

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 738 287**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 38/16</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/10</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/40</b>	(2006.01)
<b>A23L 33/19</b>	(2006.01)
<b>A61P 7/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 9/10</b>	(2006.01)
<b>A61P 13/12</b>	(2006.01)
<b>A61P 37/02</b>	(2006.01)
<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **08.04.2014 PCT/JP2014/060561**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **16.10.2014 WO14168253**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.04.2014 E 14782228 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.06.2019 EP 3017824**

54 Título: **Inhibidor de la formación de trampas extracelulares en leucocitos**

30 Prioridad:

**09.04.2013 JP 2013081243**

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

**21.01.2020**

73 Titular/es:

**KAGAYA, SHINJI (100.0%)  
7-19-16, Shimosakunobe, Takatsu-ku,  
Kawasaki-shi  
Kanagawa 213-0033, JP**

72 Inventor/es:

**HIRAHASHI, JUNICHI;  
URANO, YASUTERU;  
OKUBO, KOUSHU;  
KAMIYA, MAKO y  
KAGAYA, SHINJI**

74 Agente/Representante:

**LEHMANN NOVO, María Isabel**

**ES 2 738 287 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

Inhibidor de la formación de trampas extracelulares en leucocitos

Campo técnico de la invención

5 La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con la formación de trampas extracelulares de leucocitos, la composición comprende lactoferrina, en donde la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en poliangeítis microscópica, angeítis granulomatosa alérgica, reacción local de Shwartzman, lesión renal aguda (LRA) acompañada por lesión por isquemia-reperusión y coagulación intravascular diseminada.

Antecedentes de la invención

10 Las NET (trampas extracelulares de neutrófilos) son estructuras extracelulares que liberan estructuras tipo malla, capturan bacterias, eumicetos, helmintos y virus, y exhiben una acción antibacteriana cuando los neutrófilos se activan por la contaminación con bacterias, la forma de los neutrófilos segmentados y la distribución de cromatina son poco claras, luego, la membrana nuclear se extingue, el citoplasma y los componentes granulares existen en la estructura de la cromatina en un estado mixto y la membrana celular se rompe. Las NET implican principalmente  
15 ADN, y la histona 3 (H3) y la elastasa desempeñan un papel importante en la acción de las NET. La formación de las NET recoge localmente moléculas antibacterianas que destruyen eficazmente microorganismos. La formación de las NET provoca la NETosis de los neutrófilos, sin embargo, el mecanismo molecular de la misma no se ha aclarado mucho. Las NET se forman por la estimulación de los neutrófilos con TNF- $\alpha$ , PMA, LPS, IL-8 o similares, y la NETosis provocada en el momento de la formación de las NET exhibe una forma diferente de la necrosis o  
20 apoptosis conocida clásicamente que provoca la activación de la caspasa o la fragmentación de ADN. Cuando los neutrófilos son estimulados por LPS o PMA, se provoca autofagia y, al mismo tiempo, se genera oxígeno activado. Esto provoca degradación de la membrana nuclear, descondensación de la cromatina y citrulinación de la histona y, por lo tanto, se provoca NETosis (Documentos no patente 1 y 2).

25 Se ha documentado que, junto con la formación de las NET, muchas proteínas, especialmente, proteínas antibacterianas contenidas en gránulos azurófilos o gránulos tipo II, se secretan desde los neutrófilos por medio de desgranulación y también se secretan proteínas relacionadas con la estructura (Documento no patente 2). Estas proteínas también se denominan "proteínas constructoras de NET". Se documentan como proteínas de este tipo la elastasa neutrófila, histona, mieloperoxidasa, F-actina, lactoferrina, metaloproteasa de matriz 9, LL37, catepsina G, BPI, proteinasa 3, calprotectina, azurocidina, lisozima C, defensina, catalasa y similares (Documento no patente 3).

30 La lactoferrina está contenida en el gránulo tipo II en los neutrófilos. Los neutrófilos forman las NET y, por último, provocan desgranulación, y la lactoferrina se libera al exterior de los neutrófilos (Documento no patente 1).

35 La lactoferrina se conserva bien en los mamíferos y existe una pequeña diferencia en la función de la lactoferrina entre diferentes especies de mamífero. Hoy en día, la lactoferrina es objeto de atención como proteína contenida en la leche para la actividad fisiológica de la misma, y está disponible comercialmente. Se debería tener en cuenta que se ha documentado que la leche no tiene un efecto inhibitorio en la formación de las NET de neutrófilos bovinos (Documento no patente 4).

40 Las NET están implicadas en el aumento de tamaño y crecimiento de los trombos. Cuando se liberan las NET, la histona contenida en las mismas tiene una acción de condensación de las plaquetas. Por lo tanto, los trombos plaquetarios se forman con base en las NET. La elastasa neutrófila o la catepsina G contenidas en las NET degradan el inhibidor de la vía del factor tisular y promueven la reacción de coagulación de la sangre. Las NET desempeñan un papel en el mantenimiento de los microorganismos y similares en un sitio local por medio de una acción de este tipo (Documento no patente 5).

45 La acción de las NET, que van a exhibir originalmente, es capturar microorganismos externos tales como bacterias grampositivas, bacterias gramnegativas, eumicetos y similares, y confinar y destruir los microorganismos de este tipo en el sitio local. Debido a tener una acción de este tipo, las NET se ven con frecuencia en enfermedades infecciosas. Sin embargo, también se ha documentado que, cuando una enfermedad infecciosa se vuelve crónica, las NET se forman incluso en ausencia de microorganismos externos. Se sabe que el lupus eritematoso sistémico (LES), que es una de las enfermedades autoinmunitarias crónicas y resistentes al tratamiento, forma un anticuerpo contra su propio ADN o proteínas relacionadas y provoca así inflamación en los tejidos u órganos. Un descubrimiento  
50 característico con respecto al LES es que muchos neutrófilos están presentes en el sitio de la lesión. Se sabe que, en el suero de un paciente con LES, el péptido antibacteriano LL37 y los ADN existen en las NET (Documentos no patente 6 y 7). Una sustancia de este tipo es reconocida por las células B como un antígeno y se produce así un anticuerpo. Los neutrófilos en un paciente con LES tienen más probabilidades de provocar NETosis que los neutrófilos en una persona sana (Documento no patente 6). Se considera que estos factores inducen una  
55 inflamación crónica. Se ha documentado que el fragmento de IgG en el suero de un paciente con una vasculitis

asociada al anticuerpo frente al citoplasma de los neutrófilos (ANCA), que es una enfermedad provocada por un anticuerpo, tiene una capacidad para formar las NET de neutrófilos que es aproximadamente el doble de la capacidad de una persona sana (Documentos no patente 8 y 9).

5 La relación entre la formación de las NET y las enfermedades ha sido el objeto de atención recientemente, más específicamente, desde que se realizó el informe de Brinkman *et al.* en 2004 (Documento no patente 1). En el futuro, se revelarán novedosamente enfermedades provocadas por la formación de las NET. Aunque la formación de las NET desempeña un papel importante en la protección de un organismo vivo contra una infección, la inhibición de la formación de las NET se considera necesaria para mejorar algunos estados de enfermedades como se describió anteriormente.

10 Una sustancia que inhibe la formación de las NET, por ejemplo, estreptococo, que es una bacteria grampositiva tal como *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* o similares, se ha documentado que expresa ADNasa extracelularmente. Como sustancias que suprimen la producción de anticuerpos contra histona o superóxido, se han documentado el cloruro de difenilenodonio (DPI) y la catalasa (Documento no patente 10).

15 Además, se sabe que, por ejemplo, la actividad de la mieloperoxidasa (MPO) influye en la NETosis (Documento no patente 11) y que el fenómeno en el que los neutrófilos forman las NET y se someten a destrucción, concretamente, NETosis, es un proceso diferente a la apoptosis o necrosis (Documento no patente 10).

20 Existe una técnica anterior para prevenir una enfermedad autoinmunitaria tal como diabetes tipo I o artritis reumatoide por el uso de fragmentos de proteína básica derivada de la leche como ingrediente activo (Documento patente 1). Esta técnica anterior se especializa en el ajuste de inmunocitos, principalmente, linfocitos, supresión de citocina inflamatoria y similares, pero no con respecto a la acción de inhibición de la formación de las NET.

Hasta ahora, no se ha documentado ningún fármaco terapéutico para una enfermedad provocada por la formación de las NET.

#### Lista de referencias

##### Literatura patente

25 Documento patente 1: Solicitud de patente japonesa abierta a inspección pública n.º 2008-189637

##### Literatura no patente

Documento no patente 1: Volker Brinkmann *et al.*, 2004, Science, 303:1532-1535

Documento no patente 2: Q Remijsen *et al.*, 2011, Cell Death and Differentiation, 18: 581-588

Documento no patente 3: Maren von Koeckritz-Blickwede *et al.*, 2008, Blood, 111:3070-3080

30 Documento no patente 4: John D. Lippolis *et al.*, 2006, Veterinary Immunology and Immunopathology, 113:248-255

Documento no patente 5: Fuchs TA *et al.*, 2010, Proc Natl Acad Sci USA, 107:15880-15885

Documento no patente 6: Garcia-Romo GS *et al.*, 2011 Sci Transl Med, 3:73ra20

Documento no patente 7: Lande R *et al.*, 2011 Sci Transl Med, 3:73ra19

Documento no patente 8: Kessenbrock K *et al.*, 2009, Nat Med, 6:623-625

35 Documento no patente 9: Bosch X, 2009, J Am Soc Nephrol, 8:1654-1656

Documento no patente 10: Tobias A. Fuchs *et al.*, 2007, J Cell Biol, 176:231-241

Documento no patente 11: K. Akong-Moore *et al.*, 2012, PLOS ONE, 7:e42984

Documento no patente 12: Makoto Naito *et al.*, 2010, Seibutsu Shiryo Bunseki (Analysis of Biological Samples) 33:329-338

40 Descripción de la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar un fármaco terapéutico fundamental para una enfermedad provocada por la formación de trampas extracelulares de leucocitos, especialmente, un fármaco terapéutico inocuo y eficaz, y también un método terapéutico, adecuado para la conservación de la remisión (supresión de la recaída) realizado durante un largo periodo de tiempo.

5 Como resultado de estudios activos hechos con el fin de resolver el problema descrito anteriormente, los autores de la presente invención encontraron que la lactoferrina exhibe un efecto supresor significativo en la formación de NET y realiza una terapia fundamental de enfermedades relacionadas con las NET. También se ha encontrado que la presente invención mejora significativamente la tasa de supervivencia de animales modelo para vasculitis asociada a ANCA, reacción local de Shwartzman y coagulación intravascular diseminada (CID), dichas enfermedades son provocadas por la formación de las NET.

La presente invención se define en las reivindicaciones anejas.

También se describe lo siguiente.

- [1] Una composición para inhibir la formación de trampas extracelulares de leucocitos, que comprende lactoferrina.
- 10 [2] La composición según [1] anterior, en donde la lactoferrina se encuentra en una cantidad de entre 0,001 a 10 g/kg/día.
- [3] La composición según [1] anterior, en donde la lactoferrina deriva de seres humanos.
- [4] La composición según [1] anterior, en donde la lactoferrina es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a) a (c):
- 15 (a) una proteína formada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5;
- (b) una proteína formada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, en la que entre 1 a 66 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden, la proteína tiene actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos; y
- 20 (c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 % o superior con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, la proteína tiene actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos.
- [5] La composición según cualquiera de [1] a [5] anterior, en donde los leucocitos son uno seleccionado de entre el grupo que consiste en neutrófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos.
- 25 [6] La composición según [5] anterior, en donde los leucocitos son neutrófilos.
- [7] Una composición para tratar una enfermedad asociada con la formación de trampas extracelulares de leucocitos, la composición comprende lactoferrina.
- [8] La composición según [7] anterior, en donde la lactoferrina se encuentra en una cantidad de entre 0,001 a 10 g/kg/día.
- 30 [9] La composición según [7] anterior, en donde la lactoferrina deriva de seres humanos.
- [10] La composición según [7] anterior, en donde la lactoferrina es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a) a (c):
- (a) una proteína formada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5;
- 35 (b) una proteína formada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, en la que entre 1 a 66 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden, la proteína tiene actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos; y
- (c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 % o superior con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, la proteína tiene actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos.
- 40 [11] La composición según cualquiera de [7] a [10] anterior, en donde los leucocitos son uno seleccionado de entre el grupo que consiste en neutrófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos.
- [12] La composición según cualquiera de [7] a [11] anterior, en donde la enfermedad es una seleccionada de entre el grupo que consiste en vasculitis asociada a ANCA, lupus eritematoso sistémico, reacción local de Shwartzman,
- 45 lesión renal aguda (LRA) acompañada por lesión por isquemia-reperfusión y coagulación intravascular diseminada.
- [13] La composición según cualquiera de [7] a [12] anterior, que se encuentra en forma de alimento.

[14] La composición según cualquiera de [7] a [12] anterior, que se encuentra en forma de agente de inyección.

[15] La composición según cualquiera de [7] a [13] anterior, que es administrable por vía oral.

[16] Un método para inhibir la formación de trampas extracelulares de leucocitos, el método comprende administrar lactoferrina a un paciente.

5 [17] Un método terapéutico para una enfermedad asociada con la formación de trampas extracelulares de leucocitos, el método terapéutico comprende administrar lactoferrina a un paciente.

Se describe un método terapéutico con pocos efectos secundarios para una enfermedad provocada por la formación de trampas extracelulares de leucocitos. El método tiene pocos efectos secundarios y, por lo tanto, tiene la ventaja de ser utilizable de manera segura por una amplia gama de pacientes y personas que tienen la posibilidad de convertirse en pacientes.

10 Las composiciones para inhibición y tratamiento según la presente descripción son utilizables por una amplia gama de sujetos que incluye sujetos con depresión del sistema inmunitario tales como personas mayores, pacientes con cáncer y similares, y sujetos que tienen enfermedades infecciosas o complicaciones o que tuvieron tuberculosis. La presente descripción proporciona un fármaco terapéutico y un método terapéutico para una enfermedad asociada con la formación de trampas extracelulares de leucocitos que tienen pocos efectos secundarios, incluso si se utilizan durante un largo periodo de tiempo. Las composiciones para inhibición y tratamiento según la presente descripción son especialmente útiles como fármaco que es utilizable durante un largo periodo de tiempo para tratar las enfermedades descritas anteriormente, como fármaco que suprime la recaída después de un síntoma agudo de un sujeto está en remisión, o como fármaco terapéutico para las enfermedades descritas anteriormente que se vuelven crónicas.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1-A es un gráfico que muestra una capacidad de lactoferrina bovina de inhibir la formación de NET.

La Figura 1-B es un gráfico que muestra una capacidad de lactoferrina humana de inhibir la formación de las NET.

25 La Figura 1-C proporciona micrográficos de fluorescencia que muestran cómo la lactoferrina humana inhibe la formación de las NET.

La Figura 1-D es un gráfico que muestra el efecto, proporcionado por lactoferrina humana, de suprimir la liberación de ADN junto con la formación de las NET.

La Figura 1-E proporciona micrográficos de electrones que muestran cómo la lactoferrina humana suprime la liberación de ADN junto con la formación de las NET.

30 La Figura 2 es un gráfico que muestra el efecto, proporcionado por lactoferrina humana, de suprimir la liberación de ADN junto con la formación de las NET.

La Figura 3 es un gráfico que muestra el efecto, proporcionado por medio de administración oral de lactoferrina bovina, de aumentar la tasa de supervivencia de animales modelo de vasculitis asociada a ANCA.

35 La Figura 4-A es un gráfico que muestra el efecto, proporcionado por medio administración oral de lactoferrina bovina, de disminuir el título de anticuerpos de MPO-ANCA en la sangre de animales modelo de vasculitis asociada a ANCA.

La Figura 4-B es un gráfico que muestra el efecto, proporcionado por medio de administración oral de lactoferrina bovina, de disminuir la concentración de ADN en la sangre de animales modelo de vasculitis asociada a ANCA.

40 La Figura 4-C proporciona micrográficos que muestran cómo mejora el estado de enfermedades de tejidos renales de animales modelo de vasculitis asociada a ANCA por medio de administración oral de lactoferrina bovina.

La Figura 5-A proporciona fotografías que muestran cómo mejora la hemorragia subcutánea de animales modelo de RLS por medio de administración oral de lactoferrina bovina.

La Figura 5-B es un gráfico que muestra, con puntuaciones, la mejora en la hemorragia subcutánea de los animales modelo de RLS realizada por medio de administración oral de lactoferrina bovina.

45 La Figura 5-C proporciona micrográficos que muestran cómo mejoran los tejidos cutáneos de animales modelo de RLS por medio de administración oral de lactoferrina bovina.

La Figura 6-A es un gráfico que muestra que la concentración de ADN en bolsas de aire en los animales modelo de RLS disminuye por medio de administración oral de lactoferrina bovina.

La Figura 6-B proporciona micrográficos que muestran cómo la liberación de ADN en las bolsas de aire en los animales modelo de RS se suprime por medio de administración oral de lactoferrina bovina.

5 La Figura 7 es un gráfico que muestra los resultados de la evaluación de la tasa de supervivencia/prolongación de la vida después de la administración de histona.

La Figura 8 es un gráfico que muestra el efecto de la hemostasia en ratones modelo de trombos inducidos por histona, proporcionado por la administración de lactoferrina en las colas de los mismos.

10 La Figura 9 proporciona fotografías que muestran el efecto, proporcionado por lactoferrina, de suprimir la hemorragia en los tejidos pulmonares de los ratones modelo de trombos inducidos por histona.

La Figura 10 es un gráfico que muestra que la inhibición de la formación de las NET es una actividad específica a la lactoferrina.

Descripción de las realizaciones

De aquí en adelante, la presente invención se describirá más detalladamente.

15 1. Composición para inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos

En una primera realización, la presente descripción proporciona una composición que contiene lactoferrina para inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos (de aquí en adelante, denominada como la "composición para inhibición según la presente descripción").

20 Se ha documentado que las trampas extracelulares se forman por muchos tipos de leucocito. Por ejemplo, se ha documentado que las trampas extracelulares se forman por neutrófilos (Brinkmann, V., *et al.*, Science 2004; 303:1532-1535), granulocitos basófilos (Yousefi, S., *et al.*, Nat Med 2008; 14:949-953), mastocitos (von Koeckritz-Blickwede M, *et al.*, Blood 2008; 111:3070-3080) y monocitos (Webster SJ, *et al.*, J Immunol 2010; 185:2968-2979; por ejemplo, macrófagos (Chow, O.A., *et al.*, Cell Host & Microbe, Volume 8, Issue 5, 445-454, 18 de noviembre 2010)) y similares.

25 Se ha documentado que las trampas extracelulares formadas por estos tipos de leucocito tienen una característica común de liberar componentes de fibra que contienen principalmente ADN y proteínas de gránulos (Simon, D., *et al.*, Allergy 68 (2013) 409-416).

30 La composición para inhibición según la presente descripción agrega y/o condensa los componentes de fibra y puede suprimir así la liberación de los componentes de fibra (véase la Figura 1-E). Por lo tanto, se entenderá que ese uso de la composición para inhibición según la presente descripción agrega y/o condensa los componentes de fibra, que, de otro modo, se liberarían desde los neutrófilos utilizados en los ejemplos y también los otros tipos de leucocito (por ejemplo, granulocitos basófilos, mastocitos, monocitos (por ejemplo, macrófagos)) en el momento de la formación de las trampas extracelulares, y puede inhibir así la formación de las trampas extracelulares por medio de estos tipos de leucocito.

35 La lactoferrina, que es un ingrediente activo de la composición para inhibición según la presente descripción, puede ser cualquier lactoferrina derivada de mamíferos sin limitación específica. Preferiblemente, la lactoferrina deriva de leche de mamífero que es bebible por seres humanos (por ejemplo, leche de vaca, cabra, oveja, humana) y, más preferiblemente, deriva de leche humana. Alternativamente, la lactoferrina puede derivar de neutrófilos de los mamíferos.

40 Se conocen las secuencias de aminoácidos de lactoferrina derivada de varios tipos de mamífero (véase la Tabla 1 a continuación).

