

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 805 279**

51 Int. Cl.:

A23J 1/20	(2006.01) A23L 33/10	(2006.01)
A61P 1/00	(2006.01) A61P 1/16	(2006.01)
A61P 1/02	(2006.01) A61P 17/02	(2006.01)
A61P 1/04	(2006.01) A23L 33/19	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01)	
A61P 27/02	(2006.01)	
A61P 27/16	(2006.01)	
A61P 29/00	(2006.01)	
C07K 14/79	(2006.01)	
A61K 38/00	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.01.2010 PCT/IB2010/000149**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **07.10.2010 WO10112988**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.01.2010 E 10703352 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2020 EP 2391225**

54 Título: **Método de producción de lactoferrina**

30 Prioridad:

28.01.2009 US 202088 P

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

11.02.2021

73 Titular/es:

**PERRAUDIN, JEAN-PAUL (100.0%)
9, Avenue de la Ferme Rose
1180 Brussel, BE**

72 Inventor/es:

PERRAUDIN, JEAN-PAUL

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

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

ES 2 805 279 T3

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

DESCRIPCIÓN

Método de producción de lactoferrina

Campo de la invención

5 La invención se refiere a la calidad de la lactoferrina (Lf) para alcanzar un óptimo de todas sus actividades y evitar cualquier efecto secundario.

Antecedentes de la invención

10 Desde su primera identificación como "proteína roja" en la leche bovina hace más de 65 años, y su purificación en 1960, la lactoferrina ha intrigado y desconcertado a los investigadores. La posterior determinación de su secuencia de aminoácidos, estructura tridimensional y propiedades detalladas de unión al hierro firmemente establecida, la lactoferrina es una glucoproteína, como miembro de la familia de la transferrina, y reforzó la presunción natural de que su función biológica se relacionaba con la unión al hierro.

15 Los diferentes centros de investigación han desempeñado un papel importante haciendo hincapié en algunas funciones biológicas clave de la proteína. La lactoferrina se aisló como un componente principal en los gránulos específicos de los leucocitos polimorfonucleares con un papel importante en la amplificación de la respuesta inflamatoria. El extenso trabajo de Masson y su grupo belga ha establecido un papel claro para la lactoferrina en la inmunidad celular y ha llevado a la identificación de receptores de lactoferrina específicos en los macrófagos, la intermediación del shock endotóxico y la hiposideremia. Los esfuerzos pioneros de Montreuil y su grupo francés desentrañaron la química biológica de la lactoferrina. Lonnerdal ha abierto el papel nutricional de la lactoferrina en la absorción de iones de metales en el tracto intestinal. Broxmeyer y sus colaboradores informaron una función reguladora para la lactoferrina en la mielopoyesis. Por su parte, Reiter informó sobre la capacidad de la lactoferrina de la leche para inhibir el crecimiento de algunos microorganismos y descubrió que la privación nutricional de las bacterias del hierro explicaba la actividad antimicrobiana. Arnold y sus colaboradores informaron actividad bactericida para la lactoferrina contra una variedad de microorganismos. Tomita y su grupo de investigación en Morinaga Milk Industry en Japón descubrieron que la hidrólisis ácida/pepsina de la lactoferrina podría generar péptidos antimicrobianos catiónicos "lactoferricina".

20 Varios estudios han establecido que la suplementación con lactoferrina podría proporcionar beneficios excepcionales para la salud y una poderosa protección contra varias enfermedades. Las tecnologías de caracterización funcional han aclarado los mecanismos moleculares de las actividades multifuncionales mediadas por lactoferrina. Adicionalmente, los investigadores de laboratorios de todo el mundo han validado los resultados funcionales con suplementos de lactoferrina en ensayos aleatorios en humanos y modelos experimentales *in vivo*.

25 Pero si las actividades multifuncionales de esta glucoproteína extracelular que funciona como un componente clave de la primera línea de defensa inmune de los mamíferos contra las agresiones ambientales se ha demostrado usando una buena calidad de lactoferrina producida en el laboratorio, se ha descubierto que no es el estuche con la lactoferrina producida comercialmente.

35 Durante el procedimiento industrial, la Lf se extrae de la leche o el suero en presencia de otras proteínas básicas de la leche (MBP) tal como la lactoperoxidasa, algunas inmunoglobulinas y otros contaminantes de los cuales la concentración depende de la especificidad de la resina de intercambio iónico catiónico. Es un procedimiento fácil que consiste en extraer y purificar la Lf. De hecho, tenemos la ventaja de que la mayor parte de las proteínas y enzimas contenidas en el MBP son coloreadas. La elución de los diferentes componentes unidos a la resina se realizará usando soluciones que contienen diferentes concentraciones de NaCl. Usando tales procedimientos, los productores industriales consideran que una pureza entre 90 y 92% corresponde a una Lf lo suficientemente puro como para ser usado para las diferentes aplicaciones.

40 Sin embargo, ninguno de estos procedimientos, ni ningún otro procedimiento existente para la purificación a escala comercial de la lactoferrina, puede eliminar contaminantes que afectan la estabilidad y la actividad de la lactoferrina.

45 Parece que las enzimas contaminantes están presentes en la preparación comercial actual de lactoferrina. Estas enzimas se purifican conjuntamente durante la purificación de lactoferrina a partir de leche o suero

Con respecto a los contaminantes, como se demostrará a continuación, también se ha encontrado que la angiogenina se puede purificar durante la purificación de la Lf. Esta molécula tiene un peso molecular de 15 kDa y un pH isoelectrico de 9.5 muy cerca del Lf.

50 Esta molécula es responsable de la creación del vaso sanguíneo para alimentar las células cancerosas, la neovascularización indispensable para el crecimiento de tumores y el desarrollo de la metástasis. Durante la purificación de la Lf, esta molécula se concentró al menos 4 veces, lo que ciertamente no es beneficioso para la salud de los consumidores.

La angiogenina contribuye a un procedimiento inflamatorio que permite la trans migración de las células endoteliales y del músculo liso a través de la membrana basal para ingresar al sitio de la lesión. La angiogenina promueve la neovascularización de las células tumorales y promueve la proliferación de la metástasis de las células cancerosas.

5 La angiogenina es una proteína de 15 kDa con un pH isoelectrónico de 9,5 que significa muy cerca de Lf. Según lo descrito por Strydom et al., in 1997 (Eur. J. Biochem, 247, 535-544, angiogenin was applied to a CM-52 (cation-exchange chromatography resin) y se eluyó con NaCl 1 M en fosfato de sodio 50 mM, solución de pH 6,6. Por lo tanto, no es sorprendente que esta molécula esté copurificada con Lf y se haya detectado en el gel SDS-PAGE en presencia de todos los Lf comerciales.

10 Otro problema es la producción por tratamiento térmico de polímeros de Lf que también se ha demostrado, véase más abajo.

Por lo tanto, existe una gran necesidad de nuevos métodos de purificación y estabilización de las preparaciones de lactoferrina con el fin de eliminar contaminantes, la degradación de proteínas y los LPS para mejorar, la actividad sobre el crecimiento bacteriano y preservar la estabilidad de la proteína, durante un período más largo de tiempo.

15 Aunque originalmente se identificó como una proteína abundante en la secreción de leche, la lactoferrina se expresa predominantemente por epitelios superficiales y se secreta al ambiente de la mucosa. Como se describe, la lactoferrina se produce a niveles altos no solo en la leche sino también en los conductos nasales y traqueales y en las secreciones gástricas, genitales y oftálmicas. La lactoferrina también se produce a niveles altos en neutrófilos, donde se almacena en gránulos secundarios y se libera durante la inflamación y contribuye a su actividad antimicrobiana.

20 La lactoferrina contiene 2 dominios de unión de hierro homólogos que secuestran el hierro disponible y pueden privar a las bacterias de los dominios que requieren hierro de este elemento de crecimiento esencial. De esta manera, la proteína ejerce un efecto bacteriostático contra una amplia gama de microorganismos y ciertas levaduras. Además, la lactoferrina, por la presencia de su péptido catiónico ubicado cerca del extremo amino terminal de la proteína, ha demostrado poseer actividades bactericidas y antiendotoxinas que son independientes de la función de unión al hierro de la proteína. Esta región actúa al alterar las membranas bacterianas y al unir e inactivar los lipopolisacáridos bacterianos que contienen el lípido A llamado también endotoxinas (véase la figura 1).

25 La lactoferrina también es capaz de regular las rutas de señalización celular, que afectan actividades tales como su alivio de la inflamación, la promoción del crecimiento óseo y la supresión de la carcinogénesis.

30 De este modo, su actividad antiinflamatoria está vinculada a la capacidad de inhibir la producción de citoquinas proinflamatorias, pero a través de varios mecanismos distintos, y su regulación del crecimiento óseo que ocurre a través de las vías de la proteína quinasa activada por mitógeno. Un número creciente de estudios muestra que la lactoferrina posee propiedades anticancerígenas, inhibiendo el crecimiento del cáncer, que se derivan de su capacidad para modular vías que afectan el ciclo celular o dan como resultado una regulación positiva de la expresión de citoquinas como interleucina-18.

35 Además, la funcionalidad antimicrobiana de la lactoferrina depende de sus condiciones de conformación de proteínas, unión a metales y entorno (Naidu AS and Arnold RR., 1995, Lactoferrin interactions and biological Functions pp 259-275 Totowa, NJ, Humana Press). La actividad antimicrobiana aumenta cuando la lactoferrina se une a las superficies microbianas. Los objetivos microbianos de unión a lactoferrina específicos se han identificado en diferentes patógenos bacterianos Gram-positivos y Gram-negativos (Naidu SS et al., 1991, APMIS, 99, 1142-1150). La interacción de alta afinidad de la lactoferrina con proteínas de la membrana externa formadoras de poros de bacterias entéricas gramnegativas, incluida *Escherichia coli*, es crítica para el resultado antimicrobiano de la lactoferrina (Erdei et al., 1994, Infect Immun, 62, 1236-1240). De este modo, el daño de la membrana externa mediado por lactoferrina en bacterias Gram negativas y la potenciación antibiótica inducida por lactoferrina al causar permeación alterada de la membrana externa son ejemplos típicos de tales resultados antimicrobianos (Naidu et al., Diagn Microbiol Infect, 1988, Infect Immun, 56, 2774-2781). La interacción de la lactoferrina con la superficie microbiana, las membranas externas en particular, ha conducido a otros mecanismos antimicrobianos, tal como el bloqueo de la adhesión microbiana al epitelio intestinal y el desprendimiento específico de patógenos de la mucosa intestinal. La unión específica de la lactoferrina podría colapsar instantáneamente la función de barrera bacteriana de la membrana externa y provocar el cierre de los factores de colonización de patógenos y la producción de enterotoxinas.

50 Desde otro lado, Appelmeik y sus colaboradores (Appelmeik BJ, et al., 1994, Infection and Immunity, 62, 2628-2632) han encontrado que Lf se une al lípido A, parte del LPS y Ellass Ellass-Rochart E, et al., 1995, Biochem J. 312, 839-845) han demostrado que este sitio de unión está ubicado en el terminal N (péptido 1 a 52) de la lactoferrina, donde también se encuentra la parte principal de las actividades del Lf. A partir de estos resultados, es fácil comprender la proporción existente entre la actividad de la lactoferrina y la presencia del LPS unido a la estructura molecular de la lactoferrina.

55 Se produce una transferencia continua de LPS y endotoxina desde la luz intestinal al torrente sanguíneo. En individuos sanos, el plasma inactiva la afluencia intestinal de LPS y endotoxina y protege los órganos internos del daño. Sin embargo, cualquier alteración en la permeabilidad intestinal podría aumentar la transferencia de LPS y endotoxinas al

torrente sanguíneo. Tal flujo masivo podría agotar la capacidad del plasma para inactivar LPS y endotoxinas y, en última instancia, conducir a endotoxemia clínica (Opal SM, 2002, J. Endotoxin Res, 8, 473-476). La evidencia experimental sugiere que las especies reactivas de oxígeno son mediadores importantes de la lesión celular durante la endotoxemia, ya sea como resultado del daño macromolecular o al interferir con los procedimientos reguladores extracelulares e intracelulares. Un mecanismo importante para prevenir la endotoxemia fisiológica es reducir los lipopolisacáridos (LPS) de la luz intestinal.

En su terminal N (péptido de lactoferrina) Lf se une al lípido A, la unidad estructural tóxica de LPS con alta afinidad y funciona como un agente terapéutico para neutralizar los efectos de LPS y endotoxinas (Appelmelk BJ et al, 1994, Infect Immun 62, 2628-2632). Lf podría reducir efectivamente la entrada de LPS y endotoxina en el torrente sanguíneo mientras las toxinas todavía están dentro de la luz intestinal, pero para alcanzar tal resultado, es importante que Lf se fabrique sin LPS y endotoxina. Además, si el LF alimenta a la persona sana con LPS, este LPS podría eliminarse de la molécula y transferirse al torrente sanguíneo.

