

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 394 344**

(51) Int. Cl.:

**A61K 38/40** (2006.01)

**A61P 29/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.04.2006 E 06724054 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la solicitud europea: **27.08.2008 EP 1959988**

---

(54) Título: **Uso de lactoferrina bovina para el tratamiento de inflamación destructiva de membranas mucosas**

(30) Prioridad:

**09.12.2005 IT MI20052351**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**30.01.2013**

(73) Titular/es:

**MICROBO S.R.L. (100.0%)  
PIAZZA S. APOLLONIA 3  
00153 ROMA, IT**

(72) Inventor/es:

**VALENTI, PIERA y  
PAESANO, ROSALBA**

(74) Agente/Representante:

**BELTRAN GAMIR, Pedro**

**ES 2 394 344 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

## Campo técnico

La presente invención hace referencia a un nuevo uso farmacéutico de lactoferrina bovina y a un preparado combinado para el uso simultáneo, secuencial o separado que comprende lactoferrina bovina.

## 5 Estado de la invención

Las membranas mucosas humanas, generalmente colonizadas por bacterias comensales, son el hábitat que está más expuesto a la agresión de microorganismos patogénicos y virus. En situaciones fisiológicas, las secreciones mucosas, constituidas por diversas proteínas y péptidos de inmunidad natural, aseguran la protección contra el ataque microbiano y vírico. La respuesta inflamatoria es un mecanismo de defensa fundamental contra infecciones que está implementado por el huésped, pero en algunas condiciones puede resultar tan intensa como para ser dañina. En tales casos, la inmunotolerancia del huésped respecto de los microorganismos comensales empieza una respuesta inmune adaptativa contra patógenos, que crea una inflamación que es denominada "destructiva" porque está siempre acompañada por un daño significativo a las células del huésped. Por lo tanto, el equilibrio entre la inflamación fisiológica y la inflamación destructiva, junto con los mecanismos reguladores que limitan la respuesta inflamatoria y restablecen, cuando es necesario, la homeostasis de la inflamación (inflamación fisiológica), son esenciales, porque aseguran la inhibición de fenómenos destructivos que podrían, por ejemplo, combinarse con daño causado por trastornos infecciosos ya en progreso, y las membranas mucosas mismas, dañadas y careciendo de factores no anticuerpos de inmunidad natural, podrían volverse más susceptibles a la aparición de cualquier infección. La aparición de una inflamación patológica y destructiva puede ser causada por la persistencia de un estímulo que el cuerpo reconoce como extraño y tiende a eliminar sin éxito. Casos típicos son, por ejemplo, inflamaciones destructivas después de embarazos más o menos patológicos, y especialmente después de infecciones víricas, micosis o infecciones causadas por bacterias (tanto gram positivo como gram negativo) que están localizadas intracelularmente o que, una vez se han adherido a las células del cuerpo, sintetizan y se cubren con una capa más o menos gruesa de polisacáridos, que junto con los microorganismos constituye el llamado biofilm, que se sabe que es impermeable a agentes bactericidas y bacteriostáticos ordinarios.

25 Un trastorno adicional común e importante de la inflamación destructiva está constituido por estados más o menos graves de hipoferremia y/o anemia. Durante la inflamación hay de hecho una transferencia gradual de hierro libre desde la circulación a los tejidos, aumentando considerablemente la concentración fisiológica de hierro libre en el nivel de la membrana mucosa (aproximadamente  $10^{-18}$  M). Este hecho tiene varias consecuencias dañinas para el cuerpo, incluyendo (i) una sobreproducción, a nivel del tejido, de especies reactivas de oxígeno, sobre todo superóxidos (mediante la reacción Fenton inducida por hierro), y (ii) un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias. Además, se ha demostrado que un aumento del hierro que está disponible o libre en el nivel de las membranas mucosas facilita la proliferación y diseminación microbiana y vírica, puesto que muchos patógenos exhiben tanto crecimiento como virulencia inducida por hierro. Finalmente, la presencia de infecciones de las membranas mucosas de la cavidad oral (por ejemplo parodontopatías), del intestino (enteritidis) o del epitelio vaginal en progreso, a su vez provoca sangrado y una mayor retirada del hierro de la circulación; estos factores aumentan la sobrecarga de hierro en los tejidos (hasta el punto de crear estados de anemia crónica causados por infecciones y consiguientes inflamaciones), en una especie de retroalimentación positiva. Todo lo anterior explica por qué la aparición de una flogosis destructiva a nivel de las membranas mucosas está a menudo asociada con condiciones patológicas de hipoferremia y/o anemia y/o infecciones que afectan a dichas membranas mucosas, hasta el punto en el que los roles de causa y consecuencia entre los diversos trastornos son difíciles de distinguir.

30 Actualmente, los estados de inflamación crónica posiblemente asociados con hipoferremia, anemia, e infecciones agudas o crónicas son tratados administrando sustancias que son específicas para cada síntoma, tales como antibióticos, antivirales, antiinflamatorios o terapias basadas en hierro, de esta forma requiriendo la combinación de cócteles de medicamentos si dos o más de estas complicaciones están presentes simultáneamente. Sin embargo, no hay medicamentos capaces de tener un efecto terapéutico apreciable en más de un componente simultáneamente.

40 EP 730868 A muestra el uso de lactoferrina para el tratamiento o prevención de la inflamación oral tal como esomatitis aftosa y gingivitis.

45 EP 559425 A muestra el uso de lactoferrina para tratar y/o prevenir enfermedades infecciosas oportunistas asociadas con infección por Lentivirus.

50 US 5,834,424 muestra el uso de una transferrina, tal como lactoferrina, para inhibir la penetración de *Streptococcus pyogenes* o *Staphylococcus aureus* en membranas mucosas.

US 6,455,687 muestra la clonación y expresión de lactoferrina humana usando técnicas de ADN recombinante y el uso de tal lactoferrina humana para el tratamiento y prevención de infecciones oportunistas.

55 US 2002/016289 muestra el uso de lactoferrina humana recombinante para tratar y/o prevenir infecciones causadas por enteropatógenos tales como *H. pylori*.

El objetivo de la presente invención es, por lo tanto, proveer una sustancia para usar en el tratamiento de la inflamación destructiva que afecte a membranas mucosas asociada con infecciones agudas o crónicas y opcionalmente asociada con estados de hipoferremia y/o anemia.

Dentro del ámbito de este objetivo, un objeto es proveer un compuesto para tratar las indicaciones terapéuticas mencionadas anteriormente que permita conseguir un efecto particularmente efectivo y potente.

#### 5 Explicación de la invención

En un aspecto, la presente invención concierne la lactoferrina bovina para el uso en el tratamiento de inflamación destructiva (patológica) que afecta a membranas mucosas asociada con infección aguda o crónica, y opcionalmente asociada con estados de hipoferremia y/o anemia,

10 en los que las membranas mucosas están seleccionadas de una o más membranas mucosas vaginales, anales u orofaríngeas y lactoferrina bovina es para el uso tópico cuando la inflamación destructiva (patológica) no está asociada con hipoferremia y/o anemia, y combinada con el uso oral de lactoferrina bovina cuando la inflamación destructiva (patológica) está asociada con hipoferremia y/o anemia,

15 o cuando las membranas mucosas son membranas mucosas intestinales y la lactoferrina bovina es para uso oral cuando la inflamación destructiva (patológica) está asociada con hipoferremia y/o anemia.

En otro aspecto, la presente invención también concierne a un preparado combinado que comprende, como componentes activos, un primer compuesto farmacéutico para el uso tópico de lactoferrina bovina, y un segundo compuesto farmacéutico para el uso oral de lactoferrina bovina.

20 Se entiende que cualquier característica que esté mencionada con referencia a solo uno de los aspectos de la invención pero también puede referirse a otros aspectos debe considerarse igualmente válida con referencia a estos últimos aspectos incluso si no se repite explícitamente.

#### 25 Descripción de los ejemplos de realización preferidos

Los diversos aspectos de la presente invención derivan de observaciones sorprendentes hechas por el solicitante, según las cuales la administración tópica y/o oral de lactoferrina bovina es capaz de conseguir simultáneamente una serie de efectos, incluyendo:

i) una acción bacteriostática/fungistática y bactericida/fungicida, puesto que la lactoferrina bovina secuestra el hierro, impidiendo el crecimiento microbiano y su diseminación y al mismo tiempo tiene una acción contra los virus, impidiendo las interacciones tempranas virus-célula huésped;

30 ii) el restablecimiento de la homeostasis de la inflamación, puesto que la lactoferrina bovina,

- por un lado reduce la expresión y síntesis de citoquinas proinflamatorias, sobre todo interleuquina-1 $\beta$ , interleuquina-6, interleuquina-8, TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B, cuya sobreproducción es una característica y señal distintiva de inflamación destructiva. Hay por lo tanto una consiguiente protección contra el daño celular y un aumento de las defensas naturales del huésped,

- por otro lado, secuestra hierro libre, bloqueando la sobreproducción de especies activas de oxígeno, que también están involucradas en la activación de citoquinas proinflamatorias;

35 iii) restablecimiento de la homeostasis del hierro, puesto que la lactoferrina bovina, al inhibir la expresión y síntesis de IL-6 y consiguientemente de hepcidina, permite a la ferroportina devolver a la circulación el hierro que se ha acumulado en los tejidos. La acción positiva realizada con la liberación del hierro de los tejidos también tiene como una consecuencia importante la reducción (factor de prevención) de la susceptibilidad de dichos tejidos a ser atacados por infecciones microbianas, micóticas y víricas,

40 iv) una acción positiva sobre el restablecimiento de los valores fisiológicos de sideremia y hemoglobina, solucionando, gracias al efecto ya mencionado sobre la transferencia del hierro de los tejidos a la circulación, estados de hipoferremia y/o anemia asociados con infecciones microbianas y víricas y con fenómenos inflamatorios que son una consecuencia o no de infecciones.