Tabla 1

Lactoferrina derivada de:	N.º de acceso de Genbank	SEQ ID NO
Seres humanos	NP_001186078.1	1
Vaca	NP_851341.1	2

## ES 2 738 287 T3

Lactoferrina derivada de:	N.º de acceso de Genbank	SEQ ID NO
Oveja	ACT76166.1	3
Cabra	AAA97958.1	4
Caballo	CAA09407.1	5

En una realización, la lactoferrina utilizada para la composición para inhibición según la presente descripción es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en (a) a (c) de a continuación:

(a) una proteína formada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5;

5 (b) una proteína formada de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, en la que entre 1 a 66 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden, la proteína tiene actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos; y

10 (c) una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 % o superior con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, las proteínas tienen actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos.

15 La proteína de (b) o (c) anterior es típicamente una variante de cualquier polipéptido de los SEQ ID NO: 1 a 5 que existe de manera natural, pero abarca proteínas que se pueden adquirir artificialmente por el uso de un método de inducción de mutación en un sitio específico descrito en, por ejemplo, "Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual Vol. 3, Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001", "Ausubel, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons 1987-1997", "Nuc. Acids. Res., 10, 6487 (1982)", "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 6409 (1982)", "Gene, 34, 315 (1985)", "Nuc. Acids. Res., 13, 4431 (1985)", "Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82, 488 (1985)", y similares.

20 En esta especificación, la "proteína formada de cualquier secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, en la que entre 1 a 66 aminoácidos se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden, la proteína tiene actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos" abarca proteínas formadas por cualquier secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, en la que, por ejemplo, entre 1 a 66 residuos de aminoácido, entre 1 a 65 residuos de aminoácido, entre 1 a 60 residuos de aminoácido, entre 1 a 55 residuos de aminoácido, entre 1 a 50 residuos de aminoácido, entre 1 a 49 residuos de aminoácido, entre 1 a 48 residuos de aminoácido, entre 1 a 47 residuos de aminoácido, entre 1 a 46 residuos de aminoácido, entre 1 a 45 residuos de aminoácido, entre 1 a 44 residuos de aminoácido, entre 1 a 43 residuos de aminoácido, entre 1 a 42 residuos de aminoácido, entre 1 a 41, entre 1 a 40 residuos de aminoácido, entre 1 a 39 residuos de aminoácido, entre 1 a 38 residuos de aminoácido, entre 1 a 37 residuos de aminoácido, entre 1 a 36 residuos de aminoácido, entre 1 a 35 residuos de aminoácido, entre 1 a 34 residuos de aminoácido, entre 1 a 33 residuos de aminoácido, entre 1 a 32 residuos de aminoácido, entre 1 a 31 residuos de aminoácido, entre 1 a 30 residuos de aminoácido, entre 1 a 29 residuos de aminoácido, entre 1 a 28 residuos de aminoácido, entre 1 a 27 residuos de aminoácido, entre 1 a 26 residuos de aminoácido, entre 1 a 25 residuos de aminoácido, entre 1 a 24 residuos de aminoácido, entre 1 a 23 residuos de aminoácido, entre 1 a 22 residuos de aminoácido, entre 1 a 21 residuos de aminoácido, entre 1 a 20 residuos de aminoácido, entre 1 a 19 residuos de aminoácido, entre 1 a 18 residuos de aminoácido, entre 1 a 17 residuos de aminoácido, entre 1 a 16 residuos de aminoácido, entre 1 a 15 residuos de aminoácido, entre 1 a 14 residuos de aminoácido, entre 1 a 13 residuos de aminoácido, entre 1 a 12 residuos de aminoácido, entre 1 a 11 residuos de aminoácido, entre 1 a 10 residuos de aminoácido, entre 1 a 9 (entre 1 a varios) residuos de aminoácido, entre 1 a 8 residuos de aminoácido, entre 1 a 7 residuos de aminoácido, entre 1 a 6 residuos de aminoácido, entre 1 a 5 residuos de aminoácido, entre 1 a 4 residuos de aminoácido, entre 1 a 3 residuos de aminoácido, entre 1 a 2 residuos de aminoácido o 1 residuo de aminoácido se elimina, sustituye, inserta y/o añade, las proteínas tienen actividad de inhibición de la formación de las trampas extracelulares de leucocitos. En términos generales, el número de los residuos de aminoácido eliminados, sustituidos, insertados y/o añadidos es preferiblemente tan pequeño como sea posible.

45 Una proteína de este tipo abarca proteínas que tienen al menos un 90 %, al menos un 91 %, al menos un 92 %, al menos un 93 %, al menos un 94 %, al menos un 95 %, al menos un 96 %, al menos un 97 %, al menos un 98 %, al menos un 99 %, al menos un 99,1 %, al menos un 99,2 %, al menos un 99,3 %, al menos un 99,4 %, al menos un 99,5 %, al menos un 99,6 %, al menos un 99,7 %, al menos un 99,8 % o al menos un 99,9 % de identidad de secuencia de aminoácidos con cualquier secuencia de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5 y las proteínas tienen actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos. En términos generales, el grado de la identidad de secuencia de aminoácidos es preferiblemente tan alto como sea posible.

Con respecto a la "actividad de inhibición de la formación de las trampas extracelulares de leucocitos", los leucocitos derivan de un organismo que forma las trampas extracelulares de leucocitos. Preferiblemente, los leucocitos derivan de vertebrados y, más preferiblemente, derivan de mamíferos. Los ejemplos de mamíferos incluyen ser humano, vaca, caballo, cabra, oveja, perro y gato. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

5 Preferiblemente, los leucocitos derivan de los organismos enumerados anteriormente y también son uno seleccionado de entre el grupo que consiste en neutrófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos. Más preferiblemente, los leucocitos son uno seleccionado de entre el grupo que consiste en neutrófilos, granulocitos basófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos. Más preferiblemente, los leucocitos son neutrófilos.

10 Los leucocitos se cultivan en presencia de, o en ausencia de, lactoferrina, y el sistema de cultivo se observa por medio de un microscopio para confirmar que la formación de las trampas extracelulares disminuye en presencia de lactoferrina. Por lo tanto, se puede confirmar que la lactoferrina tiene actividad de inhibición de la formación de las trampas extracelulares de leucocitos.

15 Preferiblemente, los leucocitos se tratan con un estimulante de la formación de trampas extracelulares (parametoxianfetamina (PMA), lipopolisacárido (LPS), etc.) antes de que la lactoferrina se añada a los mismos.

Alternativamente, se recupera el sobrenadante del cultivo del sistema de cultivo y se mide la concentración de ADN en el sobrenadante. De esta manera también, se puede confirmar que la lactoferrina tiene actividad de inhibición de la formación de las trampas extracelulares de leucocitos. La concentración de ADN proviene de los ADN liberados en el sobrenadante del cultivo, principalmente, en el momento de la formación de las trampas extracelulares.

20 En el caso en el que la formación de las trampas extracelulares se inhibe por medio de lactoferrina, la concentración de ADN en el sobrenadante es inferior que en ausencia de lactoferrina.

En este caso también, es preferible que los leucocitos se traten con un estimulante de la formación de trampas extracelulares (parametoxianfetamina (PMA), lipopolisacárido (LPS), etc.) antes de que la lactoferrina se añada a los mismos.

25 La concentración de ADN se puede medir simplemente al utilizar un kit disponible comercialmente (reactivo de ensayo Picogreen dsDNA (P11496 Invitrogen)).

30 Para las condiciones de cultivo de cada tipo de leucocito y el método para confirmar si las trampas extracelulares se habían formado, lo siguiente se puede referir a: neutrofilos (Brinkmann, V., *et al.*, Science 2004; 303:1532-1535), A. K Gupta. FEBS letters 2010; 584:3193-3197, D J Novo. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(4):827-34), granulocitos basófilos (Yousefi, S., *et al.*, Nat Med 2008; 14:949-953), mastocitos (von Köckritz-Blickwede M, *et al.*, Blood 2008; 111:3070-3080), monocitos (Webster SJ, *et al.*, JImmunol 2010; 185:2968-2979: por ejemplo, macrófagos (Chow, O.A., *et al.*, Cell Host & Microbe, Volume 8, Issue 5, 445-454, 18 de noviembre de 2010)).

35 La expresión proporcionada con respecto a una secuencia de aminoácidos de cada proteína de la presente descripción "una o una pluralidad de (por ejemplo, entre 2 a 9) residuos de aminoácido se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden" indica que uno o una pluralidad de residuos de aminoácido se eliminan, sustituyen, insertan y/o añaden en cualquier posición entre una a una pluralidad de posiciones de la secuencia de aminoácidos. Dos o más entre delección, sustitución, inserción y adición pueden tener lugar al mismo tiempo.

40 Los ejemplos de residuos de aminoácidos sustituibles mutuamente se mostrarán a continuación. Los residuos de aminoácido incluidos en el mismo grupo son sustituibles mutuamente. Grupo A: leucina, isoleucina, norleucina, valina, norvalina, alanina. Ácido 2-aminobutírico, metionina, o-metilserina, t-butilglicina, t-butilalanina, ciclohexilalanina; grupo B: ácido aspártico, ácido glutámico, ácido isoaspártico, ácido isoglutámico, ácido 2-aminoadípico, ácido 2-aminosbérico; grupo C: asparagina, glutamina; grupo D: lisina, arginina, ortinina, ácido 2,4-diaminobutírico, ácido 2,3-diaminopropiónico; grupo E: prolina, 3-hidroxiprolina, 4-hidroxiprolina; grupo F: serina, treonina, homoserina; grupo G: fenilalanina, tirosina.

45 La lactoferrina utilizada en la presente descripción se puede modificar con un compuesto. Por ejemplo, la lactoferrina puede ser una proteína modificada unida con polietilenglicol (Patente japonesa n.º 4195486, patente japonesa n.º 4261531, publicación internacional WO2009/113743) o una proteína fusionada con otra proteína o un fragmento de la misma (por ejemplo, proteína estable en la sangre, es decir, IgG, albúmina o un fragmento de las mismas, etc.). (Solicitud de patente japonesa n.º 2012-98085).

## 50 2. Método terapéutico

Por medio del uso de la composición para inhibición según la presente descripción, la formación de las trampas extracelulares de leucocitos se puede inhibir eficazmente. Concretamente, el uso de la composición para inhibición según la presente descripción puede proporcionar una terapia de una enfermedad asociada con la formación de

trampas extracelulares de leucocitos (de aquí en adelante, el método terapéutico que utiliza la composición para inhibición según la presente descripción se denominará como el "método terapéutico de la presente descripción").

5 En esta especificación, el término "terapia" indica generalmente mejora de un síntoma de un ser humano o de un mamífero diferente a un ser humano. El término "mejora" indica que el grado de la enfermedad se alivia o no se deteriora en comparación con el caso en el que, por ejemplo, no se administra la lactoferrina. El término "terapia" abarca también "prevención".

10 En este caso, el objetivo de la terapia (paciente) es un organismo que padece, o está en riesgo de padecer, una enfermedad asociada con la formación de las trampas extracelulares de leucocitos. El objetivo de la terapia es preferiblemente vertebrado y, más preferiblemente, es un mamífero. El mamífero se selecciona de entre el grupo que consiste en ser humano, vaca, caballo, cabra, oveja, perro y gato. El objetivo de la terapia es todavía más preferiblemente un ser humano.

Con respecto al método terapéutico de la presente descripción, la "enfermedad asociada con la formación de las trampas extracelulares de leucocitos" puede ser cualquier enfermedad, sin limitación específica, por la que se observa que la formación de las trampas extracelulares de leucocitos aumenta en el cuerpo del paciente.

15 Las enfermedades de este tipo incluyen, por ejemplo, vasculitis asociada a ANCA (granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica, angeítis granulomatosa alérgica, etc.) lesión renal aguda (LRA) acompañada por lesión por isquemia-reperusión, lupus eritematoso sistémico (LES), apendicitis, aspergilosis, neumonía, infección con *Diplococcus pneumoniae*, fascitis necrosante, infección con estreptococo, sepsis, preeclampsia, enfermedad de Crohn, esquistosomosis, periodontitis, tuberculosis, mastitis, malaria, fibrosis quística y enfermedades de trombosis tales como trombosis venosa profunda (von Bruhl, M. L., *et al.*, J Exp Med.9 de abril de 2012; 209(4):819-35), infarto de miocardio (de Boer, O. J., Thromb Haemost. Febrero 2013; 109(2):290-7), trombosis relacionada con tumor (Demers, M., Proc Natl Acad Sci USA; 7 de agosto de 2012; 109(32):13076-81), coagulación intravascular diseminada (CID) (Tobias A. *et al.*, blood, 29 de septiembre de 2011, vol. 118, n.º 13, pp. 3708-3714), y similares (Documentos no patente 2 y 12). El síndrome de vasculitis se clasifica en vasculitis de vasos grandes, vasculitis de vasos medianos y vasculitis de vasos pequeños, dependiendo del tamaño del vaso en el que se produce la enfermedad. Las enfermedades relacionadas con las NET tales como vasculitis asociada a ANCA, LES y similares mencionadas anteriormente se clasifican dentro de la vasculitis de vasos pequeños. Sin embargo, la CID se desarrolla con frecuencia junto con un caso grave de poliarteritis nodosa, que es una vasculitis de vasos medianos (Guidelines on diagnosis and therapy of circulatory system diseases (documentado por el equipo de investigación conjunta 2006-2007)), sepsis o cáncer sólido. Con estas enfermedades, la citotoxicidad provocada por la formación de las trampas extracelulares de leucocitos (por ejemplo, NET) provoca disfunción endotelial vascular y provoca así disfunción orgánica. Con las enfermedades de trombosis mencionadas anteriormente, la formación de las trampas extracelulares de leucocitos (por ejemplo, NET) actúa como desencadenante para promover la reacción en cadena de la formación de trombos. Se considera que la lactoferrina suprime la formación y liberación/difusión de las trampas extracelulares de leucocitos (por ejemplo, NET) para prevenir la disfunción endotelial vascular, también suprime la reacción en cadena de la formación de trombosis para proporcionar una acción de protección de los órganos, y tiene así un efecto terapéutico para las enfermedades mencionadas anteriormente.

40 Las enfermedades que son objetivos del método terapéutico de la presente descripción son, preferiblemente, vasculitis asociada a ANCA (granulomatosis de Wegener, poliangeítis microscópica, angeítis granulomatosa alérgica, etc.) lupus eritematoso sistémico, reacción local de Schwartzman, y lesión renal aguda (LRA) acompañada por lesión por isquemia-reperusión; y son, más preferiblemente, poliangeítis microscópica acompañada por un aumento en el título de anticuerpos de MPO-ANCA (anticuerpo frente al citoplasma de los neutrófilos específico de mieloperoxidasa) en la sangre, angeítis granulomatosa alérgica y coagulación intravascular diseminada (CID).

45 Se ha documentado que la lactoferrina se utiliza para tratar enfermedades autoinmunitarias tales como diabetes tipo I y artritis reumatoide (Documento patente 1). Sin embargo, las enfermedades autoinmunitarias tales como la diabetes tipo I y artritis reumatoide no se consideran que sean provocadas principalmente por la formación de las trampas extracelulares de leucocitos. Por lo tanto, es sumamente posible que la lactoferrina no actúe por medio de la formación de las trampas extracelulares en la terapia descrita en el informe descrito anteriormente.

50 Concretamente, según la presente descripción, la lactoferrina exhibe un efecto terapéutico en las enfermedades mencionadas anteriormente por medio de un mecanismo completamente innovador, más específicamente, un mecanismo de inhibición de la formación de las trampas extracelulares de leucocitos.

55 La terapia de las enfermedades provocadas por LES o ANCA utiliza esteroides, un fármaco inmunosupresor o similares. Un método terapéutico de este tipo tiene problemas de imposición de una carga física (efecto secundario o similar) en el paciente, lo que provoca que el paciente sufra, y tiene un alto riesgo de inducir otra enfermedad (enfermedad infecciosa).

Por el contrario, según la presente descripción, la lactoferrina contenida en alimentos se utiliza como ingrediente activo. Esto es una ventaja en que provoca menos efectos secundarios, lo que no provoca que el paciente sufra, y tiene un menor riesgo de inducir otra enfermedad.

### 3. Composición

- 5 En otra realización, la presente descripción proporciona una composición que contiene lactoferrina para tratar una enfermedad asociada con la formación de las trampas extracelulares de leucocitos (de aquí en adelante, denominada como la "composición de la presente descripción").

El término "composición" indica una composición que contiene un aditivo tal como un vehículo o similar utilizado en la preparación de un ingrediente activo útil en la presente descripción (lactoferrina, etc.).

- 10 Con respecto a la composición de la presente descripción, la "lactoferrina" y la "enfermedad asociada con la formación de las trampas extracelulares de leucocitos" son como se describieron anteriormente.

- 15 La vía de administración de la composición de la presente descripción puede ser cualquier vía utilizada generalmente sin limitación específica. Los ejemplos específicos de la vía de administración incluyen administración oral, administración sublingual, administración transnasal, administración pulmonar, administración por medio del tubo digestivo, administración transdérmica, instilación, inyección intravenosa, inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección local e implante quirúrgico. Los ejemplos preferibles de la vía de administración son administración oral e inyección intravenosa.

- 20 La composición de la presente descripción se puede proporcionar como una formulación sólida tal como cápsula, comprimido, polvo o similares; una formulación líquida tal como disolución, suspensión, emulsión o similares; o una formulación semilíquida tal como pomada, crema, pasta o similares.

En el caso de que se administre por vía oral, la composición se proporciona preferiblemente como formación sólida. En el caso de que se inyecte, la composición se proporciona preferiblemente como una formulación sólida que abarca una formulación realizada por medio de liofilización o una formulación líquida.

- 25 En el caso de que se administre por vía oral, la composición de la presente descripción se prepara más preferiblemente como una formulación entérica. Se sabe que la lactoferrina tomada por vía oral se digiere más fácilmente con pepsina en el estómago. La composición preparada como una formulación entérica se ingiere en el cuerpo a una velocidad mayor (Takeuchi *et al.*, *Exp Physiol.* Noviembre 2006; 91(6):1033-40). En este caso, es deseable que el polvo de lactoferrina se comprima en un estado seco y se recubra con un material de recubrimiento entérico porque la lactoferrina es térmicamente inestable cuando contiene humedad (Patentes japonesas con respecto a la formulación del laboratorio nacional de referencia: patente japonesa n.º 4050784 con respecto a los gránulos, patente japonesa n.º 4592041 con respecto a los comprimidos).
- 30

- 35 La lactoferrina se puede ingerir por un ser humano o un animal diferente a un ser humano como alimento o pienso como se añade al alimento o pienso. Un método para producir un alimento o pienso de este tipo es conocido por una persona con experiencia ordinaria en la técnica. La lactoferrina se puede formular también como una formación de disolución, más específicamente, como un agente de inyección.

Alternativamente, una lactoferrina de este tipo o degradación de lactoferrina se puede añadir a un nutriente, alimento, bebida o similares tal como es o en forma de formulación.

La lactoferrina se puede utilizar de manera independiente o en combinación con otro componente farmacológicamente aceptable.

- 40 Por ejemplo, una composición como una formulación para administración oral tal como polvo, gránulo, comprimido, cápsula o similares se prepara por medio de un método normal por medio del uso de almidón, lactosa, azúcar blanco, manitol, carboximetilcelulosa, almidón de maíz, sal inorgánica o similares. Para este tipo de composición, otros excipientes de los enumerados anteriormente, un agente de recubrimiento, un ligante, un desintegrante, un tensioactivo, un lubricante, un potenciador de fluidez, un colorante, un material aromatizante o similares es utilizable cuando sea necesario.
- 45

- 50 La composición de la presente descripción puede contener lactoferrina, que es un ingrediente activo, en una cantidad terapéuticamente eficaz. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de lactoferrina como agente activo que, cuando se administra al objetivo, alivia o no deteriora el síntoma de la enfermedad asociada con la formación de las trampas extracelulares de leucocitos en comparación con el caso en el que no se administra lactoferrina. La "cantidad terapéuticamente eficaz" abarca una cantidad que es eficaz para prevención.

En el caso en el que, por ejemplo, la composición se puede administrar por vía oral, la cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra entre 0,001 a 10 g/kg/día, entre 0,005 a 10 g/kg/día, entre 0,01 a 10 g/kg/día o entre 0,01 a 5 g/kg/día. En el caso en el que la composición se administra a un ser humano, la cantidad terapéuticamente eficaz se encuentra generalmente entre 10 mg a 15.000 mg, entre 10 mg a 12.000 mg, entre 10 mg a 10.000 mg, entre 20 mg a 10.000 mg, entre 20 mg a 8.000 mg, entre 30 mg a 8.000 mg o entre 30 mg a 6.000 mg por día. Una dosis de este tipo por día se puede administrar de una vez o se puede dividir en varias veces a un paciente que necesita terapia de una enfermedad asociada con la formación de las trampas extracelulares de leucocitos.