En este procedimiento, sin embargo, Lf también se agota rápidamente y puede no estar presente en cantidades suficientes para realizar esta función si LPS y endotoxinas se liberan continuamente en grandes cantidades (Caccavo et al, 2002, J. Endotoxin Res, 8, 403-417). Se ha informado de un efecto protector para Lf contra el choque letal inducido por endotoxina administrada por vía intravenosa. La protección mediada por Lf contra el desafío de endotoxina (si la molécula está libre de endotoxina durante su producción) se correlaciona con la resistencia a la inducción a la hipotermia y un aumento general en el bienestar. Los estudios *in vitro* con una medición de citometría de flujo indicaron que Lf inhibe la unión de la endotoxina a los monocitos de una manera dependiente de la dosis, lo que sugiere que el mecanismo de acción de Lf *in vivo* podría deberse a la prevención de la inducción de citoquinas tóxica inflamatoria derivada de monocitos/macrófagos (Lee WJ et al, 1998, Infect Immun, 66, 1421-1421).

Los ensayos clínicos en humanos también han mostrado una influencia positiva del consumo de Lf en la activación primaria de la defensa del huésped (Yamauchi et al, 1998, Adv Exp Med Biol, 443, 261-265). Las personas sanas mostraron una mejora en su función de neutrófilos en suero, incluida una actividad fagocítica mejorada y producción de superóxido. Adicionalmente, la interacción específica de Lf con macrófagos alveolares, monocitos, células de Kupfer, endotelios hepáticos, neutrófilos, plaquetas y linfocitos T enfatiza el papel de Lf en la inmunidad mucosa y celular (Hanson LA, 1988, Biology of human milk. Nestle Nutrition Workshop series, 15, New-York, Raven Press). Sin embargo, toda esta actividad debido a la interacción de Lf con estas células se ve disminuida por la presencia de LPS en la estructura de Lf y por los daños de las cadenas de glucano de Lf debido al uso de temperaturas demasiado altas (> 550 °C después de 15 segundos) durante el procedimiento de fabricación y debido a la temperatura demasiado alta para el secado de la molécula, y también por la presencia de polímeros de Lf que aparecen durante el tratamiento térmico de la molécula.

En cuanto a la maduración intestinal y la reparación de la mucosa, se ha demostrado que la administración oral de Lf podría funcionar como un factor inmunoestimulador en la mucosa intestinal.

El tracto gastrointestinal madura más rápidamente en el recién nacido durante la lactancia. Esta activación depende de la unión de Lf al epitelio intestinal. Lf podría potenciar la incorporación de timidina en el ADN de la célula de la cripta *in vivo*. Este efecto trófico contribuye a la regeneración celular y la reparación tisular de la mucosa intestinal en afecciones como la gastroenteritis (Nichols et al., 1990, Pediatr Res., 27, 525-528). La presencia de LPS en la estructura de Lf disminuye esta actividad de Lf debido al hecho de que la unión de Lf al epitelio intestinal se encuentra en el péptido (1-52) que significa en el mismo lugar que los LPS.

La Lf también juega un papel importante en la absorción intestinal de hierro y otros oligoelementos esenciales tales como el zinc, el cobre (Lonnerdäl B., 1989, J. Nutr. Suppl, 119, 1839-1844). Lf también protege la mucosa intestinal del exceso de absorción de iones de metales pesados. Los receptores de unión a Lf específicos en el borde del cepillo duodenal humano están implicados en la absorción de hierro (Cox et al 1979, Biochem Biophys Acta, 588, 120-128). Se identificó un receptor intestinal de Lf. Se ha informado un aumento de la absorción de hierro a través de este receptor Lf de las membranas del borde ciliado intestinal (Kawakami H et al., 1991, Am.J. Physiol, 261, G841-G846 and Rosa G et al., J. Med Biol. Res, 27, 1527-1531) y en este documento también el péptido Lf que es responsable de la unión de la molécula a su receptor específico se ha localizado en el péptido 1-52 que también es responsable de la unión del LPS.

En cuanto a su actividad antitumoral, se muestra que Lf potencia la actividad asesina natural (NK) de los monocitos de una manera dependiente de la dosis. Lf aumenta fuertemente las funciones citotóxicas de las células asesinas activadas por linfocitos y NK (LAK). Lf es un modulador eficaz de la respuesta inmune mediada por células y los factores citotóxicos en suero a dosis bajas si los LPS no está unido a la estructura de Lf y si la angiogenina no contamina la Lf. Sin embargo, a concentraciones más altas, la inducción mediada por Lf podría conducir a una retroalimentación positiva o negativa según la densidad y los subconjuntos de la población de células inmunes, pero también a la presencia de LPS en la estructura de Lf.

El descubrimiento de receptores de Lf específicos en macrófagos, linfocitos T y B y células de leucemia establece el potencial antitumoral potencial de Lf (Shau et al., 1992, L. Leukoc Biol, 51, 343-349) que se podría eliminar por la presencia del LPS en su estructura.

La actividad antiinflamatoria de la Lf se asocia principalmente con su capacidad para eliminar el hierro. Se sabe que la acumulación de hierro en los tejidos inflamados podría conducir a la producción catalítica de radicales libres altamente tóxicos. Durante una respuesta inflamatoria, los neutrófilos migran al sitio de desafío para liberar sus gránulos ácidos que contienen Lf. Esto da como resultado la creación de un medio ácido fuerte en el sitio del tejido inflamado para amplificar las capacidades de secuestro de hierro y desintoxicación de Lf. Además de modular la homeostasis del hierro durante la inflamación, existe una creciente evidencia de que Lf podría regular directamente diversas respuestas inflamatorias. Este modo de acción independiente del hierro se basa en la unión de Lf a LPS bacteriano, que es el principal mediador proinflamatorio durante las infecciones bacterianas y el shock séptico (Miyazawa et al., 1991, J. Immunol, 146, 723-729). Lf podría desempeñar un papel importante en la modulación de la inflamación gástrica, ya que esta proteína también se expresa en la mucosa gástrica del estómago e interactúa con los receptores localizados en las células del epitelio gástrico intestinal. Esta actividad de Lf se reduce por completo o incluso se elimina cuando LPS cubre la estructura de Lf. Varios estudios *in vivo* han demostrado que la administración oral de Lf podría reducir la inducción gástrica inducida por *Helicobacter pylori* y proteger la integridad de la mucosa intestinal durante la endotoxemia. Aquí también tal actividad de Lf es muy pobre cuando los LPS están unidos a la estructura de Lf.

La actividad independiente de hierro de la Lf puede describirse de la siguiente manera: una de las funciones proinflamatorias centrales de las células endoteliales es el reclutamiento de leucocitos circulantes en los sitios de tejido inflamatorio. Los lipopolisacáridos (LPS) o las endotoxinas son un glicolípido predominante en la membrana externa de las bacterias Gram negativas. Los LPS son potentes estimuladores de la inflamación que inducen, ya sea directamente o por intermedio de las citoquinas, la expresión de moléculas de adhesión tales como la molécula de adhesión endotelial-leucocitaria (E-selectina) y la molécula de adhesión intracelular 'ICAM-1'. La estimulación con endotoxinas de las células endoteliales está mediada por la proteína soluble encontrada CD14 (sCD14), un receptor específico. CD14 es una glicoproteína de 55kDa que existe en el suero y como una proteína anclada (mCD14) en la superficie de monocitos-macrófagos. En este mecanismo, dependiendo de la concentración de LPS (endotoxinas), existe la presencia de un intermedio llamado proteína de unión a LPS (LBP), que cataliza la transferencia de monómeros de LPS de los agregados a CD14 para formar un complejo sCD14-LPS. De este modo, la activación de las células endoteliales por el complejo sCD14-LPS o solo por los LPS provoca diversas reacciones fisiopatológicas, como fiebre e hipotensión, promueve la infiltración de leucocitos y la trombosis microvascular y contribuye, durante el shock séptico, a la patogénesis de la inflamación intravascular diseminada.

Sin embargo, la lactoferrina encontrada en las secreciones exocrinas de mamíferos y liberada de gránulos de neutrófilos durante la inflamación es capaz de modular la activación de las células y evitar los daños severos causados por la presencia del LPS.

Después de la infección, se pueden detectar concentraciones de lactoferrina superiores a 20 µg/ml en la sangre. La lactoferrina es parte de un sistema de defensa primario contra la inflamación. Cualquier presencia de bacterias en el organismo inducirá la inflamación, el cáncer y otras patologías. Esta inducción va a estimular las respuestas inmunes, incluida la producción de citoquinas, el aumento de la expresión de las moléculas de adhesión celular y la secreción mediadora proinflamatoria por monocitos, macrófagos y neutrófilos, que se encuentran en los tejidos específicos del huésped por exposición sistémica a LPS. La respuesta del huésped al LPS está mediada por moléculas inmunomoduladoras tales como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa), miembros de la familia de las interleucinas (IL), especies reactivas de oxígeno y lípidos. La sobreproducción de esos mediadores induce daño tisular que precede a la falla de múltiples órganos.

La lactoferrina previene la unión mediada por LBP de LPS a mCD14 y disminuye la liberación de citoquinas de monocitos estimulados por LPS. La lactoferrina también podría modular el procedimiento inflamatorio. De hecho, los estudios informaron la función protectora de la lactoferrina contra dosis subletales de LPS en ratones. En conclusión, la capacidad de la lactoferrina para unirse a LPS libre puede explicar, en parte, las actividades antiinflamatorias de la molécula.

Es la razón por la cual cuando el humano y el animal toman lactoferrina por vía oral o por inyección para reforzar o evitar las deficiencias de su sistema de defensa primario, es primordial que la calidad de la lactoferrina sea idéntica a la que se produce del modo endógeno en el humano sano que tiene que protegerse contra las invasiones microbianas. Sabiendo que durante el procedimiento de envejecimiento, la producción de lactoferrina endógena se vuelve muy pobre, obligando a los pacientes a tomar lactoferrina exógena por vía oral o por inyección.

Los contaminantes en el material fuente podrían comprometer las aplicaciones de Lf para la salud humana. Varios factores, incluido el origen del material de origen, la purificación de proteínas, el procedimiento de secado y los métodos de cosecha, el entorno de fabricación y las condiciones de almacenamiento, contribuyen de manera acumulativa a la carga biológica de la proteína Lf. De acuerdo con lo anterior, cuando se usa como material de origen, la leche, el suero o el suero de leche podrían pasar por estreptococos fermentativos (*Streptococcus thermophilus* ..) y un medio con un ambiente ácido podría enriquecer selectivamente varias levaduras y mohos. De paso, Se sabe comúnmente que estas poblaciones microbianas proliferan y limitan competitivamente el crecimiento de varios probióticos.