45 La lactoferrina, como las transferrinas en general, hace tiempo que se conocen por su actividad antibacteriana y por su actividad bactericida. Recientemente, su habilidad de inhibir la adhesión microbiana y penetración de bacterias patogénicas conocidas como bacterias intracelulares facultativas también se ha destacado. Además, la capacidad de la lactoferrina para inhibir las etapas tempranas de una infección vírica ha sido demostrada extensivamente. Sin embargo nunca se había demostrado o sugerido que la lactoferrina bovina podría ser utilizada para boquear fenómenos de flogosis destructiva (inhibiendo la producción de superóxidos y citoquinas proinflamatorias), eliminando simultáneamente la sobrecarga de hierro en las membranas mucosas, que es una causa de la proliferación y diseminación microbiana y de estados

de anemia e hipoferremia a menudo asociados con la inflamación destructiva misma. Aunque no deseamos estar limitados por cualquier teoría científica específica, se cree que las acciones coordinadas realizadas por la lactoferrina bovina cuando se usa según la invención pueden ser atribuibles a la acción dual de secuestro de hierro libre e inhibición de la síntesis de citoquinas proinflamatorias, especialmente IL-6, sin excluir la característica capacidad de la lactoferrina (una glicoproteína muy catiónica) de unirse a cualquier componente que tenga una carga negativa que esté presente en la superficie de microorganismos, virus y células huésped. El primer efecto lleva a una reducción de la formación de especies reactivas de oxígeno, que contribuyen a la aparición de una inflamación destructiva, mientras que el segundo efecto lleva una reducción paralela de síntesis de hepcidina mediante una reducción paralela de interleuquina-6 y de otras citoquinas proinflamatorias. La hepcidina tiene un papel inhibidor en la actividad de la ferroportina, que es una proteína cuya tarea es llevar hierro desde el interior hacia el exterior de las células. Por lo tanto, cuando la hepcidina está ausente o expresada apenas porque la interleuquina-6 vuelve a la expresión normal y a los niveles de síntesis normales, la ferroportina es libre de la unión con la hepcidina y puede transportar el hierro desde los tejidos a la circulación. Al restablecer en primer lugar una respuesta inmune fisiológica y eliminar el hierro necesario para el crecimiento y la diseminación microbiana, la invención es una ayuda válida en el tratamiento también de infecciones que actualmente son difíciles de erradicar, tales como las causadas por patógenos (bacterias, virus u hongos) que están protegidos por biofilm o están localizados en áreas intracelulares que son apenas accesibles o nada accesibles a los medicamentos.

La expresión "inflamación (o flogosis) destructiva (o patológica)" se utiliza para designar una inflamación en respuesta a patógenos caracterizada por la sobreproducción de interleuquina-1 $\beta$ , interleuquina-6, interleuquina-8, TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B cuya inflamación provoca daño a las células del huésped. La verificación de la aparición de esta condición y su distinción respecto de una inflamación no destructiva son aspectos que se encuentran dentro del conocimiento de las personas expertas en la técnica.

La expresión "hipoferremia y/o anemia asociada con inflamación destructiva" significa preferiblemente que los estados de hipoferremia y anemia, individualmente o como un todo, son causados por una inflamación destructiva que afecta a las membranas mucosas. La expresión "trastornos infecciosos agudos o crónicos o infecciones asociadas con inflamación destructiva" significa preferiblemente que esas infecciones causan una inflamación destructiva. La expresión "causa inflamación destructiva" significa preferiblemente que las infecciones causadas por patógenos o bacterias comensales que se han vuelto patógenos ocasionales son un factor de riesgo aumentado para la aparición de flogosis destructiva y pueden persistir o recurrir o volverse crónicos también como consecuencia de la aparición de la inflamación destructiva. Gracias a las propiedades peculiares y ventajosas de la lactoferrina bovina, es particularmente ventajoso utilizar la invención para tratar inflamación destructiva, hipoferremia, anemia e infecciones agudas o crónicas en situaciones en las que todos estos componentes están presentes simultáneamente.

La expresión "tratar inflamación destructiva" significa reducir la gravedad o frecuencia de los síntomas de esta condición, de sus causas o de sus consecuencias. En particular, significa reducir y mantener a valores fisiológicos la producción de interleuquina-1 $\beta$ , interleuquina-6, interleuquina-8, TNF- $\alpha$  y NF- $\kappa$ B y hepcidina. Debería señalarse que no hay intención de describir o reivindicar un efecto immunosupresor, sino sólo un efecto de control de la homeostasis del proceso inflamatorio respecto de la inflamación destructiva y no contra una inflamación fisiológica normal, donde la expresión "inflamación fisiológica normal" designa un proceso inflamatorio que no conlleva la sobreproducción de las citoquinas proinflamatorias mencionadas anteriormente.

La expresión "tratar hipoferremia y anemia" significa restablecer niveles fisiológicos de sideremia y cantidad de hemoglobina en circulación.

La expresión "infecciones agudas o crónicas" designa trastornos infecciosos que afectan a las membranas mucosas y causadas por patógenos intracelulares (bacterias o virus), microorganismos que se han adherido o están protegidos en un biofilm. No se hace referencia en su lugar al tipo de patógeno (bacteria, virus, hongo o protozoo). Preferiblemente, las infecciones son una o más de entre gingivitis, parodontopatías, infecciones micóticas e infecciones víricas en general, infecciones recurrentes causadas por microorganismos que se sabe que están en forma de biofilm y microorganismos que se sabe que tienen una localización intracelular facultativa u obligatoria, como en el caso de los virus.

Las expresiones "restablecimiento de la homeostasis de hierro" o "restablecimiento del metabolismo del hierro" significa restablecer una distribución fisiológica de la cantidad de hierro entre tejidos y circulación, así como restablecer la operación fisiológica de los sistemas naturales destinados a mantener esta distribución.

La expresión "membranas mucosas" designa preferiblemente una o más de entre las membranas intestinales, vaginales, anales y membranas mucosas de la cavidad orofaríngea. Si el uso es tópico, las membranas mucosas son una o más de entre las membranas mucosas vaginales, membranas mucosas anales y membranas mucosas de la cavidad orofaríngea.

Las expresiones "administración tópica" o "tópicamente" o "medicamento para administración tópica" designan una administración local de lactoferrina bovina en una o más de entre la cavidad orofaríngea, la cavidad vaginal y la cavidad anal. Aunque es técnicamente posible en la actualidad conseguir la administración tópica también mediante administración oral (en la que, por lo tanto, la lactoferrina bovina no es absorbida sino que actúa sólo localmente en la membrana mucosa intestinal), en la presente invención una forma farmacéutica enteral no debería entenderse como "para adminis-

tracción tópica". Por lo tanto, el tratamiento de las membranas mucosas intestinales ocurre siempre y sólo mediante una administración oral que combina un efecto tópico y un efecto sistémico.

Las expresiones "administración oral", "oralmente" o "medicamento para la administración oral" designan la administración oral sistémica y tópica que por lo tanto permite tanto la absorción sistémica de la lactoferrina bovina como su actividad local. La lactoferrina bovina administrada mediante un medicamento oral por lo tanto conlleva tanto un efecto tópico local en las membranas mucosas intestinales como un efecto sistémico en todas las membranas mucosas del cuerpo después de su absorción gastrointestinal.

Tal y como se describe en detalle a continuación, independientemente de la membrana mucosa involucrada, en el caso de inflamación destructiva asociada con hipoferremia y/o anemia, el uso de la lactoferrina bovina ocurre según un modo dual tópico y oral. Por supuesto, el tratamiento de las membranas mucosas intestinales no requiere un modo de administración dual.

El término "transferrinas" designa una clase de glicoproteínas que están presentes en la naturaleza y están caracterizadas por la presencia de dos sitios de unión para el hierro (III) y por una elevada homología de secuencia entre los diversos miembros de la clase. Moléculas que pertenecen a la clase de transferrinas son lactoferrina, serotransferrina y ovotransferrina.

Sorprendentemente, se ha descubierto que el efecto sobre la flogosis obtenido con la lactoferrina bovina puede conseguirse para cualquier grado de saturación de los sitios de unión para el hierro (III), estén completamente libres (forma "apo" de lactoferrina, grado de saturación de sitios de hierro igual a 0%), parcialmente ya ocupados o completamente ya saturados (forma "holo" de lactoferrina, grado de saturación de sitios de hierro igual a 100%). En cualquier caso, debería señalarse que hay una dependencia entre la actividad exhibida y el porcentaje de saturación (pero no entre la actividad y la cantidad total de hierro contenido), en que cuanto mayor sea la presencia de lactoferrina bovina a un grado inferior de saturación, mayor la actividad conseguible. Sin embargo, una lactoferrina bovina completamente saturada (100% de grado de saturación) no exhibe un efecto terapéutico apreciable sobre la inhibición de superóxidos, que como se ha mencionado son una de las causas de la inflamación destructiva. La capacidad reducida de lactoferrina bovina saturada de hierro 100% para inhibir la expresión y síntesis de las citoquinas proinflamatorias es debido a esta función ausente. También se entiende que la lactoferrina bovina utilizable en la invención puede tener cualquier grado de saturación de los sitios de unión de hierro oscilando entre 0% de saturación a 100% de saturación, preferiblemente de 0% (incluyendo este límite) a 100% (excluyendo este límite), más preferiblemente de 0% a 20% (incluyendo estos límites) de saturación. Es posible utilizar una lactoferrina bovina que tenga un grado específico de saturación o una mezcla de lactoferrinas bovinas con diferentes grados de saturación. Es particularmente preferido utilizar lactoferrina bovina que tenga un bajo grado de saturación. También se entiende que los sitios de unión para hierro pueden ser ocupados en cualquier grado de saturación por Fe (III) y/o opcionalmente, con diferentes cinéticas y afinidades, por uno o más de otros metales de transición que tengan propiedades químicas y físicas similares. Estos metales pueden ser por ejemplo uno o más de entre Zn, Cu, Mn.