La dosis y la frecuencia de administración de la composición de la presente descripción varía según varios factores que incluyen la especie, peso corporal, género, edad y grado de avance de la enfermedad tumoral del objetivo, y la vía de administración al objetivo. Una persona con experiencia ordinaria en la técnica tal como un médico, veterinario, dentista, farmacéutico o similares podría determinar la dosis de administración teniendo en cuenta estos factores.

En lo anterior, los valores típicos se enumeran con respecto a la cantidad terapéuticamente eficaz, y la dosis y frecuencia de administración. Incluso un valor por encima o por debajo de la lista puede ser suficientemente terapéuticamente eficaz. Por lo tanto, incluso un valor por encima o por debajo de la cantidad terapéuticamente eficaz, o la dosis o frecuencia de administración está abarcado en la cantidad terapéuticamente eficaz, o la dosis y frecuencia de administración de la composición de la presente descripción.

### Ejemplos

De aquí en adelante, la presente descripción se describirá más detalladamente por medio de los ejemplos. La presente descripción no está limitada por ninguna de las realizaciones descritas en los ejemplos.

#### [Ejemplo 1] El efecto inhibitorio de la estimulación de la formación de las NET con sangre periférica de voluntarios sanos por medio de lactoferrina pretratada

##### 1. Método de aislamiento de neutrófilos humanos

De personas sanas, se muestrearon entre 15 ml a 20 ml de sangre periférica para un ciclo del experimento con una jeringuilla que contenía EDTA (aguja: entre 18 a 22 G). Después del muestreo sanguíneo, 3 ml de medio de resolución mono-poli (N.º de catálogo DSBN100, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) contenido en un tubo cónico de 15 ml, y luego 3,5 ml de sangre entera se apilaron cuidadosamente en la capa inferior del medio de resolución mono-poli. El tubo cónico de 15 ml se centrifugó a temperatura ambiente (entre 15 a 30 °C) a 400 x g durante 20 minutos en una centrifugadora de tipo oscilante y, luego, el tubo cónico se retiró cuidadosamente. Una capa de plasma marrón en la capa superior y una capa de linfocitos/monocitos inmediatamente por debajo de la capa de plasma marrón se retiraron por un aspirador o similar. Una capa transparente por debajo de la capa de linfocitos/monocitos se retiró tanto como fuera posible. Una capa rosa palo por debajo de la capa transparente se sacó con una pipeta de Pasteur. Para lavar los neutrófilos, la capa rosa palo se transfirió a un tubo de prueba que contenía disolución salina tamponada con fosfato (PBS(-): 137 mM de cloruro de sodio, 2,7 mM de cloruro de potasio, 8,1 mM de hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato, 1,47 mM de dihidrogenofosfato de potasio). El tubo de prueba que contenía los neutrófilos se centrifugó a temperatura ambiente (entre 15 a 30 °C) a 200 x g durante 10 minutos. El tubo de prueba se sacó y el sobrenadante se descartó. Se añadió agua esterilizada a 4 °C a los neutrófilos en el tubo de prueba y se dejó en hielo durante 30 segundos para provocar hemólisis de los eritrocitos mezclados en la misma. Después de la hemólisis, se añadieron 45 ml de PBS(-) al tubo de prueba, y el tubo de prueba se centrifugó a 200 x g durante 10 minutos. El tubo de prueba se sacó y el sobrenadante se descartó. La precipitación se suspendió en DMEM de cultivo + albúmina de suero humano al 2 % (serum human albumin; n.º de producto A9080 Sigma + 4 mM de L-glutamina), y se dejó a 8 °C hasta inmediatamente antes de utilizarse. Los neutrófilos se separaron en el número de entre  $1 \times 10^6$ /ml a  $1 \times 10^7$ /ml. La pureza, que se obtuvo por recuento visual de muestra post-cytospin teñida con Giemsa, fue entre un 95 a un 98 %.

##### 2. Método para pretratar los neutrófilos (inhibición de la formación de las NET) y método de inducción de NETosis (formación de las NET)

Aproximadamente 1 hora después del aislamiento de los neutrófilos descritos en "1. Método de aislamiento de neutrófilos humanos" en el Ejemplo 1, los neutrófilos se pretrataron. En un portaobjetos de 8 µ pocillos (N.º de catálogo 80826 Ibiidi (marca registrada)), los neutrófilos se esparcieron en 400 µl de DMEM de cultivo + albúmina de suero humano al 2 % (serum human albumin; n.º de producto A9080 Sigma + 4 mM L-glutamina) a una velocidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  células/pocillo. Los fármacos (I) a (V) se añadieron cada uno y se realizó el pretratamiento a temperatura ambiente durante 30 minutos: (I) lactoferrina bovina (N.º de producto 123-04124 Lote: KWG6332 WAKO (marca registrada)) (reserva: 100 mg/ml diluida a 1/500, 1/5000 o 1/50000 para tener concentraciones finales de 200 µg/ml, 20 µg/ml o 2 µg/ml; (II) lactoferrina humana (reserva: 100 mg/ml, 200 µl n.º de catálogo SIGL6793, Sigma) diluida a 1/500, 1/5000 o 1/50000 para tener concentraciones finales de 200 µg/ml, 20 µg/ml o 2 µg/ml; (III) DPI (reserva: 25 mM, n.º de producto D2926 Sigma; documento anexo; disolvente: DMSO)

diluido a 1/2500 para tener una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ ; (IV) deferoxamina (N.º de producto D9533 Sigma) (reserva: 200 mM) diluida a 1/100 para tener una concentración final de 2 mM; (V) trientina (dihidrocloreto de trietilentetramina (N.º de producto de Sigma T5033; Lote: 1354380V; reserva: 100 mM, 100  $\mu\text{l}$ )) (concentración final: 125  $\mu\text{M}$ , 12,5  $\mu\text{M}$ , 1,25  $\mu\text{M}$ ). El pretratamiento se realizó cada uno por medio del uso de reactivo en cada concentración. Después del pretratamiento, los neutrófilos se estimularon con PMA (concentración final: 25 nM, reserva: 10 mM en DMSO; n.º de producto de Sigma P8139).

### 3. Método y resultados de la observación de NETosis provocada junto con la formación de las NET

Para observar la formación de las NET, se utilizó un microscopio confocal (Leica DMI 6000B, Leica (marca registrada)). Se contó visualmente el número de neutrófilos por medio del microscopio (en todos los experimentos, se utilizó una sonda de HySO<sub>x</sub> (concentración final: 500 nM; reserva: 10 mM, proporcionada por el profesor Yasuteru URANO, Bioinformática, Ingeniería Biomédica, Departamento de Medicina Biofísica, Facultad de Medicina, Universidad de Tokio) (Kenmoku, S., *et al.*, 2007. J Am Chem Soc 129:7313-7318; Setsukinai, K., *et al.*, 2003. J Biol Chem 278:3170-3175) y se contaron las células fluorescentes rojas obtenidas por el uso de la sonda. Para cuantificar las NET, se contó visualmente el número de estructuras tipo malla teñidas con Sytoxgreen (concentración final: 500 nM; reserva: 5 mM, 5  $\mu\text{l}$ , n.º de producto S7020) y TO-PRO-3 (concentración final: 1  $\mu\text{M}$ ; reserva: 1 mM; n.º de catálogo T3605 Invitrogen (marca registrada)) y se liberó al exterior de los neutrófilos, con referencia a A. K Gupta. FEBS letters 2010; 584:3193-3197, D J Novo. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44(4):827-34 [Figura 1-C]. Después de que se inyectó el reactivo, para permitir que las células vivas se observaran a 37 °C durante un largo periodo de tiempo se suministró oxígeno para secado, 100  $\mu\text{l}$  de aceite de silicona (AR200 Lote: BCBF0602V ALDRICH Chemistry (marca registrada) 85419) se inyectaron para formar una capa de aceite. El tiempo de observación se estableció entre 1 a 8 horas (4 horas en el caso en el que la duración del periodo de tiempo no se contara hasta que se obtuvo un estado de equilibrio de la formación de las NET) y las muestras en observación se mantuvieron a 37 °C por una caja mantenedora del calor proporcionada con un microscopio. El número de células que se observaron para liberar las NET se dividió por el número total de células en un campo microscópico y el valor obtenido se representó como la velocidad de formación de las NET. En el caso en el que los neutrófilos se estimularon solo con PMA, la formación de las NET alcanzó un pico en entre 2 a 3 horas, y alcanzó una meseta a la cuarta hora o partir de ahí. La formación de las NET alcanzó un pico en entre 4 a 5 horas, y alcanzó una meseta la sexta hora o partir de ahí porque la vida de los neutrófilos en la sangre fue de entre 10 a 12 horas. En el caso en el que los neutrófilos no se estimularon, el número de las NET formadas fue tan pequeño como entre 1/8 a 1/7 del número de las NET formadas en el caso en el que los neutrófilos se estimularon con PMA. En el caso en el que cada uno de los procesos descritos en "2. Método para pretratar los neutrófilos (inhibición de la formación de las NET) y método de inducción de NETosis (formación de las NET)" se realizaron antes de que los neutrófilos se estimularan con PMA, la tasa de las NET formadas en el momento cuando la formación de las NET alcanzó la meseta fue como sigue en comparación con el caso en el que los neutrófilos se estimularon solamente con PMA. En el caso en el que el proceso se realizó con lactoferrina bovina o lactoferrina derivada de neutrófilo humana (N.º de catálogo de Sigma SIGL6793) en una concentración de 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  o 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , la tasa de las NET formadas fue la mitad. En el caso en el que el proceso se realizó con lactoferrina bovina o lactoferrina derivada de neutrófilo humana (N.º de catálogo de Sigma SIGL6793) en una concentración de 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , la formación de las NET se suprimió a 1/4 (Figura 1-A y Figura 1-B). En el caso en el que el proceso se realizó con DPI, la formación de las NET se suprimió a 1/3. En el caso en el que el proceso se realizó con deferoxamina o trientina, la formación de las NET no se suprimió.

La observación por medio de un microscopio electrónico de barrido se realizó como sigue. Los granulocitos eosinófilos se esparcieron en una placa con cubierta de vidrio o de fondo de vidrio para cultivo celular en el número de  $1 \times 10^6$  y se pretrataron con 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de lactoferrina humana o no se pretrataron antes de la estimulación para las NET. Tres horas después, la muestra se inmovilizó previamente con 0,1 M de tampón de ácido fosfórico (pH 7,4) que contenía glutaraldehído al 2 % a 4 °C durante 1 hora. Después, la muestra se inmovilizó posteriormente con 0,1 M de tampón de ácido fosfórico (pH 7,4) que contenía tetróxido de osmio al 1 % a 4 °C durante 1 hora. Después de la inmovilización, la muestra se lavó con etanol al 60 %, con etanol al 70 %, con etanol al 80 % y con etanol al 95 % mientras se agitaba cuidadosamente durante entre 5 a 10 minutos, y se sumergió dos veces en etanol al 100 % durante entre 5 a 10 minutos para deshidratarla. Se realizó secado de punto crítico por medio de sustitución con acetato de isoamilo durante entre 10 a 15 minutos. La mezcla se cubrió con una capa de tetróxido de osmio sublimado por medio del uso de un dispositivo de recubrimiento de plasma de osmio (OPC80N, Filgen, Inc.) y se observó por medio de un microscopio electrónico de barrido (JSM-6320F, JEOL, Ltd.). En el caso en el que los neutrófilos no se estimularon, los neutrófilos se mantuvieron esféricos y no se reconoció fibra extracelular. En el caso en el que los neutrófilos se estimularon con PMA, las células se rompieron y se formaron muchos componentes de fibra. Por el contrario, se observó que los neutrófilos pretratados con lactoferrina formaban componentes de fibra de este tipo en haces. Esto indica que las fibras de las NET se condensaron por la lactoferrina [Figura 1-D].

### 4. Método para medir la concentración de ADN en el sobrenadante del cultivo

El sobrenadante del cultivo se recuperó y se centrifugó a 200 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo microscópico de centrifugadora. Se midió la cantidad de ADN por medio del uso de un reactivo de ensayo Picogreen dsDNA (P11496 Invitrogen) según el protocolo que lo acompaña. En el caso en el que el

pretratamiento se realizó con lactoferrina humana, la concentración de ADN en el sobrenadante del cultivo disminuyó de una manera dependiente de la concentración y se suprimió así la liberación de los ADN por las NET (Figura 1-D).

**[Ejemplo 2] Efecto inhibitorio de la lactoferrina después de la estimulación de los neutrófilos para formar las NET en sangre periférica de un voluntario sano**

1. Método de aislamiento de neutrófilos humanos

De un voluntario sano, se muestrearon entre 15 ml a 20 ml de sangre periférica para un ciclo del experimento con una jeringuilla que contenía EDTA (aguja: entre 18 a 22 G). Después del muestreo sanguíneo, 3 ml de medio de resolución mono-poli (N.º de catálogo DSBN100, DS Pharma Biomedical Co., Ltd.) contenido en un tubo cónico de 15 ml, y luego 3,5 ml de sangre entera se apilaron cuidadosamente en la capa inferior del medio de resolución mono-poli. El tubo cónico de 15 ml se centrifugó a temperatura ambiente (entre 15 a 30 °C) a 400 x g durante 20 minutos en una centrifugadora de tipo oscilante, y, luego, el tubo cónico se retiró cuidadosamente. Una capa de plasma marrón en la capa superior y una capa de linfocitos/monocitos inmediatamente por debajo de la capa de plasma marrón se retiraron por un aspirador o similar. Una capa transparente por debajo de la capa de linfocitos/monocitos se retiró tanto como fuera posible. Una capa rosa palo por debajo de la capa transparente se sacó con una pipeta de Pasteur. Para lavar los neutrófilos, la capa rosa palo se transfirió a un tubo de prueba que contenía disolución salina tamponada con fosfato (PBS(-): 137 mM de cloruro de sodio, 2,7 mM de cloruro de potasio, 8,1 mM de hidrogenofosfato de disodio dodecahidrato, 1,47 mM de dihidrogenofosfato de potasio). El tubo de prueba que contenía los neutrófilos se centrifugó a temperatura ambiente (entre 15 a 30 °C) a 200 x g durante 10 minutos. El tubo de prueba se sacó y el sobrenadante se descartó. Se añadió agua esterilizada a 4 °C a los neutrófilos en el tubo de prueba y se dejó en hielo durante 30 segundos para provocar hemólisis de los eritrocitos mezclados en la misma. Después de la hemólisis, se añadieron 45 ml de PBS(-) al tubo de prueba, y el tubo de prueba se centrifugó a 200 x g durante 10 minutos. El tubo de prueba se sacó y el sobrenadante se descartó. La precipitación se suspendió en DMEM de cultivo + albúmina de suero humano al 2 % (serum human albumin; n.º de producto A9080 Sigma + 4 mM de L-glutamina), y se dejó a 8 °C hasta inmediatamente antes de utilizarse. Los neutrófilos se separaron en el número de entre  $1 \times 10^6$ /ml a  $1 \times 10^7$ /ml. La pureza, que se obtuvo por recuento visual de muestra post-cytospin teñida con Giemsa, fue entre un 95 a un 98 %.

2. Inducción de NETosis de los neutrófilos (formación de las NET) y método para inhibir la misma

Aproximadamente 1 hora después del aislamiento de los neutrófilos descritos en "1. Método de aislamiento de neutrófilos humanos" en el Ejemplo 2, los neutrófilos se pretrataron. En un portaobjetos Microslide de 8 pocillos (N.º de catálogo ib. 80826 Ividi (marca registrada)), los neutrófilos se esparcieron en 400 µl de DMEM de cultivo + albúmina de suero humano al 2 % (serum human albumin; n.º de producto A9080 Sigma + 4 mM L-glutamina) a una velocidad de aproximadamente  $1,0 \times 10^5$  células/pocillo y se estimularon con PMA (concentración final: 25 nM, reserva: 10 mM en DMSO, n.º de producto de Sigma P8139). 30 minutos antes de la estimulación y cada hora o cada dos horas después de la estimulación, se añadieron 200 µg/ml de lactoferrina humana (reserva: 100 mg/ml, 200 µl; n.º de catálogo SIGL6793, Sigma) para realizar la inhibición [Figura 2].

4. Método para medir la concentración de ADN en el sobrenadante del cultivo

El sobrenadante del cultivo se recuperó y se centrifugó a 200 x g durante 10 minutos, y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo microscópico de centrifugadora. Se midió la cantidad de ADN por medio del uso de un reactivo de ensayo Picogreen dsDNA (P11496 Invitrogen) según el protocolo que lo acompaña. El tratamiento con lactoferrina humana una hora o dos horas después de la estimulación tuvo un efecto similar al pretratamiento previo, y la concentración de ADN en el sobrenadante del cultivo disminuyó, lo que dio lugar a la supresión de la liberación de los ADN por las NET [Figura 2].

**[Ejemplo 3] Efecto de mejora en la tasa de supervivencia/prolongación de la vida de ratones SCG/Kj modelo de vasculitis asociada a ANCA (animales modelo de enfermedades autoinmunitarias) por medio de administración oral de lactoferrina**

1. Producción de pienso para ratones que contiene LF y método de alimentación de los mismos

La producción de pienso estándar y el pienso que contiene lactoferrina se subcontrataron a Oriental Kobo Kabushiki Kaisha.

El pienso estándar se produjo como sigue. El pienso refinado estándar AIN-93M para investigación nutricional para ratones y ratas que se publicó en 1993 por el Instituto Americano de Nutrición (14 % de caseína, 0,18 % de L-cistina, 46,5692 % de almidón de maíz, 15,5 % de α-almidón de maíz, 10,0 % de sacarosa, 4,0 % de aceite de soja, 5,0 % de polvo de celulosa, 3,5 % de mezcla mineral de AIN-93M, 1,0 % de mezcla de vitaminas AIN-93, 0,25 % de tartrato de colina, 0,0008 % de tert-butilhidroquinona) se solidificó por medio de una granuladora. Se permitió a los ratones tomar el pienso libremente. El pienso que contenía lactoferrina se produjo como sigue. Se mezcló

lactoferrina bovina en AIN-93M de modo que tuviera una concentración final de un 2 % y la mezcla se solidificó por una granuladora. Se permitió a los ratones tomar el pienso libremente.

2. Efecto de mejora en la tasa de supervivencia/prolongación de la vida de ratones SCG/Kj (ratones formadores de glomerulonefritis con semilunas espontánea/Kinjoh)

5 Ratones SCG/Kj hembra de entre seis a siete semanas de edad que tenían glomerulonefritis con semilunas y vasculitis asociada a ANCA se compraron a BioResource Center, Tsukuba Institute, RIKEN, y se les permitió acostumbrarse durante entre 1 a 2 semanas antes de ser utilizados. Los ratones se dividieron en dos grupos. A partir de la octava semana de edad, un grupo de ratones se alimentaron con el pienso que contenía lactoferrina (n = 16) y el otro grupo de ratones se alimentaron con el pienso estándar (n = 16). La tasa de supervivencia/prolongación de la vida se evaluó por medio del uso del método de Kaplan-Meier. El grupo de ratones alimentados con el pienso estándar empezó a morir gradualmente a partir de la novena semana de edad. A la 18ª semana de edad, dos ratones estaban vivos. El grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina empezó a morir a partir de la 14ª semana de edad, y 11 ratones estaban vivos a la 18ª semana de edad, lo que demuestra un efecto de mejora significativo en la tasa de supervivencia/prolongación de la vida (diferencia estadísticamente significativa  $p = 0,0111$  [Figura 3].

**[Ejemplo 4] Influencia de la administración de lactoferrina en el título de anticuerpos del MPO-ANCA (anticuerpo frente al citoplasma de los neutrófilos específico de mieloperoxidasa) en la sangre y en el ADN en la sangre de ratones SCG/Kj modelo de vasculitis asociada a ANCA (animales modelo de enfermedades autoinmunitarias)**

20 1. Producción de pienso para ratones que contiene LF y método de alimentación de los mismos

La producción de pienso estándar y el pienso que contiene lactoferrina se subcontrataron a Oriental Kobo Kabushiki Kaisha.

