del volumen deseado en el biberón. La composición de nata del biberón se puso después en cuarentena hasta que se revisaron todos los datos del panel microbiológico y se realizó un análisis nutricional completo.

30 La composición de nata del biberón se etiquetó con una fecha de caducidad específica de lote y un número de lote del producto. El producto de nata se envió después congelado al destino, por ejemplo, un hospital, en una nevera aislada empaquetada con hielo seco.

35 Ejemplo 2

40 Administración enteral de productos de nata de leche humana a lactantes de MBPN

45 Con el fin de evaluar el efecto a corto plazo del uso de una composición de nata humana, Prolact CR™, para suplementar la leche humana de bajo contenido calórico para neonatos de muy bajo peso al nacer (MBPN), leche humana comprendiendo menos de 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/ oz) se suplementó con la nata humana además de un fortificante de leche humana (Prolact + H2MF®) (es decir, la nata ajustada a la leche o al grupo de tratamiento) o con el fortificante de leche humana sin un suplemento de nata humana (es decir, el grupo de control con ajustada).

50 Se asignaron al azar a setenta y ocho lactantes pretérmino ya sea en el grupo de suplemento de nata o en el grupo control que no recibió el suplemento de nata humana. Cada grupo de estudio usó el fortificante a base de leche humana Prolact + H2MF® de acuerdo con el estándar de práctica. Típicamente, la fortificación comienza cuando el lactante recibe hasta aproximadamente 100 ml/kg/día de nutrición enteral. La leche para el grupo de prueba de nata se suplementó con la composición de nata humana después de que comenzara la fortificación y se determinó que se toleraba, usualmente un día después.

55 No se controlaron las cantidades reales de alimentación diaria durante el estudio, con la excepción de la composición de nata humana que se administró en una cantidad para alcanzar un nivel calórico de leche de la madre/leche de la donante de 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/oz) donde fue necesario. El uso del fortificante, tanto en el momento de inicio como en el protocolo de etapas, se determinaron de acuerdo con el estándar local de atención.

60 Este estudio se diseñó para evaluar una hipótesis nula de resultados inferiores con respecto a la tasa de ganancia de peso entre los dos grupos de estudio mediante el uso de las siguientes fórmulas donde μ es la tasa media de ganancia de peso en el grupo de estudio respectivo:

$$H_0: \mu_{\text{nata}} - \mu_{\text{no nata}} \leq -3 \text{ g/kg/día} \text{ y } H_a: \mu_{\text{nata}} - \mu_{\text{no nata}} > -3 \text{ g/kg/día.}$$

65 También se recolectaron datos sobre la tasa de cambio de la circunferencia de la cabeza y la longitud del cuerpo. Sin embargo, estos se probaron en base al paradigma de superioridad habitual. La tasa de ganancia de peso de cualquier

lactante que no completó el período completo del estudio se calculó durante el período por el cual el lactante permaneció en el estudio.

5 Se siguió a los sujetos de estudio hasta el primero de los siguientes períodos: 36 semanas de edad gestacional corregida o que se retira de la fortificación, lo que ocurra primero; destitución; traslado de la institución médica; o muerte. La edad gestacional corregida se calculó como edad gestacional al nacer + edad cronológica.

10 Los sujetos de estudio se seleccionaron en base a una serie de criterios de inclusión y exclusión. Todos los sujetos de estudio alcanzaron todos los criterios de inclusión y ninguno de los criterios de exclusión que se enumeran más abajo. Los cinco criterios de inclusión fueron los siguientes:

1. Peso al nacer entre 750 y 1250 g
2. Tener una expectativa razonable de supervivencia por la duración máxima del estudio (a través de 36 semanas de edad gestacional corregida o de que se retira de la fortificación, lo que ocurra primero)
- 15 3. Debe ser capaz de adherirse a un protocolo de alimentación que involucra leche de la propia madre/leche de la donante que incluirá la fortificación mediante el uso de Prolact + H2MF® y, potencialmente, nata humana
4. La alimentación enteral debe comenzar antes del día 21 de vida
5. Consentimiento informado que se obtiene del padre o tutor legal.

