

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 071**

51 Int. Cl.:

C07K 14/79 (2006.01)

A61K 38/40 (2006.01)

A23J 1/20 (2006.01)

A61P 19/00 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.07.2002 E 02758971 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.08.2013 EP 1490404**

54 Título: **Lactoferrina**

30 Prioridad:

03.04.2002 NZ 51812102

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

18.12.2013

73 Titular/es:

**AUCKLAND UNISERVICES LIMITED (100.0%)
Level 10 70 Symonds Street
Auckland 1010 , NZ**

72 Inventor/es:

**CORNISH, JILLIAN;
REID, IAN REGINALD;
PALMANO, KAY PATRICIA y
HAGGARTY, NEILL WARD**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 435 071 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

Lactoferrina

Esta solicitud reivindica prioridad con respecto a la Solicitud de Patente de Nueva Zelanda No. de Serie 518121, presentada el 3 de abril de 2002

5 Antecedentes

La lactoferrina es una glicoproteína de 80 kD fijadora de hierro presente en la mayoría de los fluidos exocritos, con inclusión de lágrimas, bilis, moco bronquial, fluidos gastrointestinales, moco cervico-vaginal, fluido seminal, y leche. La misma es un constituyente principal de los gránulos específicos secundarios de los neutrófilos polimorfonucleares circulantes. La fuente más rica de lactoferrina es la leche de mamífero y el calostro.

- 10 La lactoferrina circula a una concentración de 2-7 µg/ml. La misma tiene múltiples funciones biológicas supuestas, que incluyen la regulación del metabolismo del hierro, la función inmune, y el desarrollo del embrión. La lactoferrina tiene actividad anti-microbiana contra una diversidad de patógenos que incluyen bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, levaduras, y hongos. El efecto antimicrobiano de la lactoferrina está basado en su capacidad de fijación de hierro, que es esencial para el crecimiento de los patógenos. La lactoferrina inhibe también la replicación de
- 15 diversos virus y aumenta la susceptibilidad de algunas bacterias a los antibióticos y lisozima por fijación al componente lipídico A de los lipopolisacáridos en las membranas bacterianas.

EP 1.116.490A1 da a conocer el uso de lactoferrina para mejora de la función hepática.

US 5.932.259 da a conocer el uso de una fracción básica de proteínas aislada de leche como un agente de fortalecimiento de los huesos.

- 20 US 2002/0004073 da a conocer suplementos dietéticos para consumo humano que comprenden calostro y lactoferrina para uso en la inhibición de infecciones y aumento de la reparación y curación de los tejidos.

JP 2000281586 da a conocer el uso de una composición hierro/lactoferrina para uso en el fortalecimiento del hueso en donde la composición contiene un complejo hierro/lactoferrina que tiene al menos 3 átomos de hierro por molécula de lactoferrina.

- 25 Kanyshkova et al "lactoferrin and its biological function"; Biochemistry 66 (1) 2001, páginas 1-7 da a conocer que la lactoferrina tiene dos sitios de fijación de hierro.

De acuerdo con la presente invención, se proporciona un polipéptido de lactoferrina para uso en el tratamiento o la prevención de la osteoporosis, en donde dicho polipéptido de lactoferrina tiene una pureza de al menos 65% basada en peso seco y en donde dicho polipéptido de lactoferrina contiene no más de dos iones metálicos por molécula de

30 lactoferrina.

Preferiblemente, dicho polipéptido de lactoferrina contiene dos iones metálicos por molécula.

Ventajosamente, dicho polipéptido de lactoferrina contiene iones hierro, cobre, cobalto, manganeso, cinc o magnesio.

Más preferiblemente, dicho polipéptido de lactoferrina contiene iones hierro.

- 35 Convenientemente, dicho polipéptido de lactoferrina es humano o recombinante.

El polipéptido de lactoferrina tiene preferiblemente una pureza de al menos 75%, más preferiblemente al menos 85% y aún más preferiblemente al menos 95%.

La invención proporciona también una composición nutriente farmacéutica que comprende dicho polipéptido de lactoferrina de la invención, junto con una composición farmacéutica que comprende dicho polipéptido de lactoferrina de la invención.

40

Ventajosamente, las composiciones de la invención comprenden además un agente adicional mejorador del hueso.

Convenientemente, dicho agente mejorador del hueso se selecciona de calcio, cinc, magnesio, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K2.

Sumario

- 45 Esta invención se refiere a un polipéptido de lactoferrina que es capaz de estimular el crecimiento esquelético e inhibir la resorción ósea.

Específicamente, esta invención caracteriza un polipéptido puro de lactoferrina que contiene no más de dos (es decir 0, 1, ó, preferiblemente, 2) iones metálicos por molécula. Un polipéptido "puro" es un polipéptido exento de otras

macromoléculas biológicas y que tiene una pureza de al menos 65% (v.g., al menos 70, 75, 80, 85, 90, 95, ó 99%) basada en peso seco. La pureza de un polipéptido puede medirse por cualquier método estándar apropiado, por ejemplo, por cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida, o análisis HPLC. El polipéptido de lactoferrina puede ser un polipéptido existente naturalmente, un polipéptido recombinante, o un polipéptido sintético.