El término "lactoferrina" designa tanto la proteína nativa intacta como la proteína recombinante intacta, así como los fragmentos de la proteína intacta (nativa o recombinante) que pueden obtenerse mediante su digestión enzimática o química. La lactoferrina, altamente preservada en las diversas especies, es una glicoproteína constituida por 692 aminoácidos en la forma humana, con un punto isoeléctrico de aproximadamente 9, un peso molecular de aproximadamente 80 kDa, con tres potenciales *sitios* de glicosilación. Puede unir reversiblemente dos átomos de Fe (III) por molécula con elevada afinidad ( $K_D \cdot 10^{-20} M$ ) (esta habilidad de unir hierro también se mantiene por los lóbulos y por los diversos fragmentos descritos anteriormente). La lactoferrina está presente por ejemplo en la leche y en todas las secreciones humanas y en gránulos de neutrófilos. La ventaja de utilizar lactoferrina en vez de otras transferrinas emana de la habilidad de la lactoferrina para unir hierro con una mayor afinidad y a unirlo incluso a valores pH ácidos, que ocurren en sitios de infección. La lactoferrina puede ser producida en grandes cantidades mediante extracción de la leche de vaca. En la presente invención y en los tests que se describirán en la presente patente, la lactoferrina bovina es utilizada. Se entiende que la lactoferrina bovina puede ser natural (obtenida mediante extracción), producida por métodos recombinantes, o una mezcla de los dos tipos. Todos los preparados de lactoferrina bovina, a pesar de tener un grado diferente de saturación, excepto para la forma completamente saturada con hierro, han exhibido la misma efectividad para inhibir la expresión y la síntesis de la citoquinas inflamatorias y al restablecimiento de la homeostasis de hierro; además, el preparado 100% saturado tiene una baja actividad para quitar el hierro de los tejidos.

Sorprendentemente, también se ha descubierto que las mismas propiedades exhibidas por la lactoferrina bovina intacta también pueden conseguirse utilizando partes individuales suyas, que pueden ser obtenidas mediante la digestión enzimática de la proteína entera. Por esta razón, se entiende que el uso de la lactoferrina bovina tal y como se define anteriormente puede ser remplazada con el uso de uno o más de sus fragmentos que pueden obtenerse mediante la digestión enzimática y la purificación. Fragmentos preferidos son lóbulo N y lóbulo C y partes de dichos lóbulos, por ejemplo fragmentos aa 86-258 MW 20 KDa y aa 285-692 MW 47 KDa. La expresión "lóbulo N" designa la fracción que tiene un peso molecular (MW) de aproximadamente 33 KDa, que corresponde al fragmento de 1 a 280 y parte de dicho lóbulo con un peso molecular de aproximadamente 20 KDa, que corresponde al fragmento del aminoácido 86 a 258 de la lactoferrina intacta digerida enzimáticamente y luego purificada. La expresión "lóbulo C" designa la fracción que tiene un peso molecular de aproximadamente 38 KDa, que se corresponde con el fragmento 345-692, y otra fracción que tiene un peso molecular de 47KDa, que se corresponde con el fragmento de 285 a 692 de la lactoferrina intacta digerida enzimáticamente y subsiguientemente purificada.

La expresión "compuesto o medicamento que comprende lactoferrina bovina" designa un compuesto o medicamento que tiene lactoferrina bovina, tal y como se define anteriormente, como su ingrediente activo único, principal (en términos de porcentaje por peso o volumen) o minoritario (en términos de porcentaje por peso o volumen). La lactoferrina bovina puede utilizarse en cualquier forma farmacéutica conocida líquida, semisólida o sólida, para su administración tópica y oral, opcionalmente en combinación con excipientes o portadores farmacéuticamente aceptables. También se entiende de que si se requiriera, la lactoferrina bovina puede ser utilizada también en asociación con uno o más medicamentos convencionales que tengan una actividad antiinflamatoria, antibacteriana (tanto bacteriostática como bactericida), antiviral, antimicótica o basada en hierro. Sorprendentemente, se ha descubierto que la administración tópica de la lactoferrina bovina ha conseguido una mayor actividad en los componentes de la inflamación destructiva y de las infecciones agudas o crónicas, mientras que se ha descubierto que es menos activa en resolver estados de hipoferremia y anemia asociados con inflamación destructiva. La administración oral de la lactoferrina bovina en su lugar ha exhibido una marcada actividad también en el restablecimiento de la homeostasis del hierro (por lo tanto en resolver estados de hipoferremia y anemia). Por esta razón, el uso tópico de la lactoferrina bovina según la invención es combinado ventajosamente con su uso oral para obtener un efecto máximo también en estados de hipoferremia y anemia asociados con inflamación destructiva.

Formas farmacéuticas preferidas para la administración tópica están seleccionadas entre polvos anhidro liofilizados para su uso directo (por ejemplo, polvos liofilizados para pulverizar), soluciones de base acuosa extemporáneas o listas para usar (por ejemplo, soluciones para enjuagues o lavados), geles, cremas, comprimidos para ser disueltos en la boca, comprimidos vaginales, pastas de dientes, chicles, productos liofilizados para ser congelados. La forma farmacéutica de producto liofilizado a ser distribuido directamente en las membranas mucosas orales o vaginales es la forma que ha demostrado la mayor efectividad. Por orden de preferencia decreciente es seguido por comprimidos, cremas o geles y soluciones extemporáneas. En cuanto a las formas farmacéuticas para la administración oral, todas las formas farmacéuticas conocidas actualmente que pueden ser ingeridas han sido encontradas como efectivas. Sin embargo, los mejores resultados en términos de resolver infecciones intestinales y en tratar hipoferremia y anemia han sido obtenidos con cápsulas o comprimidos que contienen la lactoferrina bovina y, con un grado ligeramente inferior, con lactoferrina bovina disuelta en el momento de su uso en una solución acuosa.

En un segundo aspecto, la invención hace referencia a un preparado combinado para la administración simultánea, secuencial o separada, que comprende como sus componentes activos un primer compuesto farmacéutico para la administración tópica que comprende lactoferrina bovina, y un segundo compuesto farmacéutico para la administración oral que comprende lactoferrina bovina. Entre las ventajas conseguidas por el preparado según la invención está la ventaja de simultáneamente resolver estados de inflamación destructiva que ocurren junto con hipoferremia y anemia. Productos y compuestos conocidos actualmente (incluyendo compuestos normales de transferrina no formulados como un preparado combinado para uso tópico y oral) son incapaces de conseguir tal efecto simultáneamente.

Los dos compuestos del preparado pueden ser definidos mediante las mismas características requeridas y opcionales indicadas en cuanto a las formas farmacéuticas para la administración tópica y/o oral descritas anteriormente en el contexto del uso de la lactoferrina bovina.

Con el fin de obtener un efecto apreciable en todos los componentes de las infecciones agudas o crónicas, inflamación destructiva, hipoferremia y anemia, es altamente ventajoso seguir el régimen de dosis descrito a continuación.

Si el primer compuesto (tópico) está en una forma sólida de dosis única (por ejemplo tabletas, pastillas y comprimidos vaginales), preferiblemente la cantidad total de lactoferrina bovina administrada oscila entre 100 mg y 400 mg de lactoferrina bovina al día, ventajosamente durante una semana. El mismo intervalo también es preferido en el caso de compuestos farmacéuticos sólidos de dosis múltiples (por ejemplo, polvo liofilizado a ser recogido en cada instancia). Se puede elegir si se administra lactoferrina bovina una vez al día o se distribuye sobre múltiples aplicaciones al día. Ejemplos preferidos del primer compuesto para la administración tópica son tabletas, pastillas y comprimidos que comprenden de 50 mg a 200 mg de lactoferrina bovina a ser administrados dos veces al día durante una semana, comprimidos vaginales que comprenden de 50 mg a 200 mg de lactoferrina bovina a ser disueltos dos veces al día durante una semana, lactoferrina liofilizada a ser dispersada *in situ* dos veces al día en una cantidad igual a 50-200 mg por aplicación, durante una semana, lactoferrina liofilizada a ser congelada y a ser utilizada para masajear las encías varias veces al día en una cantidad igual a 10-30 mg por aplicación.

Si el primer compuesto está en forma líquida o semisólida de dosis múltiple (por ejemplo, una solución para enjuagues, geles, cremas), la cantidad de lactoferrina bovina contenida en ella está comprendida ventajosamente entre 0.1-10% peso/volumen de compuesto. Es ventajoso permanecer, en este caso también, dentro de la gama de 100-400 mg de lactoferrina bovina al día, ventajosamente durante una semana, indicada anteriormente para los compuestos sólidos.