25 El pienso estándar se produjo como sigue. El pienso refinado estándar AIN-93M para investigación nutricional para ratones y ratas que se publicó en 1993 por el Instituto Americano de Nutrición (14 % de caseína, 0,18 % de L-cistina, 46,5692 % de almidón de maíz, 15,5 % de  $\alpha$ -almidón de maíz, 10,0 % de sacarosa, 4,0 % de aceite de soja, 5,0 % de polvo de celulosa, 3,5 % de mezcla mineral de AIN-93M, 1,0 % de mezcla de vitaminas AIN-93, 0,25 % de tartrato de colina, 0,0008 % de tert-butilhidroquinona) se solidificó por medio de una granuladora. Se permitió a los ratones tomar el pienso libremente. El pienso que contenía lactoferrina se produjo como sigue. Se mezcló lactoferrina bovina en AIN-93M de modo que tuviera una concentración final de un 2 % y la mezcla se solidificó por una granuladora. Se permitió a los ratones tomar el pienso libremente.

30 2. Experimento eficaz del título de anticuerpos de MPO-ANCA y el ADN en la sangre de ratones SCG/Kj modelo de vasculitis asociada a ANCA

35 Ratones SCG/Kj hembra de al menos 6 semanas de edad se compraron a BioResource Center, Tsukuba Institute, RIKEN, y se utilizaron a partir de la octava semana de edad. Los ratones se dividieron en dos grupos. Un grupo de ratones se alimentaron con el pienso que contenía lactoferrina (n = 8) y el otro grupo de ratones se alimentaron con el pienso estándar (n = 8). Se provocó que los ratones SCG/Kj de entre 8 a 17 semanas de edad inhalaran dietiléter para anestesiarnos y se muestreó la sangre con heparina. La sangre muestreada se transfirió a un tubo microscópico de centrifugadora de 1,5 ml y se centrifugó a 4 °C a 1000 g durante 10 minutos. El sobrenadante se recuperó para utilizarlo como plasma.

40 3. Método para medir el título de anticuerpos del MPO-ANCA en la sangre

45 La medición del título de anticuerpos del MPO-ANCA se realizó por medio del uso de ELISA (Ishida-Okawara, A., *et al*, *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19:1708-1715) proporcionado por el profesor Kazuo SUZUKI, anteriormente en el Departamento de Inmunología y Control de Inflamaciones, Facultad de Medicina, Universidad de Chiba. La MPO recombinante de ratón se esparció en una concentración determinada en una placa de ELISA de 96 pocillos (TOYOSHIMA) y se dejó a 4 °C durante 16 horas. Después de que se dejó la MPO de esta manera, el sobrenadante se descartó y se pusieron entre 300 a 400  $\mu$ l de PBS(-) en cada pocillo para lavado (la operación se realizó entre 2 a 3 veces). Después del lavado, entre 300 a 400  $\mu$ l de disolución de PBS(-) al 1 % de albúmina de suero bovino se pusieron en cada pocillo, se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas y, luego, entre 300 a 400  $\mu$ l de PBS(-) se pusieron en cada pocillo para lavado (la operación se realizó entre 3 a 4 veces). Después de que se dejaron los pocillos de esta manera, suero de ratón diluido 50 veces con PBS(-) se puso en cada pocillo y se reaccionó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Después de la reacción, se pusieron entre 300 a 400  $\mu$ l de PBS(-) en cada pocillo para lavado (la operación se realizó entre 3 a 4 veces).

55 Después del lavado, anticuerpo IgG anti-ratón marcado con fosfatasa alcalina diluida 1000 veces con PBS(-) se puso en cada pocillo y se reaccionó a temperatura ambiente durante 2 horas. Después de la reacción, se pusieron entre 300 a 400  $\mu$ l de PBS(-) en cada pocillo para lavado (la operación se realizó entre 2 a 3 veces). Se pusieron

150 µl de 1 mg/ml de ácido para-nitrofenilfosfórico diluido con PBS(-) en cada pocillo y se reaccionaron durante entre 15 a 30 minutos. Una cantidad equivalente de 0,75 M de disolución acuosa de hidróxido de sodio se puso en cada pocillo para detener la reacción. La medición se realizó a una longitud de onda de 405 nm. Los resultados de la medición realizada por medio del uso de un absorciómetro fueron de modo que el título de anticuerpos medio de MPO-ANCA del grupo de ratones alimentados con el pienso estándar fue 0,283875 y el título de anticuerpos medio de MPO-ANCA del grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina fue 0,15625. Se reconoció que el título de anticuerpos del MPO-ANCA fue inferior con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina. Por lo tanto, se reconoció el efecto terapéutico (diferencia estadísticamente significativa  $p = 0,0221$ ) [Figura 4-A].

#### 10 4. Método para medir la concentración de ADN en el plasma

Se midió la cantidad de ADN en el plasma por medio del uso de un reactivo de ensayo Picogreen dsDNA (P11496 Invitrogen) según el protocolo que lo acompaña. El grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina tuvo una cantidad de ADN menor en la sangre que el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina. Esto indica que la liberación de los ADN por las NET se suprimió significativamente con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina ( $p = 0,046$ ) [Figura 4-B].

#### 15 5. Método para evaluar tejidos

Los ratones SCG/Kj se sometieron a eutanasia por medio de dislocación cervical y las muestras hepáticas se recogieron por medio de celiotomía. Se creó un bloque de parafina al 40 % y se formaron las secciones de tejido. Se realizó tinción tricrómica de Masson y se evaluó histológicamente la hemorragia subcutánea. Las secciones de tejido se sometieron a ósmosis con disolución de formalina al 10 % durante 24 horas o más para inmovilizarlas. La formalina se lavó con agua corriente durante 1 hora o más. Las secciones de tejido inmovilizadas se sumergieron en etanol al 60 % durante 1 hora, en etanol al 70 % durante 1 hora, en etanol al 80 % durante 1 hora, en etanol al 95 % durante 1 hora, en etanol al 100 % durante 1 hora 3 veces, en xileno durante 1 hora dos veces y en parafina (mantenida a 65 °C) durante 1 hora 3 veces. Entonces, el bloque de tejido se creó con una bandeja de inserción. El bloque de tejido se cortó por medio de un micrótopo en secciones de tejido que tiene cada una un espesor de entre 20 a 50 nm. Las secciones de tejido se pusieron en un portaobjetos de vidrio y se desparafinaron. La desparafinación se realizó como sigue. Las secciones de tejido que estaban completamente secas en el portaobjetos de vidrio se lavaron ligeramente con xileno durante 5 minutos 3 veces, con etanol al 100 % durante 1 minuto dos veces y con etanol al 95 %. Entonces, de manera similar, las secciones de tejido se lavaron ligeramente con etanol al 80 %, con etanol al 70%, con etanol al 60% y con agua corriente en este orden. Entonces, las secciones de tejido se sumergieron en agua de intercambio iónico y, entonces, se trataron con la tinción tricrómica de Masson. Entonces, las secciones de tejido se sumergieron en un líquido mordiente (disolución de ácido tricloroacético al 10 %, disolución de dicromato de potasio al 10 %) durante entre 10 a 15 minutos, se lavaron con agua corriente durante 5 minutos, se sumergieron en una disolución de hematoxilina de hierro (2 g de hematoxilina, 100 ml de etanol al 100 %, 0,5 g de nitrato férrico (III) 9H<sub>2</sub>O, 100 ml de disolución de ácido hidroclicórico al 25 %) durante 5 minutos y se lavaron ligeramente con agua. Se utilizó un ácido hidroclicórico al 1 % en etanol al 70 % para la separación. Las secciones de tejido se lavaron con agua durante 10 minutos para retirar el color y se sumergieron en agua de intercambio iónico. Las secciones de tejido se sumergieron en líquido I (90 ml de Biebrich Scarlet al 1 %, 10 ml de fucsina ácida al 1 %, 1 ml de ácido acético) durante entre 2 a 5 minutos y se lavaron ligeramente con agua. Las secciones de tejido se sumergieron en líquido II (5 g de ácido fosfomolibdico, 5 g de ácido fosfotúngstico, 200 ml de agua destilada) durante 30 minutos o más, se lavaron ligeramente con agua, se sumergieron en líquido III (2,5 g de azul de anilina, 2 ml de ácido acético, 100 ml de agua destilada) durante 5 minutos y se lavaron ligeramente con agua. Las secciones de tejido se sumergieron en ácido acético acuoso al 1 % durante 5 minutos y se lavaron rápidamente con agua. Las secciones de tejido se lavaron ligeramente con etanol al 60 %, con etanol al 70 %, con etanol al 80 % y con etanol al 95 % y, luego, se sumergieron en etanol al 100 % durante 5 minutos 3 veces. Las secciones de tejido se sumergieron en xileno durante 5 minutos 3 veces y se cubrieron con una cubierta de vidrio para su uso como agente montaje. El portaobjetos de vidrio se secó y luego se observó al microscopio. De manera separada, las secciones de tejido similares se tiñeron con hematoxilina-eosina. Después de desparafinarlas, las secciones de tejido se lavaron con agua corriente durante entre 3 a 5 minutos y se sumergieron en una disolución de hematoxilina de Mayer durante 5 minutos. Las secciones de tejido se lavaron con agua corriente a entre 25 a 37 °C durante entre 3 a 5 minutos y se sumergieron en una disolución de eosina durante 5 minutos. Las secciones de tejido se lavaron ligeramente con etanol al 60 %, con etanol al 70 %, con etanol al 80 % y con etanol al 95 % y, luego, se sumergieron en etanol al 100 % durante 5 minutos 3 veces. Las secciones de tejido se sumergieron en xileno durante 5 minutos 3 veces y se cubrieron con una cubierta de vidrio para su uso como agente montaje. El portaobjetos de vidrio se secó y luego se observó al microscopio. Con ambos métodos de tinción, el riñón del grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina fue más leve con respecto a fibrosis intersticial, infiltración celular inflamatoria (superior) y formación de drepanocitos (inferior) de los tejidos que el riñón de los ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina [4-C].

**[Ejemplo 5] Efecto terapéutico de la lactoferrina en los ratones modelo de reacción local de Shwartzman (RLS) (ratones modelo de enfermedades no autoinmunitarias)**

1. Producción de modelo 1 de RLS y su evaluación 1

5 Se permitió a ratones C57BL/6j con seis semanas de edad acostumbrarse durante 2 semanas y, a partir de la octava semana de edad, se alimentaron con el pienso que contenía lactoferrina o con pienso de control. A la 10ª semana de edad, se disolvió lipopolisacárido (LPS; Sigma) derivado de *Escherichia coli* en PBS(-) de modo que fuera  $\_ \text{mg/ml}$ . 100  $\mu\text{g}$  de la disolución resultante se inyectaron por vía subcutánea a cada ratón con una aguja de 30 G. El día en el que la inyección se realizó es estableció como el día 1. Se disolvió TNF- $\alpha$  recombinante de ratón (R&D Systems, Inc., n.º de producto 410-MT) en PBS(-) de modo que fuera 100  $\mu\text{g/ml}$ . 0,3  $\mu\text{g}$  de la disolución resultante se inyectaron por vía subcutánea a cada ratón en el mismo sitio. El día en el que la inyección se realizó es estableció como el día 2. En el día 3, se evaluó la hemorragia del sitio a simple vista. Con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina, el intervalo de hemorragia subcutánea se suprimió más significativamente que con el grupo de control de ratones alimentados con el pienso de control. La gravedad de la hemorragia subcutánea se observó a simple vista y se evaluó numéricamente con base en el intervalo de hemorragia y el estado de la necrosis como sigue: 0: ninguna; 1: leve; 2: moderada; 3: grave; 4 necrosis central [Tabla 2]. La gravedad del grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina fue significativamente inferior a la del grupo de control de ratones alimentados con el pienso de control ( $p > 0,0001$ ) [Figura 5-A, B].

20 Tabla 2. Puntuaciones de evaluación, por observación a simple vista, de la hemorragia subcutánea del grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina ( $n = 16$ ) y el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina ( $n = 15$ )

Observación a simple vista	Ninguna	Leve	Moderada	Grave	Necrosis central
Puntuación de hemorragia subcutánea	0	1	2	3	4

2. Método para evaluar los tejidos

25 Los ratones producidos en "1. Producción de modelo 1 de RLS y su evaluación 1" en el Ejemplo 5 se sometieron a eutanasia por medio de dislocación cervical y se tomaron muestras de piel. Se creó un bloque de parafina al 40 % y se formaron las secciones de tejido. Se realizó la tinción tricrómica de Masson y se evaluó histológicamente la hemorragia subcutánea. Las secciones de tejido se sometieron a ósmosis con disolución de formalina al 10 % durante 24 horas o más para inmovilizarlas. La formalina se lavó con agua corriente durante 1 hora o más. Las secciones de tejido inmovilizadas se sumergieron en etanol al 60 % durante 1 hora, en etanol al 70 % durante 1 hora, en etanol al 80 % durante 1 hora, en etanol al 95 % durante 1 hora, en etanol al 100 % durante 1 hora 3 veces, en xileno durante 1 hora dos veces y en parafina (mantenida a 65 °C) durante 1 hora 3 veces. Entonces, el bloque de tejido se creó con una bandeja de inserción. El bloque de tejido se cortó por medio de un micrótopo en secciones de tejido que tiene cada una un espesor de entre 20 a 50  $\mu\text{m}$ . Las secciones de tejido se pusieron en un portaobjetos de vidrio y se desparafinaron. La desparafinación se realizó como sigue. Las secciones de tejido que estaban completamente secas en el portaobjetos de vidrio se lavaron ligeramente con xileno durante 5 minutos 3 veces, con etanol al 100 % durante 1 minuto dos veces y con etanol al 95 %. Entonces, de manera similar, las secciones de tejido se lavaron ligeramente con etanol al 80 %, con etanol al 70%, con etanol al 60% y con agua corriente en este orden. Entonces, las secciones de tejido se sumergieron en agua de intercambio iónico y, entonces, se trataron con la tinción tricrómica de Masson. Entonces, las secciones de tejido se sumergieron en una disolución fijadora de tinción (disolución de ácido tricloroacético al 10 %, disolución de dicromato de potasio al 10 %) durante entre 10 a 15 minutos, se lavaron con agua corriente durante 5 minutos, se sumergieron en una disolución de hematoxilina de hierro (2 g de hematoxilina, 100 ml de etanol al 100 %, 0,5 g de nitrato férrico (III)  $9\text{H}_2\text{O}$ , 100 ml de disolución de ácido hidroclicórico al 25 %) durante 5 minutos y se lavaron ligeramente con agua. Se utilizó una disolución de ácido hidroclicórico al 1 % en etanol al 70 % para la separación. Las secciones de tejido se lavaron con agua durante 10 minutos para retirar el color y, luego, se sumergieron en agua de intercambio iónico. Las secciones de tejido se sumergieron en líquido I (90 ml de Biebrich Scarlet al 1 %, 10 ml de fucsina ácida al 1 %, 1 ml de ácido acético) durante entre 2 a 5 minutos y se lavaron ligeramente con agua. Las secciones de tejido se sumergieron en líquido II (5 g de ácido fosfomolibdico, 5 g de ácido fosfotúngstico, 200 ml de agua destilada) durante 30 minutos o más, se lavaron ligeramente con agua, se sumergieron en líquido III (2,5 g de azul de anilina, 2 ml de ácido acético, 100 ml de agua destilada) durante 5 minutos y se lavaron ligeramente con agua. Las secciones de tejido se sumergieron en ácido acético acuoso al 1 % durante 5 minutos y se lavaron rápidamente con agua. Las secciones de tejido se lavaron ligeramente con etanol al 60 %, con etanol al 70 %, con etanol al 80 % y con etanol al 95 % y, luego, se sumergieron en etanol al 100 % durante 5 minutos 3 veces. Las secciones de tejido se sumergieron en xileno durante 5 minutos 3 veces y se cubrieron con una cubierta de vidrio para su uso como agente montaje. El portaobjetos de vidrio se secó y luego se observó al microscopio. De manera separada, las secciones de tejido

similares se tiñeron con hematoxilina-eosina. Después de desparafinarlas, las secciones de tejido se lavaron con agua corriente durante entre 3 a 5 minutos y se sumergieron en una disolución de hematoxilina de Mayer durante 5 minutos. Las secciones de tejido se lavaron con agua corriente a entre 25 a 37 °C durante entre 3 a 5 minutos y se sumergieron en una disolución de eosina durante 5 minutos. Las secciones de tejido se lavaron ligeramente con etanol al 60 %, con etanol al 70 %, con etanol al 80 % y con etanol al 95 % y, luego, se sumergieron en etanol al 100 % durante 5 minutos 3 veces. Las secciones de tejido se sumergieron en xileno durante 5 minutos 3 veces y se cubrieron con una cubierta de vidrio para su uso como agente montaje. El portaobjetos de vidrio se secó y luego se observó al microscopio.

En ambos métodos de tinción, las secciones de tejido se trataron finalmente con tinción de esterasa específica (cloroacetato esterasa) en las que solo esterasa en gránulos se tiñó en secciones de tejido de este tipo. Después de desparafinarlas, las secciones de tejido se lavaron con agua corriente durante entre 3 a 5 minutos y se lavaron con agua destilada 3 veces. Las secciones de tejido se secaron a temperatura ambiente durante entre 10 a 30 minutos y se sumergieron en una disolución de reacción de cloroacetato esterasa durante entre 15 a 30 minutos. Las secciones de tejido se lavaron con agua corriente durante entre 3 a 5 minutos y se sumergieron en una disolución de hematoxilina de Mayer durante 5 minutos. Las secciones de tejido se lavaron con agua corriente a entre 25 a 37 °C durante entre 3 a 5 minutos y se sumergieron en una disolución de eosina durante 5 minutos. Las secciones de tejido se lavaron ligeramente con etanol al 60 %, etanol al 70 %, etanol al 80 % y etanol al 95 % y, luego, se sumergieron en etanol al 100 % durante 5 minutos 3 veces. Las secciones de tejido se sumergieron en xileno durante 5 minutos 3 veces y se cubrieron con una cubierta de vidrio para su uso como agente montaje. El portaobjetos de vidrio se secó y luego se observó al microscopio. Con el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina, la hemorragia subcutánea en la parte superior de la capa muscular y la formación de trombos en los vasos sanguíneos fueron significativas. Por el contrario, con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina, la hemorragia subcutánea y la formación de trombos fueron leves. Se observó que el pienso que contenía lactoferrina suprimía la infiltración neutrofílica en los tejidos subcutáneos [Figura 5-C].

### 3. Producción de modelo 2 de RLS y su evaluación 2

Una bolsa de aire se creó por vía subcutánea en la parte posterior de cada ratón para inducir RLS y se midió la concentración de ADN en la bolsa de aire y se observaron los neutrófilos. Primero, 5 ml de aire se inyectó por vía subcutánea vigorosamente en la parte posterior con una jeringuilla de 5 ml y una aguja de 30 G. Tres días después, 100 µg de LPS se inyectaron en la bolsa de aire en cada ratón. Veinticuatro horas después, 0,3 µg de TNF-α se inyectaron en la bolsa de aire de cada ratón, y 6 horas después, la bolsa de aire se lavó con 2 ml de PBS(-) esterilizada y se recuperó.

### 4. Medición de la concentración de ADN en la bolsa de aire (líquido de lavado)

El líquido de lavado muestreado se transfirió a un tubo microscópico de centrifugadora de 1,5 ml y se centrifugó a temperatura ambiente a 6000 g durante 5 minutos. Se midió la cantidad de ADN en el sobrenadante por medio del uso de un reactivo de ensayo Picogreen dsDNA según el protocolo que lo acompaña. El grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina tuvo una cantidad de ADN menor en la sangre que el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina. Esto indica que la liberación de los ADN por las NET se suprimió significativamente con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina ( $p = 0,0015$ ) [Figura 6-A].

### 5. Observación de la formación de las NET de neutrófilos

Se inmovilizaron los neutrófilos en el líquido de lavado en un portaobjetos de vidrio por medio del uso de Cytospin 2 (Shandon), se tiñeron con 5 µM de DRAQ5 y se observaron al microscopio. El número de los neutrófilos con los que se observó la formación de las NET fue más pequeño con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina que con el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina [Figura 6-B].