5 Variantes de un polipéptido de lactoferrina de tipo salvaje (v.g., un fragmento del polipéptido de lactoferrina de tipo salvaje que contiene al menos 2 (v.g., 4, 6, 8, 10, 20, 50, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700) aminoácidos, o una proteína recombinante que contiene una secuencia del polipéptido de lactoferrina) que mantienen la actividad biológica de un polipéptido de lactoferrina de tipo salvaje están dentro del alcance de la invención. Un polipéptido de lactoferrina de la invención puede ser de origen mamífero, v.g., de leche humana o bovina. El ion metálico fijado al
10 polipéptido puede ser un ion hierro (como en un polipéptido de lactoferrina existente naturalmente), un ion cobre, un ion cromo, un ion cobalto, un ion manganeso, un ion cinc, o un ion magnesio.

Un polipéptido de lactoferrina de la invención puede utilizarse para estimular el crecimiento esquelético (v.g., por promover la proliferación células osteoblásticas y condrocitos) e inhibir la resorción ósea (v.g., por inhibición del desarrollo de osteoclastos). Una preparación de un polipéptido de lactoferrina de la invención (v.g., lactoferrina
15 aislada de leche de bovino, puede contener polipéptidos de una sola especie, v.g., fijando cada molécula dos iones hierro. El mismo puede contener también polipéptidos de especies diferentes, v.g., algunas moléculas que no fijan ion alguno en tanto que otras fijan cada una uno o dos iones; algunas moléculas que fijan cada una un ion hierro y otras que fijan cada una un ion cobre; algunas moléculas que fijan cada una un polipéptido de lactoferrina biológicamente activo (de longitud total o más cortos que la longitud total), que contiene 0, 1, ó 2 iones metálicos y otras que son cada una un fragmento (igual o diferente) del polipéptido; o siendo todas las moléculas cada una un
20 fragmento (igual o diferente) de un polipéptido de lactoferrina de longitud total que contiene 0, 1, ó 2 iones metálicos. Por ejemplo, una mixtura de polipéptidos de lactoferrina de longitud total y diversos fragmentos de polipéptidos de lactoferrina de longitud total pueden prepararse a partir de un hidrolizado, v.g., un material digerido parcialmente tal como un material digerido con proteinasa de polipéptidos de lactoferrina de longitud total. En caso contrario, aquélla
25 puede obtenerse por mezcladura de polipéptidos de lactoferrina de longitud total con diversos fragmentos de polipéptidos de lactoferrina de longitud total (v.g., fragmentos sintéticos). Una mixtura de diversos fragmentos de polipéptidos de lactoferrina de longitud total, por otra parte, puede prepararse, por ejemplo, por digestión completa (es decir, tal que no queda polipéptido alguno de longitud total después de la digestión) de polipéptidos de lactoferrina de longitud total, o por mezcladura de fragmentos diferentes de polipéptidos de lactoferrina de longitud
30 total.

La invención caracteriza adicionalmente una composición nutriente farmacéutica, que puede ser leche, zumo, una bebida refrescante, un tentempié, o un suplemento dietético. La composición nutriente farmacéutica contiene un polipéptido de lactoferrina de la invención o una mixtura del polipéptido y fragmentos del polipéptido en una cantidad mayor que la cantidad existente naturalmente. Se ha encontrado que la lactoferrina estimula la proliferación células
35 osteoblásticas y condrocitos e inhibe el desarrollo de osteoclastos. Así pues, una composición nutriente farmacéutica de esta invención es útil para prevención y tratamiento de trastornos óseos tales como osteoporosis y artritis u osteo-artritis reumatoide. La composición nutriente farmacéutica puede incluir adicionalmente una cantidad adecuada de otro agente mejorador del hueso, tal como calcio, cinc, magnesio, vitamina C, vitamina D, vitamina E, vitamina K2, o una mixtura de las mismas.

40 Adicionalmente, esta invención caracteriza una composición farmacéutica que contiene un polipéptido de lactoferrina de la invención o una mixtura del polipéptido y fragmentos del polipéptido y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición farmacéutica incluye también otro agente mejorador del hueso. La invención abarca también el uso de un polipéptido de lactoferrina o una mixtura del polipéptido y fragmentos del polipéptido arriba descritos para la fabricación de un medicamento para prevención y tratamiento de enfermedades
45 óseas.