Si el segundo compuesto (oral) está en forma sólida y de dosis única (por ejemplo comprimidos), preferiblemente la cantidad total de lactoferrina bovina que es administrada oscila entre 50 mg y 200 mg al día, ventajosamente durante un mes, más preferiblemente igual a 200 mg al día, ventajosamente durante un mes. Por ejemplo es posible administrar dos veces al día polvo anhidro liofilizado que contenga 100 mg de lactoferrina bovina cada uno, durante un mes.

También es ventajoso para la administración del primer y segundo compuesto tal y como se define anteriormente que no ocurran en las comidas.

Las cantidades y los tiempos de las dosis indicadas anteriormente (definidas como completos "regímenes de dosis"), incluyendo los ejemplos específicos de compuestos tópicos y orales, han de ser considerados aspectos válidos y preferidos también con relación al uso farmacéutico de lactoferrina bovina y a los correspondientes medicamentos descritos anteriormente.

5 A modo de ejemplo, la efectividad *in vitro* de la lactoferrina bovina en el tratamiento de las gingivitis, gingivoestomatitis vírica y parodontopatías se describe ahora utilizando cultivos de fibroblastos gingivales afectados por bacterias de placa supragingival, por tipo Herpesvirus 1 y bacterias anaeróbicas Gram-negativas de placa subgingival, asociados con parodontopatías. La adición de la lactoferrina bovina reduce la elevada expresión y síntesis de citoquinas proinflamatorias producidas por células epiteliales infectadas e inhibe la producción de superóxidos, que en particular activan NF-kB, que a su vez induce la cascada de citoquinas proinflamatorias. La falta de activación de NF-kB de este modo impide el daño celular y la consiguiente diseminación de infecciones microbianas y víricas. En tests *in vivo* la efectividad de la lactoferrina bovina administrada tópicamente y oralmente en el caso de hipoferremita y anemia, para tratar gingivitis, gingivoestomatitis vírica y parodontopatías es evaluada no sólo por un examen objetivo local, sino también por parámetros clínicos, tales como la concentración de citoquinas proinflamatorias y hepcidina en la sangre o de esta última también en la orina, y por parámetros hematológicos, con atención particular a los valores de sideremia y hemoglobina antes y después del tratamiento. *In vivo*, la inflamación reducida debida a la lactoferrina bovina permite a la lactoferrina bovina también ser capaz, mediante proteínas que modulan la entrada y salida de hierro a las células (ferroportinas), de quitar el hierro de los tejidos y transferirlo a la circulación, impidiendo en los tejidos la formación de superóxidos y al mismo tiempo inhibiendo la replicación microbiana y restableciendo en la circulación los valores de sideremia y hemoglobina. Además, de nuevo a modo de ejemplo, la efectividad de la lactoferrina bovina para tratar infecciones micóticas de *Candida albicans* es ilustrada, utilizando cultivos *in vitro* de fibroblastos como un modelo de micosis orales y utilizando cultivos *in vitro* de células HeLa (derivadas de carcinoma uterino), también infectadas por *Candida albicans*, como modelo de micosis vaginales. En ambos tipos de infección, la adición de la lactoferrina bovina inhibe poderosamente la expresión y la síntesis de la interleuquina-6 por las células cultivadas. *In vivo*, la inflamación reducida permite a la lactoferrina bovina, mediante proteínas que modulan la entrada y salida de hierro en las células, ser capaz también de quitar el hierro de los tejidos, impidiendo la formación de superóxidos y al mismo tiempo inhibiendo la replicación microbiana. En estas infecciones micóticas también, en caso de hipoferremita y anemia graves, la administración tópica combinada con la administración oral en el tratamiento de infecciones gingivales o vaginales de membranas mucosas por micetes es evaluada no sólo con un examen objetivo local sino también con parámetros clínicos, tales como la concentración de citoquinas proinflamatorias y hepcidina en la sangre o de esta última también en la orina, y por parámetros hematológicos, con atención particular a los valores de sideremia y hemoglobina antes y después del tratamiento.

Además, de nuevo a modo de ejemplo, la efectividad de la lactoferrina bovina para tratar infecciones intestinales es ilustrada utilizando bacterias intracelulares facultativas tales como *Salmonella spp*, que infectan cultivos *in vitro* de células intestinales como un modelo de enteritis microbiana. La presencia de la lactoferrina bovina en cultivos celulares infectados inhibe poderosamente la expresión y la síntesis de citoquinas proinflamatorias producida por células epiteliales infectadas y de especies reactivas de oxígeno. La inflamación reducida permite a la lactoferrina bovina, mediante proteínas que modulan la entrada y salida de hierro en las células, también ser capaz de quitar el hierro de los tejidos, impidiendo la formación de superóxidos, que también activan NF-kB. La falta de activación de NF-kB, que a su vez induce la cascada de citoquinas proinflamatorias, por parte de la lactoferrina bovina, que impide la formación de superóxidos, de hecho impide el daño celular y consiguiente replicación microbiana y diseminación de la infección.

En tests *in vivo*, la efectividad de la lactoferrina bovina administrada oralmente para tratar enteritis es evaluada no sólo por un examen objetivo, sino también mediante parámetros clínicos, tales como la concentración de citoquinas proinflamatorias y de hepcidina en sangre o de esta última también en la orina, y por parámetros hematológicos, con atención particular a los valores de sideremia y de hemoglobina antes y después del tratamiento.

45 El uso de la lactoferrina bovina en la terapia de patologías infecciosas e inflamatorias de las membranas mucosas humanas, incluyendo membranas mucosas intestinales, vaginales y de la cavidad oral, con particular referencia a gingivitis, infecciones micóticas y víricas, y parodontopatías, y la capacidad de aumentar la sideremia y la hemoglobina, son sólo algunas de las posibles aplicaciones terapéuticas de la actividad de simultáneamente inhibir la expresión y síntesis de las citoquinas proinflamatorias, producción de superóxidos y, mediante el transporte de hierro de los tejidos a la circulación, de restablecer los valores normales de sideremia y hemoglobina descritos en la presente patente. Estas propiedades de la lactoferrina bovina de hecho permiten su uso para tratar muchas otras inflamaciones agudas y recurrentes e infecciones que afecten a las membranas mucosas.

55 Los ejemplos dados aquí muestran que la actividad terapéutica con respecto a trastornos infecciosos e inflamatorios de las membranas mucosas poseída por la lactoferrina bovina puede ser utilizada contra trastornos infecciosos e inflamatorios que afecten a las membranas mucosas humanas, incluyendo membranas mucosas intestinales, vaginales y orales, con particular referencia a trastornos seleccionados de entre gingivitis, infecciones micóticas y víricas, parodontopatías, hipoferremita, anemia y otros trastornos agudos y recurrentes, y puede ser considerada extremadamente ventajosa con respecto a tratamientos actualmente en uso, por ejemplo porque está caracterizada por el hecho de la falta de toxicidad y porque es la única sustancia capaz de realizar simultáneamente múltiples funciones combinadas, que comprenden especialmente la homeostasis de hierro y de la inflamación destructiva. En particular, la lactoferrina bovina, al inhibir la síntesis de la interleuquina-6, consintamente impide la síntesis de la hepcidina, modulada por la interleuquina-6, restableciendo la acción de la ferroportina, que de otra forma es inhibida por la hepcidina, cuya actividad permite el transpor-

5

te de hierro de los tejidos a la circulación, restableciendo los valores fisiológicos de sideremia y hemoglobina, que es fundamental tanto para la salud del huésped como para la terapia de los trastornos de las membranas mucosas. Además, en el caso del tratamiento de parodontopatías, la lactoferrina bovina sustituye, con una elevada tasa de éxito terapéutico, una técnica cara e invasiva tal como la eliminación quirúrgica de la placa subgingival, que soluciona el problema sólo durante periodos breves, después de los cuales aparecen repetidas recaídas infecciosas e inflamatorias hasta la completa pérdida del acoplamiento del diente y la pérdida parcial del hueso.

Otras características y ventajas de la presente invención resultarán aparentes de mejor modo a partir de la descripción de los siguientes ejemplos de realización preferidos, entendidos meramente a modo de ejemplo no limitador.

Como ya se ha mencionado anteriormente, en los tests descritos a continuación se utilizó la lactoferrina bovina.

10

#### Ejemplo 1

Actividad de la lactoferrina en gingivitis. El régimen experimental utilizado consiste en:

Microorganismos: los microorganismos fueron obtenidos inoculando directamente una placa tomada de un paciente afectado por gingivitis y utilizada a una concentración microbiana de varios géneros microbianos de  $10^7$  microorganismos/ml.

15

Monocapa celular: fibroblastos gingivales fueron cultivados hasta que se obtuvo una monocapa semiconfluente de  $10^5$  células/ml.

Infección de la monocapa celular: la monocapa de fibroblastos gingivales fue inoculada con  $10^7$  bacterias/ml de placa con el fin de tener una multiplicidad microbiana de infección de 100:1 en ausencia o presencia de 60 $\mu$ g/ml de lactoferrina bovina saturada en hierro a 15-30% e incubada durante 2 horas a 37°C.