### **[Ejemplo 6] Efecto de mejora en la tasa de supervivencia/prolongación de la vida de ratones modelo de trombos inducidos por histona (coagulación intravascular diseminada (CID)) por medio de inyección intravenosa de lactoferrina en las colas de estos**

80 mg/kg de histona (Sigma, H9250) disueltos en disolución salina fisiológica y dejados a 37 °C se administraron por vía intravenosa en las colas de ratones C57BL/6 macho con 11 semanas de edad para crear los ratones modelo de CID (Tobias A. *et al.*, blood, 29 de septiembre de 2011, vol. 118, n.º 13, pp. 3708-3714). Como pretratamiento, 20 mg/kg de lactoferrina bovina se administraron por vía intravenosa en las colas de los ratones y, 30 minutos después, la histona se administró por vía intravenosa a las colas de los ratones ( $n = 8$ ). Esos ratones se marcaron como grupo de ratones proporcionados con terapia con lactoferrina. En las colas de diferentes ratones ( $n = 8$ ), se les administraron por vía intravenosa 100 µl de disolución salina fisiológica que no contenía lactoferrina bovina y, 30 minutos después, se administró histona por vía intravenosa. Esos ratones se marcaron como grupo de control de

ratones proporcionados sin terapia. La tasa de supervivencia/prolongación de la vida después de la administración de histona se evaluó por medio del uso del método de Kaplan-Meier. El grupo de control de ratones proporcionados sin terapia empezó a morir gradualmente aproximadamente 20 minutos después de la administración de histona. Dos días después, dos ratones estaban vivos y, 4 días después, un ratón estaba vivo. Por el contrario, los 8 ratones en el grupo proporcionado con terapia con lactoferrina bovina estaban todos vivos incluso 4 días después. Se observó el efecto de mejora significativo en la tasa de supervivencia/prolongación de la vida (Figura 7; diferencia estadísticamente significativa  $p=0,0005$ ).

**[Ejemplo 7] Efecto de hemostasia en ratones modelo de trombos inducidos por histona (duración del periodo de tiempo de la hemorragia) proporcionados por medio de inyección intravenosa de lactoferrina en las colas de los mismos**

Como pretratamiento, 20 mg/kg de lactoferrina bovina se inyectaron por vía intravenosa en las colas de ratones C57BL/6 macho con 11 semanas de edad y, 30 minutos después, 60 mg/kg de histona (Sigma, H9250) disuelta en disolución salina fisiológica y dejada a 37 °C se administraron por vía intravenosa en las colas de los ratones para comprobar el efecto de la hemostasia en los ratones modelo de CID ( $n = 5$ ) (Tobias A, *et al.*, Blood, 2011; 118: pp. 3708-3714) (se adoptó un 75 % de la cantidad de histona utilizada para mejorar la tasa de supervivencia/prolongación de la vida). Para los ratones del grupo de control sin terapia ( $n = 5$ ), 100  $\mu$ l de disolución salina fisiológica que no contenía lactoferrina bovina se administró por vía intravenosa en las colas 30 minutos antes de la administración de histona. Para los ratones de control sanos ( $n = 5$ ), se administró disolución salina fisiológica, en lugar de lactoferrina bovina utilizada para el pretratamiento y también en lugar de histona. Veinte minutos después de la administración de histona, la vena de la cola de cada ratón se cortó en una posición a 3 mm del extremo y se sumergió en disolución salina fisiológica a 37 °C. Cada 30 segundos, la sangre se quitó con un papel de filtro y se midió la duración del periodo de tiempo de la hemorragia (en el caso en el que la duración del periodo de tiempo de la hemorragia fue 15 minutos o más, la duración del periodo de tiempo de la hemorragia se registró como 15 minutos y se realizó un tratamiento para la hemostasia) (Fuchs TA, *et al.*, Blood, 2011; 118:3708-3714). Se observó que los ratones del grupo de control proporcionados sin terapia sangraban durante un periodo de tiempo significativamente largo (Figura 8; grupo de control de ratones proporcionados sin terapia frente a grupo de control de ratones sanos;  $p < 0,0001$ ). Por el contrario, con el grupo de ratones proporcionados con terapia con lactoferrina bovina, la duración del periodo de tiempo de la hemorragia fue significativamente más corta (Figura 8; grupo de ratones proporcionados con terapia con lactoferrina bovina frente a grupo de control de ratones proporcionados sin terapia;  $p < 0,0001$ ).

**[Ejemplo 8] Efecto supresor de la lactoferrina en la hemorragia en tejidos pulmonares de ratones modelo de trombos inducidos por histona**

Como pretratamiento, 20 mg/kg de lactoferrina bovina se inyectaron por vía intravenosa en las colas de ratones C57BL/6 macho con 11 semanas de edad y, 30 minutos después, 80 mg/kg de histona (Sigma, H9250) disuelta en disolución salina fisiológica y dejada a 37 °C se administraron por vía intravenosa en las colas de los ratones para crear los ratones modelo de CID ( $n = 4$ ) (Tobias A., *et al.*, Blood, 29 de septiembre de 2011; vol. 118: n.º 13, pp. 3708-3714). Para los ratones del grupo de control sin terapia ( $n = 4$ ), 100  $\mu$ l de disolución salina fisiológica que no contenía lactoferrina bovina se administró por vía intravenosa en las colas 30 minutos antes de que se administrara histona por vía intravenosa. Para los ratones del grupo de control sanos ( $n = 4$ ), se administró disolución salina fisiológica, en lugar de lactoferrina bovina utilizada para el pretratamiento y también en lugar de histona. Diez minutos después de la administración de histona (segunda administración de disolución salina fisiológica), los ratones se sometieron a eutanasia. Los tejidos pulmonares se extrajeron e inmovilizaron por medio del uso de paraformaldehído al 4 %. Con el grupo de ratones proporcionados con terapia con lactoferrina bovina, no se observó que los tejidos sangraran casi nada, a diferencia del grupo de control de ratones proporcionados sin terapia; y los tejidos pulmonares del grupo de ratones proporcionados con terapia con lactoferrina bovina tuvieron un color similar al del grupo de control sano de ratones (Figura 9). Con el grupo de control de ratones proporcionados sin terapia, los tejidos pulmonares fueron más rojizos y se observó que sangraban (Figura 9).

**[Ejemplo 9] Experimento para demostrar que la inhibición en la formación de las NET es una actividad específica a la lactoferrina**

Se ha documentado que el fragmento N-terminal de la lactoferrina está cargado positivamente y, por lo tanto, se puede unir a una molécula de ADN cargada negativamente (He J, y Furmanski P., Sequence specificity and transcriptional activation in the binding of lactoferrin to DNA. Nature. 1995;373(6516):721-4). Por lo tanto, se realizó un experimento para investigar si las proteínas que son de diferentes tipos de lactoferrina pero que eran similares a la lactoferrina en peso molecular (PM) y en el punto isoeléctrico (pI) inhibirían cada una la formación de las NET. Para el experimento, se utilizaron las siguientes proteínas.

Tabla 3

Nombre de la proteína (bovina)	Peso molecular (kDa)	Punto isoeléctrico
Lactoferrina	84,0	8,2-8,9
Angiogenina	14,6	9,5
Lactoperoxidasa (LPO)	80,6	8,0

5 La angiogenina se conoce como factor de angiogénesis tumoral (Strydom DJ, Fett JW, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF y Vallee BL. La secuencia de aminoácidos de la angiogenina derivada de tumor humana. *Biochemistry*. 1985; 24:5486-94). La lactoperoxidasa es hemo peroxidasa contenida en la leche de los mamíferos en una alta concentración similar a la lactoferrina (Sharma S, Singh AK, Kaushik S, Sinha M, Singh RP, Sharma P, Sirohi H, Kaur P y Singh TP., Lactoperoxidase: structural insights into the function, ligand binding and inhibition. *Int J Biochem Mol Biol*. 2013; 4:108-28).

#### 10 1. Preparación de lactoperoxidasa, angiogenina y lactoferrina

Se disolvió proteína bruta aislada de leche bovina en 10 mM de tampón de fosfato de sodio (pH 7,0) y la disolución obtenida se cargó en una columna de SP-Sepharose (GE Healthcare Life Sciences) equilibrada con el tampón (caudal: 3,0 ml/min). La proteína unida a la columna se lavó con el tampón y se eluyeron lactoperoxidasa, angiogenina y lactoferrina por medio de un gradiente de concentración lineal de cloruro de sodio en el tampón (entre 0,3 a 1,0 M).

#### 15 2. Inhibición de la formación de las NET

La inhibición de la formación de las NET se realizó por medio de medición de la concentración de ADN en el sobrenadante del cultivo de manera similar a la del Ejemplo 2. El experimento se realizó por triplicado en tres sistemas independientes (n = 3).

#### 20 3. Resultados

Ni la lactoperoxidasa ni la angiogenina inhibieron la formación de las NET (FIG. 10;  $p < 0,01$ ). Esto indica que la inhibición de la formación de las NET por la lactoferrina no es provocada solamente por la carga positiva de las moléculas de lactoferrina, sino que es provocada por la actividad específica a la lactoferrina.

[Descripción de los datos presentados en los dibujos]

25 La Figura 1 muestra el efecto inhibitorio de la lactoferrina añadida 30 minutos antes de que los neutrófilos en la sangre periférica de voluntarios sanos se estimularan en la formación de las NET. (A) En el caso en el que el pretratamiento se realizó con 2, 20 o 200  $\mu\text{g/ml}$  de lactoferrina bovina (representada como "bLF" en todas las figuras), el efecto inhibitorio en la formación de las NET se observó en su manera dependiente de concentración. En el caso en el que el pretratamiento se realizó con 20  $\mu\text{g/ml}$  de lactoferrina bovina, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0,01$ . En el caso en el que el pretratamiento se realizó con 200  $\mu\text{g/ml}$  de lactoferrina bovina, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0,001$ . DPI a 10  $\mu\text{M}$  se utilizó como control positivo. (B) En el caso en el que el pretratamiento se realizó con 2, 20 o 200  $\mu\text{g/ml}$  de lactoferrina humana (representada como "hLF" en todas las figuras), el efecto inhibitorio en la formación de las NET se observó de manera similar a la lactoferrina bovina. Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,001$ . (C) La Figura 1-C muestra imágenes del pretratamiento realizado con 200  $\mu\text{g/ml}$  de lactoferrina humana. Los ADN extracelulares se tiñeron con 500 nM de verde Sytox. Se observó que la liberación de los ADN al exterior de las células se inhibe con el pretratamiento con lactoferrina humana. (D) El pretratamiento se realizó con lactoferrina humana y se midió la concentración de ADN en el sobrenadante del cultivo 3 horas después de que los neutrófilos se estimularan. La concentración de los ADN secretados al exterior de las células por medio de la estimulación realizada para formar las NET se suprimió de una manera dependiente de la concentración de lactoferrina bovina. En el caso en el que el pretratamiento se realizó con 20  $\mu\text{g/ml}$  de lactoferrina humana, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0,05$ . En el caso en el que el pretratamiento se realizó con 200  $\mu\text{g/ml}$  de lactoferrina humana, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0,001$ . (E) El pretratamiento se realizó con 200  $\mu\text{g/ml}$  de lactoferrina humana y se analizaron los neutrófilos con un microscopio electrónico de barrido 3 horas después de que los neutrófilos se estimularan para formar las NET. La Figura 1-E muestra imágenes obtenidas por medio del microscopio electrónico de barrido. En el caso en el que los neutrófilos no se estimularon,

los neutrófilos se mantuvieron esféricos y no se observó la liberación de los ADN. En el caso en el que los neutrófilos se estimularon con PMA, las células se rompieron y se formaron muchos componentes de fibra. Por el contrario, se observó que los neutrófilos pretratados con lactoferrina humana formaban componentes de fibra de este tipo en haces. Esto indica que las fibras de las NET se condensaron.

5 La Figura 2 muestra el efecto inhibitorio de la lactoferrina en la formación de las NET añadida después de que los neutrófilos en la sangre periférica de voluntarios sanos se estimularan para formar las NET. Los ratones pretratados con 200 µg/ml de lactoferrina humana 30 minutos antes de que los neutrófilos se estimularan se utilizaron como grupo de control de ratones. Cuando se añadieron 200 µg/ml de lactoferrina una o 2 horas después de que los neutrófilos se estimularan para formar las NET, la formación de las NET se inhibió. (Se midió la concentración de ADN en el sobrenadante del cultivo). En el caso en el que la lactoferrina se añadió 1 hora después de que los neutrófilos se estimularan, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0,001$ . En el caso en el que la lactoferrina se añadió 2 horas después de que los neutrófilos se estimularan, se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa de  $p < 0,001$ .

15 La Figura 3 muestra la influencia de la lactoferrina en la tasa de supervivencia de ratones SCG/Kj modelo de ANCA, que son ratones modelo de enfermedades autoinmunitarias. A la octava semana de edad, los ratones se dividieron en un grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina ( $n = 16$ ) y un grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina bovina ( $n = 16$ ). La Figura 3 muestra las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier hasta la 18ª semana de edad. El grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina exhibieron una mejora significativa en la tasa de supervivencia. Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ .

La Figura 4 muestra la influencia de la administración de lactoferrina en el título de anticuerpos del MPO-ANCA (anticuerpo frente al citoplasma de los neutrófilos específico de mieloperoxidasa) en la sangre, en el ADN de la sangre y en los tejidos renales de los ratones SCG/Kj. (A) Los ratones SCG/Kj, concretamente, animales modelo para vasculitis asociada a ANCA, que es una enfermedad provocada por la formación de las NET, produce MPO-ANCA relacionado con la aparición de la enfermedad. El título de anticuerpos del MPO-ANCA de los ratones SCG/kJ con 12 semanas de edad se midió por medio de ELISA. Con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina ( $n = 8$ ), el valor fue menor que con el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina ( $n = 8$ ). Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ . (B) Se evaluó el contenido de ADN en la sangre que contenía ADN liberados de los neutrófilos por la formación de las NET. La concentración de ADN en el plasma de ratones SCG/Kj con 13 semanas de edad fue menor con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina ( $n = 8$ ) que con el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina ( $n = 7$ ). Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,05$ . (C) La influencia de lactoferrina bovina en el riñón de los ratones SCG/Kj se evaluó por medio del uso de la tinción tricrómica de Masson. El riñón del grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina fue más leve con respecto a fibrosis intersticial, infiltración celular inflamatoria (superior) y formación de drepanocitos (inferior) de los tejidos que el riñón de los ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina bovina.

La Figura 5 muestra los resultados de una prueba con respecto a la influencia, en tejidos subcutáneos, de administrar lactoferrina a los ratones del modelo 1 de RLS, que son ratones modelo de enfermedades no autoinmunitarias. (A) Se dividieron ratones C57BL/6j con ocho semanas de edad en un grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina ( $n = 16$ ) y un grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina bovina ( $n = 15$ ). Dos semanas después, concretamente, a la 10ª semana de edad, LPS (100 µg/ratón) y TNF $\alpha$  (0,3 µg/ratón) se administraron por vía subcutánea a los ratones para inducir rubefacción (hemorragia subcutánea). La Figura 5-A muestra imágenes de una parte de ratones de este tipo. Con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina, la rubefacción se suprimió significativamente en comparación con el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina bovina. (B) La Figura 5-B es un gráfico que muestra los resultados de la cuantización realizada por medio del uso de las puntuaciones de evaluación en la hemorragia subcutánea mostrada en la Tabla 2. Con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina, las puntuaciones de hemorragia subcutánea fueron menores que con el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina bovina. Se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,001$ . (C) La Figura 5-C muestra los resultados de la evaluación, en los tejidos cutáneos de los ratones en los que se indujo RLS, realizada por medio del uso de tinción tricrómica de Masson y la tinción de esterasa. Con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina, la hemorragia subcutánea y la formación de trombos se suprimieron. Se mostró por medio de tinción de esterasa que la infiltración de neutrófilos se suprimió con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina.

55 La Figura 6 muestra la influencia, en la bolsa de aire proporcionada por vía subcutánea en la parte posterior, de administrar lactoferrina bovina a los ratones del modelo 2 de RLS, que son ratones modelo de enfermedades no autoinmunitarias. (A) Una bolsa de aire se creó por vía subcutánea en la parte posterior de cada uno de los ratones y los ratones se dividieron en un grupo de ratones sin inflamación ni irritación ( $n = 12$ ; 100 µg/ratón de LPS; 0,3 µg/ratón de TNF- $\alpha$ ), un grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina ( $n = 12$ ; 100 µg/ratón de LPS; 0,3 µg/ratón de TNF- $\alpha$ ) y un grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía

5 lactoferrina (n = 12). El interior de las bolsas de aire se lavó y se midió la concentración de ADN en el líquido de lavado. Con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina, la concentración de ADN en el líquido de lavado fue baja y similar a la del grupo de ratones sin inflamación ni irritación, y se obtuvo una diferencia estadísticamente significativa  $p < 0,01$ . (B) La Figura 6-B muestra los ADN, teñidos con DRAQ5, en los neutrófilos en el líquido de lavado utilizado para lavar las bolsas de aire. Con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina, apenas se observó la liberación de los ADN, a diferencia de con el grupo de ratones alimentados con el pienso que no contenía lactoferrina bovina. Esto indica que la formación de las NET se inhibe con el grupo de ratones alimentados con el pienso que contenía lactoferrina bovina.

10 La Figura 7 muestra los resultados de la evaluación sobre la tasa de supervivencia/prolongación de la vida después de la administración de histona. El grupo de control de ratones sin terapia empezó a morir gradualmente aproximadamente 20 minutos después de la administración de histona. Dos días después, dos ratones estaban vivos y, 4 días después, un ratón estaba vivo. Por el contrario, los 8 ratones en el grupo con terapia con lactoferrina bovina estaban todos vivos incluso 4 días después. Se observó el efecto de mejora significativo en la tasa de supervivencia/prolongación de la vida (diferencia estadísticamente significativa  $p=0,0005$ ).

15 La Figura 8 muestra el efecto de lactoferrina, que se inyectó en la vena de la cola, en la hemostasia de ratones modelo de trombos inducidos por histona. Con el grupo de control sin terapia, se observó una duración del periodo de tiempo de la hemorragia significativamente larga (grupo de control de ratones sin terapia frente a grupo de control de ratones sanos;  $p < 0,0001$ ). Con el grupo de ratones con terapia con lactoferrina bovina, la duración del periodo de tiempo de la hemorragia fue significativamente más corta (grupo de ratones con terapia con lactoferrina bovina frente a grupo de control de ratones sin terapia;  $p < 0,0001$ ).

20 La Figura 9 muestra el efecto supresor de la lactoferrina en la hemorragia en los tejidos pulmonares de los ratones modelo de trombos inducidos por histona. Con el grupo de ratones tratados con lactoferrina bovina, no se observó casi hemorragia de los tejidos, a diferencia del grupo de control sin terapia. Los tejidos pulmonares del grupo de ratones tratados con lactoferrina bovina mostraron un color similar al del grupo de control sano de ratones. Con el grupo de control de ratones, los tejidos pulmonares fueron más rojizos y se observó que sangraban.

25 La Figura 10 muestra que la inhibición de la formación de las NET es una actividad específica a la lactoferrina. La formación de las NET se inhibió solo por lactoferrina. Ni la lactoperoxidasa ni la angiogenina inhibieron la formación de las NET (FIG. 10; n = 3;  $p < 0,01$ ).

#### Aplicabilidad industrial

30 La presente descripción proporciona un método terapéutico con pocos efectos secundarios para una enfermedad provocada por la formación de trampas extracelulares de leucocitos. El método tiene pocos efectos secundarios y, por lo tanto, tiene la ventaja de ser utilizable de manera segura por una amplia gama de pacientes y personas que tienen la posibilidad de convertirse en pacientes.

35 Se ha confirmado con ratones modelo de enfermedades no autoinmunitarias que la lactoferrina tiene la capacidad de inhibir la formación de las trampas extracelulares de leucocitos. Por lo tanto, según la presente descripción, la lactoferrina exhibe una acción terapéutica por medio de un mecanismo completamente innovador que es diferente a cualquier mecanismo de acciones documentado en el pasado (Documento patente 1).

