

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490550 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.05.23

(51) Int. Cl. C07K 14/79 (2006.01)
A61K 38/40 (2006.01)
A23C 9/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.08.23

(54) КОМПОЗИЦИИ ЛАКТОФЕРРИНА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/236,201

(72) Изобретатель:

(32) 2021.08.23

Хлабб Кристофер, Снедекер Джонатан
(US)

(33) US

(86) PCT/US2022/075368

(74) Представитель:

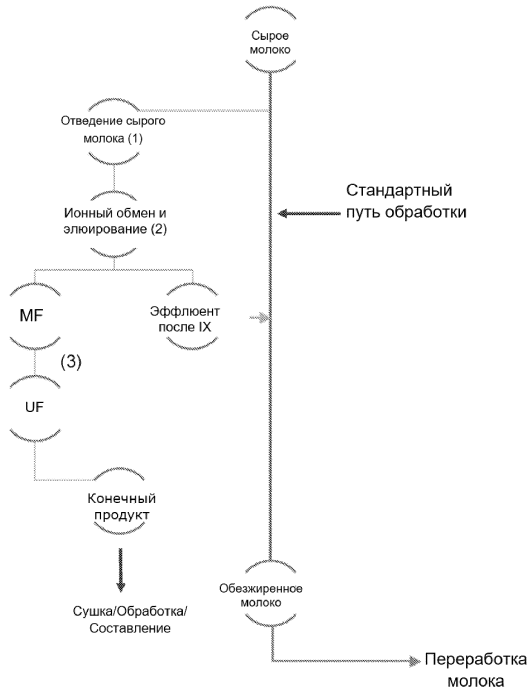
(87) WO 2023/028499 2023.03.02

Медведев В.Н. (RU)

(71) Заявитель:

ЛАКТЕА ТЕРАПЬЮТИКС ЭлЭлСи
(US)

(57) Представлены композиции, содержащие лактоферрин, в частности содержащие лактоферрин, очищенный из источников сырого натурального молока. Также представлены способы их производства и применения.



202490550 A1

202490550 A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-580931EA/085

КОМПОЗИЦИИ ЛАКТОФЕРРИНА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

1. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка заявляет приоритет по предварительной заявке № 63/236201, поданной 23 августа 2021 г., содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

2. ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Настоящая заявка содержит перечень последовательностей, который был подан через EFS-Web и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. Указанная ASCII-копия, созданная XX месяца 20XX, называется XXXXXUS_sequencelisting.txt и имеет размер XXXXXXXX байт.

3. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Лактоферрин был исследован в контексте его антимикробных свойств. Однако препараты лактоферрина обычно получают из предварительно переработанных и/или предварительно обработанных молочных продуктов, таких как источники пастеризованного молока, или получают рекомбинантным путем. Такие стратегии получения могут приводить к изменениям свойств лактоферрина по сравнению со свойствами, обнаруженными в непереработанном и/или необработанном источнике молока, например, к денатурации, снижению биологической активности, снижению железосвязывающей способности, изменению гликозилирования и/или отсутствию сохранения после трансляционных модификаций. Кроме того, доступные очищенные продукты с лактоферрином обычно содержат значительные примеси.

[0004] В данной области отсутствуют препараты и составы лактоферрина, направленные на сохранение нативной биологической активности лактоферрина, включая лактоферрин, обычно не содержащий примесей (например, других белков, ферментов, эндотоксина, прионов и т.д.).

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В данном документе представлена композиция, содержащая лактоферрин, в которой лактоферрин очищали из натурального молочного продукта и в которой процентное содержание лактоферрина составляет по меньшей мере 70%.

[0006] В данном документе также представлена композиция, содержащая очищенный лактоферрин, при этом композиция имеет повышенное массовое процентное содержание лактоферрина по сравнению с соотношением, присутствующим в непереработанном молочном продукте, содержащем лактоферрин.

[0007] В некоторых аспектах процентное содержание лактоферрина оценивают с помощью масс-спектрометрии. В некоторых аспектах масс-спектрометрия включает времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF). В некоторых аспектах оценка с помощью масс-спектрометрии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим

лактоферрину, и площадей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину. В некоторых аспектах пик, соответствующий лактоферрину, включает пики, соответствующие полноразмерному посттрансляционно модифицированному лактоферрину. В некоторых аспектах полноразмерный посттрансляционно модифицированный лактоферрин содержит пик, имеющий m/z в диапазоне от 80000 до 90000. В некоторых аспектах полноразмерный посттрансляционно модифицированный лактоферрин содержит пик, имеющий m/z в диапазоне от 79000 до 86000. В некоторых аспектах пик, соответствующий лактоферрину, включает пик ионизации, соответствующий лактоферрину. В некоторых аспектах пик ионизации, соответствующий лактоферрину, включает пики, имеющие m/z в диапазоне от 41000 до 42000.

[0008] В некоторых аспектах пики, не соответствующие лактоферрину, включают все остальные пики. В некоторых аспектах области под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, включают пики, имеющие m/z в диапазоне от 18000 до 80000, кроме пиков, имеющих m/z в диапазоне от 41000 до 42000. В некоторых аспектах области под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, включают пики, имеющие m/z в диапазоне от 18000 до 45000, кроме пиков, имеющих m/z в диапазоне от 41000 до 42000.

[0009] В некоторых аспектах масс-спектрометрия включает масс-спектрометрию с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos. В некоторых аспектах оценка включает количественное определение совпадений пептидного спектра (PSM), соответствующих лактоферрину, и PSM, которые не соответствуют лактоферрину.

[0010] В некоторых аспектах процентное содержание лактоферрина оценивают с помощью жидкостной хроматографии. В некоторых аспектах жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC). В некоторых аспектах оценка с помощью жидкостной хроматографии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площадей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину.

[0011] В некоторых аспектах одна или более площадей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, присутствующему в необработанном молочном продукте, находятся ниже предела обнаружения в композиции, где необязательно каждая площадь под пиком, который не соответствует лактоферрину, находится ниже предела обнаружения в композиции.

[0012] В некоторых аспектах процентное содержание лактоферрина составляет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%. В некоторых аспектах процентное содержание лактоферрина составляет по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%. В некоторых аспектах процентное содержание лактоферрина составляет по меньшей мере 99%.

[0013] В некоторых аспектах процентное содержание лактоферрина оценивают с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). В некоторых аспектах ELISA распознает

процентное содержание лактоферрина в конформации нативного белка. Некоторые аспекты включают антитело, которое специфически связывает конформацию нативного белка лактоферрина.

[0014] В данном документе также представлена композиция, содержащая очищенный лактоферрин, при этом композиция имеет повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза по сравнению с соотношением в непереработанном молочном продукте, содержащем лактоферрин.

[0015] В данном документе также представлена композиция, содержащая лактоферрин, в которой лактоферрин очищали из необработанного молочного продукта, и при этом композиция имеет повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза по сравнению с соотношением в непереработанном молочном продукте до очистки лактоферрина.

[0016] В некоторых аспектах повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью масс-спектрометрии. В некоторых аспектах масс-спектрометрия включает времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF). В некоторых аспектах оценка с помощью масс-спектрометрии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе. В некоторых аспектах пики, соответствующие лактоферрину, включают пики, соответствующие полноразмерному посттрансляционно модифицированному лактоферрину, и необязательно пики ионизации, соответствующие лактоферрину. В некоторых аспектах полноразмерный посттрансляционно модифицированный лактоферрин содержит пик, имеющий m/z в диапазоне от 79000 до 86000, пик ионизации, соответствующий лактоферрину, включает пики, имеющие m/z в диапазоне от 41000 до 42000, и пик, соответствующий лактопероксидазе, включает пик, имеющий m/z в диапазоне от 77000 до 78000.

[0017] В некоторых аспектах масс-спектрометрия включает масс-спектрометрию с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos. В некоторых аспектах оценка включает количественное определение PSM, соответствующих лактоферрину, и PSM, соответствующих лактопероксидазе.

[0018] В некоторых аспектах повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью жидкостной хроматографии. В некоторых аспектах жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC). В некоторых аспектах оценка с помощью жидкостной хроматографии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе.

[0019] В некоторых аспектах пик, соответствующий лактопероксидазе в композиции, находится ниже предела обнаружения. В некоторых аспектах повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза составляет 6 раз или больше.

[0020] В некоторых аспектах повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью ферментативного анализа лактопероксидазы. В некоторых аспектах оценка с помощью ферментативного анализа лактопероксидазы включает количественное определение первой активности лактопероксидазы для композиции и второй активности лактопероксидазы для натурального молочного продукта, и при этом сниженное соотношение между первой и второй активностью лактопероксидазы указывает на повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза.

[0021] В некоторых аспектах лактоферрин является бычьим. В некоторых аспектах лактоферрин не подвергали обработке. В некоторых аспектах лактоферрин не подвергали химической, ферментативной, кислотной или термической обработке. В некоторых аспектах лактоферрин не подвергали термической обработке. В некоторых аспектах лактоферрин не подвергали термической обработке при температуре 50°C или выше, 51°C или выше, 52°C или выше, 53°C или выше, 54°C или выше, или 55°C или выше. В некоторых аспектах лактоферрин не подвергали термической обработке при температуре 55°C или выше.

[0022] В некоторых аспектах очищенный лактоферрин включает нативную конформацию, по оценке с помощью кругового дихроизма.

[0023] В некоторых аспектах очищенный лактоферрин имеет нативную конформацию, по оценке с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC). В некоторых аспектах нативная конформация включает конформацию аполактоферрина и/или хололактоферрина. В некоторых аспектах конформация аполактоферрина имеет пик температуры плавления 60,2 +/- 0,8°C и/или конформация гололактоферрина имеет пик температуры плавления 88,38 +/- 0,8°C.

[0024] В некоторых аспектах очищенный лактоферрин способен связывать железо. В некоторых аспектах по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% очищенного лактоферрина способны связывать железо. В некоторых аспектах по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% очищенного лактоферрина способны связывать железо. В некоторых аспектах по меньшей мере 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% очищенного лактоферрина способны связывать железо. В некоторых аспектах способность связывать железо оценивают с помощью DSC.

[0025] В данном документе также представлена композиция, содержащая лактоферрин, в которой лактоферрин очищали из необработанного молочного продукта, и в которой очищенный лактоферрин содержит нативную конформацию, нативная конформация содержит конформацию аполактоферрина и/или хололактоферрина, и конформация аполактоферрина имеет пик температуры плавления 60,2 +/- 0,8 °C и/или конформация хололактоферрина имеет пик температуры плавления 88,38 +/- 0,8 °C.

[0026] В некоторых аспектах очищенный лактоферрин содержит посттрансляционную модификацию. В некоторых аспектах посттрансляционная

модификация включает гликозилирование.

[0027] В некоторых аспектах очищенный лактоферрин имеет среднюю молекулярную массу по меньшей мере 79000-86000 Да.

[0028] В некоторых аспектах очищенный лактоферрин сушат. В некоторых аспектах очищенный лактоферрин сушили с помощью сублимационной сушки/лиофилизации, сушки в псевдоожигенном слое или низкотемпературной распылительной сушки. В некоторых аспектах очищенный лактоферрин остается в жидкой форме благодаря очистке лактоферрина.

[0029] В некоторых аспектах композиция дополнительно содержит молекулу железа. В некоторых аспектах очищенный лактоферрин образует комплекс с молекулой железа. В некоторых аспектах молекула железа включает Fe^{2+} или Fe^{3+} . В некоторых аспектах очищенный лактоферрин образует комплекс с молекулой меди, цинка, марганца и/или галлия. В некоторых аспектах очищенный лактоферрин образует комплекс с молекулой цинка.

[0030] В некоторых аспектах композиция содержит эндотоксин на уровне 5 EU/кг или меньше.

[0031] В некоторых аспектах натуральный молочный продукт не подвергали обработке. В некоторых аспектах натуральный молочный продукт не подвергали обработке перед очисткой лактоферрина. В некоторых аспектах натуральный молочный продукт не подвергали химической, ферментативной, кислотной или термической обработке перед очисткой лактоферрина. В некоторых аспектах натуральный молочный продукт не подвергали термической обработке перед очисткой лактоферрина. В некоторых аспектах термическая обработка включает температуру $50^{\circ}C$ или выше, $51^{\circ}C$ или выше, $52^{\circ}C$ или выше, $53^{\circ}C$ или выше, $54^{\circ}C$ или выше, или $55^{\circ}C$ или выше. В некоторых аспектах термическая обработка включает температуру $55^{\circ}C$ или выше.

[0032] В некоторых аспектах лактоферрин очищают от натурального молочного продукта, который перед очисткой лактоферрина сепарируют на обезжиренное молоко и сливки. В некоторых аспектах сепарация на обезжиренное молоко и сливки включает разделение в холодной чаше. В некоторых аспектах лактоферрин очищали из натурального молочного продукта, обработанного кислотой перед очисткой лактоферрина. В некоторых аспектах кислотная обработка включает удаление нерастворимых казеинов. В некоторых аспектах кислотную обработку проводят при pH 4,0 или выше.

