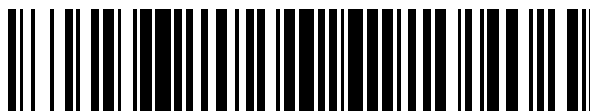


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 650 918**

51 Int. Cl.:

A61K 36/00 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

C07K 1/14 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2012 PCT/US2012/072033**

87 Fecha y número de publicación internacional: **04.07.2013 WO13102054**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2012 E 12863661 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2797611**

54 Título: **Procedimientos de aislamiento, uso y análisis de ferritina**

30 Prioridad:

30.12.2011 US 201161581780 P
30.12.2011 US 201161581809 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.01.2018

73 Titular/es:

SLOIRON, INC. (100.0%)
1547 Palos Verdes Mall 131
Walnut Creek CA 94597, US

72 Inventor/es:

THEIL, ELIZABETH C.

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 650 918 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

Procedimientos de aislamiento, uso y análisis de ferritina

La invención se refiere al campo del aislamiento de ferritina, en particular a un procedimiento de aislamiento de la ferritina del material vegetal.

5 **Antecedentes**

En seres humanos y otros animales, el hierro es esencial para la implementación y mantenimiento de muchas funciones celulares vitales y procesos biosintéticos, que incluyen transporte de oxígeno, actividad celular aeróbica, transporte de electrones intracelular, y reacciones enzimáticas integrales dentro del tejido corporal. La deficiencia de hierro es la deficiencia nutricional más común en todo el mundo, afectando a 30 millones de personas tanto en los países desarrollados como en desarrollo. La deficiencia de hierro tiene muchas repercusiones, incluyendo la disminución del crecimiento y el aprendizaje en los niños.

La mayor parte del hierro almacenado en los tejidos corporales está contenida en la ferritina. La ferritina es un complejo de proteína-hierro intracelular, formado a partir de subunidades autoensamblables. La jaula proteica puede formar hierro de manera reversible en un biomineral enjaulado, $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$, en plantas, animales y bacterias. Los oxi-biominerales de hierro dentro de las nanojaulas de proteínas son concentrados de hierro para la síntesis de proteínas y trampas de Fe (II)/oxígeno/peróxido (reactivos químicos de Fenton) para la protección antioxidante. El hierro contenido en la ferritina se concentra 100 mil millones de veces por encima de la solubilidad del ion férrico en una forma no tóxica y accesible. Las subunidades de proteína de ferritina, cuatro haces de α -hélice, contienen un centro catalítico que convierte dos átomos de Fe (II) en un intermedio de dímero en puente de Fe(III)-oxo en la mineralización. Las dos clases de ferritinas son: i) maxi-ferritinas, 24-polipéptidos, conjuntos de subunidades de 4-haces encontrados en animales, plantas y bacterias; y ii) mini-ferritinas (también llamadas proteínas Dps), 12-polipéptidos, conjuntos de subunidades de 4-haces en arqueas y bacterias.

En los animales, la ferritina está presente principalmente en los tejidos, especialmente en el hígado, el riñón, el bazo y las células eritroides de la médula ósea, donde sirve como una reserva de hierro para la producción de hemoglobina. Una pequeña fracción de ferritina está en el suero y contribuye poco al almacenamiento general de hierro, pero se usa clínicamente como indicador de los niveles de hierro en un animal. Las ferritinas se presentan en animales como aproximadamente 25 isoformas distintas dependiendo de sus proporciones de los dos subtipos principales de ferritinas, H o L. Estos distintos subtipos difieren en su distribución tisular, tasas y mecanismos de oxidación del hierro, formación del núcleo y recambio fisiológico del hierro.

La ferritina derivada de plantas y animales se puede usar como una fuente dietética para seres humanos y otros animales. La ferritina, que sobrevive la digestión en gran parte intacta, es absorbida más eficientemente por el intestino que cualquier otra fuente de hierro dietético o suplemento de hierro, debido a la gran cantidad de hierro por molécula de ferritina. La ferritina también sobrevive al tratamiento a altas temperaturas. La proteína de la ferritina hace que el hierro de ferritina sea una fuente de hierro absorbida de forma natural, de liberación lenta y con recubrimiento entérico natural. Como tal, la ferritina se puede usar para suplementar el hierro en animales que necesitan un mayor hierro en su dieta.

Lauhere et al. describen un procedimiento para la purificación y caracterización de ferritinas de semillas de maíz, guisante y soja (Lauhere et al. (1988), J Biol Chem. 263(21), 10289). Actualmente, sin embargo, existe una necesidad de procedimientos para aislar ferritina vegetal y animal a partir de una fuente disponible de bajo costo, que se puede administrar a un sujeto en una cantidad para tratar un trastorno por deficiencia de hierro o prevenir la deficiencia de hierro. También existe la necesidad de procedimientos para determinar la cantidad de hierro derivado de la ferritina animal y vegetal.

Sumario

La presente invención se refiere a un procedimiento de aislamiento de ferritina del material vegetal mediante las etapas de: (a) separación del material vegetal en una fracción soluble e insoluble; (b) eliminación de componentes que no son ferritina de la fracción soluble de la etapa (a) mediante tratamiento enzimático de la fracción soluble con una o más enzimas de degradación de carbohidratos, aislando así la ferritina; y (c) concentración de la ferritina aislada de la etapa (b).

En una realización, el material vegetal puede ser de leguminosas, tales como soja.

La invención incluye un procedimiento de aislamiento de ferritina de una leguminosa o una corriente de procesamiento de leguminosas mediante las etapas de (a) separación de la leguminosa o la corriente de procesamiento de leguminosas en fracciones de leguminosas solubles e insolubles; (b) adición de una solución reguladora salina neutra a la fracción de leguminosa insoluble para formar una solución de leguminosa insoluble; (c) clarificación de la solución de leguminosa insoluble de la etapa (b) en fracciones de solución de leguminosa soluble e insoluble; (d) tratamiento enzimático de la solución de leguminosa soluble clarificada de la etapa (c); (e) fraccionamiento de la solución de leguminosa soluble clarificada tratada enzimáticamente de la etapa (d) para

eliminar los componentes que no son ferritina; y (f) concentración de ferritina aislada a partir de la solución de leguminosa soluble fraccionada de la etapa (e).