#### Listado de secuencias

#### Listado de secuencias

40 <110> NRL Pharma Universidad de Tokio  
 <120> Inhibidor de trampas extracelulares de leucocitos  
 <130> G1004WO  
 <150> JP 2013-081243  
 <151> 09-04-2019  
 45 <160> 5  
 <170> PatentIn versión 3,5  
 <210> 1  
 <211> 666

ES 2 738 287 T3

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

<400> 1

Met Arg Lys Val Arg Gly Pro Pro Val Ser Cys Ile Lys Arg Asp Ser  
1                    5                    10                    15

Pro Ile Gln Cys Ile Gln Ala Ile Ala Glu Asn Arg Ala Asp Ala Val  
                  20                    25                    30

Thr Leu Asp Gly Gly Phe Ile Tyr Glu Ala Gly Leu Ala Pro Tyr Lys  
                  35                    40                    45

Leu Arg Pro Val Ala Ala Glu Val Tyr Gly Thr Glu Arg Gln Pro Arg  
                  50                    55                    60

5

ES 2 738 287 T3

Thr His Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Gly Ser Phe Gln  
65 70 75 80

Leu Asn Glu Leu Gln Gly Leu Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Arg Arg  
85 90 95

Thr Ala Gly Trp Asn Val Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Phe Leu Asn  
100 105 110

Trp Thr Gly Pro Pro Glu Pro Ile Glu Ala Ala Val Ala Arg Phe Phe  
115 120 125

Ser Ala Ser Cys Val Pro Gly Ala Asp Lys Gly Gln Phe Pro Asn Leu  
130 135 140

Cys Arg Leu Cys Ala Gly Thr Gly Glu Asn Lys Cys Ala Phe Ser Ser  
145 150 155 160

Gln Glu Pro Tyr Phe Ser Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Arg Asp  
165 170 175

Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Ile Arg Glu Ser Thr Val Phe Glu Asp  
180 185 190

Leu Ser Asp Glu Ala Glu Arg Asp Glu Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp  
195 200 205

Asn Thr Arg Lys Pro Val Asp Lys Phe Lys Asp Cys His Leu Ala Arg

ES 2 738 287 T3

210                      215                      220  
Val Pro Ser His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asn Gly Lys Glu Asp  
225                      230                      235                      240  
  
Ala Ile Trp Asn Leu Leu Arg Gln Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asp  
                         245                      250                      255  
  
Lys Ser Pro Lys Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Ser Gly Gln Lys Asp  
                         260                      265                      270  
  
Leu Leu Phe Lys Asp Ser Ala Ile Gly Phe Ser Arg Val Pro Pro Arg  
                         275                      280                      285  
  
Ile Asp Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Ser Gly Tyr Phe Thr Ala Ile Gln  
                         290                      295                      300  
  
Asn Leu Arg Lys Ser Glu Glu Glu Val Ala Ala Arg Arg Ala Arg Val  
305                      310                      315                      320  
  
Val Trp Cys Ala Val Gly Glu Gln Glu Leu Arg Lys Cys Asn Gln Trp  
                         325                      330                      335  
  
Ser Gly Leu Ser Glu Gly Ser Val Thr Cys Ser Ser Ala Ser Thr Thr  
                         340                      345                      350  
  
Glu Asp Cys Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Met Ser  
                         355                      360                      365

ES 2 738 287 T3

Leu Asp Gly Gly Tyr Val Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro  
 370 375 380

Val Leu Ala Glu Asn Tyr Lys Ser Gln Gln Ser Ser Asp Pro Asp Pro  
 385 390 395 400

Asn Cys Val Asp Arg Pro Val Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val  
 405 410 415

Arg Arg Ser Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys Gly Lys Lys  
 420 425 430

Ser Cys His Thr Ala Val Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met  
 435 440 445

Gly Leu Leu Phe Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Glu Tyr Phe  
 450 455 460

Ser Gln Ser Cys Ala Pro Gly Ser Asp Pro Arg Ser Asn Leu Cys Ala  
 465 470 475 480

Leu Cys Ile Gly Asp Glu Gln Gly Glu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser  
 485 490 495

Asn Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu  
 500 505 510

Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn

ES 2 738 287 T3

515

520

525

Thr Asp Gly Asn Asn Asn Glu Ala Trp Ala Lys Asp Leu Lys Leu Ala  
 530 535 540

Asp Phe Ala Leu Leu Cys Leu Asp Gly Lys Arg Lys Pro Val Thr Glu  
 545 550 555 560

Ala Arg Ser Cys His Leu Ala Met Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser  
 565 570 575

Arg Met Asp Lys Val Glu Arg Leu Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln  
 580 585 590

Ala Lys Phe Gly Arg Asn Gly Ser Asp Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu  
 595 600 605

Phe Gln Ser Glu Thr Lys Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys  
 610 615 620

Leu Ala Arg Leu His Gly Lys Thr Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Pro  
 625 630 635 640

Gln Tyr Val Ala Gly Ile Thr Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro  
 645 650 655

Leu Leu Glu Ala Cys Glu Phe Leu Arg Lys  
 660 665

<210> 2

<211> 708

<212> PRT

5 <213> *Bos taurus*

<400> 2

ES 2 738 287 T3

Met Lys Leu Phe Val Pro Ala Leu Leu Ser Leu Gly Ala Leu Gly Leu  
1                    5                    10                    15

Cys Leu Ala Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Thr Ile Ser Gln  
                  20                    25                    30

Pro Glu Trp Phe Lys Cys Arg Arg Trp Gln Trp Arg Met Lys Lys Leu  
                  35                    40                    45

Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Ala Phe Ala Leu Glu Cys  
                  50                    55                    60

Ile Arg Ala Ile Ala Glu Lys Lys Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Gly  
65                    70                    75                    80

Gly Met Val Phe Glu Ala Gly Arg Asp Pro Tyr Lys Leu Arg Pro Val  
                  85                    90                    95

Ala Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Lys Glu Ser Pro Gln Thr His Tyr Tyr  
                  100                    105                    110

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Gln Leu  
                  115                    120                    125

ES 2 738 287 T3

Gln Gly Arg Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp  
130 135 140

Ile Ile Pro Met Gly Ile Leu Arg Pro Tyr Leu Ser Trp Thr Glu Ser  
145 150 155 160

Leu Glu Pro Leu Gln Gly Ala Val Ala Lys Phe Phe Ser Ala Ser Cys  
165 170 175

Val Pro Cys Ile Asp Arg Gln Ala Tyr Pro Asn Leu Cys Gln Leu Cys  
180 185 190

Lys Gly Glu Gly Glu Asn Gln Cys Ala Cys Ser Ser Arg Glu Pro Tyr  
195 200 205

Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Gln Asp Gly Ala Gly Asp  
210 215 220

Val Ala Phe Val Lys Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys  
225 230 235 240

Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asn Asn Ser Arg Ala  
245 250 255

Pro Val Asp Ala Phe Lys Glu Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His  
260 265 270

ES 2 738 287 T3

Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Lys Glu Asp Leu Ile Trp Lys  
275 280 285

Leu Leu Ser Lys Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asn Lys Ser Arg Ser  
290 295 300

Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Pro Gly Gln Arg Asp Leu Leu Phe Lys  
305 310 315 320

Asp Ser Ala Leu Gly Phe Leu Arg Ile Pro Ser Lys Val Asp Ser Ala  
325 330 335

Leu Tyr Leu Gly Ser Arg Tyr Leu Thr Thr Leu Lys Asn Leu Arg Glu  
340 345 350

Thr Ala Glu Glu Val Lys Ala Arg Tyr Thr Arg Val Val Trp Cys Ala  
355 360 365

Val Gly Pro Glu Glu Gln Lys Lys Cys Gln Gln Trp Ser Gln Gln Ser  
370 375 380

Gly Gln Asn Val Thr Cys Ala Thr Ala Ser Thr Thr Asp Asp Cys Ile  
385 390 395 400

Val Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Leu Asn Leu Asp Gly Gly  
405 410 415

Tyr Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Leu Ala Glu  
420 425 430

ES 2 738 287 T3

Asn Arg Lys Ser Ser Lys His Ser Ser Leu Asp Cys Val Leu Arg Pro  
435 440 445

Thr Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ala Asn Glu Gly  
450 455 460

Leu Thr Trp Asn Ser Leu Lys Asp Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val  
465 470 475 480

Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Ile Val Asn Gln  
485 490 495

Thr Gly Ser Cys Ala Phe Asp Glu Phe Phe Ser Gln Ser Cys Ala Pro  
500 505 510

Gly Ala Asp Pro Lys Ser Arg Leu Cys Ala Leu Cys Ala Gly Asp Asp  
515 520 525

Gln Gly Leu Asp Lys Cys Val Pro Asn Ser Lys Glu Lys Tyr Tyr Gly  
530 535 540

Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asp Val Gly Asp Val Ala  
545 550 555 560

Phe Val Lys Asn Asp Thr Val Trp Glu Asn Thr Asn Gly Glu Ser Thr  
565 570 575

ES 2 738 287 T3

Ala Asp Trp Ala Lys Asn Leu Asn Arg Glu Asp Phe Arg Leu Leu Cys  
580 585 590

Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Thr Glu Ala Gln Ser Cys His Leu  
595 600 605

Ala Val Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Ser Asp Arg Ala Ala  
610 615 620

His Val Lys Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Leu Phe Gly Lys Asn  
625 630 635 640

Gly Lys Asn Cys Pro Asp Lys Phe Cys Leu Phe Lys Ser Glu Thr Lys  
645 650 655

Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Lys Leu Gly Gly  
660 665 670

Arg Pro Thr Tyr Glu Glu Tyr Leu Gly Thr Glu Tyr Val Thr Ala Ile  
675 680 685

Ala Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu Ala Cys Ala  
690 695 700

Phe Leu Thr Arg  
705

<210> 3

<211> 708

<212> PRT

5 <213> *Ovis aries*

<400> 3

ES 2 738 287 T3

Met Lys Leu Phe Val Pro Ala Leu Leu Ser Leu Gly Ala Leu Gly Leu  
1                    5                    10                    15

Cys Leu Ala Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Ala Ile Ser Pro  
                  20                    25                    30

Pro Glu Gly Ser Lys Cys Tyr Gln Trp Gln Arg Arg Met Arg Lys Leu  
                  35                    40                    45

Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Val Arg Arg Thr Ser Ala Leu Glu Cys  
                  50                    55                    60

Ile Arg Ala Ile Ala Gly Lys Lys Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ser  
65                    70                    75                    80

Gly Met Val Phe Glu Ala Gly Leu Asp Pro Tyr Lys Leu Arg Pro Val  
                  85                    90                    95

Ala Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Glu Lys Ser Pro Gln Thr His Tyr Tyr  
                  100                    105                    110

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Gln Leu  
                  115                    120                    125

Gln Gly Gln Lys Ser Cys His Met Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp

ES 2 738 287 T3

130	135	140	
Asn Ile Pro Met Gly Ile Leu Arg Pro Phe Leu Ser Trp Thr Glu Ser			
145	150	155	160
Ala Glu Pro Leu Gln Gly Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser Cys			
	165	170	175
Val Pro Cys Val Asp Gly Lys Ala Tyr Pro Asn Leu Cys Gln Leu Cys			
	180	185	190
Lys Gly Val Gly Glu Asn Lys Cys Ala Cys Ser Ser Gln Glu Pro Tyr			
	195	200	205
Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Gln Asp Gly Ala Gly Asp			
	210	215	220
Val Ala Phe Val Lys Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys			
	225	230	235
Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asn Asn Thr Arg Ala			
	245	250	255
Pro Val Asp Ala Phe Lys Glu Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His			
	260	265	270
Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Lys Glu Asn Leu Ile Trp Glu			
	275	280	285

ES 2 738 287 T3

Leu Leu Arg Lys Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asn Lys Ser Gln Arg  
 290 295 300

Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Gln Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys  
 305 310 315 320

Asp Ser Ala Leu Gly Phe Val Arg Ile Pro Ser Lys Val Asp Ser Ala  
 325 330 335

Leu Tyr Leu Gly Ser Arg Tyr Leu Thr Ala Leu Lys Asn Leu Arg Glu  
 340 345 350

Thr Ala Glu Glu Val Lys Ala Arg Cys Thr Arg Val Val Trp Cys Ala  
 355 360 365

Val Gly Pro Glu Glu His Ser Lys Cys Gln Gln Trp Ser Glu Gln Ser  
 370 375 380

Gly Gln Asn Val Thr Cys Ala Met Ala Ser Thr Thr Asp Asp Cys Ile  
 385 390 395 400

Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Leu Ser Leu Asp Gly Gly  
 405 410 415

Tyr Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Met Ala Glu  
 420 425 430

Asn Arg Glu Ser Ser Lys Tyr Ser Ser Leu Asp Cys Val Leu Arg Pro

ES 2 738 287 T3

435	440	445
Thr Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ala Asn Glu Gly		
450	455	460
Leu Thr Trp Asn Ser Leu Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val		
465	470	475 480
Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Ile Ala Asn Gln		
485	490	495
Thr Gly Ser Cys Ala Phe Asp Glu Phe Phe Ser Gln Ser Cys Ala Pro		
500	505	510
Gly Ala Asp Pro Lys Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Ala Gly Asp Asp		
515	520	525
Gln Gly Leu Asn Lys Cys Val Pro Asn Ser Lys Glu Lys Tyr Tyr Gly		
530	535	540
Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asp Val Gly Asp Val Ala		
545	550	555 560
Phe Val Lys Asn Asp Thr Val Trp Glu Asn Thr Asn Gly Glu Ser Ser		
565	570	575
Ala Asp Trp Ala Lys Asn Leu Asn Arg Glu Asp Phe Arg Leu Leu Cys		
580	585	590

ES 2 738 287 T3

Leu Asp Gly Thr Thr Lys Pro Val Thr Glu Ala Gln Ser Cys Tyr Leu  
595 600 605

Ala Val Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Ser Asp Arg Ala Ala  
610 615 620

His Val Glu Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Leu Phe Gly Lys Asn  
625 630 635 640

Gly Lys Asn Cys Pro Asp Gln Phe Cys Leu Phe Lys Ser Glu Thr Lys  
645 650 655

Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Lys Leu Gly Gly  
660 665 670

Arg Pro Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Thr Glu Tyr Val Thr Ala Ile  
675 680 685

Ala Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu Ala Cys Ala  
690 695 700

Phe Leu Thr Arg  
705

<210> 4

<211> 708

<212> PRT

5 <213> *Capra hircus*

<400> 4

ES 2 738 287 T3

Met Lys Leu Phe Val Pro Ala Leu Leu Ser Leu Gly Ala Leu Gly Leu  
1                    5                    10                    15

Cys Leu Ala Ala Pro Arg Lys Asn Val Arg Trp Cys Ala Ile Ser Leu  
                  20                    25                    30

Pro Glu Trp Ser Lys Cys Tyr Gln Trp Gln Arg Arg Met Arg Lys Leu  
                  35                    40                    45

Gly Ala Pro Ser Ile Thr Cys Ile Arg Arg Thr Ser Ala Leu Glu Cys  
                  50                    55                    60

Ile Arg Ala Ile Ala Gly Lys Asn Ala Asp Ala Val Thr Leu Asp Ser  
65                    70                    75                    80

Gly Met Val Phe Glu Ala Gly Leu Asp Pro Tyr Lys Leu Arg Pro Val  
                  85                    90                    95

Ala Ala Glu Ile Tyr Gly Thr Glu Lys Ser Pro Gln Thr His Tyr Tyr  
                  100                    105                    110

Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Ser Asn Phe Gln Leu Asp Gln Leu  
                  115                    120                    125

Gln Gly Gln Lys Ser Cys His Met Gly Leu Gly Arg Ser Ala Gly Trp  
                  130                    135                    140

ES 2 738 287 T3

Asn Ile Pro Val Gly Ile Leu Arg Pro Phe Leu Ser Trp Thr Glu Ser  
145 150 155 160

Ala Glu Pro Leu Gln Gly Ala Val Ala Arg Phe Phe Ser Ala Ser Cys  
165 170 175

Val Pro Cys Val Asp Gly Lys Ala Tyr Pro Asn Leu Cys Gln Leu Cys  
180 185 190

Lys Gly Val Gly Glu Asn Lys Cys Ala Cys Ser Ser Gln Glu Pro Tyr  
195 200 205

Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Gln Asp Gly Ala Gly Asp  
210 215 220

Val Ala Phe Val Lys Glu Thr Thr Val Phe Glu Asn Leu Pro Glu Lys  
225 230 235 240

Ala Asp Arg Asp Gln Tyr Glu Leu Leu Cys Leu Asn Asn Thr Arg Ala  
245 250 255

Pro Val Asp Ala Phe Lys Glu Cys His Leu Ala Gln Val Pro Ser His  
260 265 270

Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Lys Glu Asn Leu Ile Trp Glu  
275 280 285

Leu Leu Arg Lys Ala Gln Glu Lys Phe Gly Lys Asn Lys Ser Gln Ser  
290 295 300

ES 2 738 287 T3

Phe Gln Leu Phe Gly Ser Pro Glu Gly Arg Arg Asp Leu Leu Phe Lys  
305 310 315 320

Asp Ser Ala Leu Gly Phe Val Arg Ile Pro Ser Lys Val Asp Ser Ala  
325 330 335

Leu Tyr Leu Gly Ser Arg Tyr Leu Thr Ala Leu Lys Asn Leu Arg Glu  
340 345 350

Thr Ala Glu Glu Leu Lys Ala Arg Cys Thr Arg Val Val Trp Cys Ala  
355 360 365

Val Gly Pro Glu Glu Gln Ser Lys Cys Gln Gln Trp Ser Glu Gln Ser  
370 375 380

Gly Gln Asn Val Thr Cys Ala Thr Ala Ser Thr Thr Asp Asp Cys Ile  
385 390 395 400

Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Leu Ser Leu Asp Gly Gly  
405 410 415

Tyr Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val Met Ala Glu  
420 425 430

Asn Arg Lys Ser Ser Lys Tyr Ser Ser Leu Asp Cys Val Leu Arg Pro  
435 440 445

ES 2 738 287 T3

Thr Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Lys Lys Ala Asn Glu Gly  
450 455 460

Leu Thr Trp Asn Ser Leu Lys Gly Lys Lys Ser Cys His Thr Ala Val  
465 470 475 480

Asp Arg Thr Ala Gly Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Ile Ala Asn Gln  
485 490 495

Thr Gly Ser Cys Ala Phe Asp Glu Phe Phe Ser Gln Ser Cys Ala Pro  
500 505 510

Gly Ala Asp Pro Lys Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Ala Gly Asp Asp  
515 520 525

Gln Gly Leu Asp Lys Cys Val Pro Asn Ser Lys Glu Lys Tyr Tyr Gly  
530 535 540

Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Asp Val Gly Asp Val Ala  
545 550 555 560

Phe Val Lys Asn Asp Thr Val Trp Glu Asn Thr Asn Gly Glu Ser Ser  
565 570 575

Ala Asp Trp Ala Lys Asn Leu Asn Arg Glu Asp Phe Arg Leu Leu Cys  
580 585 590

Leu Asp Gly Thr Thr Lys Pro Val Thr Glu Ala Gln Ser Cys Tyr Leu  
595 600 605

ES 2 738 287 T3

Ala Val Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Arg Ser Asp Arg Ala Ala  
610 615 620

His Val Glu Gln Val Leu Leu His Gln Gln Ala Leu Phe Gly Lys Asn  
625 630 635 640

Gly Lys Asn Cys Pro Asp Gln Phe Cys Leu Phe Lys Ser Glu Thr Lys  
645 650 655

Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Lys Leu Gly Gly  
660 665 670

Arg Pro Thr Tyr Glu Lys Tyr Leu Gly Thr Glu Tyr Val Thr Ala Ile  
675 680 685

Ala Asn Leu Lys Lys Cys Ser Thr Ser Pro Leu Leu Glu Ala Cys Ala  
690 695 700

Phe Leu Thr Arg  
705

<210> 5

<211> 695

<212> PRT

5 <213> *Equus caballus*

<400> 5

Leu Gly Leu Cys Leu Ala Ala Pro Arg Lys Ser Val Arg Trp Cys Thr

ES 2 738 287 T3

1                    5                    10                    15  
 Ile Ser Pro Ala Glu Ala Ala Lys Cys Ala Lys Phe Gln Arg Asn Met  
                   20                    25                    30  
 Lys Lys Val Arg Gly Pro Ser Val Ser Cys Ile Arg Lys Thr Ser Ser  
                   35                    40                    45  
 Phe Glu Cys Ile Gln Ala Ile Ala Ala Asn Lys Ala Asp Ala Val Thr  
                   50                    55                    60  
 Leu Asp Gly Gly Leu Val Tyr Glu Ala Gly Leu His Pro Tyr Lys Leu  
 65                    70                    75                    80  
 Arg Pro Val Ala Ala Glu Val Tyr Gln Thr Arg Gly Lys Pro Gln Thr  
                   85                    90                    95  
 Arg Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Lys Lys Gly Ser Gly Phe Gln Leu  
                   100                    105                    110  
 Asn Gln Leu Gln Gly Val Lys Ser Cys His Thr Gly Leu Gly Arg Ser  
                   115                    120                    125  
 Ala Gly Trp Asn Ile Pro Ile Gly Thr Leu Arg Pro Tyr Leu Asn Trp  
                   130                    135                    140  
 Thr Gly Pro Pro Glu Pro Leu Gln Lys Ala Val Ala Asn Phe Phe Ser  
 145                    150                    155                    160