[0033] В данном документе также представлен способ оценки чистоты композиции, содержащей лактоферрин, при этом способ включает количественное определение соотношения лактоферрин:лактопероксидаза.

[0034] В некоторых аспектах соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью масс-спектрометрии. В некоторых аспектах масс-спектрометрия включает времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF). В некоторых аспектах оценка с помощью масс-спектрометрии включает количественное определение площади под пиком,

соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе. В некоторых аспектах пики, соответствующие лактоферрину, включают пики, соответствующие полноразмерному посттрансляционно модифицированному лактоферрину, и необязательно пики ионизации, соответствующие лактоферрину. В некоторых аспектах полноразмерный посттрансляционно модифицированный лактоферрин содержит пик, имеющий m/z в диапазоне от 79000 до 86000, пик ионизации, соответствующий лактоферрину, включает пики, имеющие m/z в диапазоне от 41000 до 42000, и пик, соответствующий лактопероксидазе, включает пик, имеющий m/z в диапазоне от 77000 до 78000.

[0035] В некоторых аспектах масс-спектрометрия включает масс-спектрометрию с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos. В некоторых аспектах оценка включает количественное определение PSM, соответствующих лактоферрину, и PSM, соответствующих лактопероксидазе.

[0036] В некоторых аспектах соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью жидкостной хроматографии. В некоторых аспектах жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC). В некоторых аспектах оценка с помощью жидкостной хроматографии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе.

[0037] В некоторых аспектах пик, соответствующий лактопероксидазе в композиции, находится ниже предела обнаружения.

[0038] В данном документе также представлен способ оценки чистоты композиции, содержащей лактоферрин, при этом способ включает количественную оценку активности лактопероксидазы с помощью ферментативного анализа лактопероксидазы.

[0039] В некоторых аспектах способ дополнительно включает количественное определение массового процентного содержания лактоферрина в композиции. В некоторых аспектах процентное содержание лактоферрина оценивают с помощью масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии или ELISA.

[0040] В некоторых аспектах способ дополнительно включает количественное определение массового процентного содержания лактоферрина в композиции. В некоторых аспектах способ дополнительно включает оценку нативной конформации лактоферрина с помощью кругового дихроизма. В некоторых аспектах способ дополнительно включает оценку статуса посттрансляционной модификации лактоферрина. В некоторых аспектах оценка посттрансляционной модификации включает оценку статуса гликозилирования лактоферрина. В некоторых аспектах способ дополнительно включает оценку средней молекулярной массы лактоферрина. В некоторых аспектах способ дополнительно включает оценку конформационного статуса лактоферрина. В некоторых аспектах конформационный статус оценивают с помощью ELISA. В некоторых аспектах способ дополнительно включает оценку статуса лактоферрина в отношении связывания металлов. В некоторых аспектах способ дополнительно включает оценку уровня эндотоксина в

композиции.

[0041] В данном документе также представлен способ производства любой из композиций, представленных в данном документе. В некоторых аспектах способ включает одну или более стадий, выбранных из группы, состоящей из: хроматографии, фильтрации и сушки. В некоторых аспектах способ включает каждую из стадий хроматографии, фильтрации и сушки.

[0042] В данном документе также представлена фармацевтическая композиция, содержащая любую из композиций, представленных в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0043] В данном документе также представлен способ лечения заболевания или состояния, при этом способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей любую из композиций или фармацевтических композиций, представленных в данном документе.

5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ НЕСКОЛЬКИХ ВИДОВ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0044] **Фиг. 1** иллюстрирует конкретный вариант осуществления способа очистки лактоферрина, описанного в данном документе. Вкратце, сырое молоко (необработанное молоко, например, не подвергнутое химической, ферментативной, кислотной или термической обработке перед очисткой от лактоферрина) (1) перенаправляли до входа в стандартный технологический процесс переработки молока; (2) пропускали через ионообменную смолу/колонку с эффлюентом обычно (например, по запросу/требованию производителя сырого молока) возвращаемым в стандартный рабочий процесс обработки молока, и собирали лактоферринсодержащие элюаты; (3) собранные элюаты фильтровали; и (4) очищенный лактоферрин обрабатывали.

[0045] **На фиг. 2А** показана оценка чистоты с помощью MALDI-TOF (~18-100 кДа) лактоферрина, полученного в соответствии с примером 1. В качестве исходного материала использовали сырое молозиво (RC).

[0046] **На фиг. 2В** показана оценка чистоты с помощью MALDI-TOF (~18-100 кДа) лактоферрина, полученного в соответствии с примером 1. В качестве исходного материала использовали цельное молоко (RM).

[0047] **На фиг. 3А** показана оценка чистоты с помощью MALDI-TOF (~18-100 кДа) для безрецептурной (ОТС) добавки лактоферрина.

[0048] **На фиг. 3В** показана оценка чистоты с помощью MALDI-TOF (~18-100 кДа) для приобретенного химически чистого лактоферрина.

[0049] **На фиг. 3С** показана оценка чистоты с помощью MALDI-TOF (~18-100 кДа) для приобретенного химически чистого лактоферрина.

[0050] **На фиг. 4** показана оценка чистоты с помощью масс-спектрометрии с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos лактоферрина, полученного в соответствии с примером 1.

[0051] **На фиг. 5** показана оценка чистоты с помощью ELISA для лактоферрина,

полученного в соответствии с примером 1, и приобретенного химически чистого лактоферрина.

[0052] **На фиг. 6** показано обогащение лактоферрином в ЕСМ по данным иммунофлуоресцентной (IF) визуализации.

[0053] **На фиг. 7** показана количественная оценка обогащения лактоферрином в ЕСМ.

[0054] **На фиг. 8** показано обогащение лактоферрином в ЕСМ по данным иммунофлуоресцентной (IF) визуализации первичных буккальных клетках.

[0055] **На фиг. 9** показан анализ снижения CPE Sars-CoV-2 в присутствии API-E2.

[0056] **На фиг. 10** показан график анализа на основе дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC) для оценки лактоферрина API-E2 (10 мг/мл), включая термически обработанную версию.

[0057] **На фиг. 11А** показан график анализа на основе DSC для оценки лактоферрина API-E2 в отсутствие и в присутствии избытка железа.

[0058] **На фиг. 11В** показан график анализа на основе DSC, оценивающий химически чистый стандартный лактоферрин и коммерчески доступный лактоферрин в виде пищевой добавки, наложенный поверх графика лактоферрина API-E2 (см. фиг. 10).

[0059] **На фиг. 12** показана оценка биологической активности лактоферрина в отношении бактерий слюны как оценка pH в динамике в присутствии API-E2.

[0060] **На фиг. 13** показаны фотографии домашней птицы, необработанной (слева) или обработанной API-E2 (справа), инокулированной бактериями слюны человека и оставленной на 6 дней при 37°C.

[0061] **На фиг. 14** показано, как проводили тест на зону ингибирования для оценки биологической активности лактоферрина API-E2 в отношении *E. coli*.

[0062] **На фиг. 15** показаны схема активности лактопероксидазы (LPO) и результаты анализа различных образцов лактоферрина, включая API-E2.

6. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Определения

[0063] Термины, используемые в формуле изобретения и описании, можно использовать, как изложено ниже, если не указано иное.

[0064] Термин «непереработанный молочный продукт» или «непереработанный молочный продукт, содержащий лактоферрин», используемый в данном документе взаимозаменяемо, относится к природному жидкому продукту лактации, вырабатываемому молочными железами млекопитающего и собираемому непосредственно из млекопитающего, для чего не требуется переработка (например, фильтрация, очистка с помощью колонки/смола и/или сепарация молока) и/или в отношении которого применяли стадии обработки (например, химическая обработка, ферментативная обработка, кислотная обработка и/или термическая обработка).

[0065] Термин «Необработанный молочный продукт» или «необработанный

молочный продукт, содержащий лактоферрин», используется в данном документе взаимозаменяемо, относится к молочному продукту, который не подвергали стадии обработки (например, химической обработки, ферментативной обработки, кислотной обработки и/или термической обработки), но включает прохождение одной или более стадий механической обработки (например, фильтрации, очистки на колонке/смоле и/или сепарации молока).

[0066] Если специально не оговорено или иным образом не очевидно из контекста, то в данном документе термин «приблизительно» понимается как нахождение в пределах нормальной переносимости в данной области техники, например, в пределах 2 стандартных отклонений от среднего значения. Под «приблизительно» можно понимать в пределах 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5%, 0,1%, 0,05% или 0,01% от заявленной величины. Численные значения, представленные в данном документе, иногда можно рассматривать как модифицированные термины «приблизительно», когда из контекста ясно видно, что диапазон охватываемых модификаций соответствует применимости изобретения и определенности формулы изобретения.

[0067] Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно провести, например, с помощью алгоритма локальной гомологии Smith & Waterman, Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), с помощью алгоритма спортивной гомологии Needleman & Wunsch, J. Mol. Biol. 48:443 (1970), с помощью метода поиска сходства Pearson & Lipman, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Мэдисон, Висконсин), или с помощью визуального осмотра (см. в целом Ausubel et al.).

[0068] Одним примером алгоритма, который является подходящим для определения % идентичности последовательностей и сходства последовательностей, является алгоритм BLAST, описанный в Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990). Программное обеспечение для проведения анализа BLAST общедоступно через Национальный центр биотехнологической информации.

Лактоферрин

[0069] В данном документе представлены композиции, которые содержат очищенный лактоферрин. В общем, лактоферрин в данном документе относится к очищенной форме лактоферрина млекопитающих, полученной из непереработанного молочного продукта (например, сырого молока).

[0070] Лактоферрин в очищенных композициях по настоящему изобретению обычно является бычьим, например, очищенным из источника коровьего молока. Иллюстративные молекулы бычьего лактоферрина (bLF) включают без ограничения рег. №146897-68-9 в CAS и описаны в Mead and Tweedie (Nucleic Acids Res. 1990 Dec 11;18(23):7167.) и Pierce *et al.* (Eur J Biochem. 1991 Feb 26;196(1):177-84.), каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки для всех целей. Иллюстративная неограничивающая полноразмерная аминокислотная последовательность бычьего лактоферрина (*Bos taurus*)

представлена следующим образом:

MKLFVPALLSLGALGLCLAAPRKNVRWCTISQPEWFKCRRWQWRMKKLGAPSITCVR
 RAFALECIRAIAEKKADAVTLDGGMVFEAGRDPYKLRPVAAEIYGTKESPQTHYYAVA
 VVKKGSNFQLDQLQGRKSCHTGLGRSAGWVIPMGILRPYLSWTESLEPLQGAVAKFFS
 ASCVPCIDRQAYPNLCQLCKGEGENQCACSSREPYFGYSGAFKCLQDGAGDVAFVKET
 TVFENLPEKADRQYELLCLNNSRAPVDAFKECHLAQVPSHAVVARSVDGKEDLIWKL
 LSKAQEKFGKNKSRSFQLFGSPPGQRDLLFKDSALGFLRIPSKVDSALYLGSRYLTTLKN
 LRETAEEVKARYTRVVWCAVGPEEQKKCQQWSQQSGQNVTCATASTDDCIVLVLKG
 EADALNLDGGYIYTAGKCGLVPLAENRKTSKYSSLDCVLRPTEGYLAVAVVKKANEG
 LTWNSLKDKKSCHTAVDRTAGWNIPMGLIVNQTGSCAFDEFFSQSCAPGRDPKSRLCAL
 CAGDDQGLDKCVPNSKEKYYGYTGAFRCLAEDVGDVAFVKNDTVWENTNGESTADW
 AKNLNREDFRLLCLDGTRKPVTEAQSCHLAVAPNHAVVSRSDRAAHVKQVLLHQAL
 FGKNGKNCNPKDFCLFKSETKNLLFNDNTECLAKLGGRPTYEEYLGTEYVTAIANLKKCS
 TSPLLEACAFLTR (SEQ ID NO:1; номер доступа в GenBank AAA30610.1).

[0071] Лактоферрин может представлять собой фрагмент полноразмерного лактоферрина (например, SEQ ID NO:1). Фрагменты включают биологически активные фрагменты. Используемый в данном документе термин «биологически активный» относится к белку, имеющему одну или более биоактивностей соответствующего нативного белка, включая, без ограничения ферментативную активность, противомикробную активность (например, антибактериальную, противогрибковую и/или противовирусную активность), активность по связыванию/секвестрации железа, иммуномодулирующее поведение (например, противовоспалительную активность), регуляцию роста и аффинность к клеточной поверхности, заживление ран или любую другую активность лактоферрина, описанную в данном документе или известную в данной области техники. Например, лактоферрин обычно секретируется, и биологически активные фрагменты могут включать секретируемые форматы, такие как «переработанные» фрагменты лактоферрина, лишённые сигнального пептида. В качестве иллюстративного примера лактоферрин, представленный SEQ ID NO:1, содержит сигнальный пептид MKLFVPALLSLGALGLCLA (SEQ ID NO:2; аминокислоты 1-19 SEQ ID NO:1). Соответственно, биологически активные фрагменты лактоферрина могут включать лактоферрин, лишённый сигнального пептида (например, аминокислоты 20-708 SEQ ID NO:1).