La invención también incluye un procedimiento de aislamiento de ferritina de leguminosa o una corriente de procesamiento de leguminosas por las etapas de (a) separación de la leguminosa o la corriente de procesamiento de leguminosas en fracciones de leguminosas solubles e insolubles; (b) adición de una solución reguladora salina neutra a la fracción de leguminosa insoluble para formar una solución de leguminosa insoluble; (c) clarificación de la solución de leguminosa insoluble de la etapa (b) en fracciones de solución de leguminosa soluble e insoluble; (d) tratamiento enzimático de la solución de leguminosa soluble clarificada de la etapa (c); (e) fraccionamiento de la solución de leguminosa soluble clarificada tratada enzimáticamente de la etapa (d) para eliminar los componentes que no son ferritina; y (f) concentración de ferritina aislada a partir de la solución de leguminosa soluble fraccionada de la etapa (e).

Se contempla que el material vegetal puede consistir en la planta completa, o puede ser parte de una planta, por ejemplo, una o más de una semilla, un frijol, un tallo, un fruto, una hoja, una raíz y una flor. El material vegetal puede ser material de la corriente de residuos del procesamiento de leguminosas.

La etapa de separación soluble e insoluble se puede realizar por separación mecánica.

La etapa de eliminación de los componentes que no son ferritina se realiza mediante el tratamiento enzimático de la fracción soluble con una o más enzimas de degradación de carbohidratos. Los componentes que no son ferritina tratados enzimáticamente se pueden eliminar. La enzima usada para eliminar los componentes que no son ferritina puede ser una o más de una enzima glucosidasa.

La ferritina aislada se puede concentrar, por ejemplo, secando la fracción soluble, o por ultrafiltración.

Se pueden adicionar etapas adicionales al procedimiento de aislamiento de ferritina descrito anteriormente, tal como el fraccionamiento de la fracción soluble, ya sea antes o después de que se eliminen los componentes que no son ferritina. Además, la fracción soluble se puede tratar con un solvente tal como, por ejemplo, un solvente orgánico.

También se describe un procedimiento de aislamiento de ferritina de material animal mediante las etapas de: (a) separación del material animal en fracciones solubles e insolubles; (b) desnaturalización por calor de la fracción soluble; (d) eliminación de carbohidratos de la fracción soluble desnaturalizada por calor mediante digestión enzimática; y (c) concentración de la fracción soluble desnaturalizada por calor tratada enzimáticamente. El material animal puede ser tejido animal tal como, por ejemplo, el hígado, riñón, bazo o médula ósea de un animal.

La etapa de separación soluble e insoluble puede ser una separación mecánica. La enzima usada en la etapa (d) puede ser una o más de una enzima glucosidasa. Se contempla que la desnaturalización por calor se realice a temperaturas inferiores a 80 °C. La concentración de la ferritina aislada se puede lograr secando la fracción soluble con calor bajo, secado por pulverización, o ultrafiltración.

Se pueden adicionar etapas adicionales al procedimiento de aislamiento de ferritina de material animal, que incluye fraccionamiento de tamaño después del tratamiento enzimático de la fracción soluble. Otra etapa que se puede adicionar es el tratamiento de la fracción soluble con un solvente tal como, por ejemplo, un solvente orgánico.

Se describe adicionalmente la ferritina aislada obtenida mediante los procedimientos descritos en este documento.

Se describe adicionalmente un procedimiento para determinar la cantidad de hierro de ferritina en una muestra en la que la muestra tiene un porcentaje en peso conocido de una fuente de hierro de ferritina que tiene las siguientes etapas: (a) medir el hierro total en la muestra por unidad de peso de la muestra; (b) preparar un extracto soluble de un peso conocido por volumen de la muestra de la etapa (a) para hacer un extracto de muestra soluble; (c) determinar el hierro total por peso unitario del extracto de muestra soluble de la muestra; (d) determinar la proteína de ferritina por unidad de peso en el extracto de muestra soluble, usando análisis inmunológico cuantitativo; y (e) calcular la cantidad de hierro de ferritina en la muestra usando la cantidad del hierro total de la etapa (c) dividida por la cantidad de proteína de ferritina de la etapa (d), multiplicada por la cantidad de hierro total en la muestra de la etapa (a) multiplicado por un factor de corrección, determinando así la cantidad de hierro de ferritina en la muestra. Para una muestra de leguminosas, el factor de corrección es 0,75.

La fuente de hierro de ferritina usada en este procedimiento puede ser material de una planta o un animal. La muestra que contiene hierro de ferritina se puede derivar de ferritina animal en el tejido normal o suero hiperferritinémico de un sujeto.

Se contempla que el análisis inmunológico cuantitativo se puede realizar por cualquier medio, por ejemplo, inmunotransferencia cuantitativa, análisis de transferencia Western, e inmunoelectroforesis capilar cuantitativa.

Se describe adicionalmente el uso o tratamiento de una afección causada por deficiencia de hierro en un organismo que lo necesita mediante el uso o la administración de una cantidad eficaz de ferritina aislada obtenida mediante los procedimientos descritos en este documento.

El organismo que necesita tratamiento puede ser cualquier organismo, por ejemplo, una planta o un animal tal como un mamífero, que incluye un ser humano.

Se describe adicionalmente un procedimiento para aumentar el contenido de hierro de la sustancia que se produce mediante calor mediante la adición de ferritina aislada obtenida a partir de los procedimientos descritos en este documento. La ferritina aislada se puede adicionar a la sustancia antes de que la sustancia se termine de procesar. En una descripción, la sustancia que se produce mediante calor es comida. En otra descripción, la sustancia se produce por calor es una bebida.

Breve descripción de los dibujos

Estas y otras características, aspectos y ventajas de la presente invención se comprenderán mejor con respecto a la siguiente descripción, a las reivindicaciones adjuntas y a los dibujos adjuntos.

La figura 1 representa un gráfico que demuestra la digestión enzimática del almidón en extractos de ferritina con el tiempo.

Descripción detallada

Definiciones

Como se usa en este documento, los siguientes términos y variaciones de los mismos tienen los significados que se dan a continuación, a menos que un significado diferente esté claramente destinado por el contexto en el que se usa dicho término.