20

Dosis de expresión de citoquinas: el sobrenadante de la monocapa fue recogido y centrifugado con el fin de eliminar las bacterias. Tras centrifugado repetido, el sobrenadante sin bacteria fue congelado a -20°C para el análisis de la producción de cualquier citoquina inducida por la infección. La monocapa fue en su lugar repetidamente lavada con PBS sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> con el fin de eliminar tanto las bacterias como cualquier rastro de lactoferrina, en las condiciones en las que fue añadida y lisada con el fin de extraer el ARN de los fibroblastos y probarlos para expresión de genes en comparación con los extraídos de las células no infectadas o células infectadas en la ausencia de lactoferrina, mediante un Microarray.

Dosis de la producción de citoquinas expresadas: el sobrenadante preservado fue utilizado para dosificar las citoquinas producidas mediante un test enzimático inmune (ELISA), específico para cada una de las citoquinas a ser probadas.

30

#### Ensayo superóxido.

La producción de las especies reactivas de oxígeno es medida añadiendo ferricitocromo c a las células epiteliales en cultivo. El ensayo se basó en la reducción de ferricitocromo c.

Los resultados de los experimentos se resumen a continuación:

35

Entre los 300 genes que fueron analizados, la infección de la monocapa indujo una mayor expresión de genes respecto a las células no infectadas en aproximadamente una o dos veces sólo para la interleuquina 6, interleuquina 8 y TNF- $\alpha$ . La adición de lactoferrina redujo la expresión de estas citoquinas, devolviéndolas a un valor de expresión normal. El análisis cuantitativo de la síntesis de interleuquina 6, interleuquina 8 y TNF- $\alpha$  confirmó los datos relacionados con la expresión de genes de dichas citoquinas proinflamatorias, tal y como se muestra en la tabla 1.

40

Tabla 1: Expresión y síntesis de la interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y TNF- $\alpha$  en fibroblastos gingivales que están infectados o no con placa supragingival en la ausencia o presencia de lactoferrina (60  $\mu$ g/ml).

	Sin lactoferrina			Con lactoferrina		
	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
Expresión en células no infectadas	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Expresión en células infectadas	1.5	2.0	2.0	1.0	1.0	1.0
Síntesis en células no infectadas (pg/ml)	90	2.100	22	90	2.100	22
Síntesis en células infectadas (pg/ml)	190	4.100	40	105	1.900	29

El valor 1.0 listado en la tabla hace referencia a expresión de genes normal, mientras todos los valores > 1.0 indican sobreexpresión de genes. El ligero aumento en la expresión y producción de IL-6, IL-8 y TNF- $\alpha$  es un indicador de inflamación fisiológica y está justificado por el hecho de que la placa es un grupo de bacterias que normalmente colonizan la superficie del diente. La adición de lactoferrina disminuye tanto la expresión como la síntesis de dichas citoquinas proinflamatorias, deteniendo el proceso inflamatorio que podría evolucionar, dañando las células.

En cuanto a la producción de las especies reactivas de oxígeno, una reducción en la excreción de superóxidos por células infectadas con las bacterias contenidas en la placa en la presencia de lactoferrina se ha notado respecto de las células infectadas en la ausencia de la glicoproteína. En estos experimentos, se añadieron iones de hierro al medio de cultivo a concentraciones que oscilan entre 10 y 100  $\mu$ M, es decir, igual a los que ocurren en membranas mucosas en situaciones patológicas.

#### Correlación con test *in vivo*

Entre las tres citoquinas proinflamatorias, es necesario destacar la importancia de la IL-6. En pacientes con gingivitis u otras formas inflamatorias, un aumento de IL-6 en la saliva ha sido determinado respecto de la saliva de pacientes sanos. Tras una semana de tratamiento con 100 mg de lactoferrina en forma liofilizada, aplicada a las membranas mucosas de los arcos dentales mediante el cepillado dos veces al día después de una meticulosa limpieza dental, el valor de IL-6 disminuyó y la inflamación y el sangrado desaparecieron.

Si los pacientes no mostraron valores alterados de sideremia y hemoglobina, la lactoferrina no se administró oralmente; de otra forma, estos valores volvieron a ser normales tras un mes de tratamiento con 100 mg de 15-30% lactoferrina saturada dos veces al día.

#### Ejemplo 2

La actividad de la lactoferrina en parodontopatías. El régimen experimental usado consistió en lo siguiente:

**Microorganismos:** *Prevotella intermedia* o una placa subgingival, aislada en estricta anaerobiosis de un paciente afectado por parodontopatías, se utilizó con una concentración de  $10^7$  bacterias/ml.

**Monocapa celular:** fibroblastos gingivales fueron cultivados hasta que se consiguió una monocapa semiconfluente de  $10^5$  células/ml.

**Infección de la monocapa celular:** la monocapa de fibroblastos gingivales fue inoculada con  $10^7$  bacterias/ml de *Prevotella intermedia* o de bacterias anaeróbicas Gram-negativas de la placa subgingival con el fin de tener una multiplicidad de infección microbiana de 100:1 en la ausencia o presencia de 60  $\mu$ g/ml de lactoferrina bovina saturada en hierro a 15-30% e incubada durante 4 h a 37°C.

**Dosis de expresión de citoquinas:** el sobrenadante de la monocapa que fue sometida a infección durante 4 h fue recogido y centrifugado con el fin de eliminar las bacterias. Tras repetidos centrifugados, el sobrenadante libre de bacterias se congeló a -20°C para el análisis de la producción de cualquier citoquina inducida por la infección. La monocapa en su lugar fue lavada repetidamente con PBS sin  $Ca^{2+}$  y  $Mg^{2+}$  con el fin de eliminar tanto la bacteria como cualquier rastro de lactoferrina, en las condiciones en las que habían sido añadidas y lisadas con el fin de extraer el ARN de los fibroblastos y probarlos, para expresión de genes, en comparación con los extraídos de células que no fueron infectadas o fueron infectadas en la ausencia de lactoferrina, mediante un Microarray.

**Dosis de producción de citoquinas expresadas:** el sobrenadante preservado fue utilizado para dosificar las citoquinas producidas mediante un test enzimático inmune (ELISA) específico para cada citoquina a ser probada.

#### Ensayo superóxido

**La producción de especies reactivas de oxígeno** fue medida añadiendo ferricitocromo c a las células epiteliales en cultivo. En ensayo se basó en la reducción de ferricitocromo c.

Los resultados de los experimentos se resumen a continuación:

Entre los 300 genes analizados, la infección de la monocapa celular con *Prevotella intermedia* y con placa subgingival indujo una expresión de genes que fue aproximadamente de 3 a 10 veces mayor que la no infectada por la interleuquina 1- $\alpha$ , interleuquina 1- $\beta$ , para la interleuquina 6, interleuquina 8 y GRO1, GRO2, GRO3, TNF- $\alpha$ , NF-kB, NF-kBIA.

La adición de la lactoferrina redujo la expresión de todas estas citoquinas, devolviéndolas a valores de expresión normales, excepto la IL-8, que aunque se redujo considerablemente aún permanecía sobreexpresada. El análisis cuantitativo de la síntesis, informado sólo para las citoquinas más importantes tales como la interleuquina 1- $\beta$ , interleuquina 6, interleuquina 8, y TNF- $\alpha$ , confirma los datos relacionados con la expresión de genes de estas citoquinas proinflamatorias, tal y como se informa en la tabla 2.

Tabla 2: Expresión y síntesis de interleuquina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y de TNF- $\alpha$  en fibroblastos gingivales infectados o no con *Prevotella intermedia* en la ausencia o presencia de lactoferrina (60 $\mu$ g/ml).

	Sin lactoferrina				Con lactoferrina			
	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α	IL-1β	IL-6	IL-8	TNF-α
Expresión en células no infectadas	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Expresión en células infectadas	3.0	9.1	9.5	5.4	0.7	0.4	3.5	1.0
Síntesis en células no infectadas (pg/ml)	1.000	90	2.100	22	1.000	90	2.100	22
Síntesis en células infectadas (pg/ml)	5.000	900	10.000	120	900	80	5.800	18

El valor 1.0 dado en la tabla hace referencia a una expresión de genes normal, mientras que todos los valores > 1.0 indican sobreexpresión de genes. La expresión y producción de IL-1β, IL-6, IL-8 y TNF-α por fibroblastos infectados con *Prevotella intermedia* es mayor que los observados en la infección de fibroblastos gingivales con bacterias de placa.

5 Estos datos indican que la capacidad de penetrar dentro de las células del huésped es poseída sólo por bacterias anaeróbicas Gram-negativo, asociadas con parodontopatías, tales como *Prevotella intermedia*, y no por bacterias adhesivas y no invasivas que inducen gingivitis, causa una respuesta inflamatoria mucho mayor, que puede ser considerada destructiva, tal y como se demuestra cuando las bacterias permanecen *in vitro* durante más de 4 h dentro de las células. La adición de lactoferrina reduce considerablemente no sólo la expresión y la síntesis de la IL-6, IL-8, y TNF-α, sino también de la interleuquina 1-α, interleuquina 1β, GRO1, GRO2, GRO3, NF-Kb y NF-kBIA, confirmando su gran importancia para devolver los valores de las citoquinas proinflamatorias a valores normales, excepto para IL-8, que podría ser una señal de la permanencia de las bacterias dentro de las células huésped. Datos similares se han obtenido utilizando como agente infeccioso las bacterias anaeróbicas Gram-negativas que están presentes en la placa subgingival.

10

15 La producción de superóxidos por las células epiteliales es considerable cuando las bacterias entran en la célula en la ausencia de lactoferrina, pero es inhibida por la presencia de lactoferrina.