- La Lf derivada de la leche con una contaminación del conjunto de leche de la fuente de mastitis podría introducir la presencia de LPS de cocos gram positivos que incluyen *Streptococcus uberis*, *Staphylococcus aureus* y estafilococos coagulados negativos. Por otro lado, los contaminantes ambientales tales como *Bacillus* spp formadores de esporas, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Klebsiella oxytoca*, *Pseudomonas* spp y coliformes, incluida *E. coli*. y los LPS de tales microorganismos podría entrar en el material Lf a través de la solución reguladora de elución, el equipo bioincrustado, los conductos de aire, etc. Podrían existir problemas de calidad microbiológica similares para las proteínas Lf recombinantes y derivadas de OGM de diversas expresiones tales como arroz, tabaco, levadura, cultivos celulares o animales transgénicos. Por lo tanto, la eliminación o reducción significativa de tales contaminantes microbianos de LPS es altamente deseable para aplicaciones de Lf comercial en la salud humana, en general.
- Como se explica aquí anteriormente, el contenido de LPS y endotoxinas en el material fuente podría afectar negativamente a las aplicaciones de Lf. Los lipopolisacáridos (LPS) en la membrana externa bacteriana gramnegativa generalmente consisten en un dominio hidrófobo conocido como lípido A (o endotoxina), un oligosacárido central no repetitivo y un polisacárido distal (o antígeno O) (Erridge et al., 2002, *Microbes Infect*, 4, 837-851). Los LPS y las endotoxinas podrían estimular la inducción de citoquinas y otros mediadores de la inflamación, lo que a su vez podría desencadenar una amplia gama de respuestas fisiológicas adversas (Raetz et al., 2002, *Annu Rev Biochem*, 71, 635-700). La carga biológica bacteriana gramnegativa de la leche o sus derivados usados en el aislamiento de proteínas, el entorno de la planta de procesamiento y las condiciones acumulativas contribuyen a los niveles de LPS y endotoxinas en un material fuente de Lf. Se ha revisado los posibles reservorios de contaminación por endotoxinas durante el aislamiento de materiales proteicos Majde et al., 1993, *Peptides* 14, 629-632). Rylanders (Rylander 2002, *J. Endotoxin Res*, 8, 241-252) también ha revisado la aparición del nivel de endotoxina en diferentes condiciones ambientales y además señaló los riesgos asociados con las endotoxinas no bacterianas, particularmente 1-3-β-D-glucano de las paredes celulares del molde. De este modo, los estándares de mantenimiento microbiano de las resinas cromatográficas, las prácticas de saneamiento de los equipos de procesamiento, incluso más significativamente la calidad del agua usada en la purificación de Lf, podrían contribuir acumulativamente a los niveles de LPS y endotoxinas del material de Lf purificado y, podrían limitar así las aplicaciones *in vivo* de Lf comercial. La preexistencia de complejos de Lf-LPS y endotoxinas reduce el potencial de interacción de Lf con epitelios intestinales y disminuye su capacidad para controlar la entrada intestinal de LPS y endotoxinas.
- Entonces, toda la lactoferrina comercial debería estar desprovista de LPS unido a su estructura molecular. Por ejemplo, Ward, Loren and col. en el documento WO2009/009706 han descrito un método para eliminar las endotoxinas unidas a Lf y para producir un producto de lactoferrina libre de endotoxinas (EFL). Ese no es el caso si analiza la concentración de LPS usando la prueba de limulus. También se ha demostrado que cuando esta concentración de LPS unida en la estructura de la lactoferrina es demasiado importante, el complejo LPS-Lf puede inducir la producción de mediadores inflamatorios en los macrófagos en cierta medida, en lugar de inhibir totalmente la actividad de LPS. Se debe principalmente al hecho de que cuando la concentración de LPS es demasiado importante, existe un equilibrio entre los LPS unidos → LPS-libres y es la presencia de LPS-libres lo que induce la producción de mediadores inflamatorios. Por seguridad, razones que obligan a los productores de Lf a purificar la molécula exenta de LPS unidos en la superficie de la estructura molecular de Lf. Sin embargo, ningún dato experimental en el documento WO2009/009706 evalúa que la fracción purificada de lactoferrina obtenida por dicho método esté libre de endotoxinas. El documento WO2009/009706 no describe un método de purificación de la lactoferrina mediante la eliminación de endotoxinas y angiogenina.
- Fabricada a partir de la leche y/o el suero, es normal que la lactoferrina esté cubierta en su estructura molecular por los LPS bacterianos existentes en la leche y eso puede ser peligroso si dicha reserva de leche ha sido contaminada por leche contaminada por microbios responsable de vacas con mastitis. Se sabe que una parte de las actividades de la lactoferrina está representada por su papel antibactericida que se une al LPS de las bacterias existentes en la leche. Eso significa que no es sorprendente extraer de la leche una lactoferrina completamente cubierta por LPS que ha perdido una parte importante de su actividad biológica con respecto al antioxidante, el antibacteriano y su actividad para inhibir la formación de biopelículas bacterianas y su actividad prebiótica, respectivamente.
- Además, Lf podría desnaturalizarse por tratamiento térmico. Existen diferentes parámetros que se pueden usar para estudiar la estabilidad térmica de la lactoferrina. La desnaturalización del tratamiento térmico sigue una cinética de primer orden. La desnaturalización aumenta con la temperatura. La lactoferrina libre de hierro (Apo-Lactoferrina) muestra una desnaturalización más rápida que la lactoferrina saturada de hierro (Holo-Lactoferrina). Eso se refleja en una conformación más estable cuando se une al hierro. Durante la desnaturalización térmica, la ruptura de varios enlaces provoca cambios importantes en la estructura de Lf. La estabilidad térmica aumenta en presencia de otros componentes de la leche debido a la interacción entre la lactoferrina y los caseinatos y otras proteínas de la leche.
- La lactoferrina que se extrae de la leche tiene un nivel de saturación de hierro entre el 9 y el 20% de la lactoferrina saturada de hierro. Sin embargo, después de la pasteurización de la leche o el suero de queso, la proteína que se extrae no tiene el mismo nivel de actividad ni los mismos valores en comparación con la lactoferrina, que se extrajo antes de cualquier tratamiento térmico de la leche o el suero de queso.
- De hecho, el tratamiento térmico puede destruir las cadenas de glucano de la molécula que son importantes para proteger la lactoferrina contra las enzimas proteolíticas que están presentes en el estómago y también puede producir

polímeros de Lf. Este efecto también se ha demostrado por el hecho de que cuando la lactoferrina se somete a un tratamiento térmico, la molécula tiene un mayor poder de absorción a 280 nm (Tabla 1).

5 La destrucción de las cadenas de glucano, que son sensibles al tratamiento térmico, también aumentará la unión no específica de la lactoferrina en las células. En lugar de promover el crecimiento celular, la unión no específica de la lactoferrina inducirá la asfixia de las células. En realidad, los productores de Lf comercial han establecido que la pureza de Lf se determina mediante HPLC de fase inversa usando un gradiente de acetonitrilo. Analizando la pureza de algunos Lf comerciales, se observa que los contaminantes proteicos representan alrededor del 8 al 9% frente al pico de Lf. Sin embargo, diluyendo la misma cantidad de Lf comercial, ajustada por el contenido de cenizas y humedad, no se ha encontrado la misma densidad óptica a 280 nm. Eso significa que algunas proteínas que se eluyen como Lf pueden aumentar la densidad óptica. En las figuras 2, se puede observar que Lf analizada por cromatografía de intercambio iónico FPLC (resina Mono-S - Sulfopropilo) muestra una superficie más pequeña en comparación con la superficie de Lf de tratamiento térmico. La reducción de la altura de la superficie se debe a la presencia de una nueva superficie que corresponde al hombro observado con el análisis FPLC y que llamamos pico C para simplificar la descripción del cromatograma. También se podría observar que la superficie de Lf se divide en dos partes: pico A y pico B.

15 Muy cerrado entre sí y corresponde para el pico A a la presencia de un contenido de ácido siálico que le da a la molécula un comportamiento menos básico en comparación con el nativo que no contiene ácido siálico, en el caso de Lf-NFQ, la superficie de Lf también se compone de dos superficies (superficie A y superficie B). El hombro (superficie C) solo se observa en la Lf comercial. El hombro o la superficie C tiene un mayor poder de absorbancia a 280 nm en comparación con la Lf nativo, véase la tabla 1 a continuación.

20 De todos modos, se puede considerar que el pico A y el pico B son partes de la Lf pura. La presencia del pico C no se puede detectar con el uso de la cromatografía de fase inversa. Para comprender la presencia de este pico C, se ha llevado a cabo el espectro de absorbancia completo desde 280 nm a 800 nm y se ha observado una banda de Soret a 410 nm (figura 2) que es independiente del contenido de hierro en la Lf porque esta banda de Soret debería estar presente en una longitud de onda cerrada a 465 nm. Además, la absorbancia de este pico C a 280 nm es casi el doble que la de Lf.

25 Recolectando solo los picos A y B, y aplicando nuevamente sobre la resina Mono S, se puede notar que solo los picos A y B están presentes en el cromatograma sin estar contaminados por el pico C. Por otro lado, si enviamos la solución que contiene los picos A y B a una temperatura de 72 °C, durante 5 minutos y al analizar esta solución en la resina Mono S, se observa una disminución importante de la superficie del pico A y de la superficie del pico B en comparación con el cromatograma original, pero también una apariencia del pico C (figura 2). Más tiempo, se somete a Lf a un tratamiento térmico, más los picos A y B tendrán una superficie más baja y más el pico C será importante.

30 Si se compara en la fase inversa, el cromatograma de la Lf sin tratamiento térmico y el cromatograma de la misma Lf pero que ha sido sometido a un tratamiento térmico (72 °C), durante 5 min, se puede notar que la superficie de Lf sin tratamiento térmico es menor que la superficie de Lf que ha sometido un tratamiento térmico (figura 3). El pico C se ha caracterizado como polímeros de Lf que tienen un poder de absorción mucho mayor.

Tabla 1

Calentamiento (30 segundos)	Absorbancia a 280 nm para una solución Lf de 1 mg/ml
<50°C	1,326
70°C	1,38
80°C	1,42
85°C	1,42

35 El problema no solo se basa en el hecho de que la lactoferrina purificada por el fabricante ha perdido un porcentaje de sus actividades biológicas que podría compensarse mediante la adición de una mayor concentración de la molécula, sino por el hecho de que se aconseja más que el uso de una alta concentración de Lf para alcanzar un cierto nivel de actividad, se recomienda más el uso de una alta concentración de LPS. Eso podría inducir automáticamente el procedimiento inflamatorio para proteger a los pacientes (Tabla 3).

40 Varios productos de Lf están disponibles actualmente en los mercados de alimentos saludables en todo el mundo. La mayoría de estos productos se derivan de Lf parcialmente aislada de calostro, suero de leche o queso. Adicionalmente, los problemas de calidad microbiológica y toxicológica comprometen los estándares de rendimiento *in vivo* de Lf como un material alimenticio potente.

La lactoferrina generalmente se purifica a partir de leche o suero (suero de leche o suero de queso) mediante uno o más tipos diferentes de resinas de cromatografía tales como intercambio iónico, especialmente intercambio catiónico, afinidad (heparina inmovilizada, ADN monocatenario, lisina o arginina) tinte de afinidad y exclusión de tamaño. La membrana de ultrafiltración también se puede usar para separar la lactoferrina de la leche o el suero. Tomita y sus colaboradores (Tomita et al., 2002, *biochem Cell Biol*, 80, 109-112) han dado un ejemplo del procedimiento industrial que usa tanto la cromatografía de intercambio catiónico como la filtración por membrana de flujo tangencial. Otras purificaciones usando cromatografías de intercambio catiónico se han descrito por Okonogi y sus colaboradores (Okonogi et al., *New Zealand Patent N° 221,082*), por Ulber (Ulber et al., 2001, *Acta Biotechnol*, 21, 27-34) y Zhang y sus colaboradores (Zhang et al., *Milchwissenschaft* 2002, 57, 614-617). Algunos investigadores han usado las propiedades hidrófobas de la molécula para purificar la lactoferrina mediante cromatografía de interacción hidrófoba. Machold ha descrito el comportamiento de retención de la lactoferrina en varias resinas de interacción hidrófoba bajo una gama de concentraciones de sales (Machold et al, 2002, *J. Chromatogr. A*972, 3-19).

El Dr. Denis Petitclercq ha descrito diferentes métodos en la Solicitud de Patente WO 2006/119644 y el objetivo de su invención era proporcionar un procedimiento para eliminar el contaminante enzimático responsable de la degradación de la lactoferrina. La eliminación de estas enzimas o la adición de inhibidores específicos evitarían la degradación de una preparación de lactoferrina y la pérdida de actividad de la lactoferrina. Ha aplicado su procedimiento a toda la lactoferrina comercial demostrando que es posible mejorar la estabilidad y la actividad de la lactoferrina. Proporciona un método de purificación de la lactoferrina que comprende las etapas de contacto en modo de unión y elución y de manera adsorbente una solución de lactoferrina, con un adsorbente hidrófilo y con un hidrófobo con presencia de surfactante, ambos en presencia de un soluto excluido, y recolectando una fracción que contiene lactoferrina sustancialmente libre de enzima contaminante y/o inhibidor de lactoferrina.

Ha demostrado que, en comparación con la lactoferrina purificada que usa sus métodos, la lactoferrina comercial fabricada por el mismo proveedor, así como otros proveedores disponibles en el mercado, no mostró la misma actividad. En lo que respecta a la actividad antibacteriana, la lactoferrina purificada no perdió su actividad a una concentración mayor de lactoferrina en el medio (figura 4). Ninguna de las preparaciones comerciales de lactoferrina disponibles en el mercado fue capaz de mostrar una concentración mínima de inhibición y ha demostrado que estas lactoferrinas comerciales extraídas de la leche o el suero han perdido su actividad inhibidora del crecimiento a altas concentraciones. Sin embargo, el Dr. Petitclercq ha concluido que dicho fenómeno se debe a la presencia de proteasas o péptidos degradados de Lf, pero nunca ha mencionado la presencia de angiogenina.

El documento WO2006/119644 describe un método de purificación de la lactoferrina de una lactoferrina parcialmente purificada, pero ninguno describe un método de purificación de la lactoferrina de la leche desnatada antes de la pasteurización o la leche libre de caseinato, o el suero de queso o el calostro desnatado ni la lactoferrina como se define en la presente invención.

A pesar de todos los estudios, ninguno de los procedimientos industriales, ni ningún otro procedimiento existente para la purificación a escala comercial, son capaces de purificar la lactoferrina tal como está presente en nuestros diferentes líquidos de secreción.

Sumario de la invención

Es un objeto de la invención eludir estos problemas y Lf de la misma calidad que se produce en el organismo, evitando la presencia de contaminantes tales como enzimas proteolíticas y la angiogenina, evitando la presencia de lipopolisacáridos bacterianos (incluyendo las endotoxinas), evitando la destrucción de las cadenas de glucano y la aparición de polímeros de Lf por cualquier tratamiento térmico con una temperatura superior a 55 °C se ha desarrollado usando una tecnología novedosa que permite producir comercialmente una Lf que puede tener al menos 90% de sus actividades biológicas.