ES 2 738 287 T3

Ala Ser Cys Val Pro Cys Ala Asp Gly Lys Gln Tyr Pro Asn Leu Cys  
165 170 175

Arg Leu Cys Ala Gly Thr Glu Ala Asp Lys Cys Ala Cys Ser Ser Gln  
180 185 190

Glu Pro Tyr Phe Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Lys Cys Leu Glu Asn Gly  
195 200 205

Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Ser Thr Val Phe Glu Asn Leu  
210 215 220

Pro Asp Glu Ala Asp Arg Asp Lys Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asp Asn  
225 230 235 240

Thr Arg Lys Pro Val Asp Ala Phe Lys Glu Cys His Leu Ala Arg Val  
245 250 255

Pro Ser His Ala Val Val Ala Arg Ser Val Asp Gly Arg Glu Asp Leu  
260 265 270

Ile Trp Arg Leu Leu His Arg Ala Gln Glu Glu Phe Gly Arg Asn Lys  
275 280 285

Ser Ser Ala Phe Gln Leu Phe Lys Ser Thr Pro Glu Asn Lys Asp Leu  
290 295 300

Leu Phe Lys Asp Ser Ala Leu Gly Phe Val Arg Ile Pro Ser Gln Ile

ES 2 738 287 T3

305 310 315 320

Asp Ser Gly Leu Tyr Leu Gly Ala Asn Tyr Leu Thr Ala Thr Gln Asn  
 325 330 335

Leu Arg Glu Thr Ala Ala Glu Val Ala Ala Arg Arg Glu Arg Val Val  
 340 345 350

Trp Cys Ala Val Gly Pro Glu Glu Glu Arg Lys Cys Lys Gln Trp Ser  
 355 360 365

Asp Val Ser Asn Arg Lys Val Ala Cys Ala Ser Ala Ser Thr Thr Glu  
 370 375 380

Glu Cys Ile Ala Leu Val Leu Lys Gly Glu Ala Asp Ala Leu Asn Leu  
 385 390 395 400

Asp Gly Gly Phe Ile Tyr Val Ala Gly Lys Cys Gly Leu Val Pro Val  
 405 410 415

Leu Ala Glu Asn Gln Lys Ser Gln Asn Ser Asn Ala Pro Asp Cys Val  
 420 425 430

His Arg Pro Pro Glu Gly Tyr Leu Ala Val Ala Val Val Arg Lys Ser  
 435 440 445

Asp Ala Asp Leu Thr Trp Asn Ser Leu Ser Gly Lys Lys Ser Cys His  
 450 455 460

ES 2 738 287 T3

Thr Gly Val Gly Arg Thr Ala Ala Trp Asn Ile Pro Met Gly Leu Leu  
465 470 475 480

Phe Asn Gln Thr Gly Ser Cys Lys Phe Asp Lys Phe Phe Ser Gln Ser  
485 490 495

Cys Ala Pro Gly Ala Asp Pro Gln Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val  
500 505 510

Gly Asn Asn Glu Asn Glu Asn Lys Cys Met Pro Asn Ser Glu Glu Arg  
515 520 525

Tyr Tyr Gly Tyr Thr Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Lys Ala Gly  
530 535 540

Asp Val Ala Phe Val Lys Asp Val Thr Val Leu Gln Asn Thr Asp Gly  
545 550 555 560

Lys Asn Ser Glu Pro Trp Ala Lys Asp Leu Lys Gln Glu Asp Phe Glu  
565 570 575

Leu Leu Cys Leu Asp Gly Thr Arg Lys Pro Val Ala Glu Ala Glu Ser  
580 585 590

Cys His Leu Ala Arg Ala Pro Asn His Ala Val Val Ser Gln Ser Asp  
595 600 605

Arg Ala Gln His Leu Lys Lys Val Leu Phe Leu Gln Gln Asp Gln Phe

ES 2 738 287 T3

610                      615                      620

Gly Gly Asn Gly Pro Asp Cys Pro Gly Lys Phe Cys Leu Phe Lys Ser  
625                      630                      635                      640

Glu Thr Lys Asn Leu Leu Phe Asn Asp Asn Thr Glu Cys Leu Ala Glu  
                                 645                      650                      655

Leu Gln Gly Lys Thr Thr Tyr Glu Gln Tyr Leu Gly Ser Glu Tyr Val  
                                 660                      665                      670

Thr Ser Ile Thr Asn Leu Arg Arg Cys Ser Ser Ser Pro Leu Leu Glu  
                                 675                      680                      685

Ala Cys Ala Phe Leu Arg Ala  
                                 690                      695

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de una enfermedad asociada con la formación de trampas extracelulares de leucocitos, la composición comprende lactoferrina, en donde la enfermedad se selecciona de entre el grupo que consiste en poliangeítis microscópica, angeítis granulomatosa alérgica, reacción local de Shwartzman, lesión renal aguda (LRA) acompañada por lesión por isquemia-reperfusión y coagulación intravascular diseminada.
2. La composición farmacéutica según la reivindicación 1, en donde la lactoferrina es una proteína seleccionada de entre el grupo que consiste en lo siguiente:
- (a) una proteína que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los SEQ ID NO: 1 a 5; y
- 10 (b) una proteína que tiene una identidad de secuencia de aminoácidos de un 90 % o superior con cualquiera de las secuencias de aminoácidos de los SEQ ID NO: 1 a 5, la proteína deriva de un mamífero y tiene actividad de inhibición de la formación de trampas extracelulares de leucocitos.
3. La composición para su uso según la reivindicación 1 o 2, en donde la lactoferrina se encuentra en una cantidad de entre 0,001 a 10 g/kg/día.
- 15 4. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la lactoferrina deriva de seres humanos.
5. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde los leucocitos son uno seleccionado de entre el grupo que consiste en neutrófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, monocitos, macrófagos y mastocitos.
- 20 6. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se encuentra en forma de un agente de inyección.
7. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es administrable por vía oral.
8. La composición para su uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que se encuentra en forma de alimento.
- 25