[0072] Лактоферрин может представлять собой изоформу лактоферрина, такую как изоформа альфа-лактоферрина (LF α), бета-лактоферрина (LF β) или гамма-лактоферрина (LF γ).

[0073] Лактоферрин может иметь аминокислотную последовательность на по меньшей мере 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, или ее биологически активным фрагментам (например, секретируемой форме, такой как аминокислоты 20-708 SEQ ID

NO:1, в которых отсутствует сигнальный пептид). Лактоферрин может иметь аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 95% идентичную аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, или ее биологически активным фрагментам. Лактоферрин может иметь аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 96% идентичную аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, или ее биологически активным фрагментам. Лактоферрин может иметь аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 97% идентичную аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, или ее биологически активным фрагментам. Лактоферрин может иметь аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 98% идентичную аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, или ее биологически активным фрагментам. Лактоферрин может иметь аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 99% идентичную аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, или ее биологически активным фрагментам. Лактоферрин может иметь аминокислотную последовательность, на по меньшей мере 99,5% идентичную аминокислотной последовательности, представленной как SEQ ID NO: 1, или ее биологически активным фрагментам.

[0074] Лактоферрин может иметь консервативную замену. «Консервативная замена» или «консервативная аминокислотная замена» относится к замене аминокислоты химически или функционально сходной аминокислотой. Консервативные замены хорошо известны в данной области техники, например, как описано в Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* 2nd ed. (1993) W. H. Freeman & Co., New York, NY, включенной в данный документ посредством ссылки для всех целей.

Посттрансляционные модификации

[0075] Лактоферрин, содержащийся в переработанном молочном продукте в качестве исходного материала, обычно содержит посттрансляционные модификации. Не ограничиваясь теорией, стратегии и способы очистки, описанные в данном документе, предназначены для уменьшения, минимизации или устранения разрушения нативных посттрансляционных модификаций по сравнению с теми, которые обнаружены в натуральном источнике молока, применяемом для очистки лактоферрина. Например, стратегии и способы очистки, описанные в данном документе, уменьшают, минимизируют или исключают химическую обработку, ферментативную обработку, кислотную обработку, тепловую обработку (например, пастеризацию) и/или любую другую обработку, способную нарушить нативные посттрансляционные модификации.

[0076] Посттрансляционные модификации могут представлять собой модификаций, участвующие в биологической активности лактоферрина. В общем, лактоферрин, полученный рекомбинантным путем, который обычно продуцируется в экзогенной системе экспрессии, такой как бактерии или дрожжи, не имеет посттрансляционных модификаций и/или посттрансляционных модификаций нативного лактоферрина. Посттрансляционные модификации включают без ограничения гликозилирование, фосфорилирование и

ацетилирование. Посттрансляционные модификации, в частности, могут включать гликозилирование (например, N-связанное гликозилирование), такое как гликозилирование по аспарагину 233, 281, 368, 476 и/или 545, которое может включать -ацетилнейраминовую кислоту, галактозу, маннозу, фукозу, N-ацетилглюкозамин и/или N-ацетилгалактозамин. Посттрансляционные модификации могут представлять собой встречающиеся в природе и/или не встречающиеся в природе (например, модифицированные после очистки, например, с помощью способов *in vitro*, известных специалистам в данной области техники). Посттрансляционные модификации включают обработку полноразмерного лактоферрина, такую как удаление сигнальной последовательности, как описано выше.

[0077] Немодифицированный секретируемый лактоферрин обычно имеет молекулярную массу приблизительно 78 кДа. Нативные посттрансляционные модификации могут приводить к получению молекулярной массы, варьирующей в диапазоне до приблизительно 86 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу более приблизительно 78 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу по меньшей мере 79 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу по меньшей мере 80 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу по меньшей мере 81 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу по меньшей мере 82 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу по меньшей мере 83 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу по меньшей мере 84 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу по меньшей мере 85 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу по меньшей мере 86 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу от 79 до 86 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу от 82 до 84 кДа. Очищенный лактоферрин может иметь молекулярную массу от 82 до 85 кДа.

[0078] Способы оценки посттрансляционных модификаций известны специалистам в данной области техники, такие как масс-спектрометрия или опосредованные антителами методы (например, применение антител, которые распознают посттрансляционные модификации, такие как ELISA, и/или двумерный вестерн-блоттинг).

Конформация белка

[0079] Конформационное состояние лактоферрина, обнаруженное в необработанном молочном продукте, обычно считается нативной конформацией лактоферрина. Различные обработки источников молока, обычно применяемые для очистки лактоферрина, такие как пастеризация, обычно считаются способными денатурировать белки. Не ограничиваясь теорией, стратегии и способы очистки, описанные в данном документе, предназначены для уменьшения, минимизации или устранения нарушения нативного конформационного состояния со ссылкой на конформационные состояния, обнаруженные в натуральном источнике молока, применяемом для очистки лактоферрина. Например, стратегии и способы очистки, описанные в данном документе, уменьшают, минимизируют или исключают химическую обработку, ферментативную обработку, кислотную обработку,

тепловую обработку (например, пастеризацию) и/или любую другую обработку, способную денатурировать лактоферрин.

[0080] Способы оценки конформационного состояния известны специалистам в данной области техники, такие как круговой дихроизм, рентгеновская кристаллография или опосредованные антителами методы (например, применение антител, которые распознают конформационное состояние и/или неденатурирующий вестерн-блоттинг).

Комплексообразование железа

[0081] Лактоферрин содержит два железосвязывающих домена (также называемых глобулярными долями). Не ограничиваясь теорией, можно утверждать, что свойства связывания железа могут опосредовать и/или влиять на антимикробную биологическую активность, такую как уничтожение микробов, предупреждение проникновения микроорганизмов, хелатирование, элиминация микроорганизмов и/или ингибирование роста.

[0082] Связанный с железом лактоферрин называется хололактоферрином, а не содержащий железа лактоферрин называется аполактоферрином и в некоторых случаях может различаться по биологической активности, такой как антибактериальная активность, или другим свойствам, таким как повышенная устойчивость хололактоферрина к изменениям, вызванным нагреванием, по сравнению с аполактоферрином. Лактоферрин в необработанном молочном продукте обычно содержится в определенном соотношении содержащих железа и связанных с железом форм. Например, лактоферрин в коровьем молоке обычно содержит 20-30% лактоферрина в связанной с железом форме, а в грудном молоке обычно 6-8% присутствует в связанной с железом форме. Очищенный лактоферрин в композициях по настоящему изобретению может иметь определенный диапазон связанного с железом хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать от 20 до 30% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать от 6 до 8% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать более 30% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать менее 6% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать по меньшей мере 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать 100% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать менее 20% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать более 8% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать менее 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8% или 9% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может включать менее 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18% или 19% хололактоферрина. Очищенный лактоферрин может на 100% находиться в не содержащей железа форме аполактоферрина.

[0083] Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) можно применять

для оценки способности очищенного лактоферрина находиться в форме хололактоферрина, например, для оценки способности очищенного лактоферрина связывать железо. Например, способность связывать железо можно оценить путем добавления избытка железа в присутствии очищенного лактоферрина с последующим осуществлением DSC для оценки относительных пиков, связанных с аполактоферрином и хололактоферрином. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% очищенного лактоферрина способны связывать железо. Очищенный лактоферрин и/или лекарственная формула могут включать очищенный лактоферрин, где по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% очищенного лактоферрина способны связывать железо, по оценке с помощью DSC. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% очищенного лактоферрина способны связывать железо. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% очищенного лактоферрина способны связывать железо, по оценке с помощью DSC. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где по меньшей мере 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% очищенного лактоферрина способны связывать железо. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где по меньшей мере 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% очищенного лактоферрина способны связывать железо, по оценке с помощью DSC. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где 100% очищенного лактоферрина способны связывать железо. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где 100% очищенного лактоферрина способны связывать железо, по оценке с помощью DSC (например, единственным наблюдаемым пиком в присутствии избытка железа является ассоциированный с хололактоферрином пик).

[0084] Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) можно применять для оценки пиков температуры плавления очищенного лактоферрина, в частности, пиков температуры плавления аполактоферрина и/или хололактоферрина. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где пик температуры плавления, ассоциированный с аполактоферрином, составляет $60,2 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$. Очищенный лактоферрин и/или лекарственный состав могут включать очищенный лактоферрин, где пик температуры плавления, ассоциированный с хололактоферрином, составляет $88,38 \pm 0,8^{\circ}\text{C}$.

[0085] Лактоферрин в форме хололактоферрина обычно связывает два иона железа (Fe^{3+}) в натуральных источниках молока. Очищенный лактоферрин в композициях по настоящему изобретению может быть связан с ионами металлов, отличных от ионов железа, включая без ограничения медь, цинк, марганец и/или галлий. Очищенный лактоферрин

может быть связан с ионами цинка. Очищенный лактоферрин может быть связан с ионами Fe^{2+} . Очищенный лактоферрин, связанный с ионами металлов, отличными от ионов железа, может находиться в любой из форм хололактоферрина или аполактоферрина связанного с железом лактоферрина, описанных в данном документе, например, в любом из определенных соотношений форм хололактоферрина к аполактоферрину, описанных в данном документе.

[0086] Конформационные состояния лактоферрина, например, конформации хололактоферрина и аполактоферрина, могут быть насыщены на различных уровнях ионами металлов (например, Fe^{3+}). Например, аполактоферрин обычно насыщен на менее чем 5% ионов железа, тогда как хололактоферрин обычно имеет насыщение приблизительно 100%. Бычий лактоферрин в непереработанном молочном продукте обычно насыщен на 15-20% железом.

[0087] Способы контроля определенных соотношений форм хололактоферрина к аполактоферрину известны специалистам в данной области техники. Например, в данной области техники известны способы контроля концентрации ионов трехвалентного железа, ионов металлов, отличных от ионов трехвалентного железа, и/или молекул на основе не трехвалентного железа и/или их производных железа, такие как добавление или удаление (например, как описано в Majka *et al.* [Analytical and Bioanalytical Chemistry volume 405, pages 5191-5200 (2013)], включенной в данный документ посредством ссылки для всех целей).

[0088] Способы оценки способности очищенного лактоферрина связывать ионы металлов известны специалистам в данной области техники, такие как химические анализы и/или абсорбционная спектроскопия. Например, без ограничения теорией, процессы обработки (например, те, которые обычно применяют в промышленной очистке) и/или процессы рекомбинантного производства могут изменить способность лактоферрина связывать металлы (например, посредством денатурации железосвязывающих доменов).

[0089] Способы оценки соотношения форм хололактоферрина к аполактоферрину известны специалистам в данной области техники, такие как химические анализы и/или абсорбционная спектроскопия (например, как описано в Majka *et al.* [Analytical and Bioanalytical Chemistry volume 405, pages 5191-5200 (2013)], включенной в данный документ посредством ссылки для всех целей).

[0090] В неограничивающем примере дифференциальная сканирующая калориметрия (DSC) представляет как способ оценки способности очищенного лактоферрина связывать ионы металлов, так и оценки соотношения форм хололактоферрина к аполактоферрину. Способы DSC известны специалистам в данной области техники.

Очистка молочных продуктов

[0091] Способы очистки могут уменьшить, минимизировать или исключить химическую обработку, ферментативную обработку, кислотную обработку и/или термическую обработку. Способы очистки могут уменьшить химическую обработку,

ферментативную обработку, кислотную обработку и/или термическую обработку. Способы очистки могут минимизировать химическую обработку, ферментативную обработку, кислотную обработку и/или термическую обработку. Способы очистки могут исключить химическую обработку, ферментативную обработку, кислотную обработку и/или термическую обработку. Способы очистки могут уменьшить, минимизировать или исключить химическую обработку. Способы очистки могут уменьшить, минимизировать или исключить ферментативную обработку. Способы очистки могут уменьшить, минимизировать или исключить кислотную обработку. Способы очистки могут уменьшить, минимизировать или исключить термическую обработку. Способы очистки могут уменьшить каждое из химической обработки, ферментативной обработки, кислотной обработки и термической обработки. Способы очистки могут минимизировать каждое из химической обработки, ферментативной обработки, кислотной обработки и термической обработки. Способы очистки могут исключить каждое из химической обработки, ферментативной обработки, кислотной обработки и термической обработки. Способы очистки могут исключить химическую обработку, ферментативную обработку и кислотную обработку. Способы очистки могут исключить химическую обработку, ферментативную обработку и термическую обработку.