#### Correlación con test *in vivo*

En el fluido crevicular de pacientes con parodontopatías, un aumento de la concentración de IL-1β, IL-6 y hierro se observó respecto de pacientes sanos. Tras un tratamiento de un mes con 100 mg de lactoferrina en forma liofilizada, aplicada a las membranas mucosas de los arcos dentales mediante el cepillado dos veces al día después de una limpieza dental meticulosa, el valor de IL-1β, IL-6 y de hierro en el fluido crevicular disminuyó junto con la desaparición del sangrado, de abscesos subgingivales, de inflamación y el acoplamiento del diente fue restablecido empezando en la tercera semana de tratamiento. Si los pacientes no mostraron valores alterados de sideremia y hemoglobina, la administración oral de lactoferrina no se realizó; de otra forma, el tratamiento con 100 mg de lactoferrina saturada a 15-30% dos veces al día durante un mes fue realizada. Tras un mes de esta terapia oral, estos valores retornaron a normal, junto con un descenso de la concentración de IL-6 y hepcidina en sangre o de hepcidina en orina respecto a antes del tratamiento.

#### Ejemplo 3

La actividad de la lactoferrina en infecciones debidas al Herpesvirus tipo 1 asociado con parodontopatías y herpes labial y debido a Herpesvirus tipo 2 asociado con herpes genital. El régimen experimental utilizado consistió en lo siguiente:

30 Virus

Los test se realizaron utilizando Herpesvirus tipos 1 y 2 (HSV- 1 y HSV- 2).

Infección vírica de la monocapa.

La monocapa celular (fibroblastos o HeLa) fue incubada a 4°C durante 1 h en la ausencia o presencia de 500 µg/ml de lactoferrina con HSV-1 o HSV-2. Después de que pasara este periodo, la monocapa fue colocada a 37°C.

35 Dosis de producción de interleuquina 6

El sobrenadante de los cultivos fue ensayado para determinar la producción de interleuquina 6 mediante el test de enzima inmune específico (ELISA)

Los resultados de los experimentos están resumidos a continuación:

La infección de las monocapas con HSV-1 o HSV-2 indujo una mayor secreción de interleuquina 6 respecto de las no infectadas. La adición de la lactoferrina redujo considerablemente la expresión y síntesis de las citoquinas inflamatorias y en particular de la interleuquina 6, tal y como está listado en la Tabla 3.

5 Tabla 3. Expresión y síntesis de interleuquina 6 (IL-6) en fibroblastos gingivales o en células HeLa infectadas o no con Herpesvirus tipo 1 y 2.

	Sin lactoferrina	Con lactoferrina
	IL-6	IL-6
Expresión en células no infectadas	1.0	1.0
Expresión en células infectadas	2.5	1.0
Síntesis en células no infectadas (pg/ml)	90	90
Síntesis en células infectadas (pg/ml)	320	110

El valor 1.0 dado en la tabla hace referencia a una expresión de genes normal, mientras que todos los valores >1.0 indican una sobreeexpresión de genes. Los datos obtenidos con HSV-1 o HSV-2 son similares.

#### Correlación con tests *in vivo*

10       Después del tratamiento de un mes con 100 mg de lactoferrina en forma liofilizada, aplicada a los arcos dentales mediante cepillado o en la lesión labial o genital dos veces al día después de una higiene meticulosa, el valor de las citoquinas proinflamatorias, incluyendo IL-6, y de la concentración de hierro se redujo junto, en el caso de trastornos de la cavidad oral, con la desaparición de sangrado, de abcesos subgingivales, de la inflamación destructiva, que puede conllevar la pérdida del acoplamiento del diente; mientras que en el caso del herpes labial o genital, la lesión y la correspondiente inflamación desaparecieron tras 4 o 7 días de tratamiento. Si los pacientes no mostraron valores alterados de sideremia y hemoglobina, la administración oral de lactoferrina no se realizó. En el caso de pacientes con muchas recaídas, se observaron hipoferroremia, anemia y valores elevados de IL-6 y hepcidina. En estos casos, un tratamiento con 100 mg de lactoferrina saturada a 15-30% dos veces al día durante un mes fue realizado. Después de un mes de la terapia descrita, dichos valores retornaron a ser normales, junto con una reducción en la concentración de IL-6 y hepcidina en sangre o de hepcidina en orina respecto a antes del tratamiento.

#### Ejemplo 4

Actividad de la lactoferrina en micosis de la cavidad oral. El régimen experimental utilizado consistió en lo siguiente:

25       Microorganismos. una cepa de *Candida albicans*, aislada clínicamente, fue utilizada con una concentración igual a  $10^7$  células/ml.

Monocapa celular: fibroblastos gingivales fueron cultivados hasta que se obtuvo una monocapa semiconfluente de  $10^5$  células/ml.

30       Infección de la monocapa celular: la monocapa de fibroblastos gingivales fue inoculada con  $10^7$  *C. albicans*/ml con el fin de tener una multiplicidad de infección igual a 100:1 en la ausencia o presencia de 60 µg/ml de lactoferrina bovina saturada en hierro a 15-30% e incubada durante 2 h a 37°C.

35       Dosis de la expresión de citoquinas: el sobrenadante de la monocapa fue recogido y centrifugado con el fin de eliminar las células de *C. albicans*. Después de repetidas centrifugaciones, el sobrenadante sin *C. albicans* fue congelado a -20°C para el análisis de la producción de cualquier citoquina inducida por la infección. La monocapa fue en su lugar lavada repetidamente con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con el fin de eliminar tanto *C. albicans* como cualquier rastro de lactoferrina, en las condiciones en la que fue añadida, y lisada con el fin de extraer los ARN de los fibroblastos con el fin de testarlos, para expresión de genes, en comparación con los extraídos de las células infectadas o no infectadas en la ausencia de lactoferrina mediante un Microarray.

40       Dosis de producción de citoquinas expresadas: el sobrenadante preservado fue utilizado para dosificar las citoquinas producidas mediante un test enzimático inmune (ELISA) específico para cada citoquina a ser testada.

#### 40       Ensayo de los superóxidos

La producción de las especies reactivas de oxígeno fue medida mediante la adición de ferricitocromo c a las células epiteliales en cultivo. El ensayo está basado en la reducción de ferricitocromo c.

Los resultados de los experimentos están resumidos a continuación:

5

Entre los 300 genes analizados, la infección de la monocapa indujo expresión de genes que respecto de las células no infectadas fue aproximadamente 2 veces mayor sólo por la interleuquina 6. La adición de la lactoferrina redujo la expresión de IL-6, devolviéndola a su valor normal de expresión. Los análisis cuantitativos de la síntesis de la interleuquina 6 confirmaron los datos relacionados con la expresión de genes de dicha citoquina proinflamatoria, tal y como están listados en la tabla 4.

Tabla 4: Expresión y síntesis de la interleuquina 6 (IL-6) en fibroblastos gingivales infectados o no con *C. albicans* en la ausencia o presencia de lactoferrina (60 $\mu$ g/ml).

	Sin lactoferrina	Con lactoferrina
	IL-6	IL-6
Expresión en células no infectadas	1.0	1.0
Expresión en células infectadas	2.0	1.0
Síntesis en células no infectadas (pg/ml)	90	90
Síntesis en células infectadas (pg/ml)	240	130

El valor 1.0 dado en la tabla hace referencia a una expresión de genes normal, mientras que todos los valores > 1.0 indican una sobreexpresión de genes. Los valores de la expresión y producción de IL-6 son mayores que los observados en la infección de fibroblastos gingivales con bacterias contenidas en placa. La adición de lactoferrina, también en infecciones debidas a *Candida albicans*, reduce tanto la expresión como la síntesis de IL-6.

En cuanto a la producción de especies reactivas de oxígeno, una reducción de la excreción de superóxidos fue observada por parte de las células infectadas con *Candida albicans* en la presencia de lactoferrina respecto de las infectadas de nuevo con *Candida albicans* en la ausencia de la glicoproteína.

#### Correlación con tests *in vivo*

En la saliva de pacientes afectados por la infección con *Candida albicans*, IL-6 está presente en una concentración mayor que la observada en la saliva de pacientes sanos. Después de una semana de tratamiento con 100 mg de lactoferrina en forma liofilizada, aplicada a los arcos dentales mediante cepillado, dos veces al día después de una limpieza dental meticulosa, el valor de IL-6 disminuyó junto con la desaparición de la inflamación y de la infección.

Si los pacientes no mostraron valores alterados de sideremia y hemoglobina, la administración oral de la lactoferrina no se realizó; de otra forma, la administración oral de 100 mg de lactoferrina saturada a 15-30% se realizó dos veces al día durante un mes, obteniendo el restablecimiento de los valores fisiológicos de sideremia y hemoglobina.

#### Ejemplo 5

Actividad de lactoferrina en micosis vaginales. El régimen experimental usado consistió en lo siguiente:

Microorganismos: una cepa de *Candida albicans*, aislada de un paciente afectado por vaginitis, fue utilizada con una concentración de 10<sup>7</sup> células/ml.

Monocapa celular: células HeLa derivadas de carcinoma uterino fueron cultivadas hasta que se obtuvo una monocapa semiconfluente de 10<sup>5</sup> células/ml.

Infección de la monocapa celular: la monocapa de fibroblastos gingivales fue inoculada con 10<sup>7</sup> *C. albicans*/ml con el fin de tener una multiplicidad de infección de 100:1 en la ausencia o presencia de 60 $\mu$ g/ml de lactoferrina bovina saturada en hierro a 15-30% e incubada durante 2 h a 37°C.

