

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 771 924**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47	(2006.01) A61P 17/02	(2006.01)
C07K 1/30	(2006.01) A23J 1/20	(2006.01)
C07K 14/495	(2006.01) A23C 9/20	(2006.01)
C07K 14/525	(2006.01)	
C07K 14/55	(2006.01)	
C07K 14/57	(2006.01)	
C07K 14/79	(2006.01)	
C07K 1/34	(2006.01)	
C07K 1/36	(2006.01)	
C07K 14/475	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.07.2015 PCT/EP2015/067669**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **11.02.2016 WO16020284**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.07.2015 E 15752962 (9)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **13.11.2019 EP 3177636**

54 Título: **Proceso para la preparación de mezclas de alta pureza de factores proteínicos procedentes de calostro bovino**

30 Prioridad:

06.08.2014 IT MI20141450

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

07.07.2020

73 Titular/es:

**TENAGRO S.R.L. (100.0%)
Via Crocefisso 5
20122 Milano, IT**

72 Inventor/es:

**CIPOLLETTI, GIOVANNI;
VAGNOLI, LUANA;
CHINI, JACOPO y
BIAGIOLINI, SILVIA**

74 Agente/Representante:

RUO , Alessandro

Observaciones:

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

ES 2 771 924 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

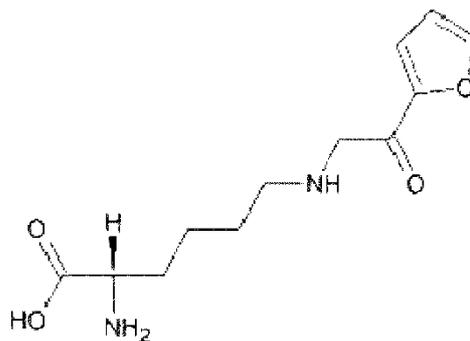
Proceso para la preparación de mezclas de alta pureza de factores proteínicos procedentes de calostro bovino

- 5 **[0001]** La presente invención se refiere a un proceso para la preparación de mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino y a las mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino obtenidas de este modo, a las composiciones relativas que comprenden dichas mezclas y a dichas mezclas para usos terapéuticos.
- 10 **[0002]** Se sabe que muchos fluidos biológicos de origen animal tales como el suero, la placenta y el calostro contienen factores proteínicos esenciales tales como citocinas, factores de crecimiento, factores quimiotácticos, factores del complemento y otros componentes. Están presentes en diferentes concentraciones en los fluidos biológicos de todos los mamíferos dependiendo de la especie, la raza y el origen geográfico.
- 15 **[0003]** La leche y el calostro de origen bovino (vacas Holstein y Frisias), además de ser productos seguros, son particularmente ricos en estos factores, que son, especialmente, lactoferrina, transferrina, IFN γ , TNF α , TGF β 1, IGF-1, inmunoglobulinas (IgG, IgM e IgA), IL-2 y factores del complemento C3A y C4A.
- 20 **[0004]** La concentración de dichos factores en el calostro alcanza su máximo 24 horas después del parto para disminuir significativamente; es absolutamente preferible recoger el calostro, dentro de las primeras 6 horas después del parto.
- 25 **[0005]** Estos factores son los mismos aislables del sobrenadante del cultivo de células madre, por tanto, se han propuesto varias aplicaciones terapéuticas de los extractos o las fracciones aisladas del calostro de mamíferos, como tratamiento alternativo a la costosa y difícil terapia con células madre (para una revisión de estos usos clínicos, véanse las referencias [1] y [2]).
- 30 **[0006]** Sin embargo, dicho proceso de extracción a partir de fluidos biológicos de origen bovino muestra diferentes elementos críticos porque se aplican a un producto heterogéneo tal como la leche o el calostro.
- 35 **[0007]** Entre los principales inconvenientes existe la necesidad de eliminar preliminarmente las caseínas que pueden ser responsables de fenómenos alérgicos u obstaculizar el aislamiento de otras proteínas deseables que son más pequeñas y menos abundantes. Las caseínas se retiran tradicionalmente mediante coagulación (precipitación) y posterior filtración.
- 40 **[0008]** Otro elemento crítico es la presencia de azúcares reductores, tales como, por ejemplo, glucosa y lactosa, que pueden crear aductos covalentes con los constituyentes proteínicos, con la consiguiente pérdida de la funcionalidad de la proteína e inducción de respuestas perjudiciales. La reacción objeto prevé, como primera etapa, la formación de una base de Schiff mediante condensación del resto carbonilo del azúcar reductor con el resto amina primaria de la lisina o con el grupo amina terminal de la proteína. Una vez formada, la base de Schiff se reorganiza espontáneamente, con la formación de aductos estables (reacción de Maillard). Además, los azúcares pueden experimentar un proceso oxidativo con la formación de especies reactivas de carbonilo tales como, por ejemplo, glioxal, metilglioxal y desoxiglucosona, capaces de reaccionar con los sitios nucleófilos de las proteínas (histidina, lisina, arginina, cisteína) formando de este modo una mezcla heterogénea de productos de reacción entre los que se encuentran derivados de carboxilisina, carboxicisteína e imidazolina. Los nombres de las proteínas modificadas por los azúcares reductores o por sus productos de degradación derivan de los productos de glucación avanzada o AGE (productos finales de glucación avanzada, del inglés *Advanced glycation end products*, ref. [3]).
- 45 **[0009]** La formación de proteínas modificadas, que se induce adicionalmente mediante reducción de azúcares, también es promovida por los productos de oxidación lipídica.
- 50 **[0010]** Más en detalle, la degradación oxidativa de los lípidos y, en particular, de los ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), implica la formación de especies reactivas de carbonilo (ERC) tales como, por ejemplo, los aldehídos alfa y beta-insaturados (hexenal, hidroxinonal, acroleína), los dialdehídos (malondialdehído) y los cetoaldehídos, forman bases de Schiff y aductos de Michael con los sustratos proteínicos. Los aductos proteínicos formados mediante adición covalente de proteínas con compuestos de aldehído generados mediante peroxidación lipídica se denominan ALE (productos finales de lipoxidación avanzada, del inglés *Advance Lipoxidation End Products*, ref. [4]).
- 55 **[0011]** La formación de AGE y ALE dentro de un proteoma complejo como el calostro, puede provocar una secuencia de respuestas biológicas potencialmente perjudiciales alterando al mismo tiempo las funciones biológicas de las mismas proteínas. Más en particular, cuando la proteína originalmente bioactiva se modifica covalentemente con la formación de AGE y ALE, su función biológica se ve comprometida de manera irreversible y esto puede deberse a diferentes mecanismos, como la conformación alterada, la alteración covalente del sitio activo y la formación de agregados. Los AGE y los ALE que inducen adicionalmente la pérdida de funcionalidad, son potencialmente dañinos ya que pueden ser inmunógenos y actuar como agonistas del receptor RAGE induciendo procesos inflamatorios y fibróticos, así como también inducir el resultado del proceso oxidativo mediante la
- 60
- 65

activación de la NADH oxidasa (véanse las referencias [5], [6]).

[0012] La formación de AGE y ALE en el calostro, la leche y los derivados de los mismos (por ejemplo, la leche en polvo y de almacenamiento a largo plazo) es impulsada por la exposición al aire, la temperatura y el almacenamiento. La presencia de AGE y ALE en dichas matrices se evalúa directamente mediante diferentes métodos analíticos, tales como, por ejemplo, análisis inmunoquímico (transferencia Western y ensayos ELISA) y espectrometría de masas ([7], [8]).

[0013] Un marcador bien conocido de la formación de AGE que puede evaluarse rutinariamente está representado por la furosina (o ϵ -furoilmetil-lisina), que es un producto de hidrólisis ácida de AGE:



Furosina

[0014] Ambas solicitudes de patente internacionales WO2013/098331 y WO2013/098333 (referencias [9], [10]) desvelan un proceso para la producción de mezclas de factores biológicos procedentes de calostro bovino. Sin embargo, el proceso desvelado no prevé ninguna etapa de reducción del contenido de lactosa inicialmente presente en el calostro, evitando de este modo la formación de AGE en el producto final.

[0015] Además, el contenido de caseína se reduce mediante el paso a través de una membrana de ultrafiltración cerámica de 300.000 Da. La criticidad más extrema de una operación de este tipo se ha observado a partir de un experimento a escala piloto, que en presencia de un producto altamente heterogéneo (con un contenido de grasa derivado de una etapa de centrifugación operada a una temperatura de 20-25 °C) conduce a una reducción tangible de la permeación de las proteínas activas, con la consiguiente reducción del rendimiento final.

[0016] El documento WO2011/064114 (ref. [11]) desvela un proceso para obtener una mezcla de factores biológicos derivados de calostro bovino (raza Holstein y Frisia) a través de una etapa inicial de microfiltración con un punto de corte molecular de 2-6 micrómetros que permite la separación de grasas y proteínas de gran tamaño, tales como caseínas y lactoalbúminas, de las proteínas séricas solubles, tales como los factores biológicos de interés. Como se esboza en el mismo documento, la eficacia de dicha extracción puede reducirse considerablemente debido a la formación de capas de caseínas lipídicas y coloidales sobre la superficie de la membrana de microfiltración con la consiguiente obstrucción de los poros de la propia membrana y la pérdida de factores activos que podrían permanecer retenidos en el retenido (véase la página 19, documento WO2011/064114). Además, la etapa de microfiltración permite la retirada de la fracción de lactoalbúmina, así como las fracciones lipídicas y de caseína. Como la lactoalbúmina tiene un peso molecular de 14,2 kDa, esto significa que también se eliminarán otras proteínas activas, por ejemplo, IGF (7,5 kDa), EGF (9 kDa), IL-17 (14 kDa) que muestran un peso molecular del mismo orden de tamaño o inferior al de la lactoalbúmina. A continuación, el permeado obtenido en la etapa de microfiltración se concentra mediante nanofiltración tangencial a través de una membrana que tiene un punto de corte molecular de 400 Da. De todos modos, el punto de corte molecular empleado no sería adecuado para el paso de lactosa en el permeado. Por tanto, en todo el proceso de extracción de acuerdo con el documento WO2011/064114 no desvela ninguna etapa de reducción del contenido de lactosa y, en consecuencia, de la formación de AGE. El documento WO2012087165 desvela un polvo lácteo enriquecido producido a partir de calostro bovino en varias etapas, incluyendo cristalización para la retirada de lactosa.

[0017] El documento WO2009135306 desvela otro método para la preparación de una mezcla procedente de calostro bovino, que implica etapas de calentamiento y ultrafiltración.

[0018] En consecuencia, existe un gran interés en el desarrollo de procesos para la extracción y purificación de fracciones de calostro bovino que contengan factores proteínicos sin cambios desde el punto de vista de la actividad biológica y que estén desprovistos de sustancias no deseables, como AGE y ALE.

[0019] Los autores de la presente invención han desarrollado ahora un proceso para la preparación de mezclas de

factores proteínicos procedentes de calostro bovino que tienen un perfil ventajoso de calidad y seguridad, que se caracteriza en particular por:

- 1) potenciación del contenido de factores proteínicos activos en el producto final;
- 2) contenido reducido de lactosa en el producto final (<1 %);
- 3) contenido reducido de AGE (furosina) y ALE en el producto final.

[0020] Adicionalmente, el proceso de la invención puede prever una única etapa de eliminación de los componentes de caseína y lipídicos con el consiguiente aumento del rendimiento final y la reducción global del tiempo de fabricación.