[0092] В целом, способы, представленные в данном документе, для производства очищенного лактоферрина не включают термические обработки, типичные для промышленных процессов очистки (например, пастеризацию), которые могут нарушить нативное конформационное состояние (например, денатурацию) по сравнению с конформационными состояниями, обнаруженными в натуральном источнике молока, применяемом для очистки лактоферрина. Типичные термические обработки, применяемые в промышленных процессах очистки, могут составлять приблизительно 63°C или выше. Термические обработки могут составлять 50°C или выше, 51°C или выше, 52°C или выше, 53°C или выше, 54°C или выше или 55°C или выше. Термические обработки могут составлять 70°C или выше, 75°C или выше, 80°C или выше, 85°C или выше, 90°C или выше, 95°C или выше или 100°C или выше. Способы очистки могут включать осуществление процессов при температурах, которые уменьшают, минимизируют или исключают нарушение нативного конформационного состояния относительно конформационных состояний, обнаруженных в натуральном источнике молока, применяемом для очистки лактоферрина, по сравнению с термическими обработками, типичными для промышленных процессов очистки. Способы очистки могут включать осуществление процессов при температурах, которые снижают, минимизируют или устраняют снижение биологической активности лактоферрина относительно биологической активности, обнаруженной в натуральном источнике молока, применяемом для очистки лактоферрина, по сравнению с термическими обработками, типичными для промышленных процессов очистки. Способы очистки могут включать получение натурального источника молока при охлажденных температурах (например, при температуре менее 15°C, например, при температуре от 2 до 15°C). Способы очистки, описанные в данном документе, могут включать термические

обработки при температуре менее 50°C. Например, источники молока можно нагревать во время одной или более стадий очистки, например, до температуры выше 37°C, но не превышающей 55°C. Нагревание может включать температуру выше 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C или 55°C. Нагревание может включать температуру выше 37°C и температуру менее 55°C. Нагревание может включать температуру выше 40°C и температуру менее 55°C. Нагревание может включать температуру выше 45°C и температуру менее 55°C. Нагревание может включать температуру выше 50°C и температуру менее 55°C. Нагревание может включать температуру выше 37°C и температуру 50°C и меньше, 51°C и меньше, 52°C и меньше, 53°C и меньше, 54°C и меньше или 55°C и меньше. Нагревание может включать температуру выше 40°C и температуру 50°C и меньше, 51°C и меньше, 52°C и меньше, 53°C и меньше, 54°C и меньше или 55°C и меньше. Нагревание может включать температуру выше 45°C и температуру 50°C и меньше, 51°C и меньше, 52°C и меньше, 53°C и меньше, 54°C и меньше или 55°C и меньше. Способы очистки, описанные в данном документе, могут включать термические обработки при 50°C или меньше, 51°C или меньше, 52°C или меньше, 53°C или меньше, 54°C или меньше или 55°C или меньше. Способы очистки, описанные в данном документе, могут включать поддержание температуры во время очистки ниже 50°C или меньше, 51°C или меньше, 52°C или меньше, 53°C или меньше, 54°C или меньше или 55°C или меньше. Поддержание температуры во время очистки может включать поддержание температуры во время всей очистки. Поддержание температуры во время очистки может включать поддержание температуры на одной или нескольких отдельных стадиях процесса очистки (например, стадиях хроматографии, фильтрации и/или сушки). Поддерживаемая температура может включать различные температуры (например, различные температурные диапазоны), специфичные для одной или более отдельных стадий процесса очистки.

[0093] Способы очистки могут включать кислотные обработки. Без ограничения теорией, для удаления казеинов можно применять кислотные обработки, такие как обработка натурального источника молока или его производного перед очисткой лактоферрина при значении рН, способном привести к тому, что казеины станут нерастворимыми в растворе. В общем, кислотные обработки, представленные в данном документе для производства очищенного лактоферрина, не включают кислотные обработки, которые нарушают нативное конформационное состояние (например, денатурируют лактоферрин) и/или снижают биологическую активность лактоферрина по сравнению с конформационными состояниями или биологической активностью соответственно, обнаруженными в натуральном источнике молока, применяемом для очистки лактоферрина. Способы очистки могут включать кислотные обработки при рН 4,0 или выше. Способы очистки могут включать кислотные обработки при рН 3,0 или выше.

[0094] Способы очистки могут включать хроматографию. Способы очистки могут включать ионообменную хроматографию. Хроматографические способы, такие как ионообменная хроматография, известны специалистам в данной области техники. Способы

очистки, описанные в данном документе, обычно включают катионообменную хроматографию. Способы очистки могут включать стадии ионообменной хроматографии в дополнение к катионообменной хроматографии, например, как катионообменная, так и анионообменная хроматография, включая в любом порядке и/или отдельно один или более дополнительных процессов очистки. Смолы и матрицы для ионообменной хроматографии известны в данной области техники. Например, катионообменные смолы включают без ограничения полиметакрилатные и агарозные матрицы. Способы очистки могут включать жидкостную хроматографию высокого давления (HPLC).

[0095] Хроматографические способы обычно включают одну или более стадий уравнивания и/или регенерации. Иллюстративный неограничивающий пример стадий уравнивания и регенерации включает промывку (1) водой с помощью обратного осмоса; (2) химически чистым 1M NaCl; и (3) повторное ополаскивание водой с помощью обратного осмоса.

[0096] Хроматографические способы обычно включают стадию загрузки. В общем, загруженный объем основан на заранее определенной связывающей способности смолы и оценке содержания нативного лактоферрина в сыром молочном загрузочном материале.

[0097] Хроматографические способы обычно включают одну или более стадий элюирования, например, элюирование очищенного лактоферрина из смолы/колонки в ионообменной хроматографии. Способы элюирования известны специалистам в данной области техники. Способы элюирования могут включать две или более стадий элюирования. Без ограничения теорией, можно применять несколько стадий элюирования для вначале элюирования контаминантов (например, любого другого продукта, кроме лактоферрина), а затем элюирования требуемого продукта (например, лактоферрина).

[0098] Способы элюирования могут включать две или более стадий элюирования при различных концентрациях соли. Не ограничиваясь теорией, можно осуществить одну или более начальных стадий элюирования (например, стадий элюирования перед стадией элюирования, содержащей требуемый очищенный лактоферрин) для удаления нежелательных белков и других контаминантов.

[0099] Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования от 0,2 до 0,7 M химически чистым раствором NaCl. Как правило, первую стадию элюирования 0,2-0,7 M химически чистым раствором NaCl осуществляют для удаления нежелательных белков и других контаминантов. Без ограничения теорией, завершение первого элюирования можно контролировать с помощью спектрометрии в ультрафиолетовой и видимой области спектра и/или колориметрических анализов, отслеживая наличие контаминантов, таких как лактопероксидаза и другие ферменты, присущие сырому молочному загрузочному материалу. Например, первую стадию элюирования 0,2-0,7 M химически чистым раствором NaCl можно осуществлять до тех пор, пока с помощью спектрометрии в ультрафиолетовой и видимой области спектра не будет обнаружено отсутствие белка, элюируемого со смолы.

[00100] Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,2 M

и вторую стадию элюирования 1 М химически чистым раствором NaCl.

[00103] Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования от 0,25 до 0,7 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,20 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,25 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,30 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,35 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,40 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,45 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,50 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,55 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,60 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,65 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl. Способы элюирования могут включать первую стадию элюирования 0,70 М химически чистым раствором NaCl и вторую стадию элюирования приблизительно 1 М химически чистым раствором NaCl.

[00104] Способы элюирования могут включать две или более стадий элюирования при разных уровнях pH градиента элюирования. Способы элюирования могут включать две или более стадий элюирования при разных концентрациях соли, разных уровнях pH и их комбинациях. Способы элюирования могут включать градиент элюирования. Способы элюирования могут включать градиент элюирования солью. Способы элюирования могут включать градиент элюирования pH. Способы элюирования могут включать элюирование как солью, так и градиентом pH.

[00105] Для каждой из вышеуказанных стадий ионообменной хроматографии (например, равновесная регенерация, загрузка и/или элюирование) специалист в данной области техники определит соответствующие скорости жидкости, например, в зависимости от выбора смолы, аппарата, сырого молочного загрузочного материала и т.д.

[00106] Способы очистки могут включать фильтрацию. Способы фильтрации известны специалистам в данной области техники. Способы очистки могут включать микрофильтрацию (обычно это относится к фильтрации с использованием мембранных пор размером от 0,1 до 10 мкм). Микрофильтрация может включать размер пор мембраны 1-10 мкм. Микрофильтрация может включать размер пор мембраны 10 мкм. Микрофильтрация может включать размер пор мембраны 1-10 мкм. Микрофильтрация может включать размер пор мембраны 0,1-1 мкм. Микрофильтрация может включать размер пор мембраны 0,1 мкм. Микрофильтрация может включать размер пор мембраны 1 мкм. Микрофильтрация может включать размер пор мембраны 0,1, 0,2, 0,3, 0,3, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9 и/или 1 мкм. Микрофильтрация может включать керамический фильтр.

[00107] Способы очистки могут включать ультрафильтрацию (обычно это относится к фильтрации с использованием размера пор мембраны от 0,01 до 0,1 мкм). Системы ультрафильтрации также можно обозначать по размерам предельного значения молекулярной массы, предназначенным для разделения пермеата и ретентата по размеру. Системы ультрафильтрации могут включать системы 5-30 кДа. Системы ультрафильтрации могут включать систему 5 кДа. Системы ультрафильтрации могут включать систему 10 кДа. Системы ультрафильтрации могут включать систему 15 кДа. Системы ультрафильтрации могут включать систему 20 кДа. Системы ультрафильтрации могут включать систему 25 кДа. Системы ультрафильтрации могут включать систему 30 кДа.

[00108] Способы очистки могут включать как микрофильтрацию, так и ультрафильтрацию, включая в любом порядке и/или отдельно один или более процессов дополнительной очистки. Способы очистки могут включать несколько стадий микрофильтрации и/или ультрафильтрации, включая в любом порядке и/или отдельно один или более дополнительных процессов очистки. В качестве иллюстративного неограничивающего примера перед ионообменной хроматографией можно использовать первую стадию предварительной микрофильтрации (например, с фильтром 10 мкм), перед ионообменной хроматографией можно использовать вторую стадию микрофильтрации (например, с фильтром 0,1-1,4 мкм), с последующей стадией ультрафильтрации (например, с фильтром 5-30 кДа).

[00109] Способы очистки могут включать комбинацию хроматографии и фильтрации, включая в любом порядке и/или раздельно один или более дополнительных процессов очистки. Способы очистки могут включать комбинацию нескольких стадий хроматографии и/или фильтрации, включая в любом порядке и/или раздельно один или более дополнительных процессов очистки. Способы очистки могут включать комбинацию микрофильтрации, ультрафильтрации и ионообменной хроматографии, включая в любом порядке и/или раздельно один или более дополнительных процессов очистки. В иллюстративном неограничивающем примере способы очистки могут включать ионообменную хроматографию (включая элюирование) с последующей микрофильтрацией и затем ультрафильтрацией. В другом иллюстративном неограничивающем примере способы очистки могут включать микрофильтрацию с последующей ионообменной

хроматографией (включая элюирование), затем дополнительную микрофльтрацию и затем ультрафльтрацию.

[00110] Способы очистки могут включать сепарацию сырого молочного продукта на производные молочного продукта, например, сепарацию натурального источника молока на обезжиренное молоко и сливки. Например, сырой молочный продукт перед хроматографией и/или фильтрацией можно сепарировать на производные молочного продукта. Способы сепарации сырого молочного продукта на производные молочных продуктов известны специалистам в данной области техники, включая без ограничения сепарацию в холодной чаше.

[00111] После очистки лактоферрина очищенный продукт можно высушить. В общем, представленные способы сушки не включают обработки, которые нарушают нативное конформационное состояние (например, денатурируют лактоферрин) и/или снижают биологическую активность лактоферрина по сравнению с конформационными состояниями или биологической активностью соответственно, обнаруженными в натуральном источнике молока, применяемом для очистки лактоферрина. Способы сушки лактоферрина известны специалистам в данной области техники, включая без ограничения сушку вымораживанием/лиофилизацию, сушку в псевдооживленном слое и/или сушку распылением при низкой температуре.

Оценка чистоты

[00112] Натуральные источники молока, включая коровье молоко, обычно содержат несколько белковых компонентов в дополнение к лактоферрину, включая без ограничения лактопероксидазу, лизоцим, казеины, иммуноглобулины, лактальбумин и лактоглобулин. Натуральные источники молока также могут содержать другие компоненты, такие как жир и эндотоксин. В общем, способы очистки, представленные в данном документе, уменьшают, минимизируют или исключают компоненты, отличные от лактоферрина. Не ограничиваясь теорией, следует отметить, что удаление одного или более дополнительных компонентов может улучшить биологическую активность лактоферрина и/или повысить безопасность.

[00113] В данном документе представлены композиции лактоферрина, имеющие повышенное массовое процентное содержание лактоферрина по сравнению с соотношением, присутствующим в непереработанном молочном продукте, содержащем лактоферрин.