Los términos "un", "uno" y "el" y los referentes similares usados en este documento se deben interpretar para cubrir tanto el singular como el plural a menos que su uso en contexto indique lo contrario.

El término "regulador" o "solución reguladora" se refiere a una mezcla de ácido y base que, cuando está presente en una solución, reduce o modula los cambios en el pH que de otro modo ocurrirían en la solución cuando se adiciona un ácido o base.

Como se usa en este documento, el término "comprender" y las variaciones del término, tales como "que comprende" y "comprende", no pretenden excluir otros aditivos, componentes, números enteros o etapas.

Un "factor de corrección" como se usa en este documento se refiere a un número usado en los cálculos de la cantidad de hierro de ferritina en una muestra. El factor de corrección es un número que debe multiplicarse por el porcentaje mínimo de hierro de ferritina en la fuente de hierro de ferritina original, porque la fuente de hierro de ferritina puede contener hierro además de hierro de ferritina. Como tal, el factor de corrección se debe usar para que no ocurra un error en el cálculo. Como ejemplo, en las leguminosas, un mínimo del 75 % del hierro es hierro de ferritina, por lo que se usaría un factor de corrección de 0,75 con las fuentes de leguminosas de hierro de ferritina. Sin embargo, otras fuentes de hierro de ferritina tendrán diferentes factores de corrección.

Como se usa en esta memoria descriptiva, el término "ferritina" significa la proteína con mineral de óxido de hierro enjaulado que confiere una absorción de hierro intestinal altamente eficaz en organismos vivos y tiene actividad biológica y/o química y estructura igual o sustancialmente similar a, una ferritina natural que contiene hierro. Como tal, la ferritina incluye una proteína de ferritina de origen natural con mineral de hierro o una proteína de ferritina recombinante, reconstituida con mineral de hierro, que comprende 12 o 24 subunidades de ferritina, en la que las subunidades se asocian para formar una nanojaula esférica. Las ferritinas naturales incluyen ferritina humana, ferritina de otros animales (ferritina derivada del bazo del caballo o ranas, por ejemplo), ferritina vegetal (derivada de soja, y cualquier otra corriente de leguminosas o de leguminosas, por ejemplo), ferritinas microbianas: microferritina (derivada de hongos), o ferritina bacteriana (bacterioferritina) o ferritina de arqueas. La proteína de ferritina incluye ferritina recombinante expresada por microorganismos transformados genéticamente tales como E. coli y otras bacterias, y levaduras. La ferritina expresada por microorganismos genéticamente transformados o recombinantes puede tener una secuencia de aminoácidos idéntica o análoga a una ferritina natural. El término proteína de ferritina puede incluir jaulas proteicas que consisten en una o ambas isoformas animales, H y L o isoformas de plantas (H-1, H-2, etc.).

Una "subunidad de proteína de ferritina" se define como una de las 12 o 24 subunidades polipeptídicas que componen una proteína de ferritina. El sistema de numeración usado en este documento para la identificación de aminoácidos dentro de las subunidades de ferritina se basa en la secuencia original de ferritina L del bazo del caballo (Número de acceso de la base de datos Swiss Protein P02791). El sistema de numeración del bazo de caballo se puede convertir fácilmente en un sistema de numeración basado en la secuencia H humana (Número de acceso de la base de datos Swiss Protein P02794; el número de acceso de la secuencia L humana es P02792), que tiene cuatro aminoácidos adicionales en el extremo N. Por lo tanto, la numeración de secuencia H humana adiciona 4 al número de aminoácido correspondiente en la ferritina de bazo de caballo. Por ejemplo, L134 por numeración de bazo de caballo corresponde a L138 por numeración de secuencia H humana. Se pueden encontrar alineaciones de secuencias de subunidades de ferritina, por ejemplo, en Theil, E. C., in Handbook of Metalloproteins,

(Messerschmidt, A. et al., eds.), John Wiley & Sons, Chichester, UK, pp. 771-81, 2001; Waldo, G. S. and Theil, E. C., in *Comprehensive Supramolecular Chemistry*, Vol. 5, (K. S. Suslick, ed.), Pergamon Press, Oxford, UK, pp. 65-89, 1996.

"Apoferritina" es la ferritina en la jaula de proteína, esto es, en el estado no mineralizado.

- 5 Un "poro de ferritina" es uno de los poros de la jaula de ferritina externa o interna que conduce a los ocho canales iónicos de entrada/salida de Fe^{2+} en una jaula de proteína de ferritina ensamblada; los canales y poros están formados por trímeros de subunidades de ferritina. En una jaula de proteína de ferritina de 24 subunidades, intacta, hay ocho ejes triples de simetría, cada uno en una unión de tres subunidades de ferritina. Cada poro de ferritina y canal iónico está formado por estas uniones tridireccionales de subunidades de ferritina. Los poros se pueden
10 visualizar en cristales de proteínas de ferritina mediante cristalografía de rayos X y analizarse en soluciones mediante cambios en la velocidad de salida de Fe^{2+} .

- Una "inmunotransferencia" o "inmunodetección" es un tipo específico de prueba bioquímica que mide la presencia o concentración de una proteína (denominada como el "analito") en soluciones que frecuentemente contienen una mezcla compleja de sustancias que incluyen otras proteínas. Los procedimientos y técnicas implicados en
15 inmunoensayos son bien conocidos por los expertos en el arte.

- "Aislamiento" o "aislamiento de ferritina" como se usa en este documento significa separación de ferritina de otros componentes en el material vegetal o animal, que proporciona un compuesto objetivo sustancialmente puro, tal como una ferritina sustancialmente pura. La ferritina sustancialmente pura contiene ferritina en una cantidad desde aproximadamente 50 % a aproximadamente 100 %, desde aproximadamente 50 % a aproximadamente 80 %, desde
20 aproximadamente 70 % a aproximadamente 85 %, desde aproximadamente 65 % a aproximadamente 95 % en peso de la proteína total en el material procesado mediante el procedimiento de la invención.

- Los términos "individuo", "sujeto" y "paciente" se usan indistintamente en este documento, y generalmente se refieren a un mamífero. El término "mamífero" se define como un individuo que pertenece a la clase Mammalia e incluye, sin limitación, seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de deportes y
25 mascotas, como vacas, ovejas, perros, caballos, gatos y vacas.