Es un objeto de la invención proporcionar un método para la producción de lactoferrina que comprenda al menos las etapas de:

a) desechar la materia prima que no ha sido tratada a una temperatura superior a 50 °C y seleccionada del grupo que consiste en leche desnatada, leche libre de caseinato, suero de queso y calostro desnatado;

b) someter esta materia prima a una etapa de extracción en una resina de intercambio catiónico usando una concentración de cloruro de sodio excluida para obtener una solución de lactenina (LN) o proteína básica de la leche (MBP);

c) someter esta solución de LN o MBP a una etapa de purificación en una resina de intercambio catiónico equilibrada con una solución reguladora de acetato a un pH entre 4 y 9 y eluida con una solución reguladora de cloruro de sodio a lo largo de cuatro etapas de elución:

i) una etapa para recolectar impurezas, realizada a un pH de 6.5 y con una solución de NaCl a una concentración de 0.05 M;

- ii) una etapa para recolectar la lactoperoxidasa, realizada con una solución de NaCl a una concentración de 0.3 M a un pH de 6.5;
- iii) una etapa para recolectar LPS, otras endotoxinas y angiogenina, realizada y con una solución de NaCl a una concentración de 0.5 M a un pH de 8; y
- 5 iv) una etapa para recolectar la lactoferrina, realizada y con una solución de NaCl a una concentración de 1 M a un pH de 8; y
- d) recolectar una fracción que contiene lactoferrina que tiene más del 95% de pureza, que no tiene polímeros y que comprende menos de 50 pg/mg de LPS, otras endotoxinas y angiogenina.
- 10 Según un objeto adicional de la invención, la etapa de recolección de la lactoferrina del método según la invención se lleva a cabo en una sala limpia.
- Según un aspecto adicional de la invención, las etapas de extracción o purificación en una resina de intercambio catiónico se realizan en modo de flujo continuo o de unión y elución.
- Según un aspecto adicional de la invención, se realiza una etapa de concentración y diafiltración después de la etapa b).
- 15 Es otro objeto de la invención proporcionar lactoferrina obtenida por el método de la invención como se describe anteriormente, en el que dicha lactoferrina tiene más del 95% de pureza, menos de 50 pg/mg de LPS, otras endotoxinas y angiogenina, y un nivel de saturación de hierro comprendido entre 9% y 20%.
- Según un aspecto adicional de la invención, la lactoferrina es para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística y la inflamación oral asociada a la bacteria de la biopelícula.
- 20 Según un aspecto adicional de la invención, la lactoferrina es para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas respiratorias y se selecciona de URTI y LRTI.
- Según otro aspecto adicional de la invención, la lactoferrina se usa después del tratamiento de la gastroenteritis.
- Según un aspecto aún más de la invención, la lactoferrina es para su uso en el tratamiento de tumores.
- 25 En otro aspecto, la invención tiene como objetivo proteger el uso de la lactoferrina de la invención para la preparación de soluciones para el cuidado de heridas, soluciones para el cuidado de los oídos, ungüentos para la curación de heridas o soluciones para el cuidado de los ojos.
- Según un aspecto adicional de la invención, la lactoferrina es para su uso en el tratamiento de pacientes con deficiencia de hierro y anemia por deficiencia de hierro.
- La invención se define por el conjunto de reivindicaciones adjuntas.
- 30 Breve descripción de los dibujos
- La figura 1 ilustra la localización del LPS y el lípido A (endotoxina) en la pared celular de las bacterias Gram negativas.
- La figura 2 ilustra el cromatograma en la cromatografía FPLC de intercambio iónico de la Lf (línea completa) que no se ha sometido a un tratamiento térmico y el cromatograma de la misma Lf que se ha sometido a un tratamiento térmico (línea gruesa).
- 35 La figura 3 ilustra el cromatograma en HPLC de fase inversa con una Lf que no se ha sometido a un tratamiento térmico y la misma Lf que se ha sometido a un tratamiento térmico.
- La figura 4 ilustra la determinación de las concentraciones inhibitorias mínimas (MIC) usando microdilución en caldo de Lf de bovino purificada en SP-Sepharose Fast Flow llamada Lf-NFQ en comparación con diferentes preparaciones comerciales de Lf.
- 40 La figura 5 ilustra un diagrama de flujo de la producción de lactoperoxidasa y lactoferrina.
- La figura 6 ilustra el diagrama general de la purificación de Lf.
- La figura 7 ilustra la medida de la capacidad de unión al hierro mediante una densidad óptica de la lactoferrina llevada gradualmente a una saturación completa mediante la adición sucesiva de partes alícuotas de una solución de hierro férrico.
- 45 La figura 8 ilustra la actividad de unión al hierro de la lactoferrina extraída de la leche pasteurizada, la lactoferrina de la leche UHT, la lactoferrina de la leche microfiltrada y la lactoferrina de la invención (Lf-NFQ).

La figura 9A y la figura 9B ilustran la actividad antibacteriana. La presencia de LPS en la estructura de Lf (Lf) disminuye su actividad antibacteriana en *Escherichia coli* en comparación con una Lf libre de LPS (Lf-NFQ).

La figura 10 ilustra la actividad antibacteriana. La presencia de LPS en la estructura de Lf (Lf) disminuyó su actividad antibacteriana contra *Helicobacter pylori* en comparación con una Lf libre de LPS (Lf-NFQ)

- 5 La figura 11 ilustra la actividad antioxidante de Lf-NFQ medida mediante un ensayo cinético y comparada con Lf extraída de leche bovina (12.000 pg de LPS/mg de Lf) y con Lf extraída de suero bovino (30.000 pg de LPS/mg de Lf).

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

- 10 Como Lf se desnaturaliza por tratamiento térmico dependiendo de las condiciones, las materias primas pasteurizadas tales como calostros bovinos, leche bovina y suero de queso no son apropiadas como fuente para la purificación de bLf (lactoferrina de bovino). Por lo tanto, la leche desnatada, el suero de queso y el calostro que no hayan sufrido un calentamiento riguroso pueden ser fuentes de bLf. Debido a que Lf tiene una naturaleza catiónica según su composición de aminoácidos, se puede purificar mediante cromatografía de intercambio catiónico, tal como carboximetil (CM)-Sephadex (Law et al., 1977; Yoshida et al., 2000) y este método de purificación es el procedimiento más popular para la purificación de bLf en empresas proveedoras de bLf. Por ejemplo, la leche desnatada (pH 6.7) o el suero de queso (pH 6.4) se filtra y se aplica a una columna de cromatografía de intercambio catiónico sin ajuste de pH.

Como se describe en la figura 5, el material que será eluido de una resina de intercambio catiónico (resina de extracción) usando una solución de alta concentración de NaCl (8%), se llama lactenina (LN) o proteína básica de la leche (MBP). La LN es una solución que contiene lactoferrina, lactoperoxidasa y algunas otras moléculas (+/- 5%).

- 20 Esta LN será microfiltrada, concentrada y diafiltrada antes de aplicarse a otra resina de intercambio catiónico equilibrada con una solución reguladora de acetato a pH 5.5 y que llamamos la resina de purificación. De hecho, durante esta segunda cromatografía, las diferentes moléculas contenidas en la LN se eluirán mediante aplicaciones de diferentes soluciones reguladoras que contienen diferentes concentraciones de NaCl. Esta segunda cromatografía es muy importante para obtener una lactoferrina como se reivindica. (Figura 6)

- 25 La lactoferrina se concentra por ultrafiltración y se separa del NaCl por diafiltración. Posteriormente, la solución de Lf se secará a baja temperatura y bajo vacío (tecnología de liofilización) y se almacenará en sobres de aluminio de grado alimenticio.

La lactoferrina obtenida por el procedimiento reivindicado en la siguiente descripción se llama Lf-NFQ.

Estabilidad térmica y química de la lactoferrina

- 30 Existen diferentes parámetros que se pueden usar para estudiar la estabilidad térmica de la lactoferrina. La desnaturalización del tratamiento térmico sigue una cinética de primer orden. La desnaturalización aumenta con la temperatura. La lactoferrina libre de hierro (Apo-Lactoferrina) muestra una desnaturalización más rápida que la lactoferrina saturada de hierro (Holo-Lactoferrina). Eso se refleja en una conformación más estable cuando se une al hierro. Durante la desnaturalización térmica, la ruptura de varios enlaces provoca cambios importantes en la estructura de Lf. La estabilidad térmica aumenta en presencia de otros componentes de la leche debido a la interacción entre la lactoferrina y los caseinatos y otras proteínas de la leche.

- 35 La lactoferrina que se extrae de la leche tiene un nivel de saturación de hierro entre el 9 y el 20% de la lactoferrina saturada de hierro. Sin embargo, después de la pasteurización de la leche o el suero de queso, la proteína que se extrae no tiene el mismo nivel de actividad ni los mismos valores en comparación con la lactoferrina, que se extrajo antes de cualquier tratamiento térmico de la leche o el suero de queso.

De hecho, el tratamiento térmico es capaz de destruir las cadenas de glucano de la molécula que son importantes para proteger la lactoferrina contra las enzimas proteolíticas que están presentes en el estómago y producir polímeros de Lf. Este efecto también se ha demostrado por el hecho de que cuando la lactoferrina se somete a un tratamiento térmico, la molécula tiene un mayor poder de absorción a 280 nm.

- 45 Actividad de unión al hierro de la lactoferrina

La actividad de la lactoferrina extraída de la leche microfiltrada ha sido probada por su actividad de unión al hierro. La lactoferrina se lleva gradualmente a la saturación completa mediante la adición sucesiva de partes alícuotas de una solución de hierro férrico. La tasa de saturación de hierro se sigue espectrofotométricamente a 465 nm.

- 50 La saturación se logra cuando la medida de la densidad óptica ya no varía (Figura 7). En el gráfico, hay dos formas de evaluar la tasa inicial de saturación de hierro al calcular la proporción de absorbancia medida a 465 nm para la proteína nativa (b1) y la proteína saturada (b2).

$$b1----- X 100 = \% \text{ de saturación inicial } b2$$

o calculando a_1/a donde

- a_1 : = μ moles de iones férricos unidos a la proteína nativa

- a = μ moles de hierro férrico unidos a la proteína saturada

$$a_1 \text{-----} \times 100 = \% \text{ de saturación inicial}$$

- 5 Cuando la lactoferrina está intacta y activa, se mantiene su capacidad de unión al hierro. Por otro lado, cuando la proteína se desnatura debido a un tratamiento UHT o se pierde parcialmente debido al tratamiento de pasteurización, pierde su capacidad de unión al hierro (Figura 8).

- 10 La lactoferrina de bovino tiene un nivel de saturación de hierro entre 9 y 20%. Los resultados han demostrado que la capacidad de hierro es similar entre una lactoferrina extraída de la leche microfiltrada y la lactoferrina de la invención. La diferencia entre los dos resultados no es significativa.

Actividad antibacterial

- 15 Como se explicó anteriormente, la funcionalidad de la actividad antimicrobiana depende de su conformación de proteínas, unión a metales y condiciones medias (Naidu et al., 1995). La actividad antimicrobiana aumenta cuando Lf se une a la superficie celular microbiana (Naidu et al., 1993). La interacción de alta afinidad de Lf con proteínas de membrana externa formadoras de poros de bacterias entéricas gramnegativas, incluida *Escherichia coli*, es crítica para el resultado antimicrobiano de Lf (Ellison et al., 1988).

De este modo, es importante que cuando produzcamos Lf a partir de leche de bovino o suero de queso, estemos seguros de que no hay más lipopolisacáridos bacterianos unidos en la estructura de Lf.

- 20 La lactoferrina se probó en dos microorganismos, *Escherichia coli* y *Helicobacter pylori*, los resultados se muestran en las figuras 9 y 10, respectivamente.

Procedimiento de *Escherichia coli*

Material biológico

E. coli K99 de BCCM/LMG bacteria Colección: laboratorium van Microbiology Universiteit Gent K.L. Lededanckstraat 35B, 9000 Gent

- 25 Medio selectivo SCC Coli/Coliforme cromógeno-agar Peptona agua

Agua destilada

Lotes de lactoferrina

Preparación de la solución bacteriana.

Se ponen en solución las cepas liofilizadas con 0.5 ml de peptona.

- 30 Rociar 100 μ l de la solución

Reproducir exactamente

Al mismo tiempo, tomar 100 μ l para poner 9 ml de peptona

Hacer 3 tubos e incubar durante 24 horas a 37 °C.

Tomar 1 ml de la solución bacteriana para tomar la O.D.

- 35 Hacer que la O.D. de la solución bacteriana alcance una concentración de 10^4 a 10^5 CFU/ml

Preparaciones de las soluciones de Lf.

Tomar 500 mg de cada lote de Lf

Agregar 100 ml de agua destilada.

Solución de 50 mg/ml.

- 40 Filtración de las soluciones.

ES 2 805 279 T3

En cada tubo de agua con peptona (9 ml), retirar 400 μ l para alcanzar un volumen de 8,6 ml y agregar 0,4 ml para alcanzar 2 mg/ml por cada Lf en polvo para analizar

Agregar 1 ml de la solución bacteriana 10^5 a 10^6 CFU/ml

Para el control del tubo, tomar 0,0 ml de solución de peptona y agregar 1 ml de solución bacteriana.

5 Manipulación

Hacer soluciones de diferenciación: 10^{-1} , -2, -3, -4, -5, -6, -7

Cultivo de las placas de Petri

Colocar 100 μ l de las diferentes soluciones diluidas en el medio de la placa de Petri

Dejar la placa de Petri a 37 °C, durante 24 horas.