[00114] Процент лактоферрина можно оценить с помощью масс-спектрометрии, включая без ограничения масс-спектрометрию с матричной лазерной десорбцией и ионизацией и временем пролета (MALDI-TOF) и/или масс-спектрометрию с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos. В общем, оценка с помощью масс-спектрометрии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площадей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину. В некоторых случаях лактоферрин может быть ассоциирован с несколькими пиками, такими как пики ионизации, соответствующие лактоферрину. Пики,

соответствующие лактоферрину, могут включать пики, соответствующие полноразмерному посттрансляционно модифицированному (например, гликозилированному) лактоферрину. Пики, соответствующие полноразмерному посттрансляционно модифицированному лактоферрину, обычно находятся в диапазоне от приблизительно 80000 до 86000 m/z . Точный пик полноразмерной посттрансляционно модифицированной молекулы может меняться, например, отражая различные статусы гликозилирования. В некоторых случаях, включительно, пики, имеющие m/z в диапазоне от 79000 до 90000, можно считать соответствующими лактоферрину. Области под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, включают все остальные пики, за возможным исключением пика ионизации, ассоциированного с лактоферрином, около 41500 m/z (например, имеющего m/z от 41000 до 42000). Области под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, могут включать пики, имеющие m/z в диапазоне от 18000 до 80000 (кроме пиков, имеющих m/z в диапазоне от 41000 до 42000). Конкретное сравнение также можно провести между лактоферрином и пиками, соответствующими лактопероксидазе (например, пиками, имеющими m/z от 77000 до 78000). Области под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, могут включать пики, имеющие m/z в диапазоне от 18000 до 45000 (кроме пиков, имеющих m/z в диапазоне от 41000 до 42000). Масс-спектрометрия с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos также позволяет количественно определить процентное содержание лактоферрина по отношению к другим компонентам в образце. Например, масс-спектрометрия с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos позволяет количественно определить процентное содержание лактоферрина путем определения % совпадений пептидного спектра (PSM).

[00115] Процент лактоферрина можно оценить с помощью жидкостной хроматографии, например высокоэффективной жидкостной хроматографии (HPLC). Оценка с помощью жидкостной хроматографии может включать количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площадей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину.

[00116] Для оценки, включающей количественное определение пиков, одна или более областей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, присутствующему в непереработанном молочном продукте, содержащем лактоферрин, могут быть ниже предела обнаружения для очищенной композиции лактоферрина. В некоторых случаях каждая область под пиком, не соответствующим лактоферрину, может находиться ниже предела обнаружения.

[00117] Процент лактоферрина можно оценить с помощью иммуноферментного анализа (ELISA). В некоторых случаях с помощью ELISA можно определить процентное содержание лактоферрина в конформации нативного белка, например, с помощью антитела, которое специфически связывает конформацию нативного белка лактоферрина.

[00118] Конкретным компонентом, обычно присутствующим в непереработанных источниках молока, который необходимо уменьшить, минимизировать или исключить при

очистке лактоферрина, является лактопероксидаза. Кроме того, лактопероксидаза часто присутствует в обнаруживаемых количествах в композициях очищенного лактоферрина, полученных типичными промышленными способами.

[00119] В данном документе представлены композиции лактоферрина, где по меньшей мере 70% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 75% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 80% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 85% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 90% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 95% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере приблизительно 100% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% композиции представляют собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 91% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 92% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 93% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 94% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 95% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 96% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 97% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 98% композиции представляет собой очищенный лактоферрин. Композиции включают те, где по меньшей мере 99% композиции представляет собой очищенный лактоферрин.

[00120] В данном документе представлены композиции лактоферрина, имеющие повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза по сравнению с соотношением в непереработанном молочном продукте, содержащем лактоферрин. Соотношения лактоферрин:лактопероксидаза можно оценить в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, такими как способы оценки чистоты, описанные в данном документе (например, масс-спектрометрия, HPLC и/или ELISA). Например, оценка может включать количественное определение площади или площадей под пиком, соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе.

[00121] Эндотоксин, присутствующий или потенциально присутствующий в натуральных источниках молока, может быть уменьшен, минимизирован или устранен. Не ограничиваясь теорией, следует отметить, что удаление эндотоксина может повысить безопасность очищенной композиции лактоферрина. Способы оценки уровней эндотоксина известны специалистам в данной области техники.

[00122] В данном документе также представлены способы оценки чистоты очищенной композиции лактоферрина, например, применение любого из способов оценки чистоты, описанных в данном документе.

Фармацевтическая композиция

[00123] В данном документе представлены фармацевтические композиции, содержащие любую из очищенных композиций лактоферрина, описанных в данном документе, и одно или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ.

[00124] Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» подразумевает композицию, подходящую для введения субъекту, например, млекопитающему, особенно человеку. Как правило, «фармацевтическая композиция» является стерильной и предпочтительно не содержит контаминантов, способных вызвать нежелательную реакцию у субъекта (например, соединение(я) в фармацевтической композиции имеет(ют) фармацевтическую степень чистоты). Фармацевтические композиции могут быть разработаны для введения субъектам или пациентам, нуждающимся в этом, с помощью ряда различных путей введения, включая без ограничения пути местного введения, такие как кожа (например, рана), слизистая оболочка, дыхательные пути, составы для перорального (включая желудочно-кишечный тракт) и назального введения.

[00125] «Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество наполнитель», «фармацевтически приемлемый разбавитель», «фармацевтически приемлемый носитель» и «фармацевтически приемлемый адъювант» означают вспомогательное вещество, разбавитель, носитель и адъювант, которые можно применять при приготовлении фармацевтической композиции, которая, как правило, безопасна, нетоксична и не является нежелательной ни в биологическом, ни в другом отношении, и включают вспомогательное вещество, разбавитель, носитель и адъювант, которые приемлемы для ветеринарного применения, а также для фармацевтического применения у человека. «Фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, разбавитель, носитель и адъювант», используемые в настоящем описании и формуле изобретения, включают как один, так и более одного такого вспомогательного вещества, разбавителя, носителя и адъюванта.

Способы лечения и предупреждения/снижения риска

[00126] В данном документе представлены способы лечения заболевания или состояния с помощью введения терапевтически эффективного количества любой из очищенных композиций лактоферрина, описанных в данном документе, включая введение любой из фармацевтических композиций, описанных в данном документе. В данном документе также представлены способы модуляции иммунного ответа (например,

стимулирования противовоспалительной активности) посредством введения терапевтически эффективного количества любой из композиций очищенного лактоферрина, описанных в данном документе, включая введение любой из фармацевтических композиций, описанных в данном документе. Термин «модулировать» охватывает поддержание биологической активности, ингибирование (частичное или полное) биологической активности и стимуляцию/активацию (частичную или полную) биологической активности. Этот термин также охватывает уменьшение или увеличение (например, усиление) биологической активности. Например, введение терапевтически эффективного количества очищенного лактоферрина может уменьшить воспаление за счет усиления противовоспалительной активности, например, в контексте воспалительного заболевания.

[00127] Используемые в данном документе термины «лечение», «осуществление лечения» и т.п. относятся к получению требуемого фармакологического и/или физиологического эффекта, такого как предупреждение, снижение риска, облегчение и/или разрешение инфекции, такой как вирусная инфекция, грибковая (например, дрожжевая) или бактериальная инфекция. Лечение может представлять собой профилактическое лечение с точки зрения полного или частичного предупреждения заболевания или его симптома и/или может быть терапевтическим с точки зрения частичного или полного излечения заболевания и/или неблагоприятного эффекта, связанного с заболеванием. Лечение охватывает любое лечение заболевания у млекопитающего, в частности, у человека, и включает: (а) профилактическое лечение (полное или частичное предупреждение) возникновения заболевания или симптома заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у него еще не диагностировано его наличие (например, у субъекта, подверженного риску инфекции); (b) ингибирование заболевания (например, устранение инфекции и/или снижение ее уровня ниже обнаруживаемого предела); и (c) облегчение заболевания (например, снижение микробной нагрузки, ассоциированной с инфекцией).

[00128] В данном документе также представлены способы снижения риска патогенного заболевания, при этом способ включает введение субъекту любой из фармацевтических композиций или композиций, описанных в данном документе. Например, снижение риска патогенного заболевания может включать без ограничения введение фармацевтических композиций или композиций, описанных в данном документе, в рану, подверженную риску инфекции патогеном. Субъект, подверженный риску патогенного заболевания, мог подвергнуться воздействию патогена. У субъекта, подверженного риску патогенного заболевания, может быть диагностирована инфекция патогеном.

[00129] «Терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» означает количество соединения, которое при введении млекопитающему или другому субъекту для лечения заболевания, состояния или нарушения является достаточным для осуществления такого лечения заболевания, состояния или нарушения. «Терапевтически

эффективное количество» будет варьироваться в зависимости от соединения, заболевания и его тяжести, а также возраста, веса и т.д. субъекта, подлежащего лечению.

[00130] Рассматриваемые соединения можно вводить субъекту отдельно или в комбинации с дополнительным активным средством. Термины «средство», «соединение» и «лекарственное средство» используются в данном документе взаимозаменяемо. Способ может дополнительно включать одновременное или последовательное совместное введение второго средства, например, малой молекулы, антитела, фрагмента антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство, аптамера, белка, антибиотика, противовирусного средства, противомикробного средства, антибактериального средства, противогрибкового средства и/или вакцины. В некоторых вариантах осуществления способ дополнительно включает проведение субъекту лучевой терапии.

[00131] Термины «совместное введение» и «в комбинации» включают введение двух или более терапевтических средств либо одновременно, совместно, либо последовательно в течение каких-либо конкретных временных ограничений. В одном варианте осуществления средства присутствуют в клетке или в организме субъекта одновременно или одновременно оказывают свое биологическое или терапевтическое действие. В одном варианте терапевтические средства находятся в одной и той же композиции или стандартной лекарственной форме. В других вариантах осуществления терапевтические средства находятся в отдельных композициях или стандартных лекарственных формах. Термин «стандартная лекарственная форма», используемый в данном документе, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для людей и животных, при этом каждая единица содержит заранее определенное количество соединения (например, аминопиримидинового соединения, как описано в данном документе), рассчитанное в количестве, достаточном для достижения требуемого эффекта в ассоциации с фармацевтически приемлемым разбавителем, носителем или несущей-средой. Описания стандартных лекарственных форм зависят от конкретного применяемого соединения и достигаемого эффекта, а также фармакодинамики, ассоциированной с каждым соединением в организме хозяина. В определенных случаях комбинация обеспечивает усиленный эффект по сравнению с любым компонентом по отдельности; в некоторых случаях комбинация обеспечивает супрааддитивный или синергический эффект по сравнению с комбинированным или аддитивным действием компонентов. Для нескольких доз два средства могут чередоваться непосредственно или, например, две или более доз одного средства могут чередоваться с одной дозой другого средства.

Способы производства

[00132] В данном документе представлены способы применения любой из очищенных композиций лактоферрина, описанных в данном документе, включая любую из фармацевтических композиций, описанных в данном документе. Способы включают любую из стадий очистки, описанных в разделе «Очистка молочных продуктов», включая комбинации стадий, описанных в данном документе. Иллюстративные неограничивающие примеры описаны в разделе «Примеры» в данном документе.

7. ПРИМЕРЫ

[0001] Ниже приведены примеры конкретных вариантов осуществления настоящего изобретения. Примеры представлены только для иллюстративных целей и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения каким-либо образом. Были предприняты усилия для обеспечения точности используемых чисел (например, количеств, температур и т.д.), однако, безусловно, следует допускать некоторые экспериментальные ошибки и отклонения.

[0002] В практике настоящего изобретения будут использоваться, если не указано иное, стандартные методы химии белков, биохимии, методы рекомбинантной ДНК и фармакологии, известные в данной области техники. Такие методики подробно описаны в литературе. См., например, T.E. Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H. Freeman and Company, 1993); A.L. Lehninger, *Biochemistry* (Worth Publishers, Inc., current addition); Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); *Methods In Enzymology* (S. Colowick and N. Kaplan eds., Academic Press, Inc.); *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18th Edition (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey and Sundberg *Advanced Organic Chemistry 3rd Ed.* (Plenum Press) Vols A and B(1992).

Пример 1. Очистка лактоферрина

[0003] Лактоферрин очищали, как показано на **фиг. 1**. Вкратце, сырое молоко (необработанное молоко, например, не подвергнутое химической, ферментативной, кислотной или термической обработке перед очисткой от лактоферрина) (1) перенаправляли до входа в стандартный технологический процесс переработки молока; (2) пропускали через ионообменную смолу/колонку с эффлюентом обычно возвращаемым в стандартный рабочий процесс обработки молока, и собирали лактоферринсодержащие элюаты; (3) собранные элюаты фильтровали; и (4) очищенный лактоферрин обрабатывали. Примечательно, что все другие известные процессы очистки лактоферрина начинаются с источника молока, полученного после стандартного рабочего процесса обработки молока, который обычно включает термическую пастеризацию. Кроме того, в качестве исходного материала использовали натуральный непереработанный молочный продукт (например, сырое молоко), так что лактоферрин включал соответствующие посттрансляционные модификации, потенциально участвующие в биологической активности, в отличие от лактоферрина, полученного рекомбинантным путем.