FIG. 1-A

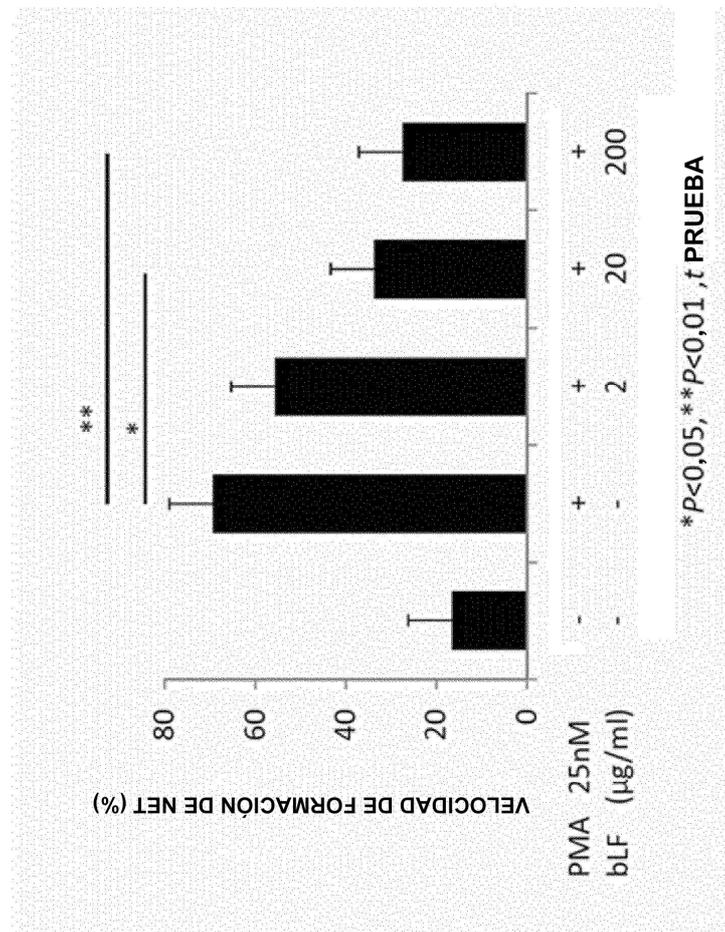


FIG. 1-B

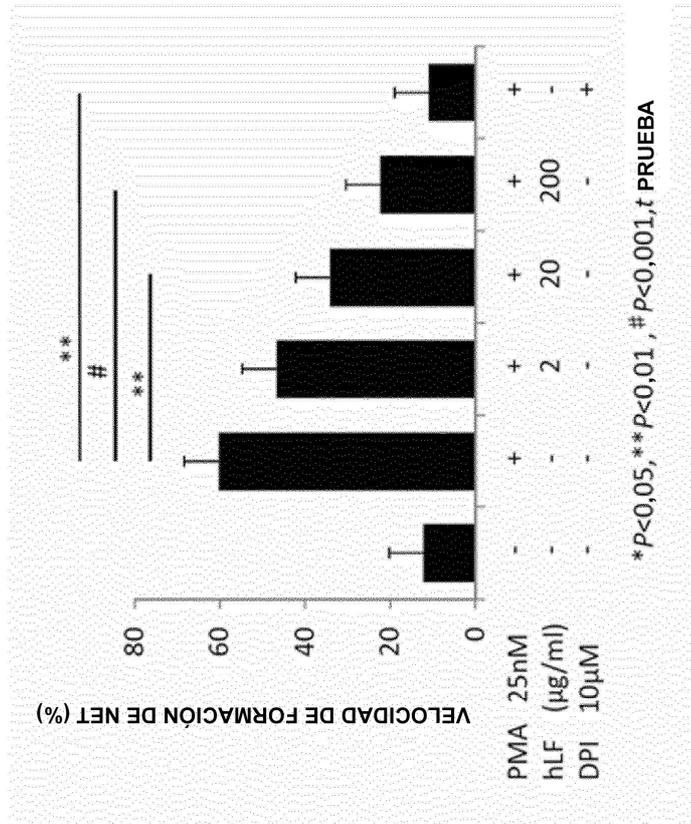


FIG. 1-C

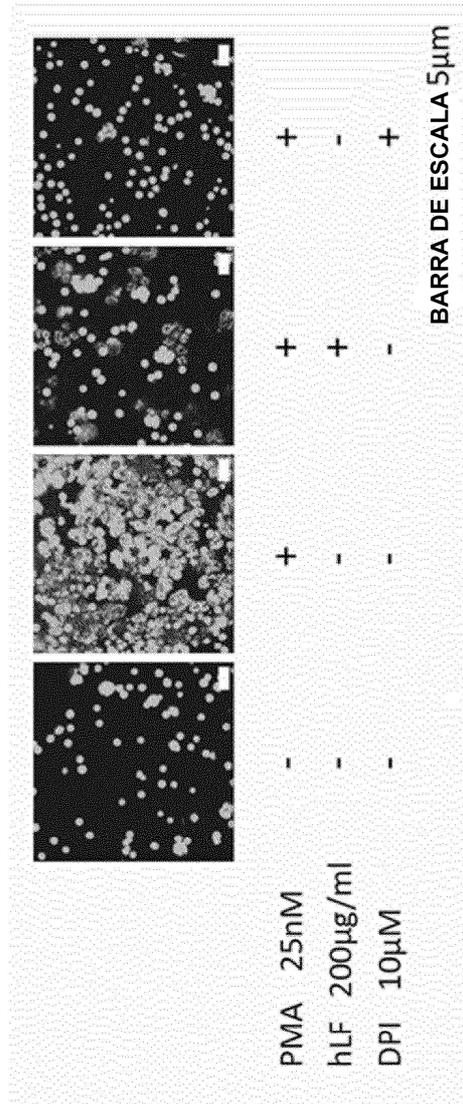


FIG. 1-D

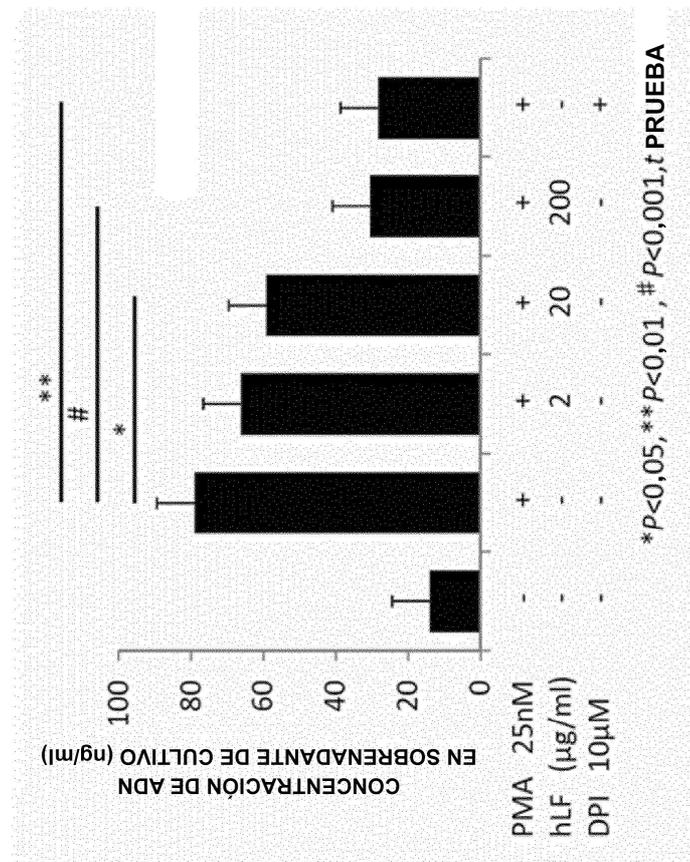


FIG. 1-E

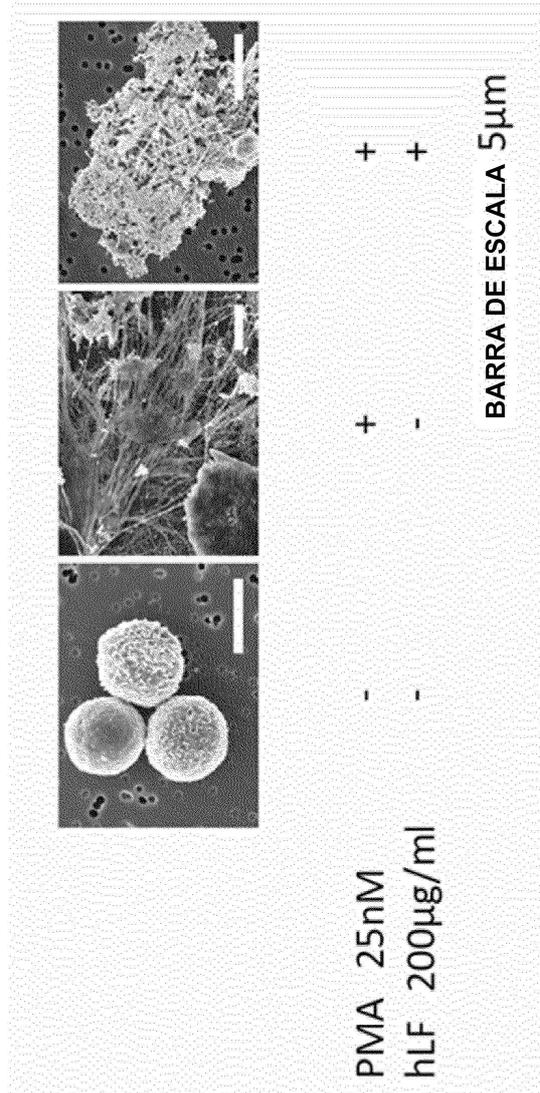


FIG. 2

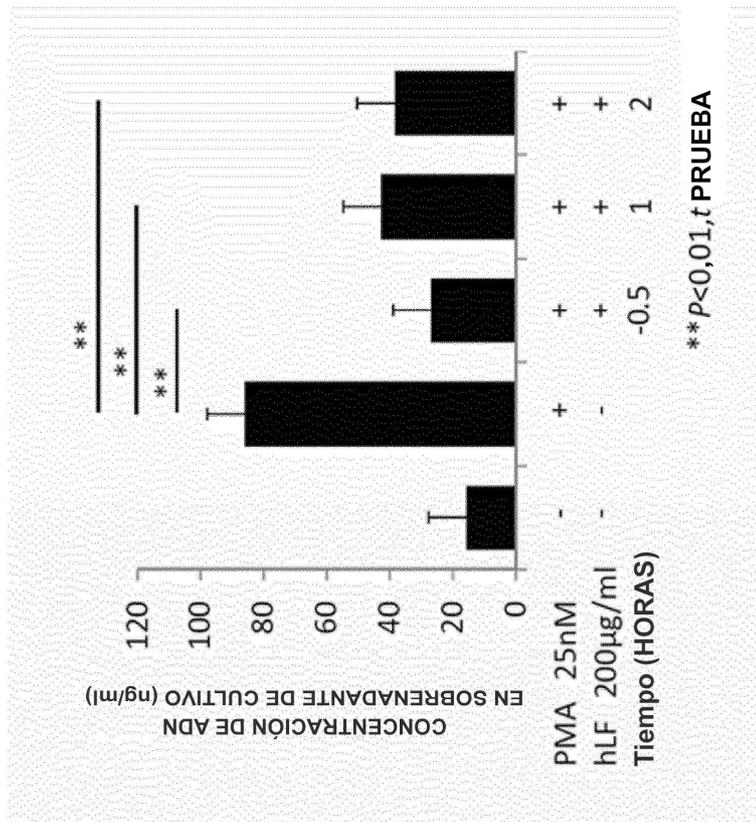


FIG. 3

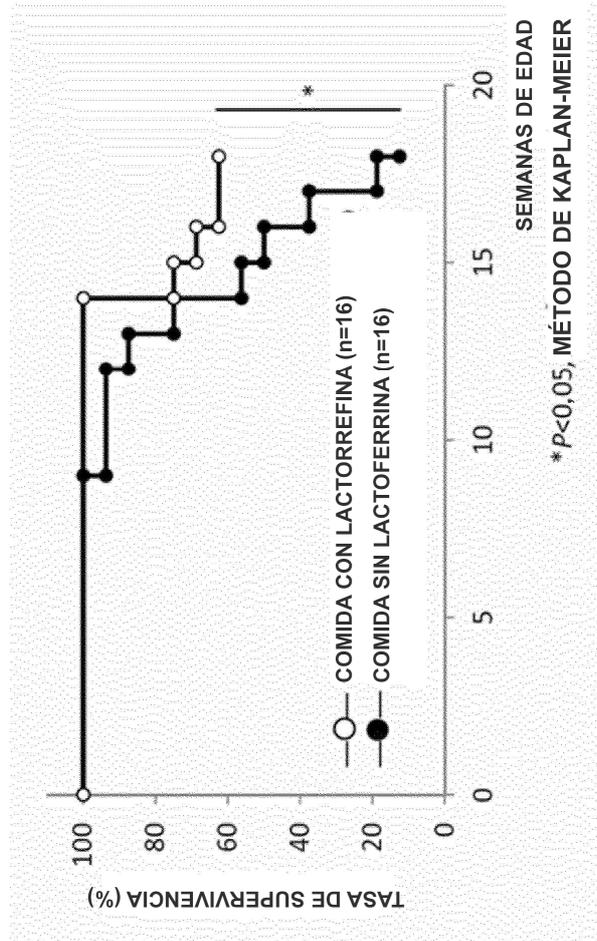


FIG. 4-A

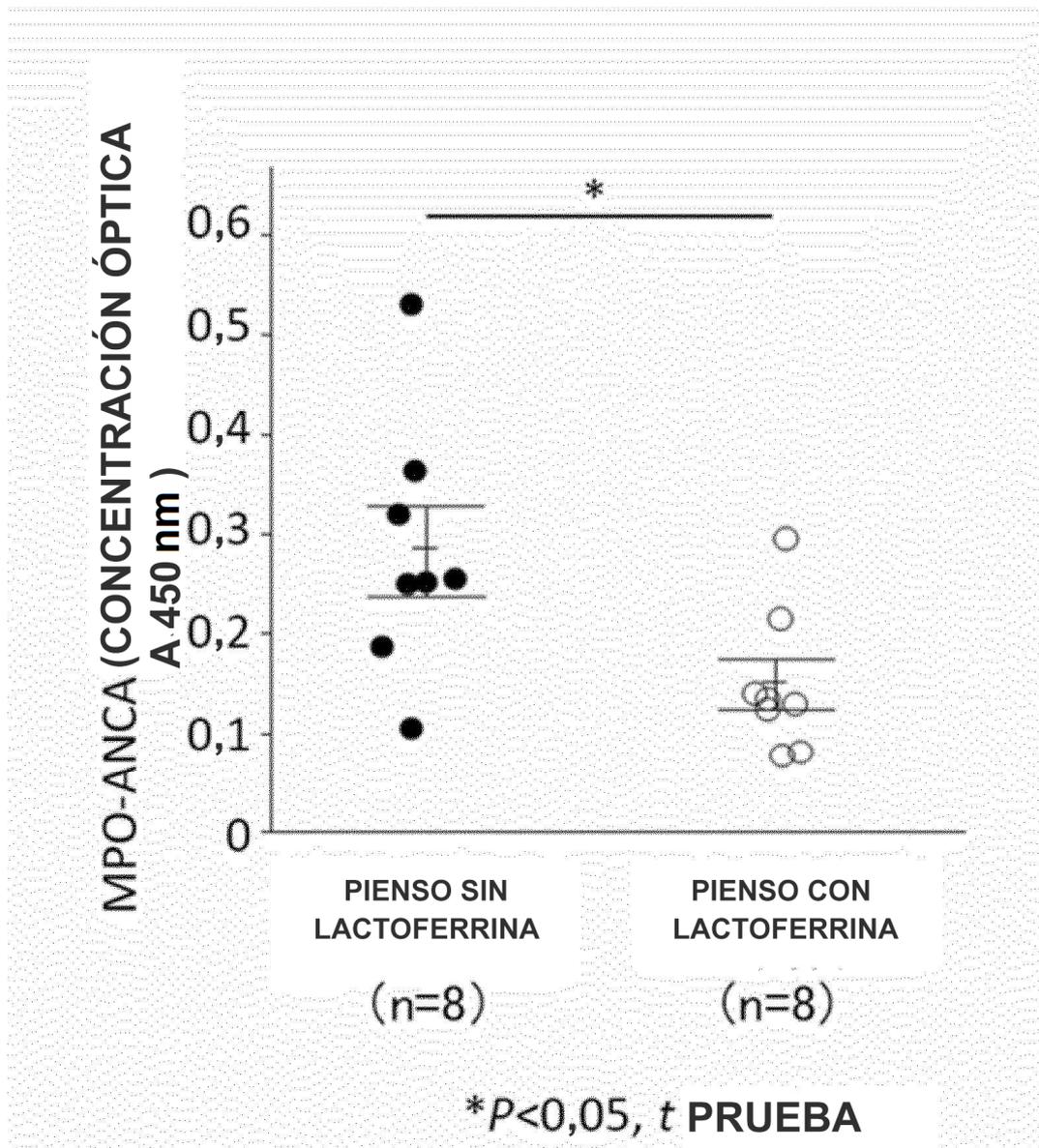


FIG. 4-B

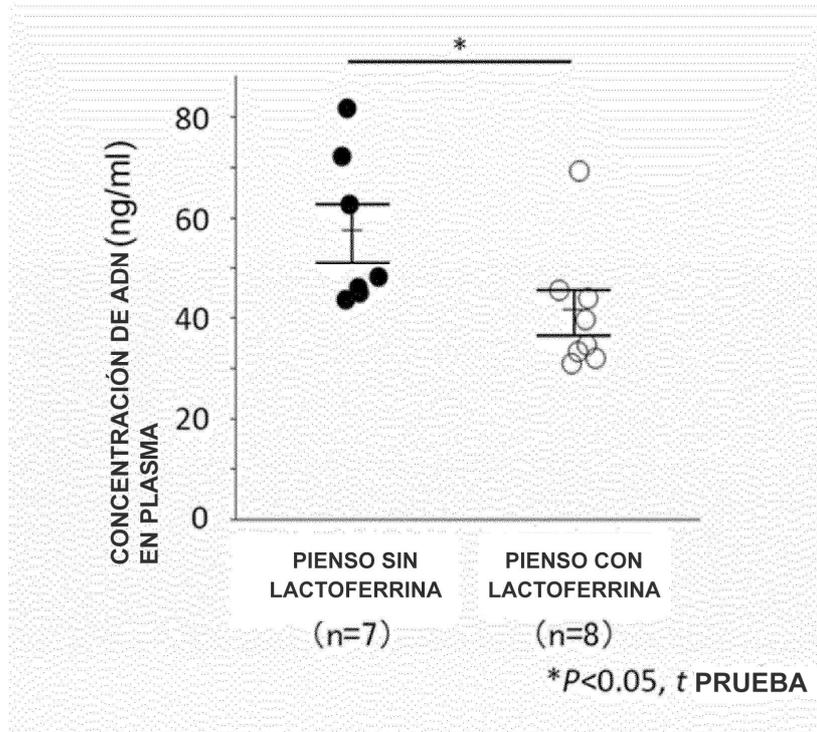


FIG. 4-C

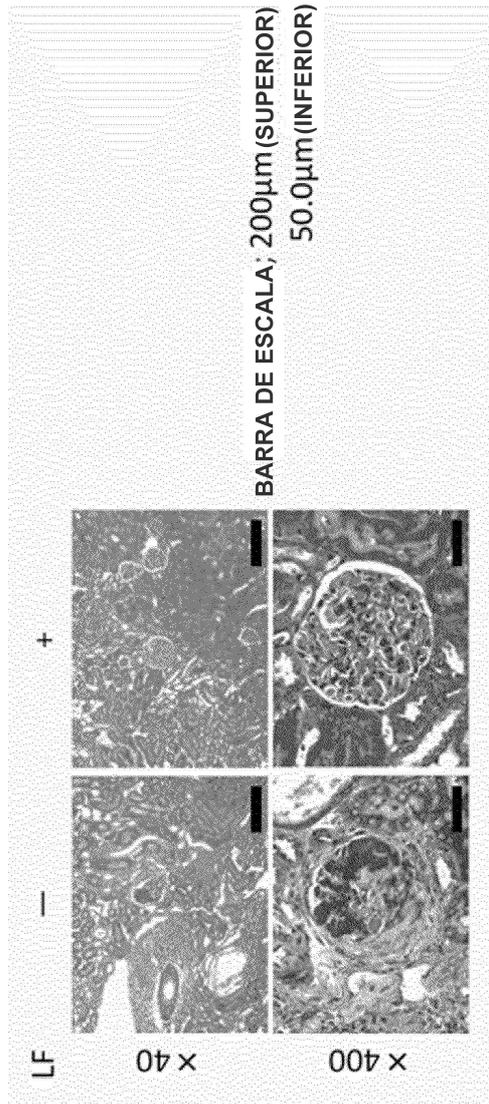


FIG. 5-A

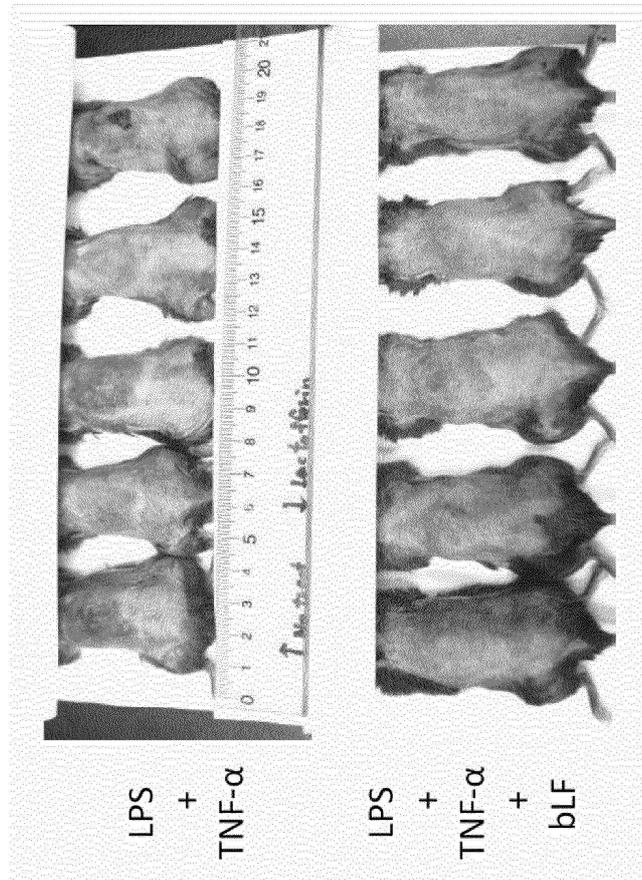


FIG. 5-B

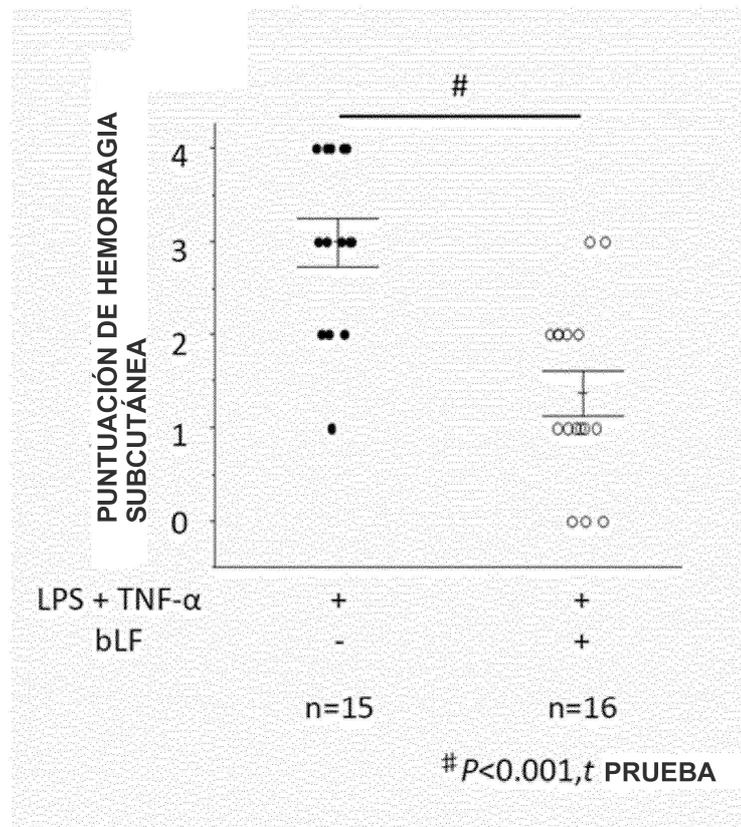


FIG. 5-C

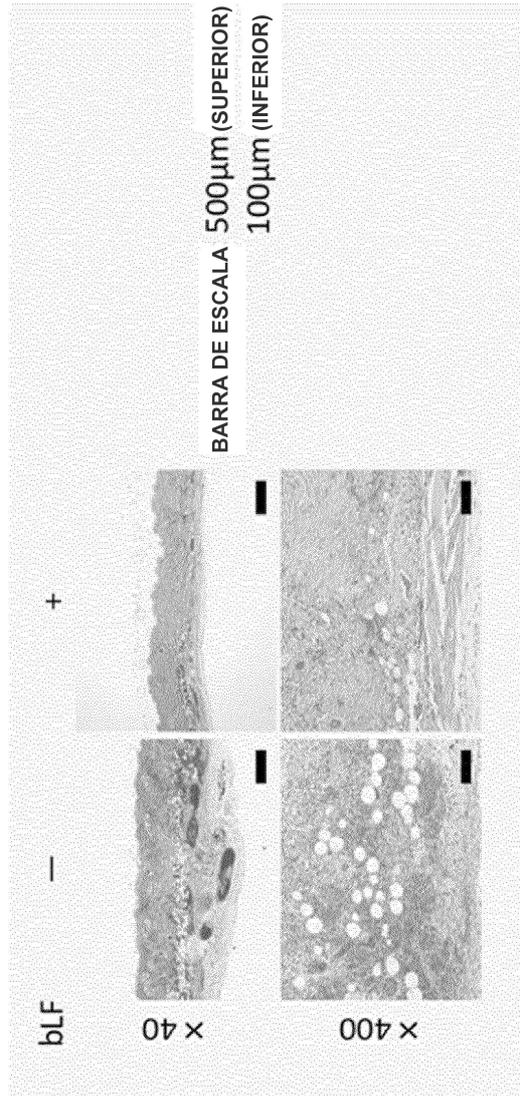


FIG. 6-A

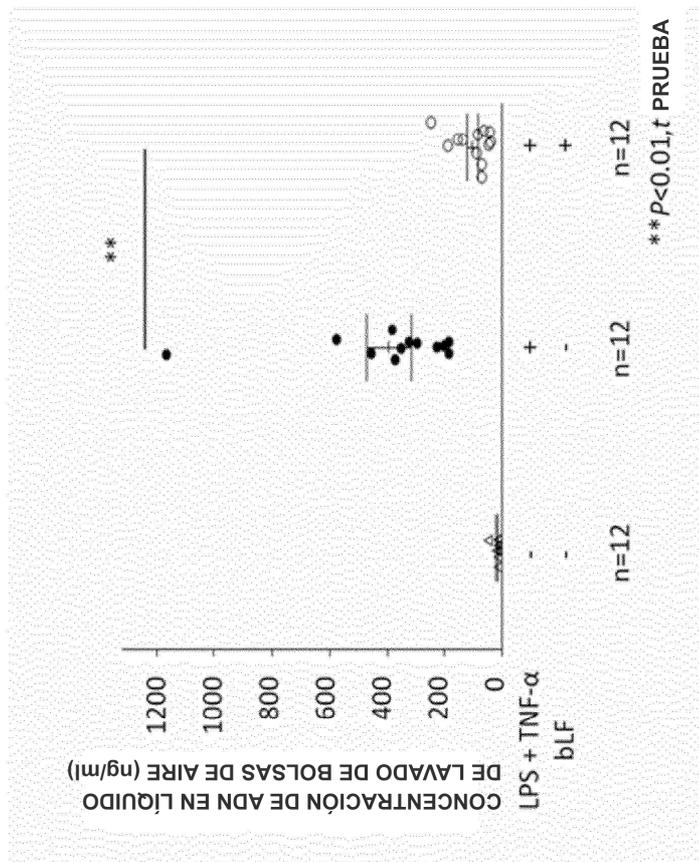


FIG. 6-B

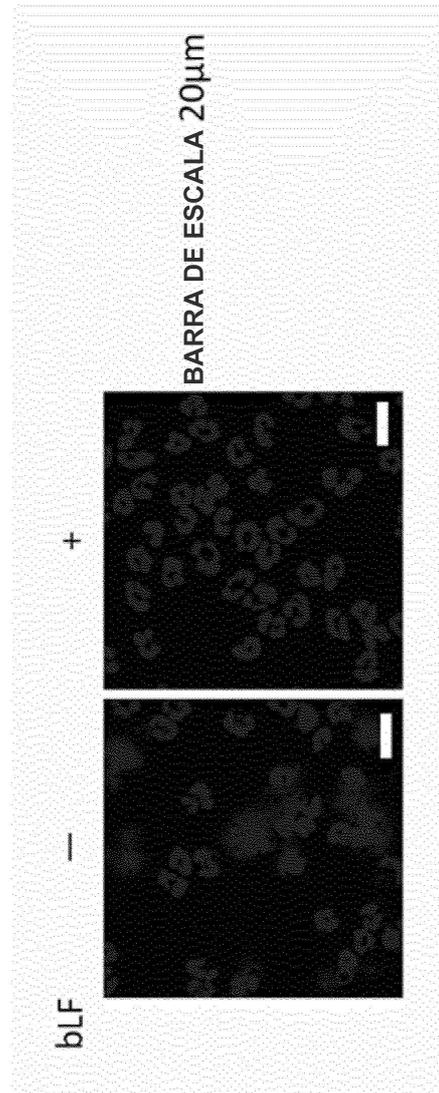
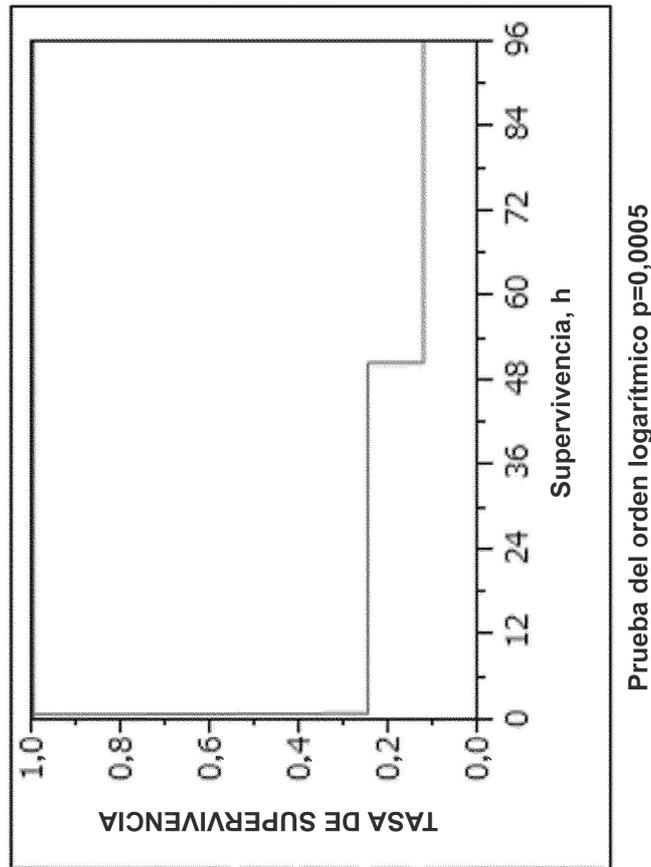
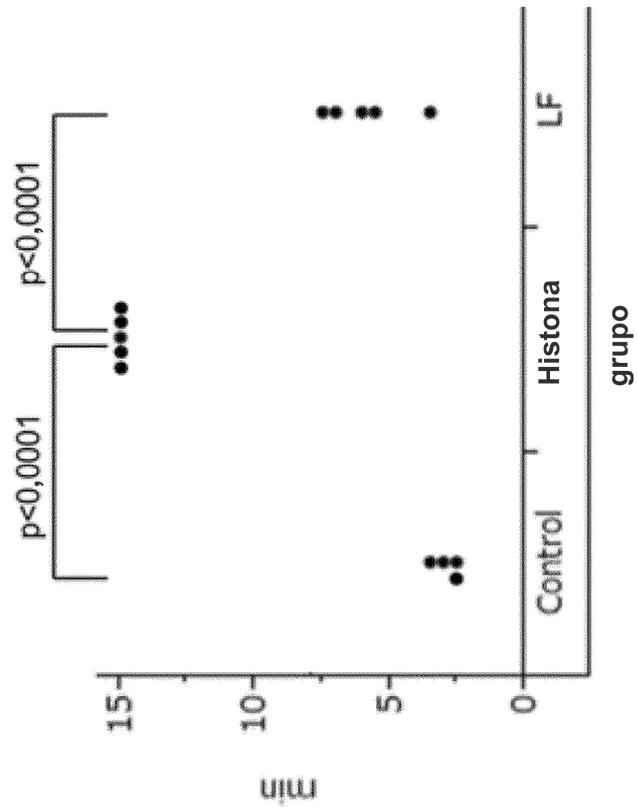


FIG. 7

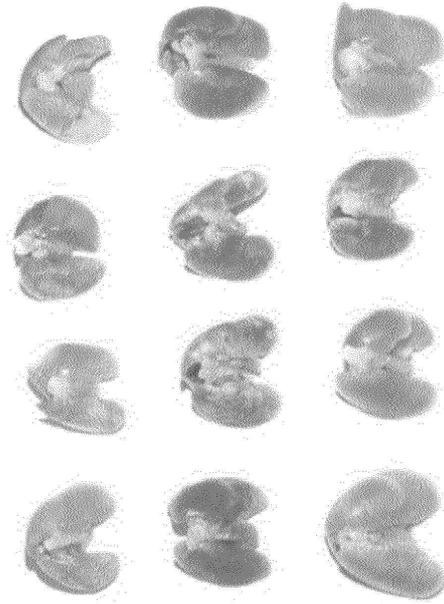


Prueba del orden logarítmico  $p=0,0005$

FIG. 8



**FIG. 9**



**GRUPO DE CONTROL  
DE RATONES SANOS**

**GRUPO DE CONTROL  
DE RATONES SIN TERAPIA**

**GRUPO DE RATONES  
CON TERAPIA  
DE LACTOFERRINA BOVINA**

FIG. 10