Esta invención proporciona un método de prevención y tratamiento de trastornos relacionados con el hueso (v.g., por estimulación del crecimiento esquelético e inhibición de la resorción ósea). El método incluye administrar a un individuo en necesidad de ello una cantidad eficaz de un polipéptido de lactoferrina de la invención o una mixtura del polipéptido y fragmentos del polipéptido. El método puede incluir adicionalmente administrar simultáneamente al
50 individuo una cantidad eficaz de otro agente mejorador del hueso.

Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en la descripción adjunta que sigue. Otras características, objetos, y ventajas de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción detallada, y de las reivindicaciones.

Descripción Detallada

55 Esta invención está basada en el descubrimiento inesperado de que la lactoferrina estimula la proliferación células osteoblásticas y condrocitos e inhibe el desarrollo de osteoclastos. Así pues, la misma es útil para prevención y tratamiento de trastornos óseos.

Un polipéptido de lactoferrina de la invención es un polipéptido puro que contiene no más de dos iones metálicos por molécula. Prácticamente, la medida de la ratio hierro/lactoferrina para una preparación de lactoferrina puede estar

comprendida dentro del intervalo de 0-2,5. La misma puede aislarse de una fuente natural (v.g., leche de mamífero), o producirse utilizando métodos de ingeniería genética o de síntesis química bien conocidas en la técnica. Lo que sigue es un procedimiento ilustrativo para aislamiento de lactoferrina de leche de bovino:

5 Se hace pasar leche desnatada reciente (7 l, pH 6,5) a través de una columna de 300 ml de S-Sepharose Fast Flow equilibrada en agua mili Q, a un caudal de 5 ml/min y a 4°C. La proteína no fijada se lava concienzudamente con 2,5 volúmenes de lecho de agua y la proteína fijada se eluye gradualmente con aproximadamente 2,5 volúmenes de lecho cada vez de cloruro de sodio 0,1 M, 0,35 M y 1,0 M. La lactoferrina que se eluye como una banda discreta de color rosa en cloruro de sodio 1 M se recoge como una sola fracción y se dializa contra agua mili-Q seguido por liofilización. El polvo liofilizado se disuelve en tampón de fosfato de sodio 25 mM, pH 6,5 y se somete a
10 cromatografía sobre S-Sepharose Fast Flow con un gradiente de cloruro de sodio hasta 1M en el tampón anterior y a un caudal de 3 ml/min. Las fracciones que contienen lactoferrina de pureza suficiente como se determina por electroforesis en gel y HPLC de fase inversa se combinan, se dializan y se liofilizan. La purificación final de lactoferrina se realiza por filtración en gel sobre Sephacryl 300 en fosfato de potasio 80 mM, pH 8,6, que contiene cloruro de potasio 0,15 M. Las fracciones seleccionadas se combinan, se dializan contra agua mili-Q y se liofilizan.
15 La pureza de esta preparación es mayor que 95% como se indica por análisis HPLC y por valores de ratio espectral (280 nm/465 nm) de ~ 19 o menos para la forma de lactoferrina saturada de hierro.

La saturación de hierro se consigue por adición de un exceso molar 2:1 de nitrilotriacetato férrico 5 mM (Foley y Bates (1987) Analytical Biochemistry 162, 296-300) a una solución al 1% de la lactoferrina purificada en Tris 50 mM, pH 7,8 que contiene bicarbonato de sodio 10 mM. El exceso de nitrilotriacetato férrico se retira por diálisis contra 100
20 volúmenes de agua mili Q (renovada dos veces) durante un total de 20 horas a 4°C. La (holo-)lactoferrina cargada con hierro se liofiliza posteriormente.

Se prepara (apo-)lactoferrina agotada en hierro por diálisis de una solución al 1% de la muestra de lactoferrina altamente purificada en agua contra 30 volúmenes de ácido cítrico 0,1 M, pH 2,3, que contiene 500 mg/l de EDTA disódico, durante 30 horas a 4°C (Massons y Heremans (1966) Protides of the Biological Fluids 14, 115-124). Se eliminan luego el citrato y el EDTA por diálisis contra 30 volúmenes de agua mili-Q (renovada una sola vez) y la
25 solución incolora resultante se liofiliza.

Un polipéptido de lactoferrina de la invención puede contener un ion hierro (como en el polipéptido de lactoferrina existente naturalmente) u otro ion metálico distinto de hierro (v.g., un ion cobre, un ion cromo, un ion cobalto, un ion manganeso, un ion cinc, o un ion magnesio). Por ejemplo, la lactoferrina aislada de leche de bovino puede estar
30 agotada en hierro y cargada luego con otro tipo de ion metálico. Por ejemplo, la carga de cobre puede realizarse de acuerdo con el mismo método descrito arriba para la carga de hierro. Para la carga de lactoferrina con otros iones metálicos, puede utilizarse el método de Ainscough, et al. ((1979) Inorganica Chimica Acta 33, 149-153).