[0004] Хроматографическую колонку использовали для выделения и очистки бычьего лактоферрина для сохранения его нативных посттрансляционных модификаций, гликозилирования и связанного железа. Колонку загружали выбранной катионообменной смолой, полиметакрилатной или агарозной матрицей, уравнивали и регенерировали путем промывки (1) водой с помощью обратного осмоса; (2) химически чистым 1 M NaCl; и (3) повторной промывкой водой с помощью обратного осмоса.

[0005] Сырое, необработанное, непереработанное цельное коровье молоко (менее чем через 24 часа после доения) получали непосредственно из молочного транспортера или силосной емкости перед сепарацией, обезжириванием, нагреванием и/или пастеризацией.

Лактоферрин очищали как из сырого молозива (RC), так и из сырого цельного молока (RM).

[0006] Молоко фильтровали от крупных частиц с помощью фильтра с размером пор 10 мкм, нагревали до температуры выше 37°C и поддерживали при температуре ниже 63°C (обычно считающейся начальной температурой пастеризации) и загружали в хроматографическую колонку. Загруженный объем был основан на заранее определенной связывающей способности и оценке содержания нативного лактоферрина в сыром молочном загрузочном материале. В процессе загрузки весь поток возвращали в балансировый резервуар пастеризатора, чтобы вернуть сырье на завод в точку перед сепарацией и пастеризацией.

[0007] После завершения загрузки смолу промывали водой с помощью обратного осмоса для удаления любых оставшихся соединений молока, которые не связались со смолой. 1-элюирование включало промывку смолы химически чистым раствором NaCl (0,2-0,7 М) и его контролировали и оценивали в отношении завершения (т.е. отсутствия белка, элюируемого из смолы) с помощью спектрометрии в ультрафиолетовой и видимой области спектра и колориметрических анализов, отслеживающих наличие контаминантов, таких как лактопероксидаза и другие ферменты, присущие сырому молочному загрузочному материалу. В частности, 1-ю обработку NaCl проводили до тех пор, пока лактопероксидаза, обычно являющаяся основной примесью, больше не присутствовала в элюированных фракциях, что оценивали колориметрическим анализом пероксидазы с использованием колориметрического субстрата пероксидазы. Фракцию 1-го элюата сохраняли в изолированном сосуде. Затем смолу промывали водой с помощью обратного осмоса. 2-элюирование проводили 1 М NaCl для удаления выделенного лактоферрина. Фракцию 2-го элюата оставляли в изолированном сосуде и затем (1) фильтровали через керамический микрофилтративный фильтр (0,1-1,4 мкм); и (2) концентрировали с использованием системы ультрафилтрации (5-30 кДа).

[0008] Обессоленный элюент затем лиофилизировали, но его можно также помещать непосредственно в сушилку с псевдооживленным слоем для сушки на наполнитель фармацевтического качества. Очищенный лактоферрин, полученный в соответствии со способами, описанными в данном документе, называется: лактоферрин Nyacinth («Nyacinth»); лактоферрин (исключительно без сопровождающих слов «химически чистый» или «в виде коммерчески доступной добавки»; ODT-SC210; и API-E2. Различные названия могут относиться к очищенному лактоферрину, полученному в соответствии с вариантами способов, описанных в данном документе.

Пример 2. Оценка чистоты лактоферрина

[0009] Очищенный лактоферрин, полученный в соответствии с примером 1, оценивали в отношении чистоты.

[0010] Обычно гели SDS-PAGE используют для оценки чистоты белковых продуктов эталонного качества, включая лактоферрин эталонного качества. Однако гели SDS-PAGE известны тем, что дают преувеличенные результаты чистоты в зависимости от условий эксперимента (Kurien and Scofield Methods Mol Biol. 2012; 869: 633-640).

Соответственно, для оценки чистоты использовали более чувствительные методы масс-спектрометрии, HPLC и ELISA.

[0011] Чистоту лактоферрина оценивали с помощью масс-спектрометрии MALDI-TOF. Высушенные образцы растворяли в воде в концентрации 10 мг/мл. Растворенные образцы смешивали с равным объемом насыщенной синапиновой кислоты в 50% ацетонитриле, содержащем 0,1% трифторуксусной кислоты. Смесь образец/матрица (2 мкл) помещали на планшет MALDI из шлифованной стали M1P 384. Масс-спектры MALDI получали при m/z 2001-20162 Да (2-20 кДа), 10039-40026 Да (10-40 кДа) и 19780-100000 Да (20 кДа-100 кДа) в режиме положительных ионов. Прибор калибровали в этих диапазонах масс с использованием стандарта калибровки белка II (Bruker). MS-спектры анализировали с использованием FlexAnalysis 3.4 (Bruker Daltonics, Биллерика, Массачусетс).

[0012] Результаты оценки чистоты с помощью MALDI-TOF (~18-100 кДа) для лактоферрина, очищенного в соответствии с примером 1 из двух различных источников натурального сырого молока (молозива и цельного молока), показаны на фиг. 2А и фиг. 2В и количественно выражены в таблице 1А и таблице 1В соответственно. Доминирующие пики выше ~80000 m/z соответствуют гликозилированному лактоферрину, а пики при ~41500 m/z соответствуют пикам ионизации лактоферрина. Примечательно, что типичный пик контаминации, ассоциированный с лактопероксидазой (~78000 m/z), был ниже предела обнаружения. Количественная оценка профилей масс-спектрометрии показала, что более 75% относительной площади под кривой (AUC), определенной для количественных пиков в диапазоне 18 кДа-100 кДа, соответствует требуемому пику гликозилированного лактоферрина от 80 до 85 кДа и близко к 100% соответствовали лактоферрину с учетом пика ионизации при ~41500 m/z (пики, выбранные для количественного определения, другими словами, считавшиеся истинными пиками выше исходного шума, определяли с помощью FlexAnalysis 3.4). Соответственно, результаты демонстрируют, что описанный в данном документе процесс очистки приводит к получению лактоферрина высокой чистоты из различных сырых натуральных молочных продуктов.

Таблица 1А. Количественное определение MALDI-TOF (сырое молозиво)

m/z	S/N	Интенс.	Область	Относительная площадь пика (%)
41651,98	11	1344	$1,53 \times 10^6$	22,95
83033,27	20	2266	$5,14 \times 10^6$	77,05

Таблица 1В. Количественное определение MALDI-TOF (сырое цельное молоко)

m/z	S/N	Интенс.	Область	Относительная площадь пика (%)
41734,817	9	374	$4,17 \times 10^5$	16,95
83202,581	22	882	$2,04 \times 10^6$	83,05

[0013] Чистоту также оценивали с помощью MALDI-TOF (~18 кДа-100 кДа) для

безрецептурной (ОТС) добавки лактоферрина [Jarrow Formulas] (фиг. 3А) и для источников лактоферрина, рекламируемых как химически чистые продукты [Sigma Bovine Colostrum Lactoferrin] (фиг. 3В и **фиг. 3С**), как указано выше, и количественно определяли в **таблице 2А**, **таблице 2В** и **таблице 2С** соответственно. В отличие от лактоферрина, полученного в соответствии с примером 1, профили масс-спектрометрии обнаруживают контаминирующие пики для ОТС добавки и обоих химически чистых источников лактоферрина, в частности, лактопероксидазы (см. пик на фиг. 3В при 77806 m/z). Количественная оценка профилей масс-спектрометрии показала, что только 25,3%, 52,3% и 11,9% соответственно относительных АUC, определенных для количественных пиков в диапазоне 18 кДа-100 кДа, соответствовали требуемому пику гликозилированного лактоферрина от 80 до 85 кДа. Даже учитывая пик ионизации лактоферрина при ~ 41500 m/z, только совокупные относительные АUC 33,5%, 66,4% и 15,9% соответственно соответствовали лактоферрину. Соответственно, результаты демонстрируют, что процесс очистки, описанный в данном документе, приводит к образованию лактоферрина более высокой чистоты, чем доступные ОТС добавки и химически чистые источники лактоферрина.

Таблица 2А. Количественное определение MALDI-TOF для ОТС добавки (фиг. 3А)

m/z	S/N	Интенс.	Область	Относительная площадь пика (%)
20345,22	12	2229	452079	2,2
20708,48	6	1107	203598	1,0
22599,98	16	2835	2,30E+06	11,4
22607,87	16	2835	2,30E+06	11,4
22610,23	16	2835	2,30E+06	11,4
22612,58	16	2835	2,30E+06	11,4
25330,59	10	1717	2,10E+06	10,5
33454,51	5	830	462461	2,3
38691,72	4	579	372891	1,9
41819,75	10	1559	1,65E+06	8,2
49570	4	593	583820	2,9
83412,65	17	2204	5,08E+06	25,3

Таблица 2В. Количественное определение MALDI-TOF для коммерческого реагента № 1 (фиг. 3В)

m/z	S/N	Область	Относительная площадь пика (%)
19287	16	1,05E+06	4,6

20664	9	948774	4,1
26702	4	381374	1,6
27849	9	878698	3,8
33513	12	1,64E+06	7,1
38663	5	1,13E+06	4,9
41652	16	3,27E+06	14,1
46357	3	453094	2,0
77806	5	1,27E+06	5,5
83027	37	1,21E+07	52,3

Таблица 2С. Количественное определение MALDI-TOF для коммерческого реагента № 2 (фиг. 3С)

m/z	S/N	Область	Относительная площадь пика (%)
18235	4	270406	0,7
19561	21	3,52E+06	9,6
21103	53	6,43E+06	17,6
22602	31	7,13E+06	19,5
23855	99	1,16E+07	31,6
32405	3	747098	2,0
33527	3	471200	1,3
34932	3	641140	1,8
41777	5	1,45E+06	4,0
83110	10	4,37E+06	11,9

[0014] Чистоту лактоферрина также оценивали с помощью масс-спектрометрии с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos. Как показано на фиг. 4 и количественно оценено в таблице 3А, масс-спектрометрический профиль орбитальной ловушки Velos для лактоферрина, полученного в соответствии с примером 1, показал, что более 80% идентифицированных совпадений пептидного спектра (PSM) соответствовали требуемому лактоферрину. В отличие от этого, как показано в таблице 3В, профиль масс-спектрометрии с линейной орбитальной ловушкой Velos для ОТС добавки показал, что только ~62% идентифицированных PSM соответствовали лактоферрину. Примечательно, что ~11% идентифицированных PSM соответствовали основному контаминанту лактопероксидазы. Соответственно, результаты демонстрируют, что процесс очистки, описанный в данном документе, приводит к образованию лактоферрина высокой чистоты и более высокой чистоты, чем другие доступные источники лактоферрина.

Таблица 3А. Количественная оценка Velos/орбитальная ловушка (фиг. 4)

Белок	% покрытия	Количество о PSM	% всего
Лактотрансферрин OS=Bos taurus OX=9913 GN=LTF PE=1 SV=2	71	517	82,19
Фактор системы комплемента В OS=Bos taurus OX=9913 GN=CFB PE=1 SV=2	33	25	3,97
Хитиназа-3-подобный белок 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=CHI3L1 PE=1 SV=3	46	24	3,82
Бета-1,4-галактозилтрансфераза 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=B4GALT1 PE=1 SV=3	33	19	3,02
Серотрансферрин OS=Bos taurus OX=9913 GN=TF PE=2 SV=1	5	18	2,86
Полимерный рецептор иммуноглобулина OS=Bos taurus OX=9913 GN=PIGR PE=2 SV=1	22	14	2,23
Бета-2-микроглобулин OS=Bos taurus OX=9913 GN=B2M PE=1 SV=2	49	12	1,91

Таблица 3В. Количественная оценка Velos/орбитальная ловушка для ОТС добавок

Белок	% покрытия	Количество о PSM	% всего
Лактотрансферрин OS=Bos taurus OX=9913 GN=LTF PE=1 SV=2	78	693	61,93
Лактопероксидаза OS=Bos taurus OX=9913 GN=LPO PE=1 SV=1	50	121	10,81
Серотрансферрин OS=Bos taurus OX=9913 GN=TF PE=2 SV=1	52	69	6,17
Рецептор фолиевой кислоты альфа OS=Bos taurus OX=9913 GN=FOLR1 PE=1 SV=3	49	38	3,40
Бета-лактоглобулин OS=Bos taurus OX=9913 GN=LGB PE=1 SV=3	47	25	2,23
Ангиогенин-1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=ANG1 PE=1 SV=4	37	21	1,88
Цистатин-С OS=Bos taurus OX=9913 GN=CST3 PE=1 SV=2	45	19	1,70

Альбумин OS=Bos taurus OX=9913 GN=ALB PE=1 SV=4	29	19	1,70
Фактор системы комплемента H OS=Bos taurus OX=9913 GN=CFH PE=1 SV=3	24	19	1,70
Ксантиндегидрогеназа/оксидаза OS=Bos taurus OX=9913 GN=XDH PE=1 SV=4	18	18	1,61
Белок S100-A9 OS=Bos taurus OX=9913 GN=S100A9 PE=1 SV=3	34	16	1,43
Молекула клеточной адгезии, зависящая от гликозилирования 1 OS=Bos taurus OX=9913 GN=GLYCAM1 PE=1 SV=2	22	15	1,34
Рибонуклеаза поджелудочная OS=Bos taurus OX=9913 GN=RNASE1 PE=1 SV=1	55	13	1,16
Липополисахарид-связывающий белок OS=Bos taurus OX=9913 GN=LBP PE=2 SV=1	26	13	1,16
Белок S100-A12 OS=Bos taurus OX=9913 GN=S100A12 PE=1 SV=3	53	10	0,89
Белок 1, связывающий фактор роста фибробластов OS=Bos taurus OX=9913 GN=FGFBP1 PE=1 SV=1	23	10	0,89

[0015] Чистоту лактоферрина также оценивали с помощью ELISA. Как показано на фиг. 5, при загрузке того же количества белка по массе, лактоферрин, полученный в соответствии с примером 1 («Hyacinth»), продемонстрировал 30% повышение связывания антител по сравнению с существующими исследовательскими стандартами. Соответственно, данные продемонстрировали, что очищенный белок Hyacinth (API-E2) достиг большей чистоты и/или сохранил большую долю нативного конформационного состояния белка по сравнению с другими эталонными продуктами исследовательского уровня.