10 Lectura

Después de 24 horas, se evalúa la CFU de E. coli.

Procedimiento de *Helicobacter pylori*

Material biológico

15 Cepa de Helicobacter pylori: cultivo de BCCM™ congelado LMG 8775:3 que se pedirá en la colección de bacterias BCCM/LMG:

Laboratorium van Microbiologie Universiteit Gent K.L. Ledeganckstraat 35B, 9000 Gent

Medio de Tripona Soya Agar con sangre de oveja en placa de Petri

Agua de peptona

Agua destilada

20 Lotes de lactoferrina

Preparación de la solución bacteriana.

Poner en solución las cepas liofilizadas con 0,5 ml de peptona

Rociar 100 μ l de la solución.

Reproducir exactamente

25 En la misma línea, tomar 100 μ l para poner 9 ml de peptona

Hacer 3 tubos e incubar durante 2 días en condiciones de anaerobiosis.

Tomar 1 ml de la solución bacteriana para tomar la O.D.

Hacer que la O.D. de la solución bacteriana alcance una concentración de 10^5 a 10^6 CFU/ml

Preparaciones de las soluciones de Lf.

30 Tomar 500 mg de cada lote de Lf

Agregar 10 ml de agua destilada

Soluciones de 50 mg/ml.

Filtración de las soluciones.

35 En cada tubo de agua con peptona (9 ml), retirar 400 μ l para alcanzar un volumen de 8,6 ml y agregar 0,4 ml para alcanzar 2 mg/ml por cada Lf en polvo para analizar

Agregar 1 ml de la solución bacteriana 10^5 a 10^6 CFU/ml

Para el control del tubo, tomar 9,0 ml de solución de peptona y agregar 1 ml de solución bacteriana.

Manipulación

Hacer diferentes diluciones: 10⁻¹, -1, -1, -4, -5, -6, -7

Cultivo de las placas de Petri

Colocar 100 µl de las diferentes soluciones diluidas en el medio de la placa de Petri

- 5 Dejar la placa de Petri a 37 °C, durante 2 días en condiciones anaerobias.

Lectura

Después de 2 días, se evaluó la CFU de H.P.

Proliferación prebiótica y salud intestinal.

Hay 2 posibilidades:

- 10 Ensayo de detección de impedancia de crecimiento y ensayo de densidad óptica de microescala

1) Ensayo de detección de impedancia de crecimiento

Se usa un sistema de control microbiano de bactómetro para controlar el crecimiento de cepas probióticas de ya sea *Lactobacillus* o *Bifidus* midiendo señales de impedancia (una función de capacitancia y conductancia) en los medios de cultivo.

- 15 Se agregó a los pocillos un volumen de 0,25 ml de Lf-NFQ seguido de 0,25 ml de suspensión bacteriana (104 células/ml) preparada en solución salina al 0,9%. La adición de 0,5 ml de suspensión bacteriana sirve como control. Los módulos inoculados se incubaron a 32 °C y los cambios de impedancia en los medios se controlaron continuamente por el Bactómetro a intervalos de 6 minutos durante 48 horas. Las curvas de crecimiento bacteriano se muestran gráficamente como cambios porcentuales de las señales de impedancia frente al tiempo de incubación. La cantidad de tiempo requerida para causar una serie de desviaciones significativas del valor de la impedancia de referencia se definió como el tiempo de detección. Si este tiempo de detección es menor que el control, se considera que las muestras de prueba provocan un "efecto prebiótico".

2) Ensayo de densidad óptica a microescala

- 25 Este método para medir el crecimiento microbiano in vitro se basa en el ensayo turbidométrico. En resumen, se agregan 0,1 ml de estéril del medio en el pocillo. Se agrega un volumen de 0,05 ml de solución de prueba a los pocillos designados seguido de la inoculación con 0,05 ml de suspensión de células microbianas que contiene +: -105 células/ml (diluido a partir de una O.D. de 1 a 660 nm = 109 células/ml). Después de la inoculación, los pocillos se incuban a 37 °C y el crecimiento microbiano se controla en diferentes momentos a medida que la turbidez cambia en los medios de cultivo midiendo la O.D. a 660 nm usando un lector de microplacas. Los pocillos que contienen caldo sin inóculos microbianos sirven como control de esterilidad. Los pocillos que contenían medio de caldo inoculado con bacterias, pero sin compuesto de prueba sirvieron como control de crecimiento positivo. El efecto prebiótico es cuando un agente ha mejorado la proliferación microbiana en comparación con el control del crecimiento.

- 30 La lactoferrina libre de LPS debería acortar en un 30% el tiempo de detección en comparación con el control. Normalmente, el tiempo de detección para probióticos se estima en 15 h, la lactoferrina libre de LPS debería acortarse en 4-5 h este tiempo de detección. Además, la multiplicación de las cepas de prueba de probióticos aumenta en > 100% con la lactoferrina libre de LPS, que es al menos dos veces más eficaz que la lactoferrina cubierta por lipopolisacáridos.

- 35 Para ser considerado como Lf-NFQ, la solución de Lf debería acortar en un 25 a 30% el tiempo de detección en comparación con el control y aumentar a un mínimo de 100% en comparación con el control después de 48 horas de incubación.

- 40 Como se ha descrito anteriormente, Lf provoca la inhibición del crecimiento microbiano por el mecanismo de estasis de privación de hierro. El hierro es crítico para muchas formas de vida, incluidos los patógenos intestinales, para generar ATP mediante el sistema de transporte de electrones dependiente del citocromo. Sin embargo, los ABL probióticos intestinales (ABL = Acidophilus, Bifidobacterium, Lactobacillus) son independientes de las vías del citocromo para la síntesis de energía celular. Por lo tanto, son selectivamente evasivas a la privación de hierro por estasis antimicrobiana por Lf. Este efecto prebiótico por Lf en el ambiente intestinal es un fenómeno de selección natural para enriquecer la flora probiótica beneficiosa y afectar la exclusión competitiva de patógenos nocivos por bacteriostasis. Es bien sabido que el intestino grueso de los lactantes está colonizado predominantemente por especies de bifidobacterias, que tienen efectos protectores contra los patógenos entéricos. La presencia de LPS y endotoxina en la superficie de Lf disminuirá este efecto prebiótico de la molécula (Tabla 2).

Tabla 2: Actividad prebiótica: la Lf comercial extraída del suero o de la leche tiene una actividad prebiótica más baja en comparación con la Lf-NFQ

Tabla 2

Actividad prebiótica	Lf-suero	Lf-leche	Lf-NFQ
Bifidobacterium spp (n=2)	124%	141%	213%
Lactobacillus spp (n=8)	97%	145%	200%
"Actividad antioxidante"			

5 El ensayo de poder reductor férrico/antioxidante (FRAP BENZIE I.F.F. and STRAIN J.J. in Methods in Enzymology, Vol 299, 1990, p 15) como se describe a continuación se ha usado para medir la actividad antioxidante de la Lf-NFQ. El reactivo FRAP se preparó mezclando 40 ml de solución reguladora de acetato 0,3 M (pH 3.6), 4 ml de cloruro férrico 20 mM y 4 ml de TPTZ 10 mM (2,4,6-tris (2-piridil-s-triazina). Las soluciones en serie (0,1 a 1,0 mM) de ácido 6-OH-2,5,7,8, -tetrametilcroman-2-carboxílico se usaron como patrones FRAP. Todos los reactivos se llevaron a 37 °C antes del ensayo. El ensayo FRAP se realizó en una microplaca de 96 pocillos mezclando 20 µl de agua destilada, 10 µl de muestra Lf-NFQ y 150 µl de reactivo FRAP. En estudios combinados, 10 µl de agua destilada y 20 µl de Lf-NFQ se mezclaron con 150 µl de reactivo FRAP. Después de una incubación instantánea a 37 °C, durante 5 min (para ácido ascórbico) y durante un lapso de tiempo de 5 min a 24 horas para Lf-NFQ). La absorbancia de la mezcla de reacción se midió a 593 nm. Los compuestos de prueba recibieron puntuaciones antioxidantes (FRAP) en comparación con el valor FRAP del ácido ascórbico.

Una lactoferrina libre de LPS (Lf-NFQ) debería alcanzar un valor de 0,660 mM en 6 horas y un pico de 0,994 mM en 24 horas (Figura 11).

Una Lf se puede considerar aceptable para alcanzar un valor entre 90 y 100% de este valor.

20 La unión de lipopolisacáridos bacterianos (LPS) a Lf se ha implicado en el mecanismo microbicida de la proteína para algunas bacterias gramnegativas (Ellison et al., 1991). Miyazawa y sus colaboradores han demostrado (1991) que la unión de LPS a la lactoferrina altera el mecanismo de unión de la lactoferrina a una línea celular mielóide. Dada la alta probabilidad de que Lf encontrara cantidades considerables de LPS en sitios de infecciones gramnegativas, se examinó el impacto de la unión de LPS a Lf en la capacidad de inhibir la formación de OH[•] resultante del sistema de xantina/xantina oxidasa suplementado con hierro según lo evaluado por el ensayo de oxidación de desoxirribosa (Cohen et al., 1992).

25 El mecanismo mediante el cual la unión de LPS a la lactoferrina disminuye su efecto de cebado sobre los neutrófilos se puede asimilar a diferentes supuestos. Las posibilidades incluyen una disminución en la afinidad por el receptor LPS o una alteración simultánea en el mecanismo de transducción de señales que conduce al cebado. Sin embargo, los datos sugieren la posibilidad de que la unión de LPS a la lactoferrina pueda proporcionar un medio para disminuir los eventos proinflamatorios que ocurren en el escenario del shock séptico. De acuerdo con la posibilidad, se ha informado que la lactoferrina disminuye la mortalidad en un modelo de ratón de choque séptico inducido por E. coli (Zagulski et al., 1989). En conclusión, como se puede observar en la figura 10, la presencia de LPS en la estructura de Lf limita fuertemente su actividad antioxidante.

35 Como se ilustra en la figura 11, se ha demostrado que LPS y Lf libre de endotoxinas (Lf-NFQ) tienen una actividad antioxidante superior en comparación con su fuente original, la Lf-suero o Lf-leche.

Como se ilustra en la tabla 3, se ha demostrado que LPS-Lf es capaz de inducir la producción de factor de necrosis tumoral (TNF- α), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 8 (IL-8).

40 Para analizar esta actividad de Lf, se ha estudiado su papel de regulación negativa en la expresión de citoquinas proinflamatorias en células epiteliales intestinales infectadas con E. coli HB101 (pRI203) y ninguna infectada. Para esta experiencia, se ha seguido el protocolo descrito por Berlutti (Berlutti et al., 2006), usando células Caco-2 y la muestra Lf-A, Lf-B y Lf-C con 1.650 pg de LP/mg de Lf, 22.000 pg de LPS/mg de Lf y 105.000 pg/mg de Lf respectivamente y se han comparado los resultados con Lf-NFQ (39 pg de LPS/mg de Lf). Cuando se infectaron las células Caco-2 sin la presencia de Lf, se observó un aumento significativo en la expresión de las citoquinas proinflamatorias, tales como 11-6, 11-8 y TNF- α en comparación con las células no infectadas (Tabla 3). En presencia de Lf, la expresión de las citoquinas se reduce en el caso de Lf-NFQ pero no en el caso de las otras muestras de Lf (Tabla 3). Se puede concluir que la presencia de LPS en la estructura de Lf inhibe su actividad para regulación negativa de la expresión de las citoquinas por las células infectadas. Lo sorprendente fue observar que, en el caso de células no infectadas en presencia de Lf que contienen una cierta cantidad de LPS unida a su estructura, las células pueden

inducir la expresión de citoquinas y que esta expresión depende de la concentración del LPS unido en la estructura de Lf, lo que no fue el caso para la Lf-NFQ que solo tenía 39 pg de LPS/mg de Lf (Tabla 3). Esta expresión podría deberse al hecho de que es posible que algunos LPS se separen de la estructura de Lf debido al medio usado para el cultivo celular y desempeñen un papel como agente proinflamatorio hacia las células no infectadas. Este papel parece más importante que el papel de regulación negativa de la Lf.

5

El protocolo usado para dicha prueba es el siguiente

Cultivo de células

10

Las células Caco-2 de carcinoma de colon humano crecieron como monocapa semiconfluente en medio Eagle modificado por Dulbecco suplementado con 1.2 gr de NaHCO₃/litro, 2 mmol de glutamina/litro, 100 U de penicilina/ml, 0.1 mg de estreptomycin/ml y 20 % de suero de ternera fetal inactivado por calor en una incubadora de CO₂ al 5% a 37 °C. Doce horas antes de la infección, la monocapa se lavó con PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ y luego se cultivó en medios frescos sin suero de ternera fetal para evitar la presencia de transferrina durante la infección.