- Una "leguminosa" puede ser una o más semillas de soja, guisantes amarillos, arvejas, lentejas, *chickpeas* (también llamados garbanzos), cacahuetes, trébol, judías pintas, judías Great Northern, judías blancas, judías rojas, judías negras, judías rojas oscuras o claras, habas, judías de media luna, judías rosadas, habas de mayocoba, judías rojas pequeñas, guisantes de ojo negro (también llamados guisantes de vaca), frijol cranberry, judías blancas, judías de arroz, mantequilla de judías y combinaciones de cualquiera de las anteriores. La leguminosa puede ser cualquiera
30 de una variedad de especies, incluyendo, por ejemplo, una especie de *Phaseolus* (por ejemplo, *Phaseolus vulgaris*), una especie de *Pisum* (por ejemplo, *Pisum sativum*), una especie de *Lens* (por ejemplo, *Lens vulgaris*, *Lens culinaris*), una especie de *Cicera* (por ejemplo, *Cicera arietenum*), una especie de *Vigna* (por ejemplo, *Vigna unguiculata*), una especie de glicina (por ejemplo, *Glycine max*) y combinaciones de cualquiera de ellas.

- El término "formulación nutracéutica" se refiere a un alimento o parte de un alimento que ofrece beneficios médicos y/o de salud que incluyen la prevención o el tratamiento de enfermedades. Los productos nutracéuticos van desde nutrientes aislados, suplementos dietéticos y dietas, hasta alimentos de diseño genético, alimentos funcionales, productos herbales y alimentos procesados tales como cereales, sopas y bebidas. El término "alimentos funcionales" se refiere a alimentos que incluyen "cualquier alimento o ingrediente alimentario modificado que pueda proporcionar
40 un beneficio para la salud más allá de los nutrientes tradicionales que contiene". Las formulaciones nutracéuticas de interés incluyen alimentos para su uso veterinario o humano, que incluyen barras de alimentos (por ejemplo, barritas de cereales, barras de desayuno, barritas energéticas, barritas nutritivas); chicles; bebidas; bebidas fortificadas; suplementos de bebida (por ejemplo, polvos para ser adicionados a una bebida); comprimidos; comprimidos para deshacer en la boca; dulces; y similares.

- El término "solución" se refiere a una composición que comprende un solvente y un soluto, e incluye soluciones y suspensiones verdaderas. Los ejemplos de soluciones incluyen un sólido, líquido o gas disuelto en un líquido y partículas o micelas suspendidas en un líquido.

- Un "suplemento" o "suplemento dietético" como se usa en este documento es útil para suplementar, reponer y aumentar el suministro de hierro a seres humanos, animales y plantas, y para tratar diversos trastornos y afecciones.
50 Un suplemento dietético se puede formular para administración oral. Como se contempla en la presente invención, un suplemento dietético incluye ferritina en una cantidad desde aproximadamente 10 % a aproximadamente 90 % en peso de la proteína total en el suplemento. Por ejemplo, suplemento dietético en cuestión incluye ferritina en una cantidad desde aproximadamente 10 % a aproximadamente 15 %, desde aproximadamente 15 % a aproximadamente 20 %, desde aproximadamente 20 % a aproximadamente 25 %, desde aproximadamente 25 % a
55 aproximadamente 30 %, desde aproximadamente 30 % a aproximadamente 35 %, desde aproximadamente 35 % a aproximadamente 40 %, desde aproximadamente 40 % a aproximadamente 45 %, desde aproximadamente 45 % a aproximadamente 50 %, o desde aproximadamente 55 % a aproximadamente 90 % en peso de la proteína total en el suplemento. Para preparaciones orales, se puede formular un suplemento dietético en cuestión con aditivos

apropiados para hacer comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; con lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes reguladores, agentes humectantes, conservantes y agentes aromatizantes. Un suplemento dietético se puede administrar en una o más de una dosis por día. Un suplemento dietético se puede administrar en diversas frecuencias, por ejemplo, cuatro veces al día, tres veces al día, dos veces al día, una vez al día, día por medio, tres veces por semana, dos veces por semana o una vez por semana.

Una "composición terapéutica" como se usa en este documento significa una sustancia que se pretende que tenga un efecto terapéutico tal como una composición farmacéutica, un nutraceutico, un suplemento dietético y otras sustancias. Una composición terapéutica se puede configurar para contener un portador farmacéuticamente aceptable. La composición terapéutica puede contener excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes. Además, sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste y reguladores del pH, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes y agentes humectantes.

Como se usa en este documento, las frases "cantidad terapéuticamente eficaz" y "cantidad profilácticamente eficaz" se refieren a una cantidad que proporciona un beneficio terapéutico en el tratamiento, prevención o manejo de una enfermedad o un síntoma manifiesto de la enfermedad. La cantidad terapéuticamente eficaz puede tratar una enfermedad o condición, un síntoma de enfermedad o una predisposición hacia una enfermedad, con el propósito de curar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, mejorar, beneficiar o afectar la enfermedad, los síntomas de la enfermedad, o la predisposición a la enfermedad. La cantidad específica que es terapéuticamente eficaz se puede determinar fácilmente por un médico facultativo normal, y puede variar dependiendo de factores conocidos en la técnica, tales como, por ejemplo, el tipo de enfermedad, la historia y la edad del paciente, el estadio de la enfermedad y la administración de otros agentes terapéuticos.

Los términos "tratamiento" o "tratar" como se usan en este documento cubren cualquier tratamiento de una afección tratable con hierro en un organismo vivo, preferiblemente un primate, y más preferiblemente un ser humano, e incluye:

(i) prevenir que la afección ocurra en un sujeto que puede estar predispuesto a la afección pero que todavía no se ha diagnosticado que la padece;

(ii) inhibir la afección, por ejemplo, detener o ralentizar su desarrollo; o

(iii) aliviar la afección, por ejemplo, causando la regresión de la afección.