[0016] Чистоту лактоферрина оценивали с помощью HPLC с использованием системы очистки белков Thermo Fisher U3000 вместе с колонкой Tricorn 5/150, заполненной Cytiva BigBeads, с использованием градиента NaCl. Как показано на фиг. 5B, API-E2, обработанный с помощью HPLC, демонстрирует одиночный пик, соответствующий лактоферрину, что указывает на чистоту ~100%.

[0017] Данные демонстрируют, что в процессе очистки примера 1 достигается более высокая чистота лактоферрина по сравнению с существующими доступными реагентами, особенно в отношении его способности снижать контаминацию лактопероксидазой.

Пример 3. Оценка активности лактоферрина с помощью ассоциации внеклеточного матрикса.

[0018] Развитие инфекции требует многостадийного процесса вирусной прогрессии. Во-первых, вирус поражает клетки после попадания в хозяина, связываясь с протеогликанами гепарансульфата (HS) хозяина во внеклеточном матриксе (ECM), облегчая связывание вирусной частицы с ее специфическим рецептором на поверхности клетки. Впоследствии вирус интернализуется и реплицируется внутри клетки-хозяина. В то время как противовирусные лекарственные средства обычно направлены либо на ингибирование ключевых белков репликации вируса, либо на специфические рецепторы на поверхности клетки, неспецифический механизм нацеливания на клетки HS при связывании ECM также может быть ингибирован, препятствуя или предупреждая связывание вируса с целевыми клетками. Поскольку этот путь относительно неспецифичен и требует покрытия внеклеточного матрикса экспонированных клеток, традиционные терапевтические средства, использующие преимущества этого подхода, обычно должны вводиться в дозах в относительно высоких локальных концентрациях, чтобы быть максимально эффективными и обычно они имеют примеси и/или токсичность. Соответственно, препараты лактоферрина с большей чистотой (например, стандарты фармацевтического уровня) будут предлагать значительно сниженные дозировки. Кроме того, приготовление таким образом, чтобы сохранить нативную функцию (например, сохранить нативную конформацию, посттрансляционные модификации, железосвязывающую способность и т.д.) сохранит эффективность лактоферрина по сравнению с его активностью в сыром молоке. Эти препараты (например, полученные в примере 1) позволяют использовать, хранить, готовить и/или доставлять лактоферрин в большей емкости, чем другие продукты лактоферрина.

[0019] Для оценки биологической активности лактоферрина, особенно его противовирусного действия, оценивали связывание с ECM. Очищенный лактоферрин получали в соответствии с примером 1. Клетки Caco-2, культура клеток человеческого происхождения, клеткам давали расти в течение трех дней после высевания на покровное стекло, чтобы клетки могли пролиферировать и ECM мог полностью развиваться. Затем к клеткам добавляли очищенный лактоферрин в различных концентрациях при 37°C в течение двух часов, чтобы позволить ему связываться, как предполагалось. Чтобы непосредственно наблюдать локализацию API, использовали иммуофлуоресцентную (IF) визуализацию и окрашивали API и E-кадгерин, маркер клеточной мембраны.

[0020] Как показано на фиг. 6, обогащение очищенного лактоферрина в ECM наблюдали по мере увеличения концентрации. Первичную внутреннюю локализацию также наблюдали при низких концентрациях, но, учитывая, что лактоферрин играет известную внутриклеточную роль и имеет рецептор, обеспечивающий его поглощение, ожидалась частичная локализация лактоферрина во внутриклеточном пространстве. Для количественной оценки локализации API измеряли абсолютную интенсивность флуоресцентного сигнала как снаружи/вдоль метки E-кадгерина, так и внутри клетки. Как

показано на фиг. 7, количественная оценка локализации лактоферрина продемонстрировала обогащение ЕСМ по мере увеличения концентрации. Результаты показывают, что очищенный лактоферрин проявляет биологическую активность при связывании с ЕСМ.

[0021] Затем первичные буккальные клетки культивировали в соответствии со стандартным протоколом (например, см. Russo et al. *Cytotechnology*. 2016 Oct; 68(5): 2105-2114; включенную в данный документ посредством ссылки для всех целей). Как для лактоферрина API-E2, так и для коммерчески доступного химически чистого стандарта, лактоферрин добавляли в среду в конечной концентрации 100 мкг/мл в течение 1 часа при 37°C, примерно в той концентрации, при которой ранее было обнаружено, что API-E2 лактоферрин начинает насыщать связывание культивируемых клеток. Иммуофлуоресцентную визуализацию проводили, как описано ранее. Как показано на фиг. 8, лактоферрин API-E2 продемонстрировал сильное связывание с ЕСМ буккальных клеток в этих условиях (верхний ряд). Однако коммерчески доступный химически чистый стандарт показал лишь ограниченную ассоциацию лактоферрина с ЕСМ в тех же условиях (нижний ряд). Результаты убедительно свидетельствуют о том, что лактоферрин API-E2 является более мощным и биоактивным в отношении ключевой ассоциации ЕСМ клетки-хозяина, которая необходима как для противовирусной активности белка, так и для снижения активности антибиотика в биопленке.

Пример 4. Противовирусная активность SARS-CoV-2

[0022] Для оценки противовирусной активности очищенного лактоферрина против SARS-CoV-2 проводили анализы снижения цитопатического эффекта (CPE).

[0023] Клетки Vero E6 высевали в 96-луночные планшеты для культивирования клеток с плотностью 80-100% конфлюэнтных клеток. Клетки инкубировали с 3-кратными серийными разведениями SC210, начиная с концентрации 1 мг/мл, в течение 2 часов при 37°C. Впоследствии клетки либо имитировали инфицирование (анализ цитотоксичности соединения), либо инфицировали с MOI 0,001 в общем объеме 150 мкл среды очищенным лактоферрином, полученным в соответствии с примером 1, химически чистым лактоферрином или ремдесивиром. Жизнеспособность клеток оценивали через три дня после инфекции путем окрашивания клеток нейтральным красным красителем в течение двух часов, экстрагирования красителя в течение 30 минут в цитратном буфере Соренсена/этаноле в соотношении 50:50 и считывания оптической плотности при OD 540 нм для определения EC50 (50% эффективная противовирусная концентрация). Как показано на фиг. 9 и количественно определено в таблице 4, очищенный лактоферрин ингибировал рост вируса, в том числе в более низкой концентрации, чем концентрация сопоставимого эталонного продукта исследовательской степени чистоты. Результаты демонстрируют, что очищенный лактоферрин, полученный в соответствии с примером 1, ингибирует вирусную инфекцию SARS-CoV-2 лучше, чем химически чистый, что предполагает повышенную биологическую активность и/или чистоту.

Таблица 4. EC50 для SARS-CoV-2

Соединение	EC50 (мкМ)
------------	------------

Лактоферрин («Hyacinth»)	0,09
Лактоферрин («Реагент»)	0,14
Ремдесивир	4,5

Пример 5. Оценка биоактивности лактоферрина с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии

[0024] Лактоферрин обладает множеством ключевых биологических активностей, связанных с его антимикробной активностью, включая важную активность хелатирования железа и связывания с клетками-хозяевами. В природе лактоферрин имеет как железосвязанную (хололактоферрин), так и не содержащую железа форму (аполактоферрин). Учитывая, что лактоферрин прочно связывается с железом, без ограничения теорией, хололактоферрин должен быть существенно более стабильным, чем аполактоферрин.

[0025] Дифференциальную сканирующую калориметрию (DSC) использовали для оценки форм хололактоферрина и аполактоферрина посредством мониторинга температуры разворачивания образцов лактоферрина с использованием nanoDSC (TA Instruments, Линдон, Юта) в соответствии со стандартными протоколами DSC, известными специалистам в данной области техники (например, см. Hinz et al «MEASUREMENT AND ANALYSIS OF RESULTS OBTAINED ON BIOLOGICAL SUBSTANCES WITH DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY»); включенную в данный документ посредством ссылки для всех целей.

[0026] Лактоферрин API-E2 (10 мг/мл), полученный, как описано в данном документе, оценивали с помощью DSC. Как показано на фиг. 10 (сплошная линия), лактоферрин API-E2 продемонстрировал два пика, соответствующие слева: аполактоферрину, как более крупный пик, и хололактоферрину, как меньший пик. Отсутствие других пиков указывает на отсутствие контаминантов и примесей и позволяет оценить API-E2 как ~100%. Результаты показывают, что присутствие лактоферрина, стабилизированного железом, приводит к сдвигу в сторону более высокой температуры денатурации в анализе DSC. Соответственно, анализ DSC продемонстрировал способность различать формы аполактоферрина и хололактоферрина в данном образце. Кроме того, отсутствие других пиков также указывало на чистоту лактоферрина API-E2. Пик аполактоферрина API-E2 имел T_m 60,2 +/- 0,8°C и дельта H 466,1 +/- 9,2 кДж/моль. Пик хололактоферрина API-E2 имеет T_m 88,38 +/- 0,8 С и дельта H 632,7 +/- 7,2 кДж/моль. Хололактоферрин в натуральном виде составлял в среднем 8,74 +/- 1,39% от общего количества лактоферрина API-E2, а остальная часть в протестированных образцах приходилась на аполактоферрин. Однако процентное содержание хололактоферрина может варьироваться естественным образом. С помощью этой методики рассчитывали, что API-E2 содержит практически 100% чистый лактоферрин.

Таблица 5. Количественная оценка железосвязывающих свойств по данным DSC

	Аполактоферрин	Хололактоферрин
Tm	60,2 +/- 0,8 С	88,38 +/- 0,8 С
Дельта Н	466,1 +/- 9,2 кДж/моль	632,7 +/- 7,2 кДж/моль
% всего	91,26 +/- 1,39%	8,74 +/- 1,39%

[0027] Анализ также проводили с термообработанным лактоферрином API-E2. Лактоферрин API-E2 нагревали в диапазоне 50-100°C. Примечательно, что диапазон нагрева, используемого в анализе DSC, сопоставим с температурами, обычно используемыми в промышленности до очистки лактоферрина (например, выше 63°C). Как показано на фиг. 10 (пунктирная линия), термообработанный лактоферрин API-E2 продемонстрировал потерю обоих обнаруживаемых пиков, что указывает на то, что формы как аполактоферрина, так и хололактоферрина были полностью денатурированы после термической обработки.

[0028] Анализ DSC далее использовали для оценки биологической активности лактоферрина, в частности, способности лактоферрина API-E2 связывать железо. Хлорид железа (FeCl₃) добавляли в 1000-кратном молярном избытке к лактоферрину API-E2. При наличии избытка железа лактоферрин API-E2 связывает железо с его открытым сайтом связывания железа. Если API-E2 сохранил свою биологическую активность в процессе производства, ожидается, что весь аполактоферрин перейдет в более стабильную форму хололактоферрина, что определяется наличием соответствующих им пиков DSC. Как показано на фиг. 11А, лактоферрин API-E2 демонстрирует два пика, соответствующие слева аполактоферрину как более крупному пику и справа хололактоферрину как меньшему пику в отсутствие избытка железа. При добавлении избытка железа 100% доступного аполактоферрина переходили в форму хололактоферрина, о чем свидетельствует единственный пик (правый пик) лактоферрина, наблюдаемый в данном случае без обнаруживаемого пика аполактоферрина. Результаты показывают, что железосвязывающая биоактивность полностью сохраняется в лактоферрине API-E2, полученном с использованием способов, описанных в данном документе.