[0021] Las mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino obtenidas de este modo muestran una inmunogenia reducida, además de una mayor concentración de factores proteínicos activos cuya actividad no se ve comprometida por los eventos de glucación y carbonilación.

[0022] Por tanto, es un objeto de la presente invención un proceso para la preparación de mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino que comprende las siguientes etapas:

- a) dilución de calostro bovino, desnatado y precipitación de caseína a un pH comprendido entre 4 y 6; preferentemente al pH isoelectrico de la caseína (4,6);
- b) centrifugación para retirar los componentes lipídicos y de caseína, preferentemente a 4000 rpm;
- c) concentración y diafiltración sobre membrana polimérica con un corte molecular entre 1.000 y 20.000 Da, preferentemente 4.000 Da, para reducir el contenido de lactosa;
- d) ajuste del pH alrededor de la neutralidad (que está en el intervalo de $6,5 \pm 1$) y centrifugación, preferentemente a 8500 rpm;
- e) filtración;
- f) llenado de tambores y congelación;

en donde la etapa c) se repite para obtener un límite de contenido de lactosa del ≤ 1 % calculado con respecto al peso seco, es decir, como concentración de lactosa por HPLC/peso seco x 100.

[0023] De acuerdo con una realización alternativa del proceso de acuerdo con la invención, es posible prever una etapa g) de criodesecación del producto final, una vez congelado.

[0024] Preferentemente, la etapa de filtración e) comprende una etapa de prefiltración realizada sobre filtros de porosidad comprendidos entre 0,5 μm y 2 μm , preferentemente de 0,5 μm , para facilitar la filtración esterilizante posterior realizada con filtros de porosidad comprendidos entre 0,45 y 1 μm , preferentemente de 0,2 μm .

[0025] De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las etapas críticas a) y c) del proceso se realizan en las siguientes condiciones:

a) Dilución del calostro, desnatado y precipitación de caseína:

[0026] El calostro se diluye con un volumen de agua (o solución salina) comprendido entre 0,5 y 100 volúmenes, preferentemente 1-10 volúmenes, más preferentemente 1 volumen. La suspensión se calienta entre 10-60 $^{\circ}\text{C}$, preferentemente a 38 $^{\circ}\text{C}$. Después, las caseínas se precipitan cambiando el pH de la suspensión entre 4-6, preferentemente a 4,6 (pH isoelectrico de la caseína). La precipitación de caseína va seguida de una etapa de centrifugación.

[0027] El componente de caseína se elimina mediante precipitación a un pH correspondiente al punto isoelectrico de la caseína y después se centrifuga. De esta manera, es posible obtener un sobrenadante con un contenido alto de factores activos y la consecuente potenciación del rendimiento final.

[0028] Los factores esenciales presentes en el calostro de partida permanecieron casi sin cambios en el sobrenadante obtenido después de la centrifugación que se transporta a la siguiente etapa.

c) Concentración y diafiltración sobre membrana polimérica de ultrafiltración entre 1000 y 20000 Da, preferentemente 4000 Da:

[0029] En dicha etapa, el calostro anteriormente desnatado desprovisto del componente de caseína, se concentra en primer lugar y después se somete a diálisis contra agua.

[0030] Esta operación (diafiltración o diálisis), junto con el uso de una membrana que tiene un punto de corte adecuado para el paso de lactosa en el permeado, permite la reducción hasta el umbral deseado. Dicha operación se conduce a conseguir un valor de lactosa en el retenido inferior o igual al 1 % calculado sobre el peso seco, es decir, como concentración de lactosa por HPLC/peso seco x 100.

[0031] La reducción sustancial del contenido de lactosa permite reducir drásticamente la formación de AGE en el producto final así como el desnatado evita la formación de ALE.

5 **[0032]** Además, no habrá presencia de polipéptidos ricos en Prolina (PRP) ni ácido siálico en el producto final (límite de detección del 1 %) ya que se aislarán mediante la diafiltración empleando membranas con un punto de corte de 4 kDa (véase el Ejemplo 5).

10 **[0033]** Es un objeto adicional de la presente invención una mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino que tenga un contenido de lactosa del $\leq 1\%$ con respecto al peso seco. Dicha mezcla de factores proteínicos se caracteriza adicionalmente por un contenido proteínico superior al 90 % (calculado mediante el método de Kjeldahl).

15 **[0034]** Además, la invención contempla una composición farmacéutica que comprende dicha mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino junto con excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables adicionales.

20 **[0035]** Preferentemente, la composición farmacéutica anterior es adecuada para la aplicación tópica o para la administración oral.

25 **[0036]** Es otro objeto de la presente invención una composición farmacéutica para la aplicación tópica que comprenda dicha mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino junto con excipientes y/o adyuvantes farmacéuticamente aceptables adicionales, para el tratamiento de afecciones patológicas que requieren la reparación o regeneración de tejidos.

30 **[0037]** De acuerdo con una realización preferida de la presente invención, las afecciones patológicas anteriores comprenden úlceras o lesiones cutáneas, quemaduras, lesiones bucales, lesiones corneales, lesiones de la mucosa nasal, lesiones mediadas por el virus del herpes y cicatrización de heridas.

35 **[0038]** Las composiciones farmacéuticas para la aplicación tópica de acuerdo con la invención están preferentemente en forma de crema, pomada, polvo, gel, loción, enjuague bucal, tampón, parches transdérmicos.

40 **[0039]** Por último, la invención se refiere a un complemento dietético que comprende la mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino, opcionalmente en asociación con uno o más ingredientes adicionales que son aceptables desde el punto de vista dietético.

[0040] La presente invención se desvelará ahora con fines ilustrativos pero no limitantes, de acuerdo con una realización preferida con referencia particular a los dibujos adjuntos, en donde:

- 40 - La Figura 1 muestra un esquema de flujo del proceso para la preparación de las mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino de acuerdo con la presente invención;
- 45 - La Figura 2 muestra el análisis por transferencia Western realizado en tres lotes diferentes (Q194/(1)47, Q194/(1)48, Q194/(1)49) usando anticuerpos policlonales contra carboximetil-lisina y los aductos de hidroxinonenal (marcador de ALE); como control positivo, se han utilizado albúminas modificadas con HNE (HNE-BSA) y carboximetil-lisina (CML-BSA);
- 50 - La Figura 3 muestra las imágenes de microscopio de campo claro de la evaluación morfológica de la monocapa celular no tratada (panel A), la monocapa celular tratada con Formulación en Gel 1 (panel B), la monocapa celular tratada con Formulación en Gel 2 (panel C);
- 55 - La Figura 4 ilustra el modelo murino de úlceras por presión mediante el uso de imanes colocados externamente para crear los eventos isquémicos de la lesión por isquemia reperusión (IR);
- La Figura 5 muestra las imágenes del análisis macroscópico cutáneo de piel dorsal del grupo de control de ratones después de 3 ciclos de IR que revelaron la presencia de lesiones cutáneas leves, edema y signos de necrosis de la epidermis;
- La Figura 6 muestra las imágenes del análisis histopatológico de muestras cutáneas dorsal de los ratones del grupo de control teñidas con hematoxilina-eosina;
- La Figura 7 muestra las imágenes del análisis macroscópico cutáneo de piel dorsal del grupo de ratones tratado con la crema que contenía el extracto de calostro bovino al 4 % de la invención;
- 60 - La Figura 8 muestra las imágenes del análisis histopatológico de muestras cutáneas dorsales del grupo de ratones tratado con la crema que contenía el extracto de calostro bovino el 4 % de la invención;
- La Figura 9 muestra el análisis por CL-IEN-EM del perfil de PRP en el permeado de la mezcla sin lactosa de factores proteínicos procedentes de calostro bovino derivado de la etapa de ultrafiltración y diafiltración a través de una membrana de punto de corte de 4000 Da.

65 **Ejemplo 1:** Proceso para la extracción de mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino con un contenido reducido de AGE y ALE

Material de partida

[0041] Se recoge calostro bovino de vacas Holstein dentro de las primeras 6 horas después del parto. Posteriormente, se congela y se almacena a -20 °C.

5

Etapas productivas del proceso

[0042] La Figura 1 muestra un esquema ilustrativo de las etapas del proceso de acuerdo con la presente invención, que puede resumirse como se indica a continuación:

10

- Dilución con agua del calostro descongelado (volumen igual)
- Desnatado y precipitación de caseína en el punto isoeléctrico (pH 4,60)
- Centrifugación a 4000 rpm con centrifugadora Alfa Laval mod. FL118 para eliminar la grasa y la caseína precipitadas
- 15 - Reducción del contenido de lactosa: concentración y diafiltración en una membrana polimérica de 4000 Da
- Ajuste del pH a $7,0 \pm 0,2$
- Centrifugación a 8500 rpm con centrifugadora Alfa Laval mod. LAB 102 B-25
- Prefiltración en un filtro de cartucho de 0,5 μm y filtración en un filtro absoluto de 0,2 μm para retirar posibles microorganismos (es decir, bacterias, mohos y levaduras)
- 20 - Envasado
- Congelación a -20 °C
- Criodesecación

Dilución de calostro con agua, desnatado y precipitación de caseína

25

[0043] Un reactor de acero inoxidable de 250 litros equipado con sistema de agitación, termostato y sonda para medir el pH, se llena con 100 kg de calostro bovino (almacenado a -20 °C y descongelado preventivamente a temperatura ambiente, 20- 25 °C) y se diluye con un volumen de agua potable obteniendo de este modo una suspensión de 200 litros. Dicha suspensión se calienta, con agitación, a una temperatura de 38 ± 1 °C. Después de aproximadamente 1 h, se realiza una precipitación de caseína mediante acidificación hasta pH 4,6. Después de 1 h de agitación, se realiza una centrifugación.

30

Centrifugación a 4000 rpm para eliminar precipitados de grasa y caseína

35

[0044] El reactor se descarga y se realiza una centrifugación para eliminar todos los precipitados (grasa y caseínas).

Reducción del contenido de lactosa y diafiltración en una membrana polimérica de 4000 Da

40

[0045] La fracción transparente separada mediante centrifugadora se concentra usando membranas de ultrafiltración con un punto de corte molecular de 4000 Da con el fin de permitir el paso de lactosa al permeado y retener el componente proteínico en el concentrado.

45

[0046] El retenido se concentra hasta un volumen de aproximadamente 1:3 con respecto al volumen inicial; después de que se realiza una diafiltración contra agua hasta que se consigue el contenido de lactosa deseado en el retenido (inferior o igual al 1 % con respecto al peso seco).

50

[0047] El contenido de lactosa en la solución se determina mediante HPLC (Perkin Elmer con columna Transgenomic ICE SEP Ion 300, eluyente de ácido sulfúrico 0,015 N, temperatura 45 °C, caudal 0,4 ml/min).

Ajuste de pH y centrifugación a 8500 rpm

55

[0048] El pH del retenido diafiltrado se ajusta a la neutralidad, seguido de centrifugación a 8500 rpm con una centrifugadora Alfa Laval Mod. FL118 para aclarar la solución antes de la etapa de filtración.

Prefiltración de 0,5 μm y filtración de 0,2 μm

60

[0049] La solución se filtra con filtros de cartucho absoluto de 0,5 μm (es decir, Sartorius, Millipore, Pall, etc.) y, si es necesario, con filtros de cartucho absoluto de 0,2 μm adicionales (es decir, Sartorius, Millipore, Pall, etc.).