Las cantidades indicadas en la memoria descriptiva y las reivindicaciones pretenden abarcar variaciones de las cantidades indicadas consistentes con la práctica de la presente invención. Tales variaciones se determinan fácilmente por un experto en el arte siguiendo los procedimientos descritos en la memoria descriptiva y por lo general codifican una variación del orden de +/- 10-20 %.

Hierro de ferritina

La ferritina es una forma única de hierro en la dieta ya que contiene una jaula proteica con mineral de óxido de hierro enjaulado. En contraste con otros suplementos de hierro y fuentes de hierro en la dieta, la capa de proteína de ferritina protege el intestino de un usuario contra la química de radicales libres causada por el hierro, que puede irritar el intestino. Además, el hierro de ferritina se libera lentamente en la sangre del intestino, lo que también permite la protección del intestino contra la química de los radicales libres causada por el hierro.

La ferritina vegetal contiene un promedio de 1000 átomos de hierro por jaula de proteína, y la ferritina animal contiene un promedio de 1500-2000 átomos de hierro por jaula de proteína, lo que permite una absorción más eficiente de hierro de ferritina por el cuerpo. En otras palabras, para un evento de transporte en el intestino, el cuerpo del usuario obtendría 1000 veces más hierro que de las sales de hierro y quelantes que no son hemo.

El hierro de ferritina es bien absorbido por los animales. En un modelo de rata, se ha demostrado que la ferritina cura la deficiencia de hierro. En los seres humanos, el hierro de ferritina se absorbe en el orden del 20-30 %.

El hierro de ferritina es absorbido por el intestino usando un mecanismo diferente del mecanismo de absorción de otras fuentes de hierro tales como suplementos de hierro no hemo o hierro hemo de la carne. Los seres humanos han estado consumiendo hierro de ferritina durante milenios en formas tales como las leguminosas ricas en ferritina, que se han cultivado durante 12.000 años. Todas las culturas contemporáneas incluyen las leguminosas en sus dietas tradicionales y modernas. Además, la ferritina vegetal puede ser consumida por los veganos, lo cual es importante ya que muchas dietas veganas son deficientes en hierro y deben ser complementadas con hierro.

Aislamiento de ferritina del material vegetal

El material vegetal se usa como material de partida para aislar la ferritina en una forma sustancialmente pura. El procedimiento de la invención para aislar ferritina del material vegetal comprende las etapas de:

(a) separación del material vegetal en una fracción soluble e insoluble; (b) eliminación de componentes que no son ferritina de la fracción soluble de la etapa (a) mediante tratamiento enzimático de la fracción soluble con una o más enzimas de degradación de carbohidratos, aislando así la ferritina; y (c) concentración de la ferritina aislada de la etapa (b).

Este procedimiento de aislamiento de ferritina es menos laborioso y costoso que los procedimientos descritos anteriormente. Los procedimientos previos de extracción de ferritina de las plantas incluyen la molienda de material vegetal en nitrógeno líquido, seguido de la adición de solución reguladora de extracción y clarificación por filtración y centrifugación. (Ragland, M. et al., J Biol Chem. 265:18339-44 (1990). Sin embargo, dicho procedimiento es apropiado solo para investigación debido a la naturaleza laboriosa y costosa del procedimiento.

Un material vegetal de partida típico es una leguminosa tal como soja.

Además de soja, guisantes amarillos, guisantes verdes, lentejas, garbanzos, cacahuets, trébol, judías pintas, judías Great Northern, judías blancas, judías rojas, judías negras, judías rojas oscuras o claras, habas, judías de media luna, judías rosadas, habas de mayocoba, judías rojas pequeñas, guisantes de ojo negro, frijol cranberry, judías blancas, judías de arroz, mantequilla de judías, o una combinación de los mismos se pueden utilizar como material vegetal de partida.

Se contempla en la presente invención que el material vegetal usado para aislar la ferritina puede incluir la planta completa, o cualquier porción rica en ferritina de una planta, por ejemplo, semilla, tallo, fruto, hoja, raíz (por ejemplo, raíz nodulante), flor, tallo, etc. En algunos casos, la fuente de la ferritina es una o más de una semilla, una raíz nodulante y una hoja. Cuando la fuente de la ferritina es una semilla o una judía, la ferritina se puede obtener a partir de la semilla completa o judía, o una parte de una semilla o judía, por ejemplo, la vaina.

Las semillas de plantas de leguminosas tales como soja tienen un alto contenido de ferritina en comparación con otras semillas de plantas; secciones de hojas inmaduras y senescentes y como nódulos fijadores de nitrógeno que acumulan ferritina. Se han probado semillas de soja y se ha demostrado que son una buena fuente de hierro para la nutrición animal y humana (Murray- Kolb et al, Am J Clin Nutr. 77:180-4, 2003; Davila-Hicks et al. Am J Clin Nutr. 80:936-40, 2004; Theil E.C. et al, J Nutr 142: 478-83, 2012; Beard, J.L. et al., J. Nutr. 126:154-60, 1996) y sobrevive a la digestión humana en gran parte intacta (Theil E.C. et al., J. Nutr. 142:478-83, 2012). En estudios de cultivos celulares, la ferritina intacta se transporta desde el lado apical de modelos de células intestinales polarizadas a través de endocitosis mediada por receptor (San Martin et al., J Nutr. 138:659-66, 2008). El hierro absorbido por el intestino de la ferritina intacta se produce intracelularmente y se libera del lado basolateral (Theil E.C. et al., J. Nutr. 142:478-83 2012). La ferritina purificada y la harina de soja son fuentes de hierro para tratar la deficiencia de hierro en el sistema modelo de rata. (Beard, J.L et al., J Nutr. 126:154-60 1996).

El material vegetal de partida también puede ser una corriente de procesamiento o una corriente de residuos que resulta del procesamiento de soja u otras judías. Por ejemplo, la fuente de la ferritina aislada puede ser una corriente de residuos de la producción de tofu o leche de soja de la soja. El procesamiento de la soja para la leche de soja produce un subproducto insoluble de la soja, llamado okara. Se puede usar ya sea okara húmedo u seco u otro material de corrientes de proceso de residuos de leguminosas como material vegetal de partida.

El material vegetal de la corriente de residuos y/o las propias leguminosas se trata para aislar la ferritina, seguido de la concentración de la ferritina. La ferritina concentrada se puede usar luego para tratar seres humanos y otros animales que la necesitan, tal como, por ejemplo, el tratamiento de una deficiencia de hierro.