En una preparación de un polipéptido de lactoferrina de la invención, los polipéptidos pueden ser de una sola especie, o de especies diferentes. Por ejemplo, los polipéptidos pueden contener cada uno un número diferente de
35 iones metálicos o una especie diferente de iones metálicos; las longitudes de los polipéptidos pueden variar, v.g., algunos son polipéptidos de longitud total y algunos son fragmentos, y los fragmentos pueden representar cada uno una porción particular de un polipéptido de longitud total. Una preparación de este tipo puede obtenerse de una fuente natural o por mezcla de especies diferentes de polipéptidos de lactoferrina. Por ejemplo, una mixtura de polipéptidos de lactoferrina de longitudes diferentes puede prepararse por digestión con proteinasas (completa o
40 parcial) de polipéptidos de lactoferrina de longitud total. El grado de digestión puede controlarse de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica, v.g., por manipulación de la cantidad de proteinasa o del tiempo de incubación. Una digestión completa produce una mixtura de diversos fragmentos de polipéptidos de lactoferrina de longitud total; una digestión parcial produce una mixtura de polipéptidos de lactoferrina de longitud total y diversos fragmentos.

45 Un polipéptido de lactoferrina o una mixtura del polipéptido y fragmentos del polipéptido arriba descritos se utiliza para preparar una composición nutriente farmacéutica de esta invención para prevención y tratamiento de trastornos relacionados con el hueso. Ejemplos de tales trastornos incluyen, pero sin carácter limitante, osteoporosis, artritis reumatoide u osteo-artritis, osteodistrofia hepática, osteomalacia, raquitismo, osteítis-fibrosa cística, osteodistrofia renal, osteoesclerosis, osteopenia, fibrogénesis imperfecta-ossium, hiperparatiroidismo secundario,
50 hipoparatiroidismo, hiperparatiroidismo, enfermedad renal crónica, sarcoidosis, osteoporosis inducida por glucocorticoides, hipercalcemia idiopática, enfermedad de Paget, y osteogénesis imperfecta. La composición nutriente farmacéutica puede ser un suplemento dietético (v.g., una cápsula, una minibolsita, o una tableta) o un producto alimenticio (v.g., leche, zumo, una bebida refrescante, una bolsa de té de hierbas, o dulces). La composición puede incluir también otros nutrientes, tales como una proteína, un carbohidrato, vitaminas, minerales,
55 o aminoácidos. La composición puede encontrarse en una forma adecuada para uso oral, tal como una tableta, una cápsula dura o blanda, una suspensión acuosa o aceitosa, o un jarabe; o en una forma adecuada para uso parenteral, tal como una solución acuosa de propilenglicol, o una solución acuosa tamponada. La cantidad del ingrediente activo en la composición nutriente farmacéutica depende en alto grado de una necesidad específica del individuo. La cantidad varía también, como ha sido reconocido por los expertos en la técnica, dependiendo de la ruta
60 de administración, y de la posible co-utilización de otros agentes mejoradores del hueso.

Se encuentra también dentro del alcance de esta invención una composición farmacéutica que contiene una cantidad eficaz de un polipéptido de lactoferrina o una mezcla del polipéptido y fragmentos del polipéptido arriba descritos, así como un vehículo farmacéuticamente aceptable. La composición farmacéutica puede utilizarse para prevenir y tratar trastornos relacionados con el hueso arriba descritos. La composición farmacéutica puede incluir
 5 adicionalmente una cantidad eficaz de otro agente mejorador del hueso. El vehículo farmacéuticamente aceptable incluye disolvente, un medio de dispersión, un recubrimiento, un agente antibacteriano y antifúngico, y un agente isotónico y retardante de la absorción. Una "cantidad eficaz" es la cantidad requerida para conferir un efecto terapéutico. La interrelación de las dosis para animales y humanos (basada en miligramos por metro cuadrado de superficie corporal) ha sido descrita por Freireich, et al., (1966) Cancer Chemother. Rep. 50:219. El área de la
 10 superficie corporal puede determinarse aproximadamente a partir de la altura y el peso del individuo. Véase, v.g., Scientific Tables, Geigy Pharmaceuticals, Ardley, Nueva York, 1970, 537. Las dosis eficaces varían también, como ha sido reconocido por los expertos en la técnica, dependiendo de la ruta de administración, el uso de excipientes, y análogos.