Infección de células huésped con *E. coli* HB101 (pRI203)

15

El método ha sido descrito por Berlutti et al 2006. La monocapa de células Caco-2 semiconfluente se ha infectado con una multiplicidad de infección 100 bacterias por célula con *E. coli* HB101 (pRI203) en ausencia o presencia de Lf libre de LPS o en presencia de Lf que contiene diferentes niveles de LPS (100 µg de proteína/ml). Después de 4 h de incubación, las células se lavaron ampliamente con PBS, sin Ca²⁺ y Mg²⁺. Después del lavado, se agregó medio fresco, que contenía 100 µg de gentamicina/ml, a monocapas infectadas con *E. coli* HB101 (pRI203) para matar las bacterias extracelulares, y las células se incubaron durante 2 horas más a 37 °C y se lavaron abundantemente. Luego, las monocapas se trataron con 0.3 ml de mezcla de tripsina-EDTA (0.05% de tripsina (1/250) y 0.02% de EDTA) durante 5 minutos a 37 °C y se lisaron mediante la adición de 0.5 ml de ácido desoxicólico al 1%. Los lisados celulares se diluyeron en PBS sin Ca²⁺ y Mg²⁺ y se colocaron en placas en agar con ampicilina (100 µg/ml) para cuantificar el número de *E. coli* HB101 (pRI203) intracelular viable.

20

Detección de IL-6, IL-8 y factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α) en sobrenadantes de Caco-2 por ELISA

25

Según lo descrito por Berlutti et al 2006, la monocapa de células Caco-2 semiconfluente se infectó como se describe aquí anteriormente, ya sea en ausencia o en presencia de Lf libre de LPS o en presencia de Lf que contiene diferentes niveles de LPS (100 µg de proteína/ml). Después de 4 h de incubación, las células se lavaron ampliamente en PBS, se agregaron monocapas con medio nuevo que contenía 100 µg de gentamicina/ml, y las células se incubaron durante 24 horas más a 37 °C. Al final, se recogieron los sobrenadantes para cada pocillo, y la concentración de IL-6, IL-8 y TNF-α se determinó usando kits estándar de ELISA Quantikine (R&D Systems, Wiesbaden, Alemania) y kits de HBT (Holland Biotechnology BV, Firma Bierman, Bad Nauheim, Alemania).

30

Tabla 3

Ninguna célula Caco-2 infectada					
Citoquinas (pg/ml)	No Lf	Lf-NFQ	Lf-A	Lf-B	Lf-C
TNF-α	44	40	105	130	165
IL-6	112	87	140	220	430
IL-8	2700	2750	3600	3650	4600
Células Caco-2 infectadas con <i>E. coli</i> HB101 (pRI203)					
Citoquinas(pg/ml)	No Lf	Lf-NFQ	Lf-A	Lf-B	Lf-C
TNF-α	160	48	154	164	160
IL-6	1200	150	1240	1350	1300
IL-8	12250	3200	10700	10800	11500

Tabla 3: Se incubaron células Caco-2 no infectadas o células Caco-2 infectadas con E. coli HB101 (pRI203) en presencia o ausencia de Lf-NFQ, Lf-A, Lf-B, Lf-C (100 µg/ml). Las concentraciones de citoquinas secretadas se determinaron por ELISA. Los valores de P <0.01 se consideraron significativos.

Prueba de limulus

5 Como se ha descrito aquí anteriormente, la presencia de LPS y endotoxinas se considera uno de los contaminantes más importantes para la reducción del rendimiento de la actividad de la Lf. Basado en los tipos y niveles de contaminantes, así como las garantías de calidad microbiana con una buena práctica de fabricación en la fabricación a escala industrial de Lf, el procedimiento de purificación se ha desarrollado usando una solución reguladora específica como agentes descontaminantes durante las diferentes etapas del procedimiento. Esta tecnología podría ampliar sistemáticamente el alcance del tratamiento para la reducción de la contaminación para mejorar las propiedades multifuncionales de Lf, creando así un poderoso sistema fisiológico.

Además, durante el procedimiento de purificación, el agua que se ha usado para preparar todas las soluciones reguladoras se ha destilado y tratado por microfiltración, ozono (O3) y por UV 254 nm. Esta agua estaba libre de pirógenos.

15 La carga biológica de diferentes preparaciones comerciales de Lf se midió mediante ensayos estándar según the United States Food Administration (FDA) Bacteriological Analytical Manual. La contaminación por LPS y endotoxinas en preparaciones comerciales de Lf se cuantificó mediante el ensayo de lisado de amebocitos de Limulus usando el kit de prueba desarrollado por Cambrex Bioscience, Walkerville, MD. El análisis de la Lf comercial reveló que la Lf derivada del suero albergaba más carga biológica que la Lf derivada de la leche. Una porción significativa de los recuentos de placas aeróbicas de Lf derivada del suero se identificaron como microorganismos grampositivos, como Penicillium spp y Aspergillus spp. Los niveles de LPS y endotoxina de ambas preparaciones comerciales de Lf reflejaron sus cargas bacterianas coliformes y gramnegativas. La mediana de LPS y endotoxina en la Lf derivada del suero fue aproximadamente 3 veces mayor que en la Lf derivada de la leche. Los contaminantes de LPS y endotoxinas en ambas preparaciones de Lf fueron biológicamente activos e indujeron la producción de TNF-α (factor de necrosis tumoral) en monocitos estimulados y células de enterocitos (células Caco-2) (Tabla 3).

Para evitar tal problema, la cantidad de LPS y endotoxinas que pueden cubrir la estructura de la lactoferrina, debe estar en un valor entre 50 a 100 pg/mg de lactoferrina con una preferencia de un valor <50 pg/mg de Lf.

Actividad en la mucosa celular intestinal

30 Algunos estudios han demostrado que la Lf en el laboratorio puede tener una actividad en la renovación de las células de la mucosa intestinal. Se ha estudiado esta actividad en comparación con un control, una Lf comercial estándar y la Lf-NFQ cuando esta molécula se agrega a un régimen especial a los niños de 5 a 9 meses que han sido hospitalizados debido a una gastroenteritis. La concentración de Lf fue similar a la Lf suministrada por la leche materna (15 mg/kg/día). Se realizó una biopsia de jejunal el día 2 y el día 4 después del inicio del tratamiento y también 5 días después. La renovación celular se evaluó mediante la técnica de coloración inmune (inmunotinción con ciclina PCNA - Galand et Degraef, Cell tissue Kinet, 1989, 22, 383-392). Veinte pacientes han recibido el régimen especial sin Lf, diecisiete pacientes han recibido el régimen especial que contiene la Lf comercial y dieciocho pacientes han recibido el régimen especial que contiene la Lf-NFQ. El porcentaje en células de células mitóticas de fase S no fue significativamente diferente en los tres grupos durante los primeros 4 días del tratamiento (6 a 15%).

40 5 días después, el porcentaje de células en la fase S mitótica fue significativamente diferente, se observa un rápido aumento en ambos grupos Lf, del 12 al 15% para los lactantes que recibieron la Lf comercial y del 18 al 21% para los lactantes quienes recibieron la Lf-NFQ en comparación con el grupo de control donde el nivel fue del 5 al 8%.

45 Además, las actividades de disacaridasa de los enterocitos del borde ciliado aumentaron para ambos grupos Lf se describen en la tabla 4 y permanecen bajas para el grupo control. Estos resultados sugieren que Lf tiene una acción favorable en la renovación de enterocitos en la fase de recuperación de la gastroenteritis aguda. Esta acción fue superior en el caso de Lf-NFQ en comparación con una Lf comercial.

Tabla 4

Estudio: aumento de la renovación de enterocitos durante la gastroenteritis aguda después de la adición de Lf al régimen de realimentación.		
Prueba:	17 lactantes- 18 lactantes -	edad: 5 a 10 meses- Lf comercial: 15 mg/kg/día edad: 5 a 9 meses- Lf-NFQ: 15 mg/kg/día
Control:	20 lactantes-	edad: 5 a 15-meses- Sin Lf
Biopsias intestinales en el día (2-4) y 5 días después		

Renovación de enterocitos (ciclina/PCNA)			
	Control	Lf comercial	Lf-NFQ
Día 2-4: células mitóticas en fase S	6 - 15	6 -15	6 - 15
5 días después: células mitóticas en fase S	5 - 8	12 - 15	18-21
disacaridasa del borde ciliado			
	Control	Lf comercial	Lf-NFQ
Lactasa:	3 - 5%	10-12%	24%
Maltasa	2 - 6%	19-20%	31%
Sucrosa	2 - 4%	10 - 12%	24%

Ejemplo:

Materias primas

5 Como se explicó, para evitar la desnaturalización de la lactoferrina y/o la destrucción de sus cadenas de glucano y/o la aparición de polímeros de Lf por tratamiento térmico, es importante extraer Lf de la materia prima no pasteurizada tal como la leche desnatada antes de la pasteurización o leche libre de caseinato, suero de queso o calostro desnatado.

En primer lugar, la materia prima se recoge a un máximo de 10 °C en las granjas que han recibido un número de control de seguridad de la AFSCA (Federal Agency of the Security of the Food Chain).

10 La materia prima se desnata a 50 °C y no necesita microfiltrarse antes para extraer la LN que contiene Lf. Sin embargo, algunas cooperativas de leche prefieren microfiltrar la materia prima en membranas cerámicas de 1,4 µm que constituyen para ellos un reemplazo de la pasteurización.

Extracción de la lactoferrina.

15 La cromatografía en columna de extracción cuya parte activa que tiene un volumen de 12 m³ contiene 2.000 litros (lecho fluidizado) o más de resina de extracción (dependiendo de la cantidad de materia prima que se va a tratar). Se aplica la materia prima a través de esta resina de intercambio catiónico y las moléculas bajo iones catiónicos de pH 6,6 se unen a la resina, por lo que esta resina puede extraer la LN. La LN es una mezcla compuesta principalmente por proteínas/enzimas básicas. Teniendo en cuenta el color de las moléculas, es fácil observar su unión a la resina. Se observaron desde el principio los cambios de la resina de las cuotas blancas a las negras a la unión de las moléculas básicas y principalmente debido a la lactoperoxidasa (que se caracteriza por un color verde oscuro del cual predomina el color. La velocidad de flujo puede ser hecho entre 25.000 litros y 50.000 litros por hora, dependiendo de la calidad, la cantidad de materia prima y su origen.

25 Se continua aplicando la materia prima hasta que se haya saturado la capacidad de unión de la resina (65% de Lf, 30% de LP y 5% de contaminantes) y se observará que el color de la resina todavía es negro. En base al pH isoeléctrico de las moléculas, Lf representa el pH isoeléctrico, el isoeléctrico más alto, se puede continuar aplicando la materia prima a través de la columna y se observará que Lf puede mover las otras moléculas de las LN unidas a la resina y ocupan su lugar en la resina. Después de un cierto tiempo correspondiente a un volumen 2,5 veces equivalente al volumen necesario para saturar la resina, se puede observar que la resina se vuelve roja, lo que significa que la resina tiene casi solo Lf unida a su soporte. En tales condiciones, la lactenina estará compuesta de 88% de Lf, 10% de LP y 2% de contaminantes.

30 Esta LN de la cual la concentración de sus componentes dependerá de la fuente de la materia prima, del tiempo o del volumen que se haya aplicado, se eluirá mediante la aplicación de una solución de NaCl 1,35 M (8%). La solución tan recogida que se llama lactenina (LN) o proteína básica de la leche (MBP), se concentrará y se diafiltrará usando membranas de 30 kD. Teniendo en cuenta el momento en que comenzaremos el procedimiento de purificación (segunda etapa), la solución de MBP se microfiltrará a través de membranas cerámicas de 0,8 µm.

35 Purificación de la lactoferrina.

La LN se almacena a 4 °C antes de aplicarse a otra resina de intercambio catiónico. La solución de LN se aplicará sobre una resina de intercambio catiónico. El volumen que se aplicará dependerá del volumen de la resina en proporción con la concentración de lactoferrina en la LN. Esta resina de purificación es una Sepharose Fast Flow fabricada por Amersham.

- 5 Todos los días se aplicará un cierto volumen de la solución de LN, dependiendo del volumen de la resina de purificación de la resina de intercambio catiónico equilibrada con una solución reguladora de acetato de sodio 50 mM pH 4 a 8,8 y una solución de NaCl a concentración de 0.02 M a 1.5 M.

El procedimiento de purificación se procederá de la siguiente manera:

- Impurezas A: eluidas con una solución reguladora de acetato de sodio, pH 6,5, NaCl 0,05 M
- 10 - Lactoperoxidasa: eluida con una solución reguladora de acetato de sodio, pH 6,5, NaCl 0,3M
- LPS, endotoxina, proteasas y angiogenina: se eluyen usando una solución reguladora acetato de sodio, pH 8, NaCl 0,5 M
- Lactoferrina: se eluyó con una solución reguladora de acetato de amonio, pH 8, NaCl 1M.

La Lf eluida, se recogerá en una sala limpia, como una sala limpia de flujo laminar.

- 15 Ultrafiltración - diafiltración

La solución de lactoferrina se concentra por ultrafiltración (ultrafiltración tangencial) usando membranas orgánicas de 30 kD y se diafiltra para obtener una solución final de 3M.