Llenado de tambores y congelación

65

[0050] El producto filtrado se transporta directamente al recipiente colector para el almacenamiento u opcionalmente para la criodesecación.

Criodesecación

[0051] El producto congelado se somete a un proceso de criodesecación que comienza a una temperatura de -50 °C y se detiene a una temperatura de 25-30 °C.

5 **Ejemplo 2:** *Análisis cualitativo-cuantitativo del producto final mediante el proceso de la invención*

MATERIALES Y MÉTODOS

10 [0052] Se han medido dosificaciones de inmunoglobulinas, factores de crecimiento y factores del complemento mediante ensayo ELISA.

[0053] Para la medición de los niveles de lactosa y furosina, se realizó un análisis por HPLC.

15 RESULTADOS

[0054] Los resultados del análisis realizado sobre el producto criodesecado que deriva de tres lotes diferentes (Q194/47, Q194/48, Q194/49) obtenidos a través del proceso que se desvela en el Ejemplo 1, se ilustran en la siguiente Tabla 1.

20

TABLA 1

Lote	Q194/(1)47	Q194/(1)48	Q194/(1)49
Lactoferrina µg/mg liófila	6,7	5,7	9,3
Transferrina µg/mg liófila	1,1	1,8	1,3
IgA mg/mg liófila	0,19	0,1	0,13
IgM mg/mg liófila	0,2	0,3	0,23
IgG mg/mg liófila	0,6	0,67	0,6
IGF ng/mg liófila	2,0	0,8	2,2
TGFβ pg/mg liófila	9,8	12,8	20,9
IFN-γ pg/mg liófila	3,2	9,0	2,3
TNFα pg/mg liófilo	26	66	25
IL-2 pg/mg liófila	2,3	5,2	2,3
C3A pg/mg liófila	1,2	2,1	1,1
C4A pg/mg liófila	1,1	0,7	1,5

[0055] Dicha mezcla de factores proteínicos se caracteriza adicionalmente por un contenido proteínico mayor del 90 % (calculado mediante el método de Kjeldahl).

25 [0056] Los resultados relativos a las dosificaciones de lactosa y furosina sometidas a ensayo en los tres lotes se representan en la siguiente Tabla 2.

TABLA 2

	Q194/(1)47	Q194/(1)48	Q194/(1)49
Lactosa	0,06 %	0,26 %	0,56 %
Furosina	42,3 ± 5,7 mg/100 g de proteína	56,3 ± 6,4 mg/100 g de proteína	55,0 ± 6,3 mg/100 g de proteína

30 [0057] Del análisis de la Tabla 2 anterior puede inferirse un contenido de lactosa inferior al 1 % y un contenido de furosina extremadamente reducido.

[0058] Para confirmar adicionalmente la eficacia del proceso propuesto con el fin de reducir la formación de AGE y ALE, se ha realizado un análisis de transferencia Western en los tres lotes anteriores.

35

[0059] El análisis prevé la separación electroforética por SDS-PAGE del proteoma, seguida de transferencia en gel sobre membrana de nitrocelulosa y posterior identificación de AGE y ALE usando anticuerpos policlonales anti-carboximetil-lisina (marcador de AGE) y los aductos de hidroxinonal (marcador de ALE). Como controles positivos se han utilizado albúminas modificadas con HNE (HNE-BSA) y carboximetil-lisina (CML-BSA).

40

[0060] Los resultados representados en la Figura 2 muestran la ausencia de cualquier banda referible a aductos de proteínas CML y HNE en los tres lotes analizados. Por el contrario, las bandas convencionales son bien visibles.

45 **Ejemplo 3:** *Evaluación comparativa in vitro de la actividad de cicatrización de heridas de una formulación en gel que comprende la mezcla de factores proteínicos de la invención*

[0061] El fin de este ensayo es comparar la eficacia de formulaciones en gel que comprenden la mezcla de factores proteínicos de la invención en la reparación de heridas simulando esta situación *in vitro* haciendo un corte en monocapas celulares de fibroblastos humanos y después comparando la aproximación de los bordes del corte en células tratadas y no tratadas.

5

MATERIALES Y MÉTODOS

Estirpes celulares

10 **[0062]** Se emplearon fibroblastos humanos de estirpe celular de la derma (HuDe) para el ensayo de MTT y fueron adquiridos por el Istituto Zooprofilattico sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia, Italia.

Control negativo (C-): células HuDe no tratadas.

15

Control de calidad (CC): control interno que consiste en suero de ternera recién nacido (NBCS) del 15 % con actividad de cicatrización de heridas conocidas. Las células se cultivaron hasta que alcanzaron la confluencia, la monocapa se lesionó y, por último, las células se cultivaron en un medio que contenía suero de ternera fetal enriquecido con factores de crecimiento de fibroblastos (15 %).

Formulaciones en gel sometidas a ensayo:

20

[0063] Se han preparado y sometido a ensayo las siguientes formulaciones en gel con o sin el extracto de calostro bovino de acuerdo con la invención.

- Formulación en Gel 1 con extracto de calostro (código interno A113-003D):

Denominación INCI	% p/p
Agua	89,250
Zumo de hoja de <i>Aloe barbadensis</i>	2,000
Extracto de calostro bovino	1,800
Hidroxietilcelulosa	1,500
Goma de xantano de <i>Chondrus Crispus</i> (carrageninas)	1,100
Policarbófilo AA1	0,800
Fenoxietanol	0,750
Hidróxido de sodio	0,500
Extracto glicólico de <i>Melissa officinalis</i>	0,500
Benzoato de sodio	0,500
Sorbato de potasio	0,500
Sacarosa	0,300
Sacarina de sodio	0,200
Imidazolidinil Urea	0,200
Aroma	0,100

25

- Formulación en Gel 2 (sin principios activos):

Denominación INCI	% p/p
Agua	91,05
Zumo de hoja de <i>Aloe barbadensis</i>	2,000
Hidroxietilcelulosa	1,500
Goma de xantano de <i>Chondrus Crispus</i> (carrageninas)	1,100
Policarbófilo AA1	0,800
Fenoxietanol	0,750
Hidróxido de sodio	0,500
Extracto glicólico de <i>Melissa officinalis</i>	0,500
Benzoato de sodio	0,500
Sorbato de potasio	0,500
Sacarosa	0,300
Sacarina de sodio	0,200
Imidazolidinil Urea	0,200
Aroma	0,100

Ensayo MTT preliminar

30

[0064] Con el fin de seleccionar las concentraciones de las formulaciones en gel que han de usarse para el ensayo comparativo (no concentraciones citotóxicas para las células) también se realizó un ensayo de MTT preliminar de

cultivos celulares de fibroblastos (Hude).

5 **[0065]** Se trataron células con concentraciones a escala de las dos formulaciones en gel con o sin principios activos (tan bajas como de 1 mg/ml y diluciones posteriores 1:2) y se usaron células no tratadas como control negativo.

[0066] El ensayo de MTT se realiza en células tratadas con formulaciones en gel que tienen las siguientes concentraciones diferentes: 1 mg/ml-0,25 mg/ml y 0,15 mg/ml.

10 **[0067]** Se extiende un número adecuado de células en los pocillos (placa de 96 pocillos, 150 µl/pocillo de suspensión celular).

15 **[0068]** Una vez que se ha alcanzado una confluencia del 60-70 %, se añade medio fresco con diluciones a escala de formulaciones en gel sometidas a ensayo (comenzando a 1 mg/ml y dilución posterior 1:2).

[0069] La incubación con las diferentes formulaciones en gel dura toda la noche (24 horas). Después de la sustitución del medio con medio fresco + MTT, las células se incuban durante 3 h a 37 °C. Después, las células se lavan más veces para eliminar desechos de solución de MTT.

20 **[0070]** La lectura del fluorímetro se realiza a una longitud de onda de 540 nm.

Simulación de heridas

25 **[0071]** Después de hacer un corte en la monocapa celular de fibroblastos confluentes (simulación de una herida) a través del uso de una aguja de jeringa de insulina para simular una herida, las células se trataron con las dos formulaciones en gel que tenían la concentración elegida, como control negativo se usaron células no tratadas y, como control de calidad interno, un patrón con actividad conocida de actividad de cicatrización de heridas.

30 **[0072]** Por tanto, se han realizado las siguientes evaluaciones:

- una evaluación morfológica de la monocapa
- ensayo de MTT
- dosificación de interleucina IL8.

35 Evaluación morfológica

[0073] La evaluación morfológica de la monocapa se realizó mediante la obtención de fotos de microscopio de campo claro para verificar el adelgazamiento/cierre del corte con el acercamiento/confluencia de los colgajos.

40 Ensayo de MTT

[0074] El ensayo se bloquea (después de aproximadamente 96 horas) y se realiza un ensayo de MTT para evaluar la viabilidad de las células. El ensayo de MTT se realiza en células tratadas con concentraciones de opciones de producto iguales a 1-0,25 mg/ml y 0,15 mg/ml.

45 Ensayo de IL8

[0075] La dosificación de la IL8 se realiza en el sobrenadante de las células no tratadas y las células tratadas con formulaciones en gel que tienen las siguientes concentraciones diferentes 1 mg/ml-0,25 mg/ml y 0,15 mg/ml.

50 **RESULTADOS**

Ensayo preliminar de viabilidad celular

55 **[0076]** Los resultados se proporcionan como Densidad Óptica (D.O.) que es proporcional a las células vivas. Después se calculó el % de viabilidad celular de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{\text{(muestra de D.O. promedio)}}{\text{(control de D.O. promedio)}} * 100$$

60 **[0077]** Basándose en los resultados obtenidos, se eligieron concentraciones de 1 mg/ml-0,25 mg/ml y 0,15 mg/ml en las formulaciones en gel con o sin principios activos para realizar el ensayo de MTT. Las tablas 3 y 4 representan los resultados de D.O. obtenidos con las Formulaciones en gel 1 y 2 en todo el intervalo de concentraciones

analizado.

TABLA 3: Formulación en Gel 1 con extracto de calostro

Muestra (mg/ml)	1	0,5	0,25	0,125	0,062	0,031	0,015	0,0078	Control negativo
D.O.	0,54	0,52	0,537	0,55	0,55	0,55	0,49	0,58	0,55
% de viabilidad celular	97,5	94,6	97,1	99,30	99,4	99,8	89,8	105,40	100,00

5

TABLA 4: Formulación en gel base 2 sin extracto

Muestra mg/ml	1	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0312	0,0156	0,0078	Control negativo
D.O.	0,54	0,56	0,56	0,57	0,57	0,58	0,60	0,61	0,593
% de viabilidad celular	91,4	95,0	94,9	95,8	95,9	97,2	101,5	102,9	100

10

[0078] A partir de la evaluación morfológica se observó un enfoque neto de los colgajos de la monocapa en las placas tratadas con las diversas concentraciones de Formulación en Gel 1 en comparación con las placas con las células no tratadas y las placas tratadas con Formulación en Gel 2 (véase la Figura 3, paneles A-C). La Figura 3A muestra que no se observa ninguna aproximación de los bordes del corte en la monocapa de células no tratadas; la Figura 3B muestra que se observa una aproximación evidente de los bordes del corte con un cierre casi total del mismo en las células tratadas con Formulación en Gel 1 (con principios activos); la Figura 3C muestra que se observa cualquier aproximación de los bordes del corte en las células tratadas con Formulación en Gel 2 (sin principios activos).