Los ocho criterios de exclusión fueron los siguientes:

- 20 1. Menos de una expectativa razonable de supervivencia para la edad gestacional particular del lactante a través del período de estudio
2. Inscripción en cualquier otro estudio clínico que afecta el manejo nutricional durante el período de estudio
3. Decisión de no iniciar la alimentación enteral mínima antes del día 21 de vida
4. Incapaz de obtener el consentimiento informado del padre o tutor legal antes del inicio de la alimentación enteral
- 25 5. Presencia de enfermedades del corazón congénitas clínicamente significativas
6. Presencia de cualquier malformación congénita importante.
7. Potencial razonable para el traslado temprano a una institución que no es de estudio
8. Incapaz de participar por cualquier motivo en base a la decisión del investigador del estudio.

30 Después de determinar la elegibilidad del lactante y obtener el consentimiento informado del padre o tutor legal, los lactantes se asignaron al azar mediante el uso de un esquema en bloque estratificado (por sitio de estudio) ya sea en el grupo de prueba que recibió el suplemento de nata humana o en el grupo control que no lo recibió el suplemento de nata humana. El resto de la nutrición (por ejemplo, leche humana y Prolact + H2MF®) se proporcionó de la misma manera y de acuerdo con la práctica estándar institucional para ambos grupos de estudio.

35 La asignación al azar se realizó en bloques de 4 sin el uso de variables de estratificación excepto para el sitio de estudio debido al pequeño tamaño del estudio. El tamaño del bloque se mantuvo ciego. Si bien cegar los grupos de estudio siempre es conveniente en los estudios que se asignan al azar, debido a la naturaleza de las intervenciones, por ejemplo, la necesidad de probar la leche humana en un solo grupo y los métodos por los cuales se preparó y suministró la nutrición, no fue posible para este estudio.

45 El número de lactantes que se incluye en este estudio se basó primero en el criterio de valoración principal de la tasa de ganancia de peso durante el período de inicio de la alimentación enteral a través de 36 semanas de edad gestacional corregida o cuando el lactante se retiró de la fortificación, lo que ocurriera primero. Un estudio de leche humana y Prolact + H2MF® por Sullivan y otros (J Pediatrics, 156:562-567, 2010) demostró una desviación estándar de la ganancia de peso de 4 g/kg/día. El objetivo del ensayo fue mostrar una falta de inferioridad en la media de la ganancia de peso para el grupo de prueba de nata en comparación con el grupo control. La falta de inferioridad se ha definido como una diferencia de ganancia de peso de menos de 3 g/kg/día. Con un nivel de significación unilateral del 5 % y una potencia del 90 %, el estudio requirió 31 sujetos por grupo (62 en total) con el fin de demostrar la hipótesis de falta de inferioridad. Sin embargo, se anticipó que para algunos lactantes en el grupo de nata, su leche humana (por ejemplo, de la madre o de la donante) no podría caer por debajo de 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/oz) en base a los datos de Wojcik y otros (J Am Diet Assoc, 109:137-140, 2009) que demostró que esto puede ocurrir hasta en un 25 % de las veces. Como resultado, el tamaño de la muestra para el grupo de prueba de nata aumentó en aproximadamente un 25 % en 39 sujetos, y el grupo control también aumentó para mantener el estudio en equilibrio. El tamaño total de la muestra resultante fue de 78 sujetos. El grupo de prueba de nata fue un grupo de intención de tratar (ITT) a pesar del hecho de que algunos de los infantes pueden no recibir el suplemento de nata.

60 Una vez que se inició la fortificación de leche humana y se estableció la tolerancia en base a la observación clínica, la leche humana se probó cada vez que se usó un nuevo recipiente de leche humana para preparar la alimentación. El contenido calórico de leche humana se midió mediante el uso de un dispositivo disponible comercialmente (el espectrómetro de infrarrojo cercano Unity SpectraStar) que se proporciona para este propósito. Cada vez que el contenido calórico de leche humana para un lactante en el grupo de prueba de nata cayó por debajo de 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/oz), se determinó el volumen de la composición de nata humana necesario para acercar lo más posible el contenido calórico a 67,6 kcal/100 ml (20 kcal/oz). La cantidad a añadir se calculó al ml más cercano al redondear hacia abajo de 0,1-0,4 ml y redondear hacia arriba de 0,5-0,9 ml con el fin de evitar imprecisiones debido al dispositivo

de medición de calorías que se usa en el área de preparación de nutrientes. Antes de añadir el volumen que se calculó de la composición de nata, se eliminó un volumen igual de leche humana del recipiente, que mantiene de esta manera el mismo volumen total. La leche humana que se ajusta en calorías, si se requiere, y el Prolact + H2MF® posterior se proporcionaron después de acuerdo con la atención estándar institucional. A los lactantes que se asignaron al azar en el grupo control se les proporcionó leche humana y Prolact + H2MF® de acuerdo con el estándar institucional de atención sin ningún uso del análisis de leche, como es típico para la gran mayoría de las unidades de cuidados intensivos neonatales.