Un polipéptido de lactoferrina de la invención o una mezcla del polipéptido y fragmentos del polipéptido pueden formularse en formas de dosificación para rutas de administración diferentes utilizando métodos convencionales. Por ejemplo, aquella puede formularse en una cápsula, un sello de gel, o una tableta para administración oral. Las cápsulas pueden contener cualesquiera materiales estándar farmacéuticamente aceptables tales como gelatina o celulosa. Las tabletas pueden formularse de acuerdo con procedimientos convencionales por compresión de
 15 mezclas del polipéptido de lactoferrina o una mezcla del polipéptido y fragmentos del polipéptido con un vehículo sólido y un lubricante. Ejemplos de vehículos sólidos incluyen almidón y azúcar-bentonita. El polipéptido de lactoferrina o una mezcla del polipéptido y fragmentos del polipéptido pueden administrarse en forma de una tableta de envoltura dura o una cápsula que contiene una aglomerante, v.g., lactosa o manitol, una carga convencional, y un agente de conformación en tabletas. La composición farmacéutica puede administrarse por la ruta parenteral. Ejemplos de formas de dosificación parenteral incluyen soluciones acuosas, solución salina isotónica o glucosa al
 20 5% del ingrediente activo, u otro excipiente farmacéuticamente aceptable bien conocido. Ciclodextrinas, u otros agentes solubilizantes bien conocidos por quienes están familiarizados con la técnica, pueden utilizarse como excipientes farmacéuticos para suministro del agente terapéutico.

La eficacia de una composición de esta invención puede graduarse tanto in vitro como in vivo. Véanse, v.g., los ejemplos que siguen. Resumidamente, la composición puede testarse en cuanto a su capacidad para promover la proliferación células osteoblásticas y condrocitos in vitro. Para estudios in vivo, la composición puede inyectarse en un animal (v.g., un ratón) y se accede luego a sus efectos sobre los tejidos óseos. Basándose en los resultados, pueden determinarse un intervalo de dosificación apropiado y la ruta de administración.

Los ejemplos específicos que siguen debe considerarse como meramente ilustrativos, y no limitantes del resto de la exposición en modo alguno, cualquiera que sea éste. Sin más elaboración, se cree que un experto en la técnica puede, basándose en la descripción de esta memoria, utilizar la presente invención en su máxima extensión.

La lactoferrina promueve la proliferación células osteoblásticas primarios de rata

Se aislaron osteoblastos por digestión con colagenasa de cráneos de rata fetal de 20 días, como ha sido descrito previamente por Lowe y colaboradores (Lowe et al., (1991) Journal of Bone and Mineral Research 6, 1277-1283). Los cráneos se diseccionaron asépticamente, y los huesos frontal y parietal se despojaron de su periostio. Se
 40 recogieron únicamente las porciones centrales de los huesos, exentas de tejido de sutura. Los cráneos se trataron dos veces con solución salina tamponada con fosfato (PBS) que contenía EDTA 3 mM (pH 7,4) durante 15 minutos a 37°C en un baño de sacudidas de agua. Después de lavado una sola vez en PBS, los cráneos se trataron dos veces con 3 ml de colagenasa de concentración 1 mg/ml durante 7 minutos a 37°C. Después de desechar los sobrenadantes de las digestiones I y II, los cráneos se trataron ulteriormente dos veces con 3 ml de colagenasa de
 45 concentración 2 mg/ml (30 minutos, 37°C). Los sobrenadantes de las digestiones III y IV se agruparon, se centrifugaron, y las células se lavaron en medio de Eagle modificado de Dulbecco (DME) con 10% de suero de ternero fetal (FCS), se suspendieron en DME/FCS al 10%, y se pusieron en matraces de 75 cm³. Las células se incubaron bajo 5% de CO₂ y 95% de aire a 37°C. Se alcanzó la confluencia al cabo de 5-6 días, en cuyo momento se subcultivaron las células. Después de tripsinización utilizando tripsina-EDTA (0,05%/0,53 mM), se lavaron las
 50 células en medio esencial mínimo (MEM) con 5% FCS y se resuspendieron en un medio reciente, después de lo cual se sembraron a razón de 5 x 10⁴ células/ml en placas de 24 pocillos (suspensión de 0,5 ml de celdas por pocillo, es decir, 1,4 x 10⁴ células/cm²). El carácter de tipo osteoblástico de estas células se ha establecido por demostración de niveles elevados de actividad de fosfatasa alcalina y producción de osteocalcina [como ha sido descrito por Groot, et al. (1985) Cell Biol Int Res 9, 528] y una respuesta sensible a adenilato-ciclasa para la
 55 hormona paratiroidea y prostaglandinas [como ha sido descrito por Helmann-Erlee, et al. (1986) Novena Conferencia Internacional acerca de hormonas reguladoras del calcio y metabolismo óseo, p. 409].