Concentración

La solución de lactoferrina de baja conductividad se concentra después para alcanzar una concentración del 15-16%.

- 20 Microfiltración

La lactoferrina se somete a una microfiltración final usando membranas de 0,22 µm.

Liofilización

La solución de lactoferrina se liofiliza a 45 °C al vacío.

Molienda

- 25 Para algunas aplicaciones, el polvo de lactoferrina se tritura y se microniza para obtener un polvo de 80 mallas.

Mezcla

La producción diferente de lactoferrina se mezclará para obtener un lote de 200 kg. Se realizarán muestras de 50 gr y 10 gr.

Embalaje

- 30 El polvo de lactoferrina se embala en sobres de aluminio y polietileno de grado alimenticio.

Todas las etapas donde se maneja o manipula la lactoferrina purificada se llevan a cabo en un espacio cerrado controlado ambientalmente para evitar la contaminación de la lactoferrina purificada, por ejemplo, salas limpias asépticas.

- 35 También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, para acelerar la maduración del tracto gastrointestinal en el recién nacido, o la reparación del tejido de la mucosa intestinal en condiciones de recuperación de una gastroenteritis.

También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, para aumentar la síntesis hepática en el recién nacido.

- 40 También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, para mejorar la actividad asesina (NK) natural de los monocitos y aumentar las funciones de citotoxicidad tanto de las células asesinas activadas por linfocitos (LAK) como de NK.

También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, como un agente antitumoral potencial a través de sus receptores específicos en macrófagos, linfocitos T y B y células de leucemia.

También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, para reducir la expresión de algunas citoquinas proinflamatorias.

5 También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, para inhibir o matar bacterias o para tratar enfermedades asociadas a bacterias de biopelícula, tales como fibrosis quística o inflamación oral.

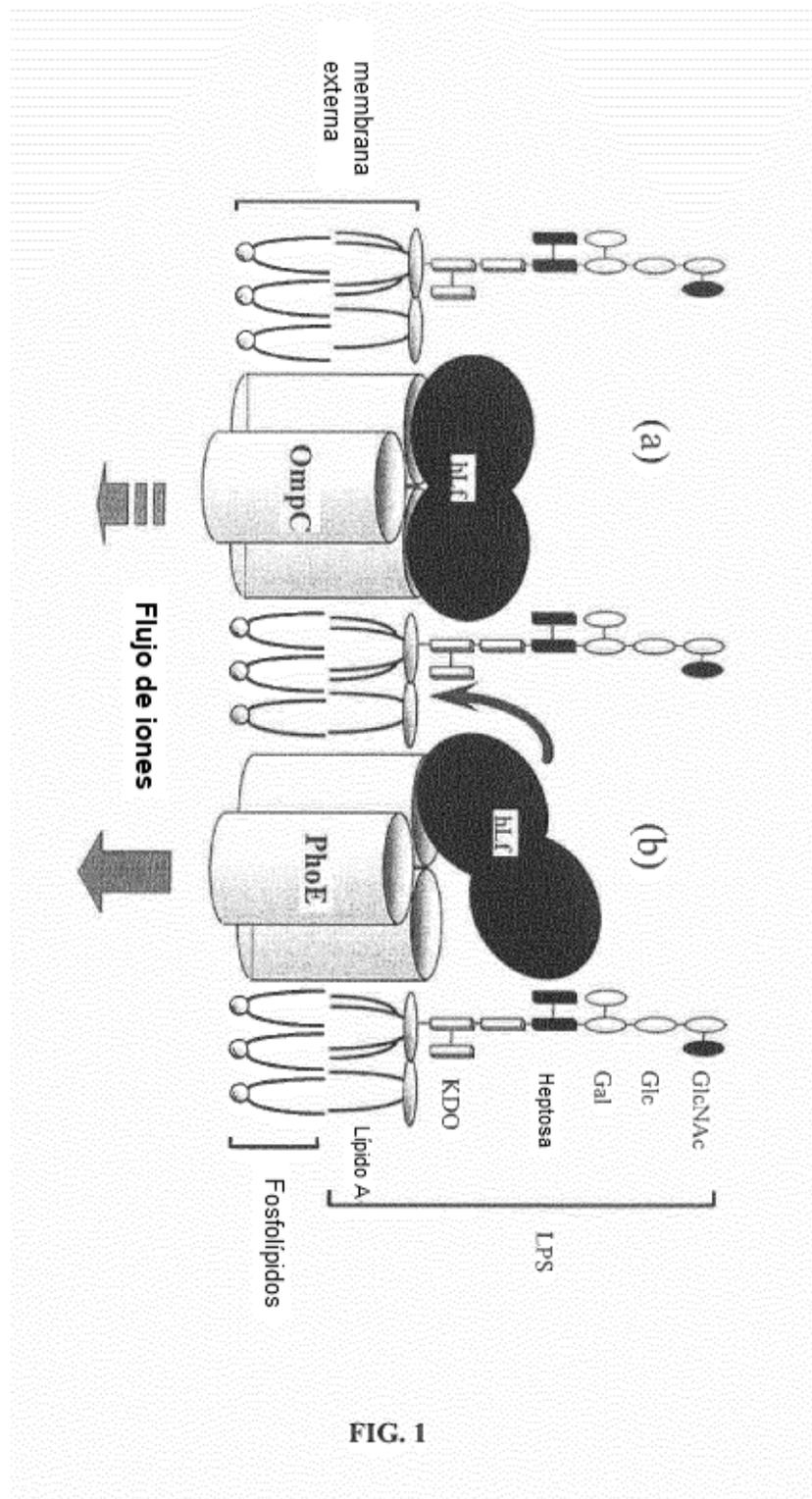
También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, para preparar soluciones para el cuidado de heridas, soluciones para el cuidado de heridas, soluciones para el cuidado del oído, ungüentos para la curación de heridas o soluciones para el cuidado de los ojos.

10 También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, para la absorción de hierro a través de las células epiteliales en el caso de pacientes con deficiencia de hierro y anemia por deficiencia de hierro y también para mujeres embarazadas.

También se discute el uso de la lactoferrina obtenida por el método descrito anteriormente, para tratar enfermedades infecciosas respiratorias (URTI y LRTI).

REIVINDICACIONES

1. Método de producción de lactoferrina que comprende al menos las etapas de:
- a) desechar la materia prima que no ha sido tratada a una temperatura superior a 50 °C y seleccionada del grupo que consiste en leche desnatada, leche libre de caseinato, suero de queso y calostro desnatado;
- 5 b) someter esta materia prima a una etapa de extracción en una resina de intercambio catiónico usando una concentración de cloruro de sodio de un soluto excluido para obtener una solución de lactenina (LN) o proteína básica de la leche (MBP);
- c) someter esta solución de LN o MBP a una etapa de purificación en una resina de intercambio catiónico equilibrada con una solución reguladora de acetato a un pH entre 4 y 9 y eluída con una solución reguladora de cloruro de sodio durante cuatro etapas de elución:
- 10 i. una etapa para recolectar impurezas, realizada a un pH de 6.5 y con una solución de NaCl a una concentración de 0.05 M;
- ii) una etapa para recolectar lactoperoxidasa, realizada con una solución de NaCl a una concentración de 0.3 M a un pH de 6.5;
- 15 iii) una etapa para recolectar LPS, otras endotoxinas y angiogenina, realizada y con una solución de NaCl a una concentración de 0.5 M a un pH de 8; y
- iv. una etapa para recolectar lactoferrina, realizada y con una solución de NaCl a una concentración de 1 M a un pH de 8;
- y
- 20 d) recolectar una fracción que contiene lactoferrina que tiene más del 95% de pureza, que no tiene polímeros y que comprende menos de 50 pg/mg de LPS, otras endotoxinas y angiogenina.
2. El método según la reivindicación 1, en el que la etapa de recolección de la lactoferrina se lleva a cabo en una habitación limpia.
3. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, en el que las etapas de extracción o purificación en una resina de intercambio catiónico se realizan en modo de flujo continuo o de unión y elución.
- 25 4. El método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se realiza una etapa de concentración y diafiltración después de la etapa b).
5. La lactoferrina obtenida por el método según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que dicha lactoferrina tiene más del 95% de pureza, menos de 50 pg/mg de LPS, otras endotoxinas y angiogenina, y un nivel de saturación de hierro comprendido entre 9 % y 20 %.
- 30 6. La lactoferrina de la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de la fibrosis quística y la inflamación oral asociada a la bacteria de la biopelícula.
7. La lactoferrina de la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de enfermedades infecciosas respiratorias y seleccionada entre URTI y LRTI.
- 35 8. La lactoferrina de la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de gastroenteritis.
9. La lactoferrina de la reivindicación 5, para su uso en el tratamiento de tumores.
10. Uso de la lactoferrina según la reivindicación 5 para la preparación de soluciones para el cuidado de heridas, soluciones para el cuidado de los oídos, ungüentos para la curación de heridas o soluciones para el cuidado de los ojos.
- 40 11. La lactoferrina obtenida según la reivindicación 5 para su uso en el tratamiento de pacientes con deficiencia de hierro y pacientes con anemia por deficiencia de hierro.



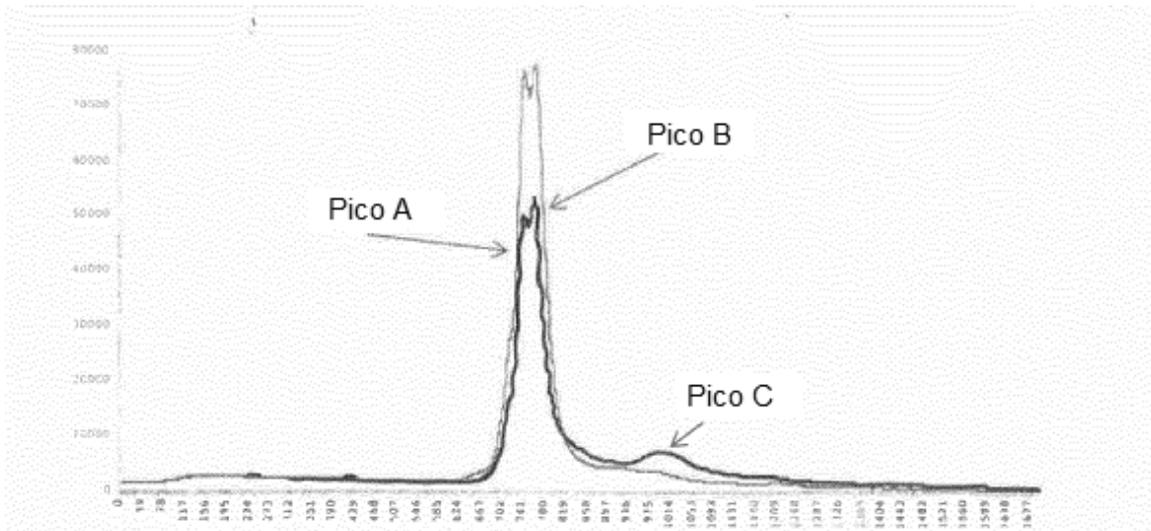


FIG. 2

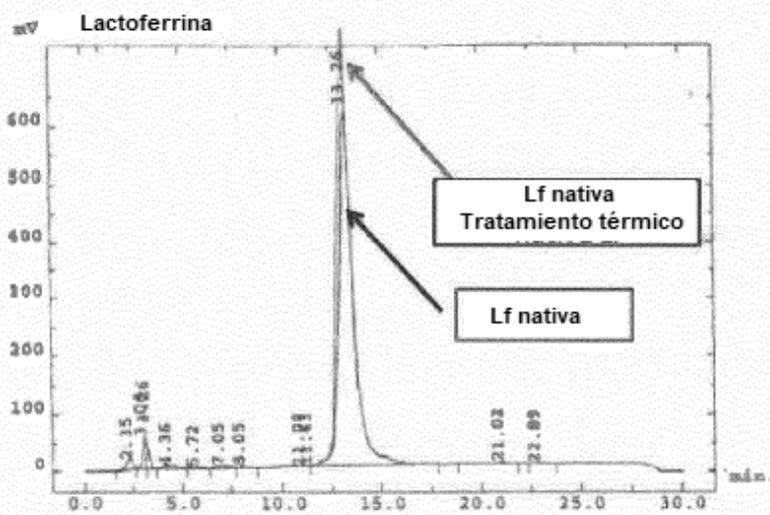
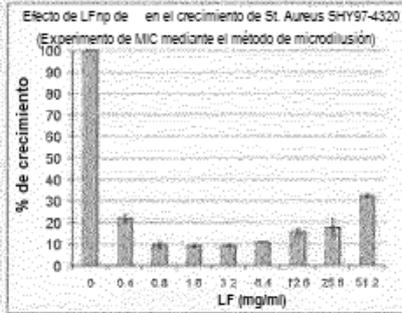