La etapa de separación del material vegetal en una fracción soluble e insoluble se puede realizar a través de cualquier técnica de separación, tal como, por ejemplo, separación mecánica.

Los componentes que no son ferritina se eliminan de la fracción soluble del material vegetal separado por tratamiento enzimático de la fracción soluble con una o más enzima(s) que degradan los carbohidratos. En una realización preferida, una o más de las enzimas usadas en el procedimiento es una enzima glucosidasa. Alternativamente, o además, una o más de las enzimas empleadas en el procedimiento pueden ser una amilasa, en particular una α -amilasa o una β -amilasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una galactanasa, una α -galactosidasa, una β -galactosidasa, una poligalacturonasa, una pectina metil esterasa, una ramnogalacturonasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una pectina liasa, una xilanasa, una celulasa, una β -glucosidasa, una celobiohidrolasa, una xilosidasa, una mananasa y/o una glucuronisidasa. Las enzimas se usan en una dosificación normalmente empleada para degradar carbohidratos.

Después del tratamiento enzimático, la fracción soluble se puede dializar para eliminar los componentes que no son ferritina de bajo peso molecular. La concentración de la ferritina aislada se puede lograr por cualquier medio, tal como, por ejemplo, secar la fracción soluble que contiene ferritina, o por ultrafiltración.

Las etapas adicionales en el procedimiento de aislamiento de ferritina pueden incluir el fraccionamiento de la fracción soluble después de eliminar los componentes que no son ferritina. Además, el procedimiento de aislamiento de ferritina puede incluir la etapa de tratamiento del material de partida o la fracción soluble con un solvente inorgánico u orgánico. El tratamiento con solvente puede ocurrir antes o después de la eliminación de los componentes que no son ferritina de la fracción soluble.

El producto del procedimiento de esta invención se denomina ferritina aislada, ferritina purificada o ferritina sustancialmente purificada. La ferritina aislada mediante el procedimiento de la invención es útil para aplicaciones industriales, como se describe más adelante.

Extracción de ferritina de material animal

En animales, la ferritina está presente en grandes cantidades en el hígado, el riñón, el bazo y la médula ósea. Una divulgación de la presente solicitud contempla que la ferritina se puede derivar de los tejidos de animales. Las ferritinas que contienen hierro derivadas de animales también pueden ser utilizadas por seres humanos y otros animales que necesitan un mayor contenido de hierro en su dieta.

El aislamiento de ferritina de material animal se puede realizar usando las etapas de: (a) separación del material animal en fracciones solubles e insolubles; (b) desnaturalización por calor de la fracción soluble; (c) eliminación de carbohidratos de la fracción soluble desnaturalizada por calor mediante digestión enzimática; y (d) concentración de la fracción soluble desnaturalizada por calor tratada enzimáticamente, aislando así la ferritina.

El material animal de partida puede ser tejido animal tal como hígado, riñón, bazo o médula ósea de un animal.

La separación de material soluble e insoluble se puede lograr a través de cualquier medio, tal como, por ejemplo, separación mecánica.

La etapa de desnaturalización por calor se puede realizar a temperaturas adecuadas para desnaturalizar las proteínas. Se contempla que se pueden usar temperaturas inferiores a 80 °C.

Los carbohidratos se pueden eliminar de la fracción soluble desnaturalizada por calor por cualquier medio, tal como, por ejemplo, el tratamiento enzimático de la fracción soluble. La enzima puede ser una o más enzimas de degradación de carbohidratos. En una divulgación, una o más de las enzimas usadas en el procedimiento es una enzima glucosidasa. Alternativamente, o, además, una o más de las enzimas empleadas en el procedimiento puede ser una amilasa, en particular una α -amilasa o una β -amilasa, una arabinanasa, una arabinofuranosidasa, una galactanasa, una α -galactosidasa, una β -galactosidasa, una poligalacturonasa, una pectina metil esterasa, una ramnogalacturonasa, una ramnogalacturonano acetil esterasa, una pectina liasa, una xilanasas, una celulasa, un β -glucosidasa, celobiohidrolasa, xilosidasa, mananasa y/o glucuronisidasa. Las enzimas se usan en una dosificación normalmente empleada para degradar carbohidratos. La concentración de la ferritina aislada puede conseguirse por cualquier medio tal como, por ejemplo, secado con calor bajo, ultrafiltración o secado por pulverización.

También se describe la adición de otras etapas en el procedimiento de aislamiento de ferritina de material animal. Por ejemplo, la fracción soluble tratada enzimáticamente se puede fraccionar por tamaño para eliminar el material de carbohidrato digerido. Además, el procedimiento de aislamiento de ferritina puede incluir la etapa de tratamiento de la fracción soluble con un solvente inorgánico u orgánico. El tratamiento con solvente puede ocurrir antes o después de la eliminación de los componentes que no son ferritina de la fracción soluble.

Aplicaciones industriales

La ferritina aislada obtenida mediante el procedimiento de la invención a partir del material de partida de la planta o la ferritina aislada obtenida mediante el procedimiento descrito a partir del material de partida animal puede tener diversas aplicaciones industriales. La ferritina aislada es particularmente útil para ser adicionada a productos para la nutrición humana o animal, tales como alimentos, bebidas, nutracéuticos y suplementos.

Se contempla que la ferritina aislada obtenida mediante los procedimientos de la invención y descritos se puede adicionar a una sustancia que se produce mediante calor para aumentar el contenido de hierro de la sustancia que se produce mediante calor. Una sustancia que se produce mediante calor puede ser comida o bebida. La ferritina aislada se puede adicionar a la sustancia que se produce mediante calor, ya sea antes o después de que la sustancia se produzca por calor.

Tratamiento o prevención de la deficiencia de hierro

Se describe adicionalmente en este documento una composición terapéutica o suplementaria que contiene la ferritina vegetal o animal aislada mediante los procedimientos descritos anteriormente que se pueden administrar a un organismo que necesita hierro por cualquier medio conocido. El organismo puede ser un animal como un mamífero, incluido un ser humano. Alternativamente, el organismo puede ser una planta. La composición se puede administrar por vía oral.