Se realizaron estudios de proliferación (recuento de células e incorporación de timidina) tanto en poblaciones de células con crecimiento activo como en poblaciones sin crecimiento activo. Para producir células de crecimiento activo, se pusieron poblaciones subconfluentes (24 horas después del subcultivo) en MEM reciente que contenía 1%
 60 de FCS y una muestra de lactoferrina. Para producir células que no crecían activamente, se pusieron poblaciones subconfluentes en medio exento de suero con seroalbúmina bovina al 0,1% más una muestra de lactoferrina. Se

analizaron los números de células al cabo de 6, 24, y 48 horas después de la adición de las muestras de lactoferrina (es decir, lactoferrina purificada, holo-lactoferrina, y apo-lactoferrina) preparadas como se ha descrito arriba. Los números de células se determinaron después de retirar las células de los pocillos por exposición a tripsina/EDTA (0,05%/0,53 mM) durante aproximadamente 5 minutos a 37°C. El recuento se realizó en una cámara de hemocitómetro. La incorporación de [³H]-timidina en células de crecimiento activo y células sin crecimiento activo se evaluó por pulsación de las células con [³H]-timidina (1 µCi/pocillo) 2 horas antes del final de la incubación. El experimento se terminó al cabo de 6, 24, ó 48 horas por lavado de las células en MEM que contenía timidina fría seguido por la adición de ácido tricloroacético al 10%. El precipitado se lavó dos veces con etanol: éter (3:1), y los pocillos se desecaron a la temperatura ambiente. El residuo se redisolvió en KOH 2 M a 55°C durante 30 minutos, se neutralizó con HCl 1 M y una parte alícuota se sometió a conteo de radiactividad. Tanto para los recuentos de células como para la incorporación de timidina, cada experimento se realizó en cada momento al menos 4 veces diferentes utilizando grupos experimentales constituidas por al menos 6 pocillos.

Se encontró que la respuesta mitogénica de la muestra de lactoferrina purificada era muy potente, como se muestra por una tasa notablemente incrementada de proliferación de células osteobásticas (es decir, aumento en la incorporación de timidina en el DNA de las células en crecimiento). La potente respuesta osteogénica observada anteriormente se comparó con la del Factor 1 de crecimiento semejante a la insulina (IGF-1), un mitógeno osteoblástico bien reconocido. IGF-1 exhibía un efecto máximo de 1,25 veces el control en el mismo sistema de cultivo de células osteoblásticas, mientras que el efecto de la lactoferrina era 2,26 veces el del control para la dosis máxima testada (10 µg/ml).

20 **La lactoferrina promueve la proliferación de condrocitos**

Se aislaron condrocitos por eliminación del cartílago (rodajas de espesor total) de las superficies tibial y femoral de ovejas en condiciones asépticas. Las rodajas se pusieron en medio de Eagle Modificado de Dulbecco (DME) que contenía 5% de FBS (v/v) y antibióticos (penicilina 50 g/l, estreptomina 50 g/l y neomicina 100 g/l) y se desmenuzaron finamente con un bisturí. Se retiró el tejido y se incubó a 37°C primeramente con pronasa (0,8% p/v durante 90 minutos) seguida por colagenasa (0,1% p/v durante 18 horas) para completar la digestión. Las células se aislaron del material digerido por centrifugación (10 minutos a 1300 rpm) se resuspendieron en DME/5% FBS, se pasaron a través de un tamiz de malla de nailon de tamaño de poro 90 Fm para eliminar cualesquiera fragmentos no digeridos, y se recentrifugaron. Las células se lavaron luego y se resuspendieron dos veces en el mismo medio, se sembraron en un matraz de 75 cm² que contenía DME/10% FBS, y se incubaron bajo 5% CO₂/95 de aire a 37°C. La confluencia se alcanzó al cabo de 7 días, en cuyo momento se subcultivaron las células. Después de tripsinización utilizando tripsina-EDTA (0,05%/0,53 mM), las células se lavaron en DME/5% FBS y se resuspendieron en un medio nuevo, después de lo cual se sembraron en placas de 24 pocillos (5 x 10⁴ células/ml, 0,5 ml/pocillo). La medida de la incorporación de timidina se realizó en poblaciones de células de crecimiento detenido como en el caso de los cultivos de células semejantes a osteoblastos descritos anteriormente. Se encontró que la lactoferrina estimulaba la proliferación de condrocitos a concentraciones superiores a 0,1 µg/ml.

La lactoferrina promueve la proliferación células osteoblásticas en cultivo de órganos

Se ha descrito previamente un cultivo de órganos de ratón neonatales (Cornish, et al. (1998) Am. J. Physiol 274, E823-E833). Resumidamente, ratones neonatales de 2 días de edad se inyectaron subcutáneamente con ⁴⁵Ca marcado radiactivamente. Tres días después, se extirparon los cráneos y se pusieron sobre rejillas de tela metálica en cápsulas Petri que contenían 0,1% de seroalbúmina bovina/Medio 199. Se añadió lactoferrina, y los cráneos se incubaron durante 48 horas. Cuatro horas antes del final del periodo de incubación, se añadió [³H]-timidina. El experimento se terminó, y se midieron la liberación de ⁴⁵Ca y la incorporación de timidina. Se encontró que la lactoferrina estimula la síntesis de DNA, lo cual refleja la proliferación de células del linaje osteoblástico.