Dosis de la expresión de citoquinas: el sobrenadante de la monocapa fue recogido y centrifugado con el fin de eliminar las células de *C. albicans*. Después de repetidas centrifugaciones, el sobrenadante sin *C. albicans* fue congelado a -20°C para el análisis de la producción de cualquier citoquina inducida por la infección. La monocapa fue en su lugar lavada repetidamente con PBS sin Ca<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> con el fin de eliminar tanto el *C. albicans* como cualquier rastro de lactoferrina, en las condiciones en la que fue añadida y lisada con el fin de extraer los ARN de las células HeLa con el fin de testarlos, para su expresión de genes, en comparación con los extraídos de las células infectadas en la ausencia de lactoferrina, mediante un Microarray.

Dosis de producción de las citoquinas expresadas: el sobrenadante preservado fué utilizado para dosificar las citoquinas producidas mediante un test enzimático inmune (ELISA) específico para cada citoquina a ser testada.

#### Ensayo de los superóxidos

La producción de las especies reactivas de oxígeno fue medida mediante la adición de ferricitocromo c a las células epiteliales en cultivo. El ensayo fue basado en la reducción de ferricitocromo c.

Los resultados de los experimentos están resumidos a continuación:

Entre los 300 genes analizados, la infección de la monocapa indujo una expresión de genes que comparada con las células no infectadas fue aproximadamente dos veces mayor sólo para la interleuquina 6. La adición de la lactoferrina redujo la expresión de IL-6, devolviéndola a un valor de expresión normal. El análisis cuantitativo de la síntesis de interleuquina 6 confirmó los datos relacionados de la expresión de genes de dicha citoquina proinflamatoria, tal y como está listado en la tabla 5.

Tabla 5: Expresión y síntesis de la interleuquina 6 (IL-6) por células HeLa infectadas o no con *C. albicans* en la ausencia o en la presencia de lactoferrina (500 µg/ml).

	Sin lactoferrina	Con lactoferrina
	IL-6	IL-6
Expresión en células no infectadas	1.0	1.0
Expresión en células infectadas	2.0	1.0
Síntesis en células no infectadas (pg/ml).	90	90
Síntesis en células infectadas (pg/ml)	200	95

El valor 1.0 dado en la tabla hace referencia a una expresión de genes normal, mientras que todos los valores > 1.0 indican una sobreexpresión de genes. La adición de lactoferrina, en células infectadas con *Candida albicans*, reduce tanto la expresión como la síntesis de IL-6.

En cuanto a la producción de especies reactivas de oxígeno, una reducción de la excreción de superóxidos por las células infectadas con *Candida albicans* en la presencia de lactoferrina fue observada con respecto a las infectadas, de nuevo con *Candida albicans*, en la ausencia de la proteína.

#### Correlación con los tests *in vivo*

En las secreciones vaginales de pacientes afectadas por infecciones vaginales apoyada por *Candida albicans*, IL-6 está presente en una concentración mayor que la observada en pacientes sanos. Después de un tratamiento de una semana con 100 mg de lactoferrina en forma liofilizada, aplicada en la vagina dos veces al día después de una higiene meticulosa, el valor de IL-6 en la secreción vaginal disminuyó, y la inflamación y la infección desaparecieron. Si los pacientes no mostraron valores alterados de sideremia y hemoglobina, la administración oral de lactoferrina no fue realizada; de otra forma la administración oral de 100 mg de lactoferrina saturada a 15-30% se realizó dos veces al día durante 1 mes, obteniendo el restablecimiento de los valores fisiológicos de sideremia y hemoglobina.

#### Ejemplo 6

Actividad de la lactoferrina en enteritidis. El régimen experimental utilizado consistió en lo siguiente:

Microorganismos: una cepa de *Salmonella typhi*, aislada clínicamente, fue utilizada a una concentración de  $10^7$  células/ml.

Monocapa celular: células intestinales, CaCo-2, fueron cultivadas hasta obtener una monocapa semiconfluente de  $10^5$  células/ml.

Infección de la monocapa celular: la monocapa de células intestinales fue inoculada con  $10^7$  *S. typhi*/ml con el fin de tener una multiplicidad de infección de 100:1 en la ausencia o presencia de 60 µg/ml de lactoferrina bovina saturada en hierro a 15-30% e incubada durante 2 h a 37°C.

Dosis de la expresión de citoquinas: el sobrenadante de la monocapa fue recogido y centrifugado con el fin de eliminar las células de *S. typhi*. Después de repetidas centrifugaciones, el sobrenadante sin *S. typhi* fue congelado a -20°C para el análisis de la producción de cualquier citoquina inducida por la infección. La monocapa fue en su lugar lavada repetidamente con PBS sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  con el fin de eliminar tanto la *S. typhi* como cualquier rastro de lactoferrina, en las condiciones en las que fue añadida, y lisada con el fin de extraer los ARN de las células CaCo-2 con el fin de testarlas, para expresión de genes, en comparación con las extraídas de las células infectadas en la ausencia de lactoferrina mediante un Microarray.

Dosis de producción de las citoquinas expresadas: el sobrenadante preservado fue utilizado para dosificar las citoquinas producidas mediante un test enzimático inmune (ELISA) específico para cada citoquina a ser testada.

#### Ensayo de los superóxidos

La producción de las especies reactivas de oxígeno fue medida añadiendo ferricitocromo c a las células epiteliales cultivadas. El ensayo está basado en la reducción de ferricitocromo c.

Los resultados de los experimentos están resumidos a continuación:

Entre los 300 genes analizados, la infección de la monocapa indujo expresión de genes, que comparada con las células no infectadas, fue aproximadamente dos veces mayor sólo para la interleuquina 6. La adición de lactoferrina redujo la expresión de IL-6, devolviéndola a un valor de expresión normal. El análisis cuantitativo de la síntesis de interleuquina 6 confirmó los datos relacionados con la expresión de genes de esta citoquina proinflamatoria, tal y como está listado en la tabla 6.

Tabla 6: Expresión y síntesis de interleuquina 1 $\beta$ , interleuquina 6 (IL-6), interleuquina 8 (IL-8) y TNF- $\alpha$  en células intestinales infectadas o no con *Salmonella typhi* en la ausencia o presencia de lactoferrina (60 $\mu$ g/ml).

	Sin lactoferrina				Con lactoferrina			
	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$	IL-1 $\beta$	IL-6	IL-8	TNF- $\alpha$
Expresión en células no infectadas	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Expresión en células infectadas	3.0	8.1	9.2	5.0	0.9	0.5	3.0	1.0
Síntesis en células no infectadas (pg/ml)	1.000	90	2.100	22	1.000	90	2.100	22
Síntesis en células infectadas (pg/ml)	4.500	850	9.000	120	800	80	3.800	15

#### Ejemplo 7

Cápsulas para la administración oral en el tratamiento de hipoferremia y anemia.

Cualquiera que sea la causa de los estados de hipoferremia y anemia, la administración durante un mes de una cápsula que contiene 100 mg de lactoferrina dos veces al día restableció los valores normales de sideremia y hemoglobina. Los datos cuantitativos resultantes están resumidos en la tabla 7 y pueden ser atribuidos a todos los tratamientos *in vivo*, a los que hacen referencia a los ejemplos 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Tabla 7: Valores medios de hemoglobina y sideremia de 150 pacientes, antes y después del tratamiento con 100 mg de lactoferrina 2 veces al día.

Antes del tratamiento		Después del tratamiento con lactoferrina 100 mg 2 veces al día	
Hemoglobina g/dl Gama y valores medios	Sideremia $\mu$ g/ml Gama y valores medios	Hemoglobina g/dl Gama y valores medios	Sideremia $\mu$ g/ml Gama y valores medios
10.1-11.9 11.0	25-64 44.5	12.2-13.5 12.8	80-130 105.0

Además, los valores de hepcidina y de IL-6 ensayados después de una administración de lactoferrina durante un mes fueron menores que aquellos anteriores a la terapia. En particular, la hepcidina disminuyó de 160 ng/ml a 100 ng/ml en sangre, y de 1000 ng/mg de creatinina al día a 10 ng/mg de creatinina al día en orina. En cuanto a IL-6, después de un mes de tratamiento con lactoferrina, su concentración en sangre disminuyó de 7.5 en hombres y 5.4 pg/ml en mujeres a aproximadamente 2.4 y 1.2 pg/ml respectivamente.

#### Ejemplo 8

Producto liofilizado para uso oral. Uso: deposición de 100 mg de lactoferrina en las membranas mucosas de la cavidad oral dos veces al día después de una higiene oral meticulosa.

Ingrediente activo: 100 mg de lactoferrina liofilizada

Excipientes: bicarbonato sódico 25 mg  
citrato sódico 25 mg

Ejemplo 9

5 Producto liofilizado para uso vaginal. Uso: deposición de 100 mg de lactoferrina en membranas mucosas vaginales dos veces al día después de una higiene meticulosa.

Ingrediente activo: 100 mg de lactoferrina liofilizada

Ejemplo 10

Solución para uso oral. Uso: un enjuague de aproximadamente 10-15 ml dos veces al día después de una higiene oral meticulosa.

10 Composición para 100 ml:

Ingrediente activo: solución en agua o en solventes usada normalmente para soluciones orales que contienen 1% de lactoferrina a ser disuelta en el momento de su uso.