Las composiciones terapéuticas o suplementarias que contienen ferritina se pueden administrar en dosis suficientes para tratar o prevenir la deficiencia de hierro. Una cantidad terapéutica o profiláctica eficaz para tratar un trastorno relacionado con la deficiencia de hierro (tal como, por ejemplo, anemia) mediante los procedimientos descritos en este documento comprende una cantidad suficiente del agente de ferritina derivado de la planta o animal o composición terapéutica que contiene ferritina derivada de plantas o animales, durante todo el curso del tratamiento para mejorar o reducir los síntomas del trastorno al que se destina el tratamiento. La composición también puede contener un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable. Tales portadores o excipientes incluyen cualquier agente farmacéutico que no induzca por sí mismo la producción de anticuerpos perjudiciales para el individuo que recibe la composición, y que se pueden administrar sin la toxicidad indebida.

Los agentes de ferritina aislados y las composiciones terapéuticas se pueden administrar mediante administración continua, administración intermitente o mediante una combinación de administración continua e intermitente. Muchos factores pueden influir en la dosis y el tiempo requeridos para tratar eficazmente a un sujeto, incluyendo, pero no limitando a, la gravedad de la enfermedad o trastorno, los tratamientos previos, la salud general y/o la edad del sujeto y otras enfermedades presentes. Además, el tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición puede incluir un único tratamiento o una serie de tratamientos. Además de su administración individualmente o como una pluralidad, las composiciones terapéuticas se pueden administrar en combinación con otros agentes conocidos eficaces en el tratamiento de enfermedades. En cualquier caso, el médico encargado de la administración puede ajustar la cantidad y el momento de la administración de la composición terapéutica sobre la base de los resultados observados usando medidas estándar de eficacia conocidas en la técnica o descritas en este documento.

Cuantificación de hierro de ferritina

Se ha demostrado previamente la determinación aproximada de la proteína de ferritina y la concentración de hierro en extractos de plantas utilizando transferencia de Western cuantitativa con un antisuero de ferritina anti-soja policlonal de conejo (Ragland, M. and Theil, E.C., Plant Mol. Biol. 21:555-560, 1993; Kimata, Y. and Theil, E.C., Plant Physiol. 104:263-270, 1994; Burton, J.W., et al., J. Plant Nutr. 21:913-927, 1998)

Los procedimientos descritos en este documento contemplan una cuantificación precisa de hierro derivado de ferritina vegetal y animal, ya sea natural o de apoferritina recombinante con mineral de hierro reconstituido usando transferencia Western cuantitativa ya sea clásico o automatizado, inmunoanálisis cuantitativo usando electroforesis capilar en combinación con la determinación de la cantidad de hierro de ferritina y la cuantificación de la proteína total en la muestra. El hierro puede estar contenido en alimentos, suplementos dietéticos, nutracéuticos y similares. El hierro de ferritina derivada de cualquier material natural o procesado se puede cuantificar, incluida la ferritina aislada mediante los procedimientos descritos en este documento.

Para determinar la cantidad de hierro de ferritina en una muestra, debe conocerse el porcentaje en peso de la muestra de una fuente de hierro de ferritina. La fuente de hierro de ferritina puede ser de origen vegetal o animal. La muestra puede ser cualquier tipo de muestra, por ejemplo, material natural o procesado, incluidas muestras de alimentos, bebidas, plantas o animales. Además, se puede determinar la cantidad de hierro de ferritina en el tejido derivado de animales o seres humanos, incluido el tejido normal o el suero hiperferritinémico de un sujeto.

Las etapas para determinar la cantidad de hierro de ferritina en una muestra donde la muestra tiene un porcentaje en peso conocido de una fuente de hierro de ferritina incluyen las etapas de: (a) medir el hierro total en la muestra por unidad de peso de la muestra; (b) preparar un extracto soluble de un peso conocido por volumen de la muestra de la etapa (a) para hacer un extracto de muestra soluble, (c) determinar el hierro total por unidad de peso del extracto de muestra soluble de la muestra; (d) determinar la proteína de ferritina por unidad de peso en el extracto de muestra soluble, usando análisis inmunológico cuantitativo; y (e) calcular la cantidad de hierro de ferritina en la muestra usando la cantidad de hierro total de la etapa (c) dividida por la cantidad de proteína de ferritina de la etapa (d), multiplicada por la cantidad de hierro total en la muestra de la etapa (a) multiplicado por un factor de corrección, determinando así la cantidad de hierro de ferritina en la muestra. La ecuación es la siguiente: $a(c/d) \text{ (factor de corrección)} = e$.

El factor de corrección usado en el cálculo depende de la fuente del hierro de ferritina en la muestra. Por ejemplo, el factor de corrección es 0,75 para una muestra que comprende leguminosas, lo que haría la ecuación anterior de la siguiente manera: $a(c/d) (0,75) = e$.

El análisis inmunológico cuantitativo usado en la etapa (d) descrita anteriormente puede ser cualquier tipo de análisis inmunológico cuantitativo tal como, por ejemplo, una inmunotransferencia cuantitativa, análisis de transferencia Western o inmunoelectroforesis capilar cuantitativa.

También se contempla que los componentes necesarios para determinar la cantidad de hierro de ferritina en una muestra se pueden proporcionar en un kit.

Ejemplos

Ejemplo 1- Aislamiento de ferritina a partir de plantas

Para aislar la ferritina de las plantas, el material vegetal de partida se separó en fracciones solubles e insolubles después de adicionar una solución de sal acuosa, neutra, regulada casi a neutralidad. La mezcla se puede enfriar, a temperatura ambiente o calentar. En este ejemplo, el material vegetal/solución de sal se mantuvo refrigerado entre 32 y 43 grados Fahrenheit (0 a 6 grados Celsius) durante la noche con agitación o agitación lenta. También se podrían usar condiciones más extremas de temperatura, pH y solvente, que no interfieran con el inmunoanálisis. A continuación, el material vegetal/extracto salino se filtró, seguido de clarificación usando centrifugación continua o estática a más de 35.000 x g, durante 20 minutos.