La lactoferrina emite señales por la vía de la quinasa MAP en los osteoblastos

Esta metodología ha sido descrita previamente (Grey, et al. (2001) Endocrinology 142, 1098-1106). Específicamente, se sembraron osteoblastos primarios de rata preparados como se ha descrito arriba en placas de cultivo de tejidos de 6 pocillos a una densidad inicial de 5 x 10⁴ células/ml en MEM 5% FCS, y se dejaron crecer hasta 80-90% de la confluencia. Después de privación de suero durante una noche, las células se trataron a la temperatura ambiente con lactoferrina en MEM/0,1% BSA. En experimentos diseñados para determinar el efecto de los inhibidores de la transducción de señales sobre la fosforilación de la quinasa MAP42/44 inducida por lactoferrina, las células se pretrataron con el inhibidor durante 30 minutos antes de la adición de lactoferrina. Después de tratamiento durante el periodo de tiempo indicado, se aspiró el medio de tratamiento, se lavaron las células en PBS enfriado en hielo y se rascaron luego en tampón de lisis HNTG enfriado en hielo (HEPES 50 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, 1% Triton, 10% glicerol, MgCl₂ 1,5 mM, EDTA 1 mM) que contenía un cóctel de inhibidores de proteasa y fosfatasa (PMSF 1 mM, 1 µg/ml de peptatina, 10 µg/ml de neupeptina, 10 µg/ml de aprotinina, 1 nM de vanadato de sodio, y 500 mM de NaF). Los lisados se agitaron enérgicamente con brevedad, se centrifugaron a 13.000 rpm a 4°C, y se guardaron luego a -70°C hasta su análisis. El contenido de proteínas de los lisados de células se midió utilizando el ensayo de proteínas DC (BioRad, Hercules, CA). Se sometieron cantidades iguales del lisado de células totales (30-50 µg) a 8% SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, y se sometieron a inmunotransferencia durante una noche a 4°C con un anticuerpo anti-fosfoquinasa MAP p42/44 (1:1000). Como

control para la carga de proteína, se liberaron de materias volátiles los mismos filtros y se sondaron de nuevo con un anticuerpo contra la quinasa MAP p42/44 total (1:400). La incubación con el anticuerpo secundario conjugado a HRP se realizó durante 1 hora a la temperatura ambiente, y las membranas se analizaron por ECL. Se repitieron las inmunotransferencias al menos 3 veces. Se encontró que la lactoferrina induce la fosforilación de las quinasas MAP p42/p44 en los osteoblastos de una manera dependiente de la dosis y del tiempo a concentraciones de 1-100 µg/ml.

La lactoferrina estimula el crecimiento del hueso in vivo

El modelo de ratón utilizado en estos estudios ha sido descrito previamente (Cornish, et al. (1993) Endocrinology 132, 1359-1366). Se administraron diariamente inyecciones (0 mg, 0,04 mg, 0,4 mg y 4 mg) de lactoferrina durante 5 días, y los animales se sacrificaron una semana más tarde. Se determinó la formación de hueso por marcación fluorescente del hueso nuevamente formado. Se determinaron los índices de resorción ósea y de masa ósea por microscopía óptica convencional, ayudada por software de análisis de imágenes. La inyección local de lactoferrina en ratones adultos dio como resultado un crecimiento incrementado del hueso del cráneo, con aumentos significativos en el área ósea después de sólo 5 inyecciones, y los animales se sacrificaron una semana después. La formación de hueso se determinó por marcación fluorescente del hueso recién formado.

15 Aplicación 1

Pueden prepararse yogures cuajados de entre 14 y 17% de sólidos con o sin fruta añadida, como sigue:

Leche en polvo desnatada de calorías medias (entre 109 y 152 g) y estabilizador ALACO (100 g) se reconstituyen con aproximadamente 880 ml de agua a 50°C. Se añade luego grasa de mantequilla anhidra (20 g) y se mezcla durante 30 min. La mixtura se calienta luego a 60°C, se homogeneiza a 200 bar, y se pasteuriza finalmente a 90°C. Después de enfriar a una temperatura entre 40 y 42°C, se añade una mixtura iniciadora y la preparación de proteínas liofilizada arriba descrita (hasta 50 mg de lactoferrina con una pureza de 95% o una cantidad equivalente de una fuente no tan fuertemente purificada). En caso deseado, puede añadirse también fruta fresca en este momento. La mixtura se envasa luego en recipientes, se incuba a 40°C hasta que se alcanza un pH de 4,2-4,4, y finalmente se enfría en un refrigerante de blastos.

Un método alternativo para preparación de los mismos yogures cuajados es por mezcla en seco de la cantidad indicada de lactoferrina o la cantidad indicada como tasa de dosificación, en los sólidos de leche secos, antes de su utilización en la formación de yogur.