15

[0079] El ensayo de MTT mostró un aumento en la viabilidad celular de fibroblastos en las placas tratadas con Formulación en Gel 2 para indicar la eficacia de la formulación base sin principios activos en la nutrición de la célula, mientras que la viabilidad de fibroblastos en las placas tratadas con Formulación en Gel 1 demostró ser comparable a la de las células no tratadas, lo que indica la ausencia total de citotoxicidad del dispositivo médico sometido a ensayo, y demostró una modulación del metabolismo de las células que dio como resultado células sanas y viables y capaces de reconstruir la monocapa donde se realizó el corte (véase la Figura 3).

20

[0080] Los resultados del ensayo de MTT se proporcionan como Densidad Óptica (D.O. que es proporcional a las células vivas) y se representan en las Tablas 5 y 6. CC es el control de calidad, que es un control interno con actividad conocida de cicatrización de heridas:

25

[0081] después se calculó el % de inhibición de la viabilidad celular de acuerdo con la fórmula:

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \frac{(\text{muestra de D.O. promedio})}{(\text{control de D.O. promedio})} * 100$$

30

TABLA 5: Formulación en Gel 1

Muestra mg/ml	1	0,25	0,15	Control negativo	CC
D.O. promedio	1,419	1,473	1,648	1,586	2,566
% de vitalidad celular	89,50	92,87	103,89	100,00	161,78

TABLA 6: Formulación en Gel 2

Muestra mg/ml	1	0,25	0,15	Control negativo	CC
D.O. promedio	2,048	1,628	1,590	1,586	2,566
% de vitalidad celular	129,12	102,63	100,28	100,00	161,78

Evaluación de la actividad antiinflamatoria

35

[0082] Los resultados del ensayo de citocinas IL-8 se proporcionan como Densidad Óptica (D.O.) y pg/ml, que son proporcionales a las IL-8 inducidas.

40

[0083] El % de reducción de interleucina 8 en las muestras se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\% = 100 - \frac{(\text{muestra de IL8 pg/ml})}{(\text{control de IL8 pg/ml})} * 100$$

[0084] La dosificación de IL8 mostró una disminución significativa en el % de IL8 a concentraciones de 1 y

0,25 mg/ml en ambas formulaciones en gel sometidas a ensayo, mostrando, por tanto, una acción antiinflamatoria comparable sobre los fibroblastos.

[0085] Los resultados se representan en las siguientes Tablas 7 y 8.

5

TABLA 7: Formulaci3n en Gel 1

Muestra	Control negativo	1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,15 mg/ml
D.O. Valor medio	1,9	1,292	1,659	1,755
Valor medio pg/ml	3.064,727	1.959,970	2.627,693	2.838,670
% de IL8	100	63,95	85,74	92,62
% de reducci3n de IL8	0	36,05	14,26	7,38

TABLA 8: Formulaci3n en Gel 2

Muestra	Control negativo	1 mg/ml	0,25 mg/ml	0,15 mg/ml
D.O. Valor medio	1,9	1,392	1,623	1,779
Valor medio pg/ml	3.064,727	2.140,429	2.560,639	2.844,373
% de IL8	100	69,84	83,55	92,81
% de reducci3n de IL8	0	30,16	16,45	7,19

10 [0086] Estos resultados indican en general que la eficacia de los ingredientes activos del extracto de calostro presente en la Formulaci3n en Gel 1 tiene un objetivo diferente que la reducci3n de la respuesta inflamatoria.

[0087] Los resultados obtenidos han demostrado la eficacia en la cicatrizaci3n de heridas de la Formulaci3n en Gel 1, en comparaci3n con la misma formulaci3n b3sica sin principios activos (Formulaci3n en Gel 2).

15

[0088] De hecho, la Formulaci3n en Gel 2 mostr3 una actividad "nutriente" para los fibroblastos *in vitro* pero no fue capaz de estimular la cicatrizaci3n de heridas (simulaci3n *in vitro* cortando la monocapa de fibroblastos cultivados y sin pruebas de la aproximaci3n de los bordes del corte), actividad que se debe a la presencia de los factores prote3nicos activos presentes en la Formulaci3n en Gel 1.

20

Ejemplo 4: *Evaluaci3n del efecto protector del uso t3pico del extracto de calostro bovino de la invenci3n en un modelo murino de 3lceras por presi3n*

MATERIALES Y M3TODOS

25

Formulaci3n en crema al 4 % sometida a ensayo:

[0089] Se ha preparado y sometido a ensayo la siguiente formulaci3n en crema que contiene el extracto de calostro bovino (4 %) de acuerdo con la invenci3n.

30

Denominaci3n INCI	% p/p
Agua	67,420
Benzoato de alquilo C12-15	5,000
Estearato de glicerilo (y) Estearato de PEG-100	5,000
Calostro PP013 AIM	4,000
Estearato de octilo	4,000
Alcohol cetear3lico	3,000
Aceite de <i>Prunus amygdalus dulcis</i>	3,000
Glicerina	3,000
Ciclometicona	2,000
Cera Alba	1,000
Acetato de tocoferilo	1,000
Fenoxietanol	0,750
Octenilsuccinato de almid3n de aluminio	0,350
Imidazolidinil urea	0,280
EDTA dis3dico	0,200

Animales

[0090] Se emplearon ratones hembra CD-1 de 10 semanas de edad (en el n3mero de 8 animales) suministrados por Charles River, Calco, Italia. El peso estaba entre 20-25 g al comienzo del ensayo.

35

Enjaulamiento

- 5 [0091] Cada ratón se enjauló en jaulas de 160x270x370 mm durante dos semanas antes del comienzo del ensayo.
- [0092] El control automático garantizó 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad.
- [0093] Una planta de acondicionamiento reguló la temperatura ambiente y la humedad.

10 Limpieza y desinfección

[0094] Las jaulas y la sala de alojamiento se limpiaron antes de alojar a los animales, después, la limpieza y la desinfección se realizaron dos veces por semana.

15 Alimentación

[0095] Los animales fueron alimentados a demanda con una dieta granulada convencional, proporcionada por el Laboratorio Dottori Piccioni (Italia).

20 Agua

[0096] A los animales se les proporcionó agua purificada, disponible a demanda y distribuida a través de un sistema de agua automático.

25 [0097] Los animales seleccionados para el estudio se alojaron individualmente en 14 jaulas numeradas.

[0098] Los animales utilizados en el estudio se asignaron aleatoriamente a los diferentes grupos de tratamiento al comienzo del estudio.

30 Diseño del estudio

[0099] El estudio publica el desarrollo de un modelo murino de úlceras por presión mediante el uso de imanes colocados externamente para crear los eventos isquémicos de la lesión por isquemia reperusión (IR).

35 [0100] Los animales se alojaron individualmente, se les afeitó el lomo, se limpiaron con alcohol, la piel se tiró suavemente hacia arriba y se colocó entre dos placas magnéticas de cerámica redondas que tenían un diámetro de 12 mm (113 mm²) y 5 mm de espesor, con un peso promedio de 2,4 g y fuerzas magnéticas de 1.000 G; Este proceso crea una presión de compresión de 50 mmHg entre los dos imanes (véase la Figura 4).

40 [0101] Después, los animales se dividieron en dos grupos como se indica a continuación:

1) Grupo de control: se realizaron tres ciclos de IR en 3 ratones para iniciar la formación de úlceras de decúbito. Un solo ciclo de IR consiste en un período de colocación de los imanes de 12 horas, seguido de una liberación de período de descanso de 12 horas. Después de los 3 ciclos de IR, los animales se sacrificaron. Grupo B: se realizaron tres ciclos de IR en cada ratón para iniciar la formación de úlceras de decúbito. Se aplicó una administración tópica de 200 mg de la crema que comprende extracto de calostro bovino al 4 % de la invención sobre los lomos de cada ratón el día anterior al primer ciclo de IR y al final de cada ciclo de compresión.

50 [0102] Después de los 3 ciclos de IR, los animales se sacrificaron. Se recogieron muestras de piel de cada ratón del área tratada, se fijaron en formol tamponado con fosfato al 10 % y se incrustaron en cera. Se obtuvieron secciones de 2 µm de espesor y se recogieron en portaobjetos silanizados y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Después, las muestras se observaron con un microscopio óptico Nikon 80i, equipado con una cámara digital.

55 RESULTADOS

Análisis macroscópico cutáneo

60 [0103] El análisis macroscópico cutáneo de la piel dorsal del grupo de control (después de 3 ciclos de IR) reveló la presencia de lesiones cutáneas leves, edema y signos de necrosis de la epidermis (véase la Figura 5).

Análisis histopatológico

65 [0104] El análisis histológico de muestras de piel dorsal teñidas con hematoxilina-eosina mostró: área ulcerosa amplia de la epidermis; espongirosis marcada de la capa basal (los puentes intercelulares aparecen muy prominentes); infiltrado inflamatorio difuso marcado; edema conectivo; hiperemia vascular; presencia de eritrocitos extravasales (véase la Figura 6).

2) Grupo B: 3 ciclos de IR + Formulación en Crema al 4 % al final de cada ciclo de compresión y el día anterior al primer ciclo de IR.

5 Análisis macroscópico cutáneo

[0105] El análisis macroscópico de la piel dorsal reveló: úlceras cutáneas con áreas necróticas y edema (véase la Figura 7).

10 Análisis histopatológico

[0106] El análisis histológico de muestras de piel dorsal teñidas con hematoxilina-eosina mostró: área ulcerosa amplia de la epidermis; cuando la epidermis presente es hiperplásica, sin espesor regular, espongiosis marcada de la capa basal y presencia de linfocitos; infiltrado inflamatorio difuso marcado; edema conectivo; hiperemia vascular; presencia de eritrocitos extravasales (véase la Figura 8).

Ejemplo 5: Evaluación de la presencia de los polipéptidos ricos en Prolina (PRP) en la preparación que contiene la mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino producida de acuerdo con el procedimiento de la invención

[0107] Los polipéptidos ricos en prolina (PRP) contenidos en el calostro bovino son polipéptidos enriquecidos en prolina (aproximadamente el 22 %) y aminoácidos ácidos, aunque son pobres en alanina, glicina, arginina, metionina e histidina y carecen de triptófano y cisteína [12].

[0108] Inicialmente, se identificaron PRP, también definidas como Clostrinina (CLN), como una única proteína con un peso molecular de aproximadamente 17-18 kDa. Estudios adicionales permiten una mejor caracterización de PRP que están hechos de al menos 32 polipéptidos con un intervalo de masa entre 0,5 y 3 kDa [12]. Existen varios métodos para la purificación de PRP basados esencialmente en una primera extracción alcohólica seguida de filtración tangencial que permite la separación de PRP, caracterizadas por un PM bajo en comparación con los componentes proteínicos caracterizados por un PM mayor.

[0109] Por ejemplo, Sokolowska et al. [13] desvelaron un método basado en la extracción de metanol al 60 % seguido de diafiltración usando fibra hueca con un punto de corte de 10 kDa. El filtrado obtenido se concentró en fibra hueca con un punto de corte de 1 kDa.

[0110] A través de análisis por CL-IEN-EM y ensayo de degradación de Edman, se identificó un conjunto de péptidos pertenecientes a la familia de PRP [12]. La siguiente Tabla 9 representa la lista de los polipéptidos identificados y sus respectivos PM.