FIG. 3

**LF: Actividad in vitro
St. aureus SHY97-4320**



Lf np = Lf no pura encontrada en el mercado

LF NFQ = LF - Pura

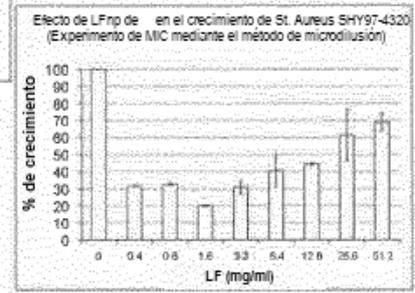
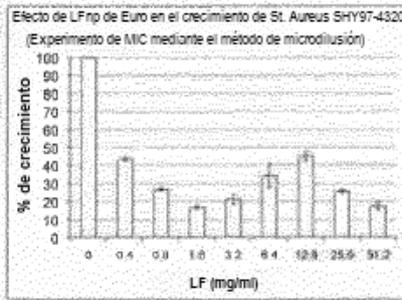
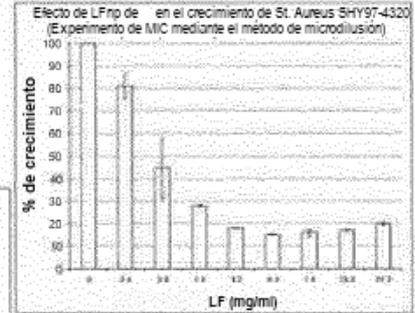
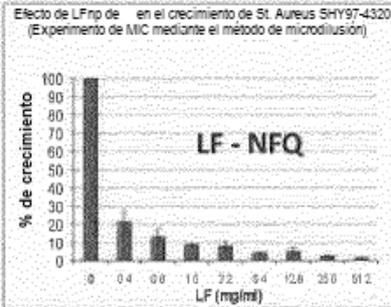


FIG. 4

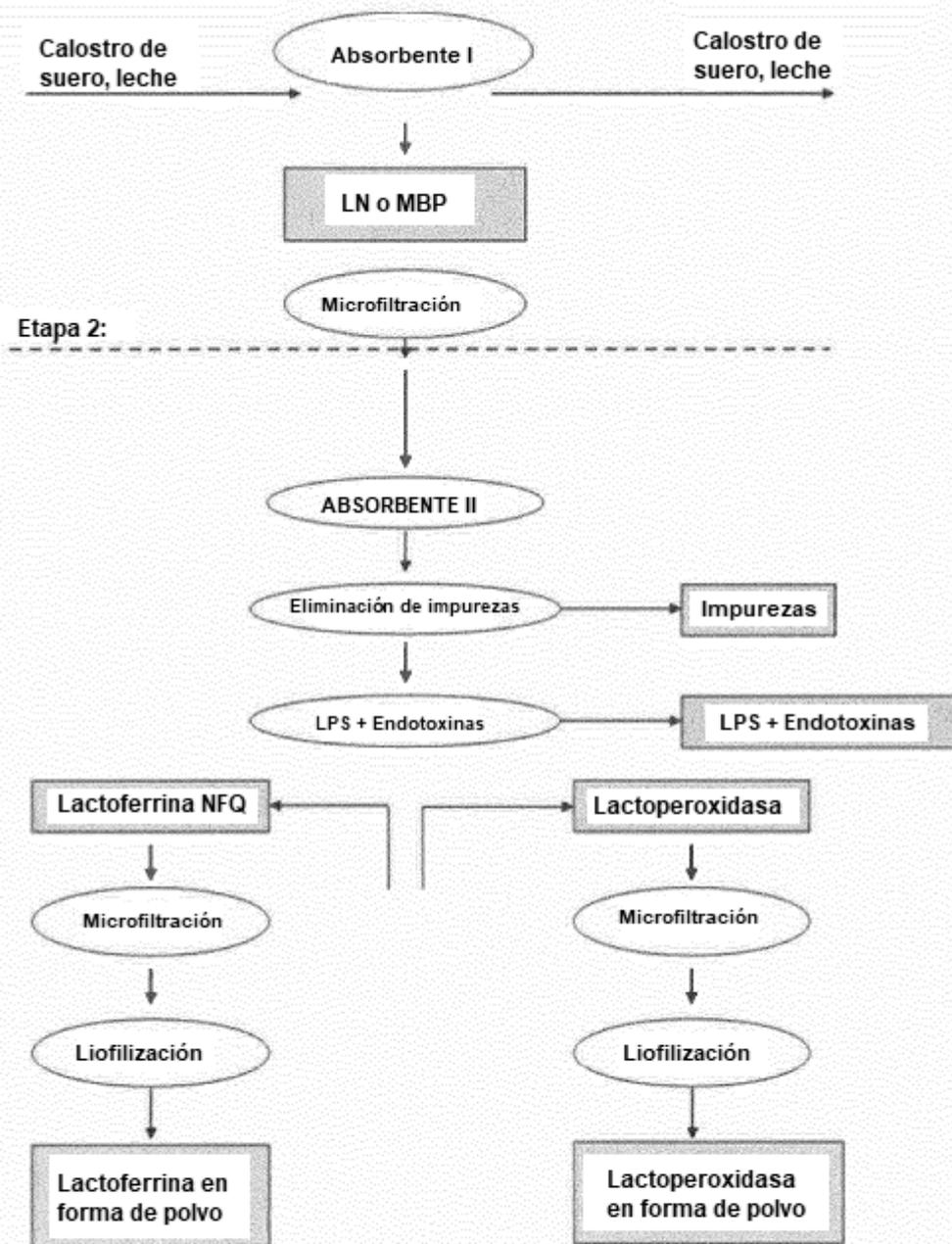


FIG. 5

Figura 2

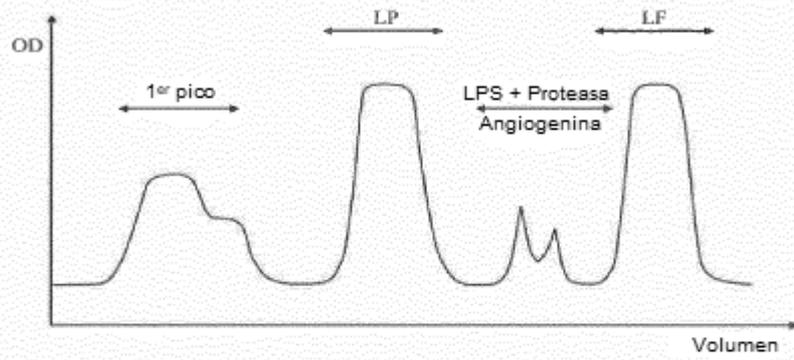


FIG. 6

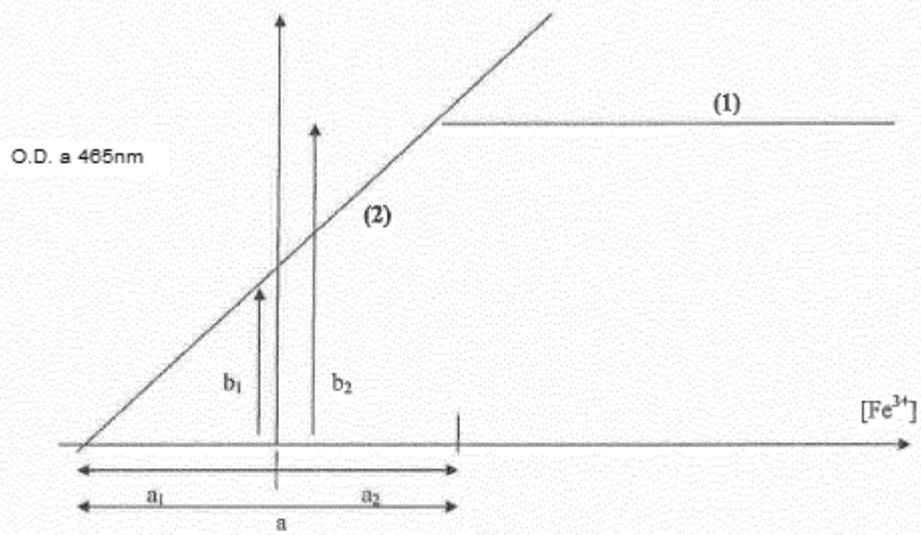


FIG. 7

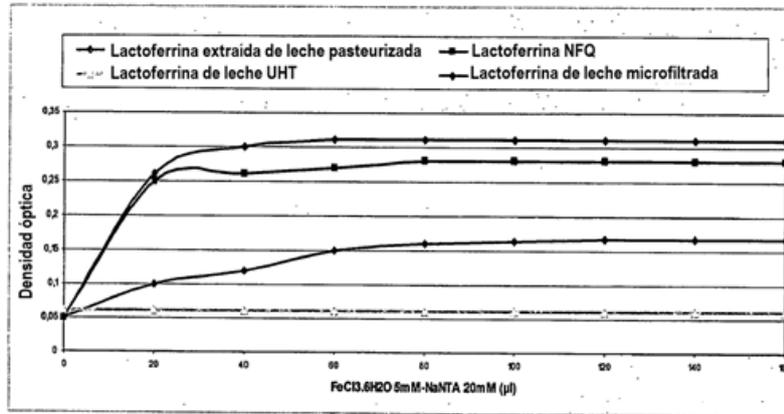


FIG. 8

Actividad antibacteriana LF en E.coli

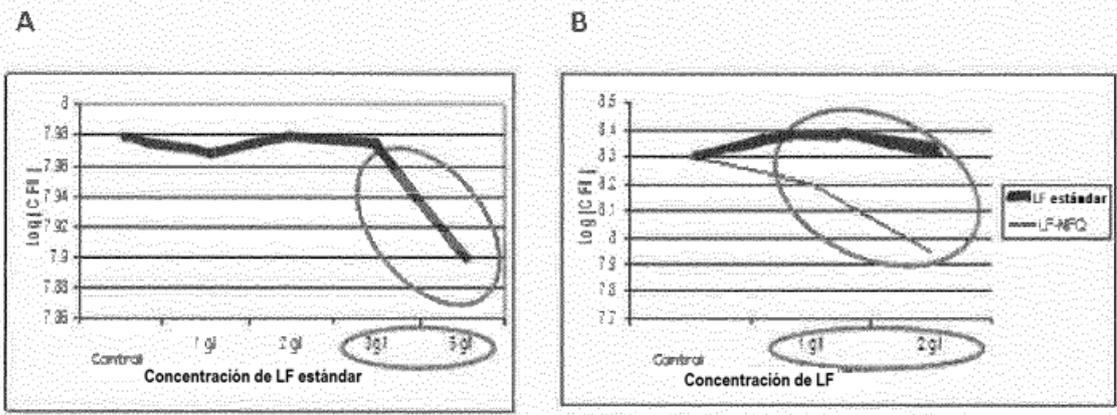


FIG. 9

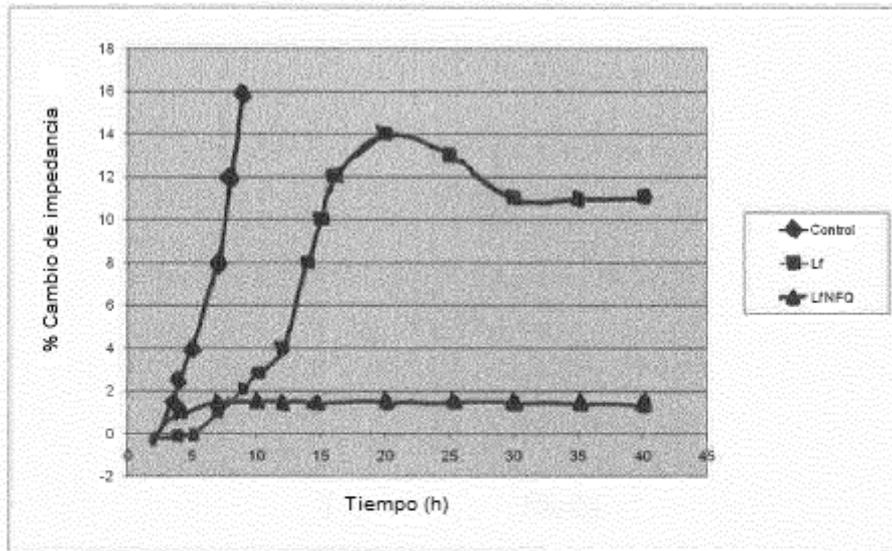


FIG. 10

Controles de calidad de la actividad antioxidante de lactoferrina

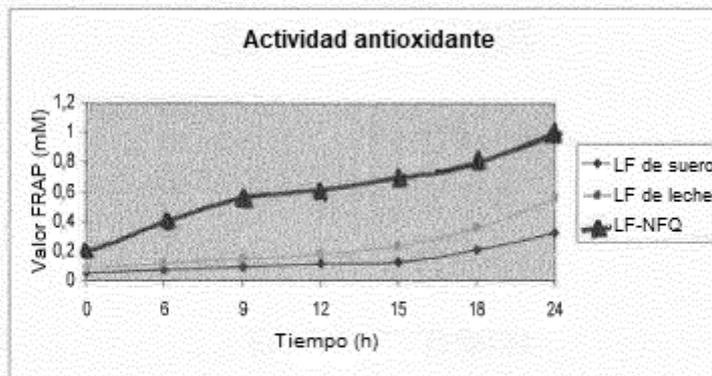


FIG. 11