Aplicación 2

Mezclas secas de leche en polvo desnatada o entera con calcio y las preparaciones de lactoferrina liofilizada pueden proporcionar formulaciones de base láctea o composiciones que se pueden utilizar como alimentos funcionales o como ingredientes alimentarios funcionales. Tales composiciones pueden utilizarse como leches reconstituidas, ingredientes de leche en polvo, postres lácteos, alimentos funcionales, quesos o mantequilla o bebidas, y productos nutritivos farmacéuticos o suplementos dietéticos. La mezcla de los ingredientes secos en ratios de leche en polvo:calcio:agente activo de lactoferrina entre 90:9,5:0,5 y 94:5,95:0,001 proporciona composiciones adecuadas para tales usos.

Aplicación 3

Composiciones mezcladas de leche en polvo, calcio, y el ingrediente rico en lactoferrina pueden utilizarse como alimentos dietéticos óseos funcionales, ingredientes de alimentos dietéticos óseos, o como ingrediente alimentario para suministro de nutrientes dietéticos óseos en una diversidad de alimentos dietéticos.

Para tales composiciones, los contenidos de calcio y proteína de las composiciones precisan ser ajustados a los límites nutricionales permisibles requeridos. Los ingredientes de leche en polvo disponibles en el comercio contienen típicamente entre 300 y 900 mg de calcio por 100 g de polvo, dependiendo de sus procedencias. Puede añadirse al polvo una fuente de calcio para aumentar el contenido de calcio hasta 3% en peso del ingrediente leche en polvo como una mezcla. El nivel de proteínas o los polvos de proteínas de base láctea del ingrediente de leche disponible comercialmente varían dependiendo del tipo del ingrediente, el método de su fabricación, y su uso propuesto. El ingrediente leche en polvo contiene típicamente entre 12% y 92% de proteínas. Ejemplos son leche en polvo desnatada y entera disponibles comercialmente, caseínas de grado alimentario, caseinatos, polvos concentrados de proteínas de leche, polvos de producto retenido secados por pulverización y ultrafiltrados o microfiltrados, y los productos aislados de proteínas de leche. La preparación rica en lactoferrina puede incorporarse en una mezcla de proteínas y calcio para proporcionar leches en polvo nutricionales que pueden utilizarse como ingredientes dietéticos en alimentos y bebidas. Tales mezclas proporcionan ingredientes adecuados para uso en la preparación de yogures y bebidas de yogur, bebidas ácidas, mezclas de ingredientes de leche en polvo, productos lácteos líquidos pasteurizados, productos de leche UHT, productos lácteos cultivados, bebidas de leche acidificadas, productos combinados de leche y cereales, leches malteadas y productos combinados de leche y soja. Para tales usos, la mezcla puede tener una composición en la que el contenido de calcio está comprendido entre 0,001% y 3,5% (p/p), la composición de proteínas representa entre 2% y 92%, y la lactoferrina como el agente de proliferación de osteoblastos se añade a niveles comprendidos entre 0,000001% y 5,5%.

Otras Realizaciones

5 La totalidad de las características expuestas en esta memoria descriptiva pueden combinarse en cualquier combinación. Cada característica expuesta en esta memoria descriptiva puede reemplazarse por una característica alternativa que sirva para el mismo propósito, o un propósito equivalente o similar. Así pues, a no ser que se especifique expresamente otra cosa, cada característica expuesta es sólo un ejemplo de una serie genérica de características equivalentes o similares.

REIVINDICACIONES

1. Una composición constituida esencialmente por polipéptido de lactoferrina para uso en el tratamiento o la prevención de la osteoporosis, en donde dicho polipéptido de lactoferrina tiene una pureza de al menos 65% basada en peso seco y en donde dicho polipéptido de lactoferrina contiene no más de dos iones metálicos por molécula de lactoferrina.
5
2. La composición de la reivindicación 1, en donde dicho polipéptido de lactoferrina contiene dos iones metálicos por molécula.
3. La composición de la reivindicación 2, en donde dicho polipéptido de lactoferrina contiene iones hierro, cobre, cromo, cobalto, manganeso, cinc o magnesio.
- 10 4. La composición de la reivindicación 3, en donde dicho ... contiene iones hierro.
5. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho polipéptido de lactoferrina es humano.
6. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde dicho polipéptido de lactoferrina es recombinante.
- 15 7. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha composición comprende al menos 75% de polipéptido de lactoferrina.
8. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha composición es al menos 85% de polipéptido de lactoferrina.
- 20 9. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde dicha composición es al menos 95% polipéptido de lactoferrina.
10. Una composición que comprende dicho polipéptido de lactoferrina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha composición es un nutriente farmacéutico.
11. Una composición que comprende dicho polipéptido de lactoferrina de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde dicha composición es farmacéutica.
- 25 12. Una composición de la reivindicación 10 ó 11, en donde dicha composición comprende adicionalmente un agente adicional mejorador del hueso.
13. La composición de la reivindicación 12, en donde dicho agente mejorador del hueso se selecciona de calcio, cinc, magnesio, vitamina C, vitamina D, vitamina E y vitamina K2.