Ejemplo 11

15 Solución para uso vaginal. Uso: un lavado de aproximadamente 20-25 ml dos veces al día después de una higiene meticulosa.

Composición para 100 ml:

Ingrediente activo: solución en agua o en solventes usado normalmente para soluciones vaginales que contienen 1% de lactoferrina a ser disuelta en el momento de su uso.

Ejemplo 12

20 Gel o crema para uso oral. Uso: aplicación dos veces al día después de una higiene oral meticulosa.

Composición para 100 g

Ingrediente activo: lactoferrina es incorporada con una concentración de 1% en la crema o el gel.

Excipientes: Común a todos los geles o cremas para aplicaciones en membranas mucosas.

Ejemplo 13

25 Gel o crema para uso vaginal. Uso: aplicación dos veces al día después de una higiene meticulosa.

Composición para 100 g:

Ingrediente activo: lactoferrina es incorporada con una concentración del 1% en la crema o el gel.

Excipientes: común a todos los geles o cremas para aplicaciones en la mucosa vaginal.

30 Ejemplo 14

Comprimidos para uso tópico. Uso: un comprimido a ser disuelto en la boca dos veces al día después de una higiene oral meticulosa.

Composición para 300 mg:

Ingrediente activo: 100 mg de lactoferrina

35 Excipientes: benzoato sódico 150 mg

esencia de menta 50 mg

Ejemplo 15

Comprimidos vaginales. Uso: un comprimido a ser aplicado en la vagina dos veces al día después de una higiene meticulosa.

40 Composición para 300 mg:

Ingrediente activo: 100 mg de lactoferrina

Excipientes: benzoato sódico 150 mg

bicarbonato sódico 50 mg

Ejemplo 16

5

Pasta de dientes: Uso: al menos dos veces al día.

Composición para 100 mg

Ingrediente activo: lactoferrina 500 mg

Excipientes: común a todas las pastas de dientes, más 50 mg de bicarbonato sódico y 50 mg de citrato sódico.

Ejemplo 17

10

Chicle. Uso: 1 chicle a ser masticado después de cada comida

Ingrediente activo: lactoferrina 500 mg

Excipientes: goma base 400 mg

citrato sódico 10 mg

bicarbonato sódico 10 mg

15

hidroxibenzoato 20 mg

esencias 5 mg

Ejemplo 18

Producto liofilizado a ser disuelto en agua y congelado. Uso: masaje de las encías dos o más veces al día.

Composición para 10 ml:

20

Ingrediente activo. 20 mg de lactoferrina

Excipientes: esencias 5 mg

Ejemplo 19

Cápsulas a ser tragadas. Uso: 1 cápsula dos veces al día que no coincide con las comidas.

Composición por cápsula:

25

Ingrediente activo: 100 mg de lactoferrina

Excipientes: bicarbonato sódico 25 mg

30

Los ejemplos dados anteriormente demuestran la capacidad de la lactoferrina bovina para inhibir la expresión y la síntesis de las citoquinas proinflamatorias por fibroblastos gingivales infectados con bacterias contenidas en una placa, tomada de un paciente, junto con la actividad de proteger las células contra el daño causado por superóxidos, según un modelo experimental que es descrito, repetible y reproducible. Los ejemplos dados anteriormente demuestran también la capacidad de la lactoferrina bovina para inhibir la expresión y la síntesis de las citoquinas proinflamatorias por fibroblastos gingivales infectados con *Prevotella intermedia* o bacterias anaeróbicas Gram-negativas presentes en la placa subgingival, junto con la actividad de proteger las células contra daños causados por superóxidos, según un modelo experimental que es descrito, repetible y reproducible. Los ejemplos dados anteriormente también demuestran la capacidad de la lactoferrina bovina para inhibir la expresión y la síntesis de las citoquinas proinflamatorias por fibroblastos gingivales o por células HeLa infectadas con *Candida albicans*, junto con la actividad de proteger las células contra daños causados por superóxidos, según un modelo experimental que es descrito, repetible y reproducible. Los ejemplos dados anteriormente demuestran también la capacidad de la lactoferrina bovina para inhibir la expresión y la síntesis de las citoquinas proinflamatorias por parte de las células intestinales infectadas con *Salmonella spp*, junto con la actividad de proteger las células contra daños causados por superóxidos, según un modelo experimental que es descrito repetible y reproducible. En los tests in vivo, en todos los casos en los que se encontraron hipoferrremia y anemia en la infección e inflamación de las membranas mucosas, antes y después de la administración oral de lactoferrina bovina durante al menos un mes, el análisis de IL-6 y de hepcidina en sangre o en orina fue realizado junto con análisis de los valores hematológicos, para demostrar la efectividad del invento para restablecer la homeostasis del hierro en circulación y depositado en tejidos.

Aunque sólo algunos de los ejemplos de realización preferidos de la invención han sido descritos en el texto, la persona experimentada en la técnica entenderá inmediatamente que en cualquier caso es posible obtener otros ejemplos de realización igualmente ventajosos y preferidos.

**REIVINDICACIONES**

1. Lactoferrina bovina para su uso en el tratamiento de inflamación destructiva (patológica) que afecta a membranas mucosas asociada con infección aguda o crónica, y opcionalmente asociada con estados de hipoferremia y/o anemia
- 5        cuando las membranas mucosas están seleccionadas de entre una o más de membranas mucosas vaginales, anales o de la cavidad orofaríngea y la lactoferrina bovina es para uso tópico cuando la inflamación destructiva (patológica) no está asociada con hipoferremia y/o anemia, y combinada con el uso oral de lactoferrina bovina cuando la inflamación destructiva (patológica) está asociada con hipoferremia y/o anemia, o
- cuando las membranas mucosas son membranas mucosas intestinales y la lactoferrina bovina es para su uso oral cuando la inflamación destructiva (patológica) está asociada con hipoferremia y/o anemia.
- 10      2. La lactoferrina bovina para su uso según la reivindicación 1, cuando el tratamiento comprende obtener simultáneamente los siguientes efectos:
- i) Una acción bacteriostática/fungistática, bactericida/fungicida y una acción que bloquea interacciones tempranas virus-células huésped para infecciones víricas,
  - ii) Restablecimiento de la homeostasis de la inflamación,
  - 15        iii) Restablecimiento de la homeostasis de hierro,
  - iv) Restablecimiento de los valores fisiológicos de siderremia y hemoglobina.
- 20      3. La lactoferrina bovina para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, cuando las infecciones agudas o crónicas asociadas con inflamación destructiva (patológica) están seleccionadas de entre una o más de infecciones micóticas y víricas en general, infecciones recurrentes causadas por microorganismos presentes en forma adherida, agregada o de biofilm y microorganismos que tienen una localización intracelular facultativa u obligatoria.
- 25      4. La lactoferrina bovina para su uso según la reivindicación 3, cuando las infecciones agudas o crónicas asociadas con inflamación destructiva (patológica) están seleccionadas de entre una o más de gingivitis, gingivoestomatitis vírica y parodontopatías.
5. La lactoferrina bovina para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, cuando el tratamiento hace referencia a estados en los que la inflamación destructiva (patológica), hipoferremia, anemia e infecciones agudas o crónicas están presentes simultáneamente.
- 30      6. La lactoferrina bovina para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, cuando el tratamiento de la hipoferremia y/o anemia comprende restablecer una distribución fisiológica de la cantidad de hierro entre tejidos y circulación.
7. Un preparado combinado que comprende, como componentes activos, un primer compuesto farmacéutico para uso tópico de lactoferrina bovina y un segundo compuesto farmacéutico para uso oral de lactoferrina bovina.
- 35      8. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, en el que la lactoferrina tiene un grado de saturación de los sitios de unión para hierro (III) que oscila de 0% saturación a 100% saturación, preferiblemente de 0% (límite incluido) a 100% (límite no incluido), más preferiblemente de 0% a 20% (límites incluidos) de saturación.
9. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según la reivindicación 8, en la que el grado de saturación es obtenido con uno o más de Fe(III), Zn, Cu y Mn.
- 40      10. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, en la que la lactoferrina es seleccionada entre uno o más de lactoferrina nativa intacta, lactoferrina recombinante intacta, lóbulo N, lóbulo C, secuencia comprendida entre aa 86 y 258 de lactoferrina intacta, y secuencia comprendida entre aa 285 y 692 de lactoferrina intacta.
11. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, en el que el uso tópico es obtenido mediante polvos anhidros liofilizados para su uso directo en membranas mucosas.
- 45      12. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, en donde el uso oral es obtenido mediante cápsulas o comprimidos que contienen la lactoferrina.
13. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, en donde el uso tópico de la lactoferrina es tal como para administrar una cantidad total de lactoferrina que oscila entre 100 mg y 400 mg al día, durante una semana.

14. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según la reivindicación 13, en donde el uso tópico ocurre mediante polvo liofilizado a ser dispersado sobre las membranas mucosas dos veces al día en una cantidad igual a 50-200 mg por aplicación, durante una semana.
- 5 15. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según la reivindicación 13, en donde el uso tópico ocurre mediante una forma líquida o semisólida de dosis múltiple que comprende lactoferrina en la gama de 0,1% - 10% peso/volumen total de compuesto.
16. Lactoferrina bovina o preparado combinado para su uso según una o más de las anteriores reivindicaciones, en donde el uso oral de la lactoferrina es tal como para administrar una cantidad total de lactoferrina de entre 50 y 200 mg al día, durante un mes, preferiblemente igual a 200 mg al día, durante un mes.