El algoritmo nutricional se continuó hasta que el lactante alcanzó las 36 semanas de edad gestacional corregida o se le retiró el fortificante, lo que ocurriera primero, o se eliminó del estudio de cualquier otra manera (por ejemplo, debido al traslado a una institución que no es de estudio, eliminación del estudio, o muerte). Los resultados se muestran más abajo en la tabla 1.

Se proporcionaron formularios de recolección de datos con el fin de capturar la información relevante que se indica más abajo. Como se indicó anteriormente, la medida principal de eficacia para este estudio fue la tasa de cambio de peso desde el inicio de la alimentación enteral a través las 36 semanas de edad gestacional corregida o del retiro del fortificante, lo que ocurriera primero. En base al paradigma ITT que se define anteriormente, se determinó la tasa de cambio de peso del período de tiempo en el estudio para cualquier sujeto que falló al completar el período de estudio por cualquier motivo. Con el fin de proporcionar una comparación válida entre los sujetos de estudio, la tasa de ganancia de peso se reportó como g/kg/día. Cualquier sujeto que falló al completar el período de estudio se eliminó de cualquier cálculo con respecto a este criterio de valoración principal.

Al entrar al estudio, se registraron las siguientes variables: peso al nacer, edad gestacional, sexo, puntaje de Apgar a los 5 minutos, uso de ventilación mecánica, uso de esteroides prenatales o posnatales, y la edad en días a la que se inició la alimentación enteral. Además, se observó la presencia de cualquiera de las siguientes afecciones clínicas ya sea en el momento de entrar al estudio o que ocurrieron durante el curso del estudio: taquipnea transitoria del recién nacido (TTN), hemorragia intraventricular (HIV), y conducto arterioso persistente (CAP).

Se determinó el incremento de la circunferencia de la cabeza para el período de estudio y el incremento de longitud para el período de estudio. La longitud y la circunferencia de la cabeza se midieron semanalmente durante el período de estudio y se registraron como cm/semana. También se registró el uso de medicamentos que influyen en el crecimiento y el desarrollo, que incluyen los esteroides posnatales (por ejemplo, hidrocortisona y dexametasona), cafeína y otras preparaciones de metilxantina.

La cantidad diaria de toda la nutrición enteral se registró en unidades de mL. Esta cantidad se subdividió en los varios tipos de nutrición que se usaron, es decir, leche de la madre, leche de la donante, suplemento de nata, Prolact + H2MF®, y cualquier otro soporte nutricional. En el caso de intolerancia a la alimentación o descontinuar la alimentación enteral y el lactante regresa a la nutrición parenteral total (NPT), se identificó la causa supuesta. Además, se registró el número total de días de NPT durante el período de estudio.

Aunque no es un enfoque de este estudio, se registraron ocurrencias de sepsis, enterocolitis necrotizante (ECN) y otros resultados de infecciones que se relacionan. Además, se recolectó y registró información demográfica y médica básica sobre cada sujeto. Estas variables incluyeron edad gestacional, peso al nacer (que incluye si el peso al nacer era apropiado para la edad gestacional (AGA) o pequeño para la edad gestacional (PEG) en base a los criterios estándar), sexo, y grupo racial.

Los resultados del estudio indicaron que los lactantes en el grupo de prueba de nata crecieron a un ritmo más rápido con respecto al peso, y la longitud cuando se compararon con el grupo control, lo que demuestra claramente la eficacia superior de los productos que se reivindican en comparación con los protocolos de alimentación actuales.