40 TABLA 9: PRP publicados actualmente en la bibliografía

PRP	Peso molecular
DKE	390
LNf	392
SEQP (SEQ ID NO:1)	459
VVMEV (SEQ ID NO:2)	575
SEEMP (SEQ ID NO:3)	591
DSQPPV (SEQ ID NO:4)	641
CPQSVH (SEQ ID NO:5)	669
VLPPNVG (SEQ ID NO:6)	694
DPPPPQS (SEQ ID NO:7)	736
MQPPPLP (SEQ ID NO:8)	778
KYKLQE (SEQ ID NO:9)	807
AFLLYQE (SEQ ID NO:10)	882
RGPFILV (SEQ ID NO:11)	898
SLPQNILPL (SEQ ID NO:12)	994
VYPFTGPIV (SEQ ID NO:13)	1006
VESYVPLFP (SEQ ID NO:14)	1050
TQTPVVVPPF (SEQ ID NO:15)	1084
QPLPPTVMFP (SEQ ID NO:16)	1126
SWMHQPPQLP (SEQ ID NO:17)	1220
MPQNFYKLPQM (SEQ ID NO:18)	1396
LFFFLPVVNVLP (SEQ ID NO:19)	1403

(continuación)

PRP	Peso molecular
AFLLYQEPVLGPV (SEQ ID NO:20)	1445
MHQPPQPLPPTVMF (SEQ ID NO:21)	1619
VLEMKFPQQETVT (SEQ ID NO:22)	1712
DLEMPVLPVEFPFV (SEQ ID NO:23)	1728
LKPFKLVVEVFPF (SEQ ID NO:24)	1785
LQTPQPLLQVMMEPQGD (SEQ ID NO:25)	1924
SLTLTDVEKLHLPLVQ (SEQ ID NO:26)	2015
LQPEIMGVPKVKETMVPK (SEQ ID NO:27)	2023
DQPPDVEKPDLPFQVQS (SEQ ID NO:28)	2066
ATFNRYQDDHGEEILKSL (SEQ ID NO:29)	2135
HKEMPFKYPVEPFESQ (SEQ ID NO:30)	2190
LSQPKVLPVQKAVPQPDMPQ (SEQ ID NO:31)	2409

[0111] De la tabla anterior puede inferirse que menos de la mitad de los PRP publicados (un 42 %) tienen un PM < 1000 Da y más del 82 % se caracterizan por un PM < 2000 Da.

5

[0112] El proceso para la producción del preparado sin lactosa que contiene mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino de la invención, prevé la diafiltración del centrifugado obtenido, usando membranas de ultrafiltración con un punto de corte de 4000 Da. Dicha operación, además de concentrar el centrifugado, permite el agotamiento de lactosa y, en general, el agotamiento de los componentes de PMB, tales como ácido siálico (PM = 309).

10

[0113] Sobre la base de la distribución de PM de los PRP publicados anteriormente, queda claro que la etapa de diafiltración anterior es capaz de separar los PRP junto con los componentes de PMB, tales como el ácido siálico. Para confirmar la predicción anterior, se realizó un análisis por CL-IEN-EM/EM de la preparación sin lactosa que contiene los factores proteínicos procedentes de calostro bovino de la invención (indicados en el presente documento como Retenido) y del permeado obtenido de la diafiltración y concentrado adicionalmente mediante ósmosis (indicados en el presente documento como Permeado).

15

[0114] El análisis por CL-IEN-EM se ha realizado en modo EM/EM (modo de barrido dependiente de datos) usando un sistema Thermo Finningam Surveyor™ (ThermoFinningam Italia, Ródano, Milán, Italia) equipado con bomba cuaternaria, automuestreador termostatzado y sistema de desgasificación al vacío conectado con un espectrómetro de masas de triple cuadrupolo Finningam TSQ Quantum Ultra™ (ThermoFinningam Italia, Ródano, Milán, Italia). Los datos se elaboraron usando el software Xcalibur™ (ThermoFinningam).

20

[0115] La separación cromatográfica se obtuvo a través de elución inversa usando una columna Phenomenex Sinergy polar-FI (150 X 2 mm; diámetro de partículas 4 µm; Chemtek Analítica, Anzola Emilia, Bolonia, Italia) protegida por una precolumna polar-FI (4 X 2 mm; diámetro de partículas 4 µm; Chemtek Analítica, Anzola Emilia, Bolonia, Italia), mantenida a una temperatura de 25 °C mediante un termostato. El caudal de la fase móvil se ha mantenido a 0,2 ml min⁻¹ con un gradiente lineal del 100 % de fase A (ácido fórmico al 0,1 % en H₂O) al 80 % de fase B (CH₃CN) en 24 minutos, seguido de un período de 6 minutos de elución isocrática. La composición eluyente se publicó a las condiciones iniciales en 2 minutos con una fase de equilibrio adicional de 6 minutos.

25

30

[0116] El automuestreador se mantuvo a 4 °C mediante un termostato, con el fin de garantizar las condiciones óptimas de estabilidad durante las inyecciones (volumen de inyección de 15 µl).

35

[0117] El análisis por IEN/EM se realizó en las siguientes condiciones experimentales: temperatura capilar 270 °C; voltaje de pulverización 4,0 kV; tensión capilar 21 kV. El gas de nebulización (nitrógeno) se mantuvo a un caudal de 0,5 l min⁻¹.

40

[0118] Como se indica en la Figura 9, el análisis por CL-IEN-EM del permeado muestra la elución de varios picos con respecto a los péptidos en un intervalo de masa nominal comprendido entre m/z 620 y 2089 en un tiempo de retención comprendido entre 5 y 10 minutos. El análisis por EM/EM y la búsqueda en la base de datos permitieron identificar 10 péptidos publicados en la bibliografía como PRP cuyas secuencias se representan en la Tabla 10.

45

TABLA 10. Péptidos identificados en el permeado

Péptido	Masa nominal
CPQSVH (SEQ ID NO:5)	669
VLPPNVG (SEQ ID NO:6)	694
DPPPPQS (SEQ ID NO:7)	736

(continuación)

Péptido	Masa nominal
MQPPPLP (SEQ ID NO:8)	778
LFFFLPVVNVLP (SEQ ID NO:19)	1403
MHQPPQPLPPTVMF (SEQ ID NO:21)	1619
LKPFPKLKVEVFPFP (SEQ ID NO:24)	1785
LQTPQPLLQVMMEPQGD (SEQ ID NO:25)	1924
LQPEIMGVPKVKETMVPK (SEQ ID NO:27)	2023
DQPPDVEKPDLPQFQVQS (SEQ ID NO:28)	2066

5 **[0119]** El análisis confirma 10 de los 33 PRP publicados en la bibliografía y la presencia de otros péptidos (al menos 12) aún no identificados. La superposición parcial de PRP se debe a la alta variabilidad de la composición de los PRP dependiendo de varios factores, tales como el momento de la recogida del calostro.

10 **[0120]** Este perfil peptídico no se representó en absoluto en el retenido, potenciando también la concentración hacia el límite de capacidad de la columna, mientras que se observó una elución entre 25 y 35 minutos de una fracción de proteína con un PM superior a 12.000 Da, entre ellas lactoalbúmina y las dos isoformas de lactoglobulina, que están ausentes en el permeado.

15 **[0121]** El análisis por CL-IEN-EM anterior se realizó con el fin de excluir la presencia de PRP y ácido siálico en el extracto final de calostro bovino obtenible de acuerdo con el proceso de la invención. Los datos confirman que el perfil de permeado contiene una agrupación de péptidos que comprende entre otros 10 de los 33 PRP desvelados en la bibliografía (véanse las Tablas 9 y 10). Dichos péptidos no son detectables, así como tampoco el ácido siálico (límite de detección de PRP determinado con un péptido de síntesis = 1 %) en las mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino obtenido de acuerdo con el proceso de la invención. Por el contrario, las mezclas de factores proteínicos procedentes de calostro bovino obtenidas de acuerdo con el proceso de la invención contienen varias proteínas (ausentes en el permeado) tales como lactoalbúmina y las dos isoformas de lactoglobulinas.

20 BIBLIOGRAFÍA

[0122]

- 25 [1] *Alternative Medicine Review*, 8(4), 2003, 378.
 [2] *Int. J. Clin. Pharmacol. and Therapy*, 46(5), 2008, 211-225.
 [3] Vistoli G., De Maddis D., Cipak A., Zarkovic N., Carini M., Aldini G., "Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation". *Free Radic. Res.* Agosto de 2013; 47 Supl. 1:3-27.
 30 [4] Aldini G., Dalle-Donne I., Facino R.M., Milzani A., Carini M., "Intervention strategies to inhibit protein carbonylation by lipoxidation-derived reactive carbonyls". *Med. Res. Rev.* de noviembre de 2007; 27(6):817-68.
 [5] Poulsen M.W., Hedegaard R.V., Andersen J.M., de Courten B., Bügel S., Nielsen J., Skibsted L.H., Dragsted L.O., "Advanced glycation endproducts in food and their effects on health". *Food Chem. Toxicol.* Octubre de 2013; 60:10-37.
 35 [6] Ott C., Jacobs K., Flaucke E., Navarrete Santos A., Grune T., Simm A., "Role of advanced glycation end products in cellular signaling". *Redox Biol.* Enero de 2014; 2:411-29.
 [7] Meltretter J., Pischetsrieder M., "Application of mass spectrometry for the detection of glycation and oxidation products in milk proteins". *Ann. N.Y. Acad. Sci.* Abril de 2008; 1126:134-40.
 [8] Fenaille F., Parisod V., Tabet J.C., Guy P.A., "Carbonylation of milk powder proteins as a consequence of processing conditions". *Proteomics*. Agosto de 2005; 5(12):3097-104.
 40 [9] WO2013/098331.
 [10] WO2013/098333.
 [11] WO2011/064114.
 [12] Kruzel ML, Janusz M, Lisowski J, Fischleigh RV, Georgiades JA. *J. Mol. Neurosci.* Diciembre de 2001; 17(3):379-89.
 45 [13] Agata Sokoowska, Renata Bednarza, Magdalena Pacewicz, Jerzy A. Georgiadesb, Tadeusz Wilusza, Antoni Polanowska. *International Dairy Journal* 18 (2008) 204-209.