El carbohidrato se eliminó parcialmente de la fracción soluble obtenida a partir de la etapa de clarificación. El carbohidrato se eliminó mediante una mezcla de enzimas glucosidasas adicionadas durante la extracción o después de la clarificación. La figura 1 muestra la eliminación de un carbohidrato, a saber, almidón o celulosa, en extractos de ferritina que se trataron con una glucosidasa. El gráfico demuestra la conversión de carbohidratos en extracto de ferritina tratado con glucosidasa a azúcares reductores a temperatura ambiente con el tiempo. En este ejemplo, el azúcar liberado se midió como la absorbancia a 500 nm del complejo de ácido 3,5 dinitrosalicílico-azúcar y se analizó mediante espectrofotometría UV-vis.

Después de que los carbohidratos se eliminaron enzimáticamente, la solución soluble clarificada se dializó con membranas selectivas de tamaño con el fin de eliminar los azúcares y la enzima digeridos. La solución soluble fraccionada se secó a continuación a baja temperatura para concentrar la ferritina aislada.

La preparación resultante que contiene ferritina aislada se usa luego como un aditivo alimentario o de bebida, o como un suplemento para tratar seres humanos y otros animales que son deficientes en hierro. Hasta la fecha, se han logrado concentraciones de ferritina de más de 1000 veces mediante este proceso.

Ejemplo de referencia 2: aislamiento de ferritina de animales

La ferritina se puede aislar a partir de material animal tal como, por ejemplo, hígado, riñón, bazo, médula ósea u otra fuente rica en ferritina. El aislamiento de la ferritina del material animal se puede realizar siguiendo las etapas de: (a) separación del material animal en fracciones solubles e insolubles; (b) desnaturalización por calor de la fracción soluble; (d) eliminación de carbohidratos de la fracción soluble desnaturalizada por calor mediante digestión enzimática; y (c) concentración de la fracción soluble desnaturalizada por calor tratada enzimáticamente. La ferritina aislada que contiene hierro derivada de animales también puede ser usada por seres humanos y otros animales que necesitan una mayor cantidad de hierro en su dieta.

Ejemplo de referencia 3- Determinación del contenido total de ferritina

El contenido de ferritina se puede determinar a partir de cualquier sustancia que contenga ferritina incluyendo una sustancia procesada (es decir, alimento, suplemento, nutriceútico) derivada de material de partida animal o vegetal. En este ejemplo, el hierro de ferritina se cuantificó en una muestra de alimentos que contenía hierro de ferritina de leguminosas.

En primer lugar, se determinó el contenido total de hierro en los alimentos. A continuación, se determinó la concentración de hierro, la cantidad porcentual del componente no leguminoso y la cantidad porcentual del componente de leguminosa de la sustancia procesada. A partir de los números resultantes, se calculó el contenido de hierro de la leguminosa del sustrato procesado total.

Se determinó entonces la cantidad de hierro por proteína de ferritina y para la fracción de proteína del extracto. Para hacer esto, se preparó un extracto acuoso de la sustancia procesada usando, como ejemplo, 3 mililitros (ml) de material de extracción por miligramo (mg) de la sustancia procesada. Se determina la concentración total de hierro en el extracto. La concentración de proteína de ferritina específica en el extracto también se determina usando un análisis inmunológico cuantitativo, por ejemplo, inmunotransferencia cuantitativa o electroforesis capilar automatizada acoplada a la cuantificación de quimioluminiscencia o fluorescencia con un antisuero dirigido hacia la ferritina de leguminosas enteras o a un péptido de ferritina. Las concentraciones de proteínas de extracto se determinan con un ensayo de proteínas estándar, tal como el análisis de proteínas colorimétricas de Bradford, que se basa en unión a proteínas de un colorante tal como azul de Coomassie. Se determina el peso seco de una alícuota de la muestra. La cantidad de hierro por proteína de ferritina, la cantidad de hierro de ferritina y la cantidad de proteína de leguminosa total/ml de extracto y /gm de materia prima de leguminosa se calcula a partir de los resultados combinados de los inmunoanálisis de hierro, proteína y específicos de ferritina. Se determina el contenido de ferritina máximo y mínimo de los alimentos procesados. La cantidad de hierro de ferritina de leguminosa por gramo de alimento se calcula a partir de los gramos de leguminosa adicionada por gramo de alimento y los gramos de hierro de ferritina leguminosa/g de leguminosa adicionada al alimento procesado. La cantidad mínima de ferritina por gramo de alimento procesado se calcula multiplicando el número resultante por 0,75 para tener en cuenta las cantidades máximas de hierro que no es de la ferritina en las leguminosas. Si la ferritina animal fuera la fuente de la ferritina, se realizaría la medición del hierro hemo y la corrección correspondiente a la determinación total de hierro.

Además de la ferritina medida en material natural y procesado, la cantidad de ferritina que contiene hierro en un tejido, o en suero durante la hiperferritinemia en animales o seres humanos se puede determinar mediante el uso de un antisuero específico dirigido hacia la ferritina y los inmunoanálisis cuantitativos tal como transferencia Western o electroforesis capilar automatizada.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de aislamiento de ferritina del material vegetal que comprende las etapas de:
 - (a) separación del material vegetal en una fracción soluble e insoluble;
 - (b) eliminación de componentes que no son ferritina de la fracción soluble de la etapa (a) mediante tratamiento enzimático de la fracción soluble con una o más enzimas de degradación de carbohidratos, aislando así la ferritina; y
 - (c) concentración de la ferritina aislada de la etapa (b).
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el material vegetal comprende leguminosas, preferiblemente soja.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el material vegetal comprende la planta completa, o una o más de una semilla, un frijol, un tallo, un fruto, una hoja, una raíz y una flor.
4. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el material vegetal comprende la corriente de residuos del procesamiento de leguminosas.
5. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la etapa de separación soluble e insoluble comprende separación mecánica.
6. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la eliminación de los componentes de no ferritina tratados enzimáticamente, preferiblemente con una o más enzimas de degradación de carbohidratos que comprenden una enzima glucosidasa.
7. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la concentración de la ferritina aislada comprende secar la fracción soluble o ultrafiltración.
8. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionamiento de la fracción soluble.
9. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además la etapa de fraccionamiento de la fracción soluble con un solvente.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que el solvente es un solvente orgánico.

25

FIGURA 1