La Tabla 1 es un resumen de las velocidades de los parámetros de crecimiento que se definen durante el período de estudio para los 78 pacientes en el estudio. No hubo diferencias en las referencias demográficas excepto la raza ($p=0,02$). No hubo casos de ECN y no hubo diferencias en las tasas de sepsis entre los grupos de estudio. El límite inferior unilateral del 95 % del intervalo de confianza para la diferencia en la velocidad media (control de nata) en términos de g/kg/día fue 0,38. Esto estuvo muy por encima del valor de -3 que se indica como definición de falta de inferioridad.

Tabla 1

Parámetro	Grupo nata (n=39)	Grupo control (p=39)	valor p (prueba t de dos muestras con tolerancia para varianzas desiguales)
Velocidad de longitud (cm/sem)	1,03 ±0,33	0,83±0,41	0,02
Velocidad de la cabeza (cm/semana)	0,90±0,19	0,84±0,22	0,21
Velocidad de peso (g/día)	19,8±5,1	17,1±6,4	0,045
Velocidad de peso (g/kg/día)	14,0±2,5	12,4±3,9	0,03

5 La Tabla 2 muestra las velocidades de crecimiento que se definen desde el nacimiento y desde el momento en que recupera el peso al nacer.

Parámetro	Grupo nata (n=39)	Grupo control (n=39)	valor p (prueba de suma de rango de Wilcoxon)
Velocidad de longitud desde el nacimiento (cm/semana)	0,95±0,34	0,76±0,29	0,01
Velocidad de la cabeza desde el nacimiento (cm/semana)	0,64±0,19	0,62±0,21	0,58
Velocidad de peso desde el nacimiento (g/día)	16,5±4,6	14,6±5,7	0,19
Velocidad de peso desde el nacimiento (g/kg/día)	11,4±2,1	10,3±3,4	0,11
Velocidad de peso que se calcula desde el momento en que el lactante recuperó el peso al nacer (g/día)	21,8±5,4	18,6±6,4	0,02
Velocidad de peso que se calcula desde el momento en que el lactante recuperó el peso al nacer (g/kg/día)	15,7±2,5	13,7±4,0	0,02

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición para la administración enteral a un lactante que comprende nata pasteurizada derivada de leche humana, donde la composición comprende 2,0 – 3,0 kcal/ml y un 18 - 30% de grasa de leche humana.
2. La composición de la reivindicación 1, que además comprende permeado de leche desnatada humana o agua desionizada.
- 10 3. Uso de la composición de la reivindicación 1 para aumentar el contenido calórico de la leche humana a un nivel calórico deseado.
4. El uso de la reivindicación 3, donde el contenido calórico deseado es 67,6 kcal/100ml (20 kcal/oz), 81,2 kcal/100 ml (24 kcal/oz) u 87,9 kcal/100 ml (26 kcal/oz).
- 15 5. Un método para elaborar una composición para la administración enteral a un lactante de nata pasteurizada derivada de leche humana que comprende las etapas de:
(a) separar una mezcla de leche humana en una porción de nata y una porción de leche desnatada,
(b) formular la porción de nata para obtener una composición de nata que comprenda 2,0 – 3,0 kcal/ml y 1-30% de grasa de leche humana, y
20 (c) pasteurizar la composición de nata;
donde la etapa (b) comprende medir el contenido calórico de la porción de nata y, si la porción de nata está por encima de 2,0 – 3,0 kcal/ml, añadir un volumen de permeado obtenido por ultrafiltración de la porción de leche desnatada o agua desionizada a la porción de nata.
- 25 6. El método de la reivindicación 5, donde la etapa de separación es mediante ultracentrifugación.
7. El método de la reivindicación 5, que además comprende ultrafiltrar el agua de la porción de leche desnatada, obteniendo así un permeado de leche humana desnatada.
- 30 8. El método de la reivindicación 5, que además comprende una etapa de testar la mezcla de leche humana en busca de adulterantes, contaminantes, drogas y/o patógenos.
9. El método de la reivindicación 8, donde la etapa de testado comprende un análisis PCR en busca de VIH, VHB y VHC.
- 35 10. El método de la reivindicación 8, donde la etapa de testado detecta proteína bovina.
11. El método de la reivindicación 8, donde la etapa de testado comprende comprobar una o más drogas seleccionadas de anfetaminas, benzodiazepinas, cocaína, metanfetaminas, opiáceos, THC y los principales metabolitos de los mismos.
- 40 12. El método de la reivindicación 5, donde la mezcla de leche humana es de una o más donantes.