50 LISTADO DE SECUENCIAS

[0123]

- <110> TENAGRO s.r.l.
 55 <120> PROCESO PARA LA PREPARACIÓN DE MEZCLAS DE ALTA PUREZA DE FACTORES PROTEÍNICOS

PROCEDENTES DE CALOSTRO BOVINO

<130> P1176PC

5 <150> MI2014A001450
<151> 06-08-2014

<160> 31

10 <170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 4

15 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido rico en Prolina

20 <400> 1

Ser Glu Gln Pro
1

<210> 2

25 <211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

30 <223> Péptido rico en Prolina

<400> 2

Val Val Met Glu Val
1 5

35 <210> 3

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

40 <220>

<223> Péptido rico en Prolina

<400> 3

45 <210> 4

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial

50 <220>

<223> Péptido rico en Prolina

<400> 4

55 <210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Péptido rico en Prolina

<400> 5

Asp Ser Gln Pro Pro Val
1 5

60 <210> 5

ES 2 771 924 T3

<211> 6
 <212> PRT
 <213> Artificial
 5 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina
 <400> 5
 Cys Pro Gln Ser Val His
 10 1 5
 <210> 6
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina
 20 <400> 6
 Val Leu Pro Pro Asn Val Gly
 1 5
 <210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Artificial
 <220>
 30 <223> Péptido rico en Prolina
 <400> 7
 Asp Pro Pro Pro Pro Gln Ser
 35 1 5
 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 40 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina
 <400> 8
 45 Met Gln Pro Pro Pro Leu Pro
 1 5
 <210> 9
 <211> 6
 <212> PRT
 50 <213> Artificial
 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina
 55 <400> 9
 Lys Tyr Lys Leu Gln Glu
 1 5
 60 <210> 10

ES 2 771 924 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

<400> 10

Ala Phe Leu Leu Tyr Gln Glu
1 5

10

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

20 <400> 11

Arg Gly Pro Phe Pro Ile Leu Val
1 5

25 <210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

<400> 12

Ser Leu Pro Gln Asn Ile Leu Pro Leu
1 5

35 <210> 13
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

<400> 13

45 Val Tyr Pro Phe Thr Gly Pro Ile Asn
1 5

50 <210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial

55 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

<400> 14

Val Glu Ser Tyr Val Pro Leu Phe Pro
1 5

60 <210> 15

ES 2 771 924 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 5 <223> Péptido rico en Prolina

<400> 20

Ala Phe Leu Leu Tyr Gln Glu Pro Val Leu Gly Pro Val
 1 5 10

10 <210> 21
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina

<400> 21

20 Met His Gln Pro Pro Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe
 1 5 10

<210> 22
 <211> 15
 25 <212> PRT
 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido rico en Prolina

30 <400> 22

Val Leu Glu Met Lys Phe Pro Pro Pro Pro Gln Glu Thr Val Thr
 1 5 10 15

35 <210> 23
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Artificial

40 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina

<400> 23

45 Asp Leu Glu Met Pro Val Leu Pro Val Glu Pro Phe Pro Phe Val
 1 5 10 15

<210> 24
 <211> 15
 <212> PRT
 50 <213> Artificial

<220>
 <223> Péptido rico en Prolina

55 <400> 24

Leu Lys Pro Phe Pro Lys Leu Lys Val Glu Val Phe Pro Phe Pro
 1 5 10 15

60 <210> 25
 <211> 17

ES 2 771 924 T3

<212> PRT
<213> Artificial

5 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

<400> 25

Leu Gln Thr Pro Gln Pro Leu Leu Gln Val Met Met Glu Pro Gln Gly
1 5 10 15

Asp

10 <210> 26
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

15 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

<400> 26

20 Ser Leu Thr Leu Thr Asp Val Glu Lys Leu His Leu Pro Leu Pro Leu
1 5 10 15

Val Gln

25 <210> 27
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

30 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

<400> 27

Leu Gln Pro Glu Ile Met Gly Val Pro Lys Val Lys Glu Thr Met Val
1 5 10 15

Pro Lys

35 <210> 28
<211> 18
<212> PRT
<213> Artificial

40 <220>
<223> Péptido rico en Prolina

<400> 28

Asp Gln Pro Pro Asp Val Glu Lys Pro Asp Leu Gln Pro Phe Gln Val
1 5 10 15

Gln Ser

45 <210> 29
<211> 18

ES 2 771 924 T3

<212> PRT
 <213> Artificial

5 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina

<400> 29

Ala Thr Phe Asn Arg Tyr Gln Asp Asp His Gly Glu Glu Ile Leu Lys
 1 5 10 15

Ser Leu

10 <210> 30
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Artificial

15 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina

<400> 30

20 His Lys Glu Met Pro Phe Pro Lys Tyr Pro Val Glu Pro Phe Thr Glu
 1 5 10 15

Ser Gln

25 <210> 31
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> Artificial

30 <220>
 <223> Péptido rico en Prolina

<400> 31

Leu Ser Gln Pro Lys Val Leu Pro Val Pro Gln Lys Ala Val Pro Gln
 1 5 10 15

Pro Asp Met Pro Ile Gln
 20

REIVINDICACIONES

- 5 **1.** Proceso para la preparación de una mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino que comprende las siguientes etapas:
- a) dilución de calostro bovino, desnatado y precipitación de caseína a pH entre 4 y 6;
 - b) centrifugación para retirar los componentes lipídicos y de caseína;
 - c) concentración y diafiltración sobre membrana polimérica con un corte molecular entre 1000 y 20000 Da para reducir el contenido de lactosa en el retenido;
 - 10 d) ajuste del pH alrededor de la neutralidad y centrifugación;
 - e) filtración;
 - f) llenado de tambores y congelación;
- 15 en donde se repite la etapa c) para obtener un retenido que tiene un contenido de lactosa < 1 % calculado con respecto al peso seco.
- 2.** Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la centrifugación de la etapa a) tiene lugar preferentemente a 4000 rpm.
- 20 **3.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en donde el pH de la etapa a) es de 4,6, el pH isoeléctrico de la caseína.
- 4.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en donde en la etapa c) el punto de corte molecular de la membrana polimérica es de 4000 Da.
- 25 **5.** Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en donde la centrifugación de la etapa d) se realiza a 8500 rpm.
- 30 **6.** Proceso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde la filtración de la etapa e) se realiza sobre filtros de porosidad entre 0,5 µm y 2 mM para facilitar la filtración de esterilización posterior realizada con filtros de porosidad entre 0,45 µm y 1 µm.
- 7.** Proceso de acuerdo cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende adicionalmente una etapa g) de criodesecación del producto congelado obtenido en la etapa f).
- 35 **8.** Una mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino que tiene un contenido de lactosa ≤ 1 % calculado con respecto al peso seco, obtenible mediante el proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
- 40 **9.** La mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino de acuerdo con la reivindicación 8, para su uso como medicamento.
- 10.** La mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, que se administra por vía tópica o por vía oral.
- 45 **11.** La mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, para su uso en el tratamiento de afecciones patológicas que requieren la cicatrización o regeneración de tejidos, seleccionándose dicha afección patológica preferentemente entre el grupo que comprende lesiones cutáneas o úlceras, quemaduras, lesiones bucales, lesiones corneales, lesiones de la mucosa nasal, lesiones provocadas por el virus del herpes y para la cicatrización de heridas.
- 50 **12.** Uso de la mezcla de factores proteínicos procedentes de calostro bovino de acuerdo con la reivindicación 8 como suplemento alimenticio.

Esquema general del proceso:

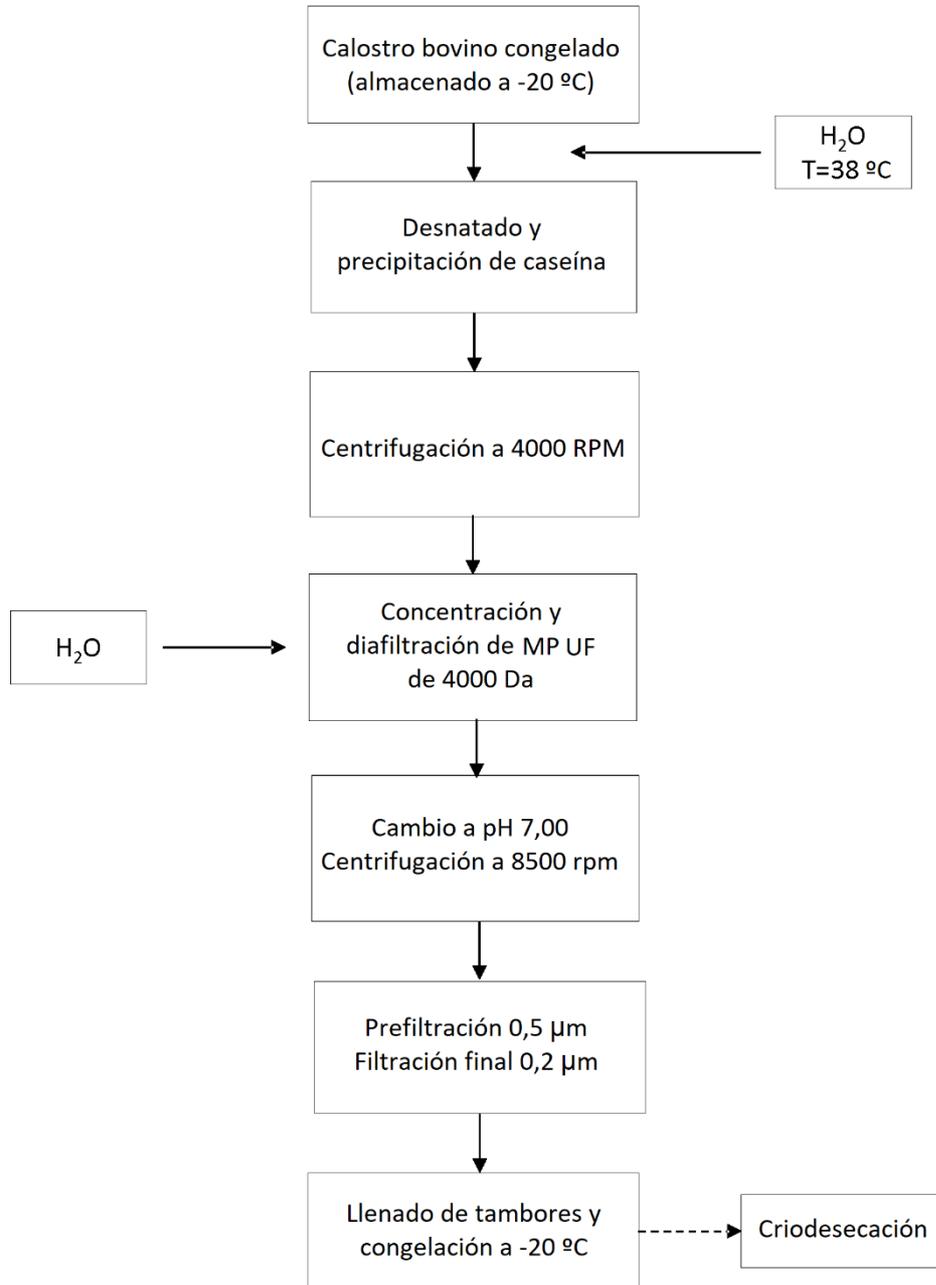


Fig. 1

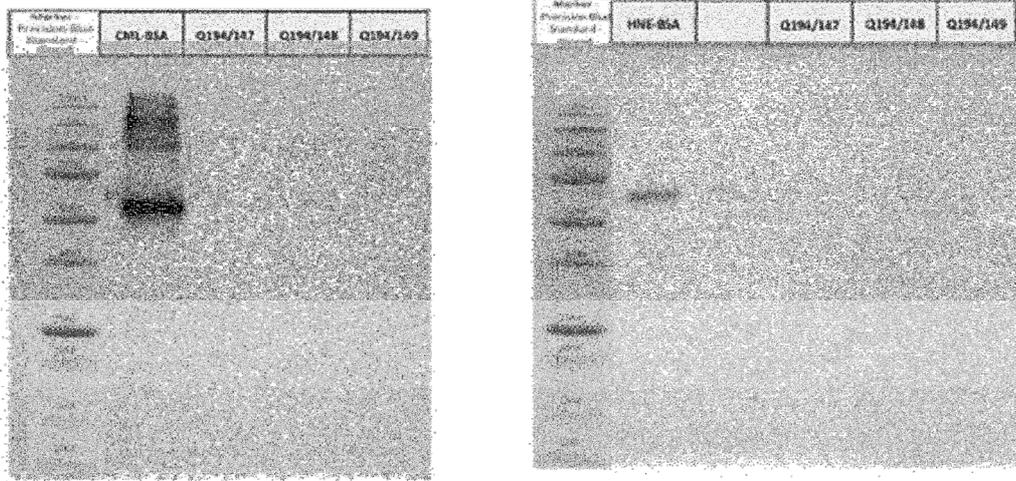


Fig. 2

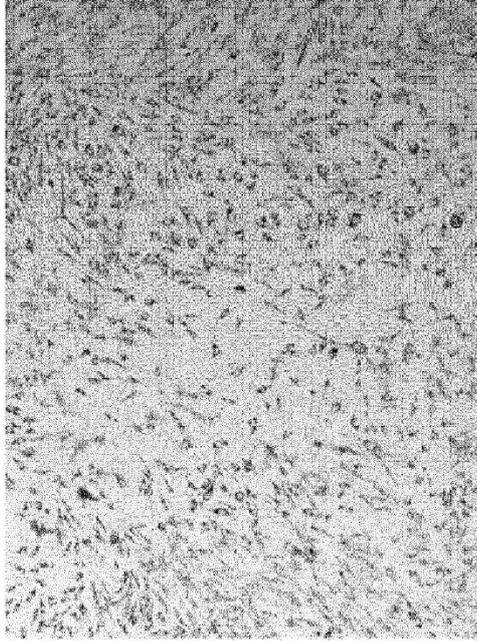


Fig. 3b

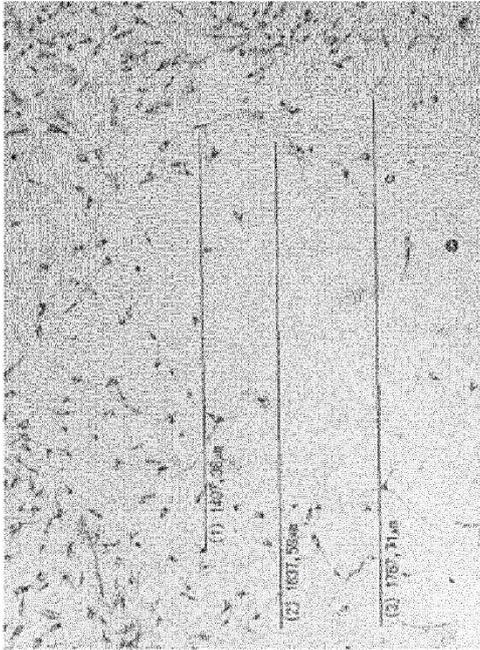


Fig. 3a

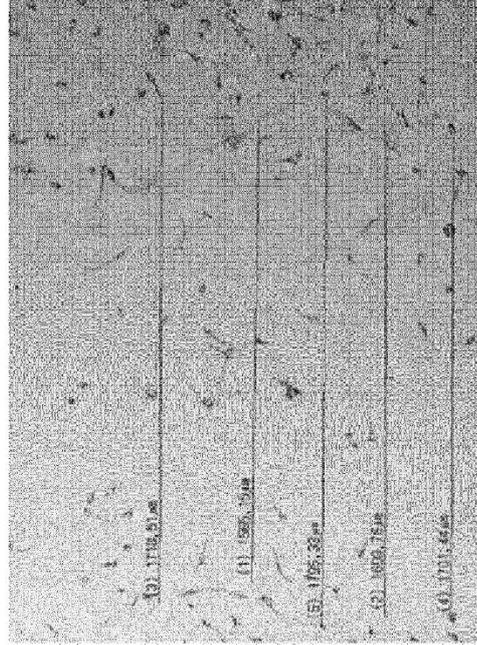


Fig. 3c

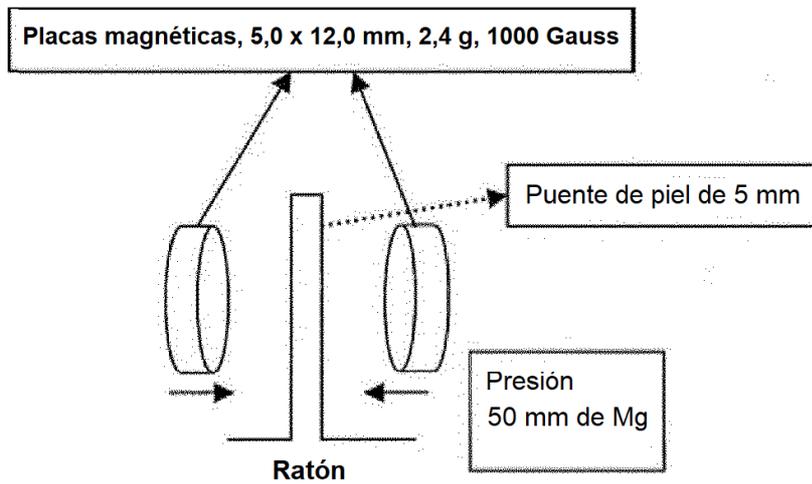
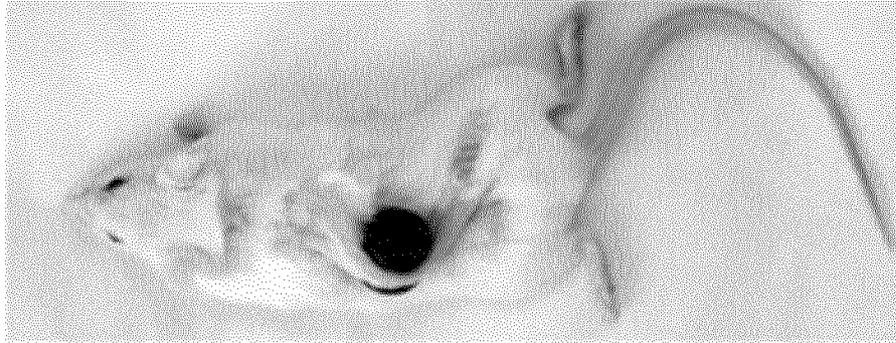


Fig. 4

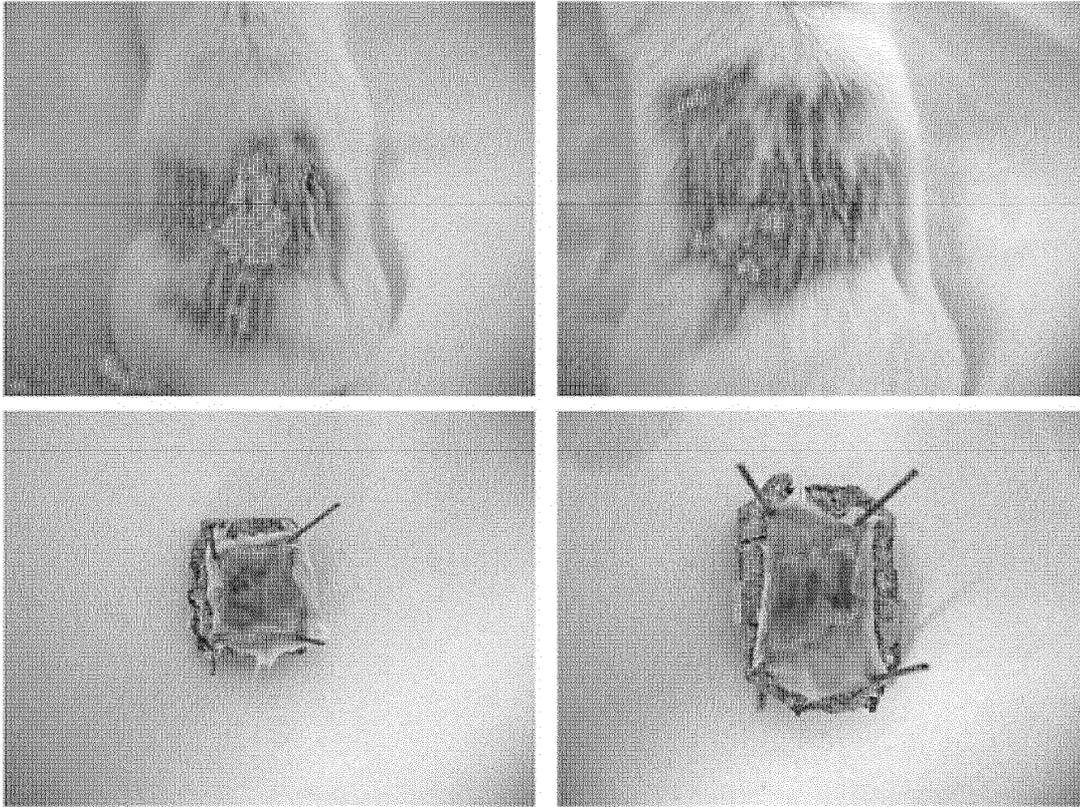


Fig. 5

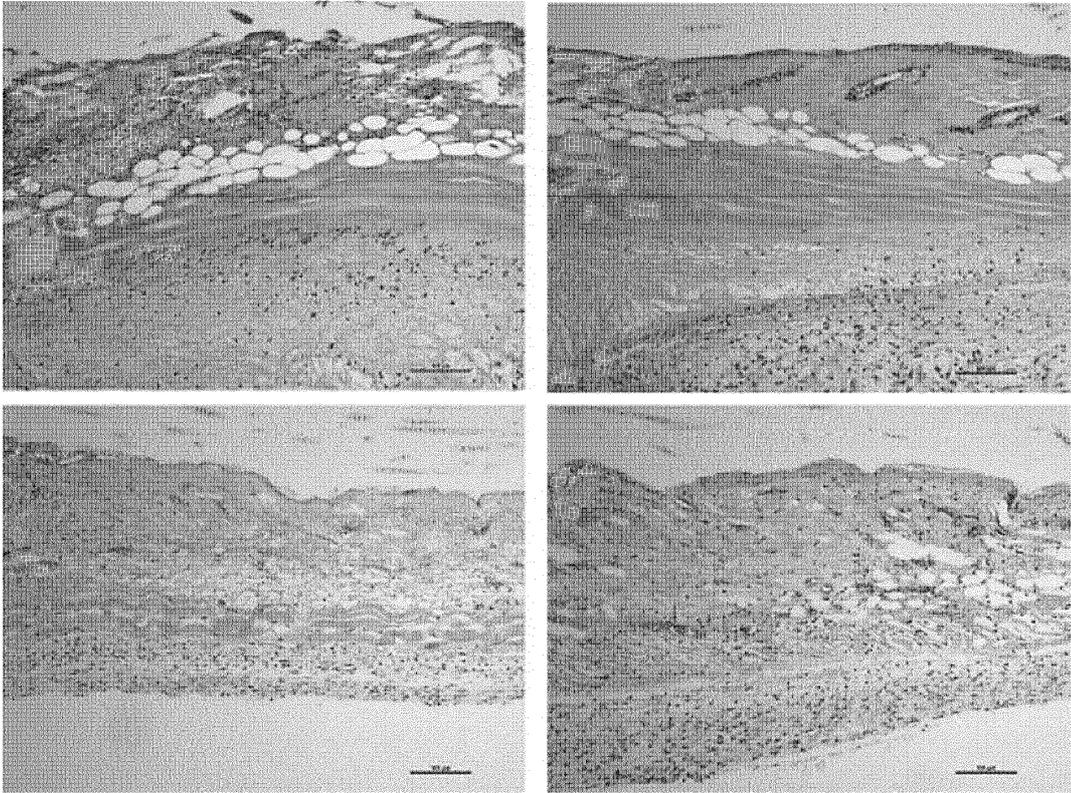


Fig. 6

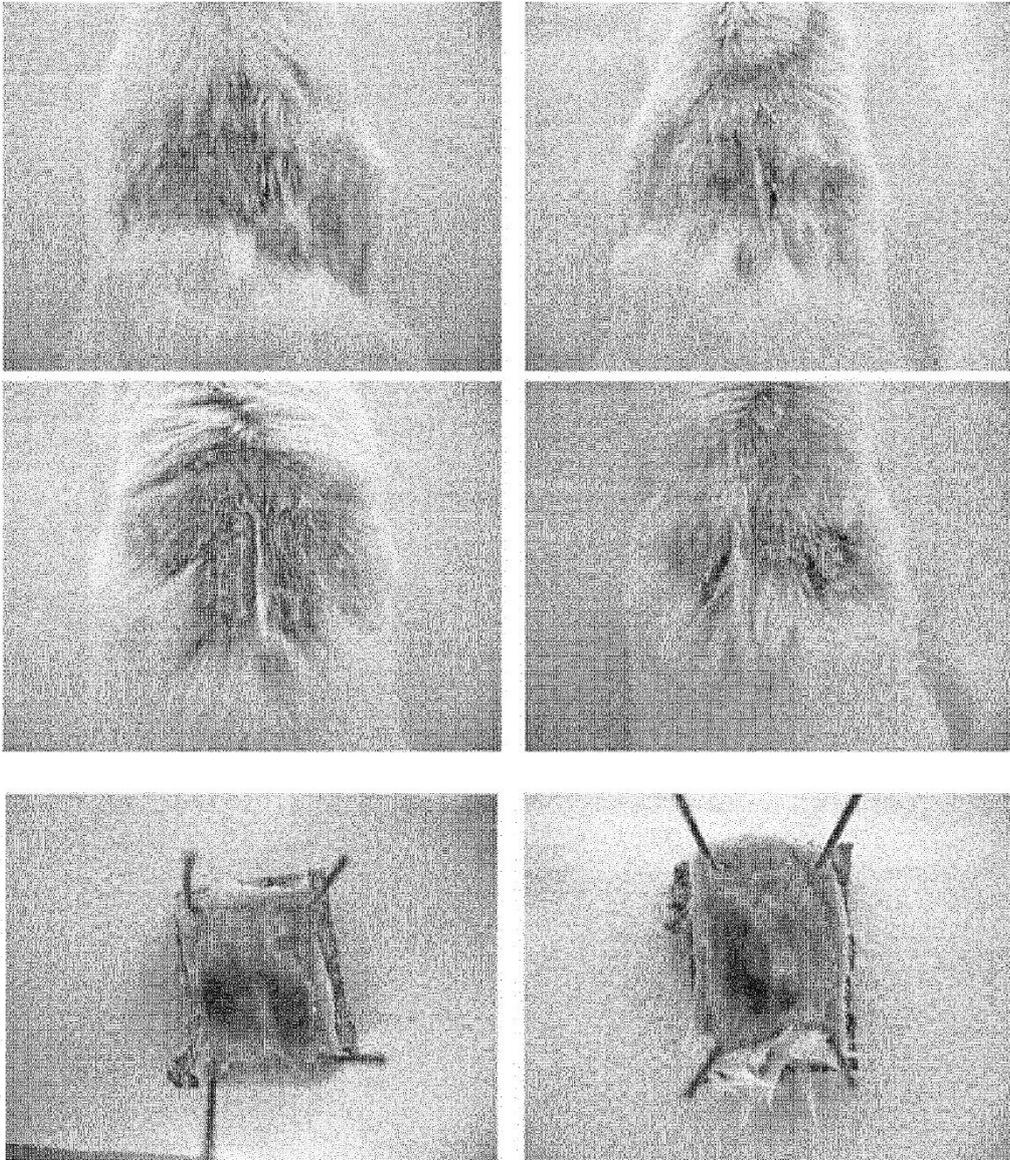


Fig. 7

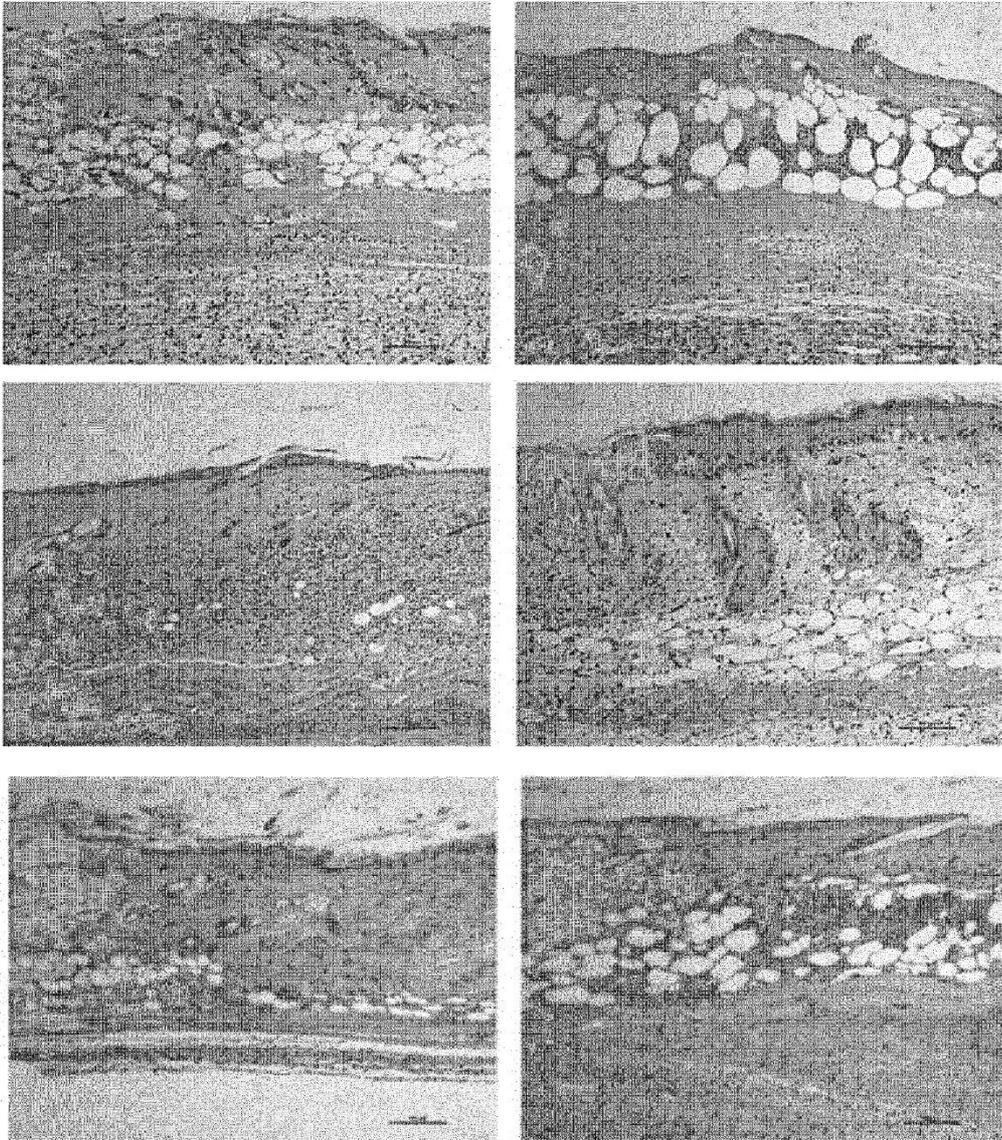


Fig. 8

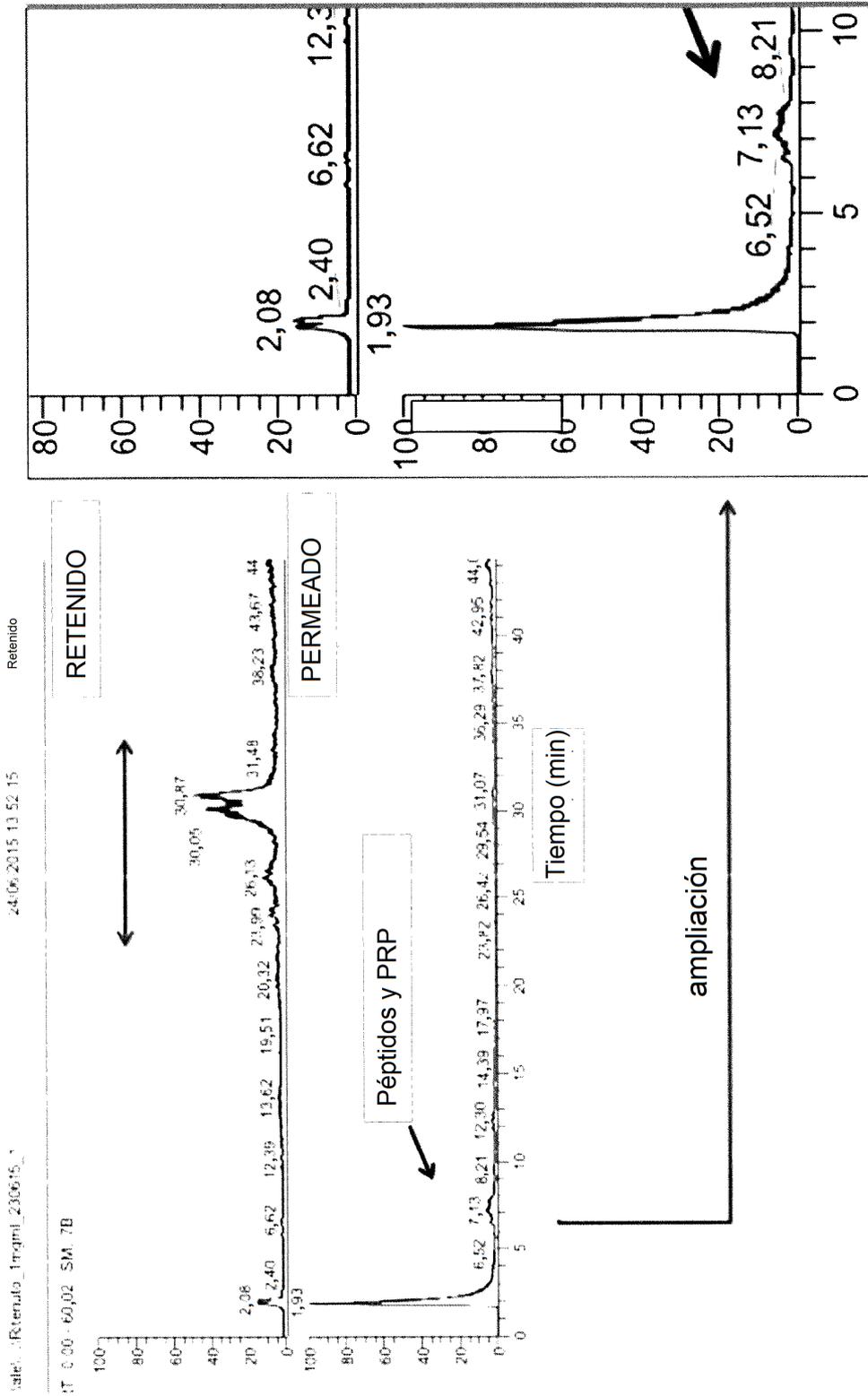


Fig. 9