[0029] Химический чистый стандартный лактоферрин и коммерчески доступный лактоферрин в виде пищевой добавки также оценивали с помощью DSC в условиях, используемых для оценки API-E2 выше. Как показано на фиг. 11В, пики химическим чистого стандартного лактоферрина были значительно меньше, чем пики, наблюдаемые для API-E2, и менее четко выражены, а также содержали 1 дополнительный пик, который связан с примесью. Кривая имела неспецифический наклон вверх, что обычно наблюдается для продукта с высокой степенью денатурированного белка, присутствующего в образце. Предполагаемое соотношение пиков аполактоферрина и хололактоферрина в этом результате почти одинаково, что указывает на результирующую потерю аполактоферрина во время переработки. Кроме того, пики как аполактоферрина, так и хололактоферрина денатурируются при более низкой температуре, 55 и 85°C соответственно, что демонстрирует более высокую степень нестабильности вследствие предварительной

химической, ферментативной и/или термической обработки и утрачивает способность связывать железо. Также, как показано на фиг. 11В, коммерчески доступный лактоферрин в виде пищевой добавки (нижняя линия) не продемонстрировал никаких обнаруживаемых пиков, указывающих на то, что продукт полностью денатурирован или в нем отсутствует молекула лактоферрина.

Пример 6. Оценка биологической активности лактоферрина в отношении бактерий слюны с помощью тестирования значения рН

[0030] Бактерии слюны (включая *Lactobacillus*, *Lactococcus* и *Streptococcus mutans*) выделяют кислоту во время роста. Это закисление тесно ассоциировано с разрушением зубов, особенно когда оно приводит к снижению значения рН ниже 5,5, что является клинически значимым порогом. Взвесь этих бактерий обрабатывали сахарозой для стимуляции роста, а также различными концентрациями лактоферрина API-E2. После добавления сахарозы и лактоферрина API-E2 рН доводили до 7 посредством титрования и впоследствии контролировали изменение рН в течение следующих 6 часов.

[0031] Как показано на фиг. 12, без обработки лактоферрином API-E2 и в присутствии сахарозы бактерии слюны продуцировали кислоту, что приводило к снижению значения рН до уровня ниже 5,5 в течение 4 часов. Однако при концентрации лактоферрина API-E2 1 мг/мл или 10 мг/мл в присутствии сахарозы значение рН поддерживается на уровне выше 5,5 в течение всего 6-часового периода тестирования. Результаты показывают, что присутствие API-E2 снижает выработку бактериальной кислоты в зависимости от концентрации, что указывает на противомикробную биологическую активность лактоферрина API-E2.

Пример 7. Оценка биологической активности лактоферрина с помощью поверхностной обработки домашней птицы.

[0032] Куриные грудки инокулировали бактериями слюны человека в суспензии, как описано выше при тестировании рН (включая *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus mutans* и *Porphyromonas gingivalis*) и оставляли на 6 дней при 37°C.

[0033] Как показано на фиг. 13, без обработки куриная грудка была покрыта бактериальным ростом в конце 6-дневного окна. Однако при обработке лактоферрином API-E2 в концентрации 3 мг/мл через 6 дней не наблюдали заметного роста каких-либо колоний бактерий, что указывает на противомикробную биологическую активность лактоферрина API-E2 после обработки поверхности.

Пример 8. Оценка биоактивности лактоферрина по зоне ингибирования

[0034] Для оценки биологической активности API-E2 лактоферрина проводили тест на зону ингибирования. Планшет с *E. coli* культивировали с добавлением 100 мкг/мл, 10 мкг/мл, 1 мкг/мл и 0,1 мкг/мл лактоферрина API-E2, добавленного к бумажным кружкам, и позволили ему диффундировать.

[0035] Как показано на фиг. 14, полное ингибирование обнаруживали в зоне диффузии при 100 мкг/мл и 10 мкг/мл лактоферрина API-E2 вместе с ограниченной зоной ингибирования при 1 мкг/мл, что указывает на противомикробную биологическую

активность лактоферрина API-E2. Зоны ингибирования не наблюдали при концентрации 0,1 мкг/мл.

Пример 9. Оценка биоактивности лактоферрина по активности LPO

[0036] Разрабатывали ферментативный анализ активности лактопероксидазы (LPO) с использованием молекулы, которая в присутствии активности пероксидазы приобретает синий цвет.

[0037] Как показано на фиг. 15, для очищенного стандарта LPO, наличие которого подтверждали с помощью M/S, это дает сильный положительный ответ (фиг. 15, №3). Для API-E2 Lf, очищенного, как описано в данном документе, LPO не обнаруживали ни с помощью M/S, ни с помощью ферментативного анализа (фиг. 15, №1). Однако для коммерчески доступного химически чистого стандарта Sigma (L9507) обнаруживали, что контаминант LPO можно обнаружить с помощью M/S, но это не приводит к положительной ферментативной реакции (фиг. 15, №2). Это указывает на то, что лактоферрин, полученный с помощью предыдущих методологий, приводил к общей потере биологической активности белков, обработанных с помощью этих условий. Однако в процессе, описанном в данном документе, где LPO можно было обнаружить с помощью M/S, также наблюдали соответствующую ферментативную активность. Только в образцах, в которых LPO полностью или почти полностью удаляли из лактоферрина (M/S не обнаружено), ферментативной активности не наблюдали. Это указывает как на то, что продукт лактоферрина API-E2 достигает очень высокой степени чистоты, так и на то, что процесс очистки, описанный в данном документе, в целом сохраняет активность белка на всех стадиях очистки.

8. ЭКВИВАЛЕНТЫ

[0038] Хотя настоящее изобретение было подробно показано и описано со ссылкой на предпочтительный вариант осуществления и различные альтернативные варианты осуществления, специалистам в соответствующей области техники будет понятно, что в нем могут быть сделаны различные изменения в форме и деталях, не выходя за рамки сущности и объема настоящего изобретения.

9. ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[0039] Все ссылки, выданные патенты и заявки на патенты, цитированные в тексте настоящего описания, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте для всех целей.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Композиция, содержащая лактоферрин, в которой лактоферрин очищали из натурального молочного продукта и в которой процентное содержание лактоферрина составляет по меньшей мере 70%.

2. Композиция, содержащая очищенный лактоферрин, при этом композиция имеет повышенное массовое процентное содержание лактоферрина по сравнению с соотношением, присутствующим в непереработанном молочном продукте, содержащем лактоферрин.

3. Композиция по п. 1 или п. 2, в которой процентное содержание лактоферрина оценивают с помощью масс-спектрометрии.

4. Композиция по п. 3, в которой масс-спектрометрия включает времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF).

5. Композиция по п. 3 или п. 4, в которой оценка с помощью масс-спектрометрии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площадей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину.

6. Композиция по п. 5, в которой пик, соответствующий лактоферрину, включает пики, соответствующие полноразмерному посттрансляционно модифицированному лактоферрину.

7. Композиция по п. 6, в которой полноразмерный посттрансляционно модифицированный лактоферрин содержит пик, имеющий m/z в диапазоне от 79000 до 90000.

8. Композиция по п. 6, в которой полноразмерный посттрансляционно модифицированный лактоферрин содержит пик, имеющий m/z в диапазоне от 79000 до 86000.

9. Композиция по любому из пп. 5-8, в которой пик, соответствующий лактоферрину, включает пик ионизации, соответствующий лактоферрину.

10. Композиция по п. 9, в которой пик ионизации, соответствующий лактоферрину, включает пики, имеющие m/z в диапазоне от 41000 до 42000.

11. Композиция по любому из пп. 5-10, в которой пики, которые не соответствуют лактоферрину, включают все остальные пики.

12. Композиция по любому из пп. 5-10, в которой области под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, включают пики, имеющие m/z в диапазоне от 18000 до 80000, кроме пиков, имеющих m/z в диапазоне от 41000 до 42000.

13. Композиция по любому из пп. 5-10, в которой области под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, включают пики, имеющие m/z в диапазоне от 18000 до 45000, кроме пиков, имеющих m/z в диапазоне от 41000 до 42000.

14. Композиция по п. 3, в которой масс-спектрометрия включает масс-спектрометрию с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos.

15. Композиция по п. 14, в которой оценка включает количественное определение

совпадений пептидного спектра (PSM), соответствующих лактоферрину, и PSM, которые не соответствуют лактоферрину.

16. Композиция по п. 1, в которой процентное содержание лактоферрина оценивают с помощью жидкостной хроматографии.

17. Композиция по п. 16, в которой жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC).

18. Композиция по п. 16 или п. 17, в которой оценка с помощью жидкостной хроматографии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площадей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину.

19. Композиция по любому из пп. 5-18, в которой одна или более площадей под пиком, которые не соответствуют лактоферрину, присутствующему в необработанном молочном продукте, находятся ниже предела обнаружения в композиции, при этом необязательно каждая площадь под пиком, который не соответствует лактоферрину, находится ниже предела обнаружения в композиции.

20. Композиция по любому из пп. 1-19, в которой процентное содержание лактоферрина составляет по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95%.

21. Композиция по любому из пп. 1-19, в которой процентное содержание лактоферрина составляет по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99%.

22. Композиция по любому из пп. 1-19, в которой процентное содержание лактоферрина составляет по меньшей мере 99%.

23. Композиция по п. 1, в которой процентное содержание лактоферрина оценивают с помощью иммуноферментного анализа (ELISA).

24. Композиция по п. 23, в которой ELISA распознает процентное содержание лактоферрина в конформации нативного белка.

25. Композиция по п. 24, в которой ELISA включает антитело, которое специфически связывает конформацию нативного белка лактоферрина.

26. Композиция, содержащая очищенный лактоферрин, при этом композиция имеет повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза по сравнению с соотношением, присутствующим в непереработанном молочном продукте, содержащем лактоферрин.

27. Композиция, содержащая лактоферрин, в которой лактоферрин очищали из необработанного молочного продукта, и при этом композиция имеет повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза по сравнению с соотношением в непереработанном молочном продукте до очистки лактоферрина.

28. Композиция по п. 26 или п. 27, в которой повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью масс-спектрометрии.

29. Композиция по п. 28, в которой масс-спектрометрия включает времяпролетную

масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF).

30. Композиция по п. 28 или п. 29, в которой оценка с помощью масс-спектрометрии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе.

31. Композиция по п. 30, в которой пики, соответствующие лактоферрину, включают пики, соответствующие полноразмерному посттрансляционно модифицированному лактоферрину, и необязательно пики ионизации, соответствующие лактоферрину.

32. Композиция по п. 30 или п. 31, в которой полноразмерный посттрансляционно модифицированный лактоферрин содержит пик, имеющий m/z в диапазоне от 79000 до 86000, пик ионизации, соответствующий лактоферрину, включает пики, имеющие m/z в диапазоне от 41000 до 42000, и пик, соответствующий лактопероксидазе, включает пик, имеющий m/z в диапазоне от 77000 до 79000.

33. Композиция по п. 28, в которой масс-спектрометрия включает масс-спектрометрию с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos.

34. Композиция по п. 33, в которой оценка включает количественное определение PSM, соответствующих лактоферрину, и PSM, соответствующих лактопероксидазе.

35. Композиция по п. 26 или п. 27, в которой повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью жидкостной хроматографии.

36. Композиция по п. 35, в которой жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC).

37. Композиция по п. 35 или п. 36, в которой оценка с помощью жидкостной хроматографии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе.

38. Композиция по любому из пп. 30-37, в которой пик, соответствующий лактопероксидазе в композиции, находится ниже предела обнаружения.

39. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза составляет 6 раз или больше.

40. Композиция по п. 26 или п. 27, в которой повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью ферментативного анализа лактопероксидазы.

41. Композиция по п. 40, в которой оценка с помощью ферментативного анализа лактопероксидазы включает количественное определение первой активности лактопероксидазы для композиции и второй активности лактопероксидазы для натурального молочного продукта, и при этом сниженное соотношение между первой и второй активностью лактопероксидазы указывает на повышенное соотношение лактоферрин:лактопероксидаза.

42. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой лактоферрин является бычьим.

43. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой лактоферрин не подвергали обработке.

44. Композиция по п. 43, в которой лактоферрин не подвергали химической, ферментативной, кислотной или термической обработке.

45. Композиция по п. 43, в которой лактоферрин не подвергали термической обработке.

46. Композиция по любому из пп. 43-45, в которой лактоферрин не подвергали термической обработке при температуре 50°C или выше, 51°C или выше, 52°C или выше, 53°C или выше, 54°C или выше, или 55°C или выше.

47. Композиция по п. 43 или п. 45, в которой лактоферрин не подвергали термической обработке при температуре 55°C или выше.

48. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин имеет нативную конформацию, по оценке с помощью кругового дихроизма.

49. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин имеет нативную конформацию, по оценке с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC).

50. Композиция по п. 49, в которой нативная конформация включает конформацию аполактоферрина и/или хололактоферрина.

51. Композиция по п. 50, в которой конформация аполактоферрина имеет пик температуры плавления 60,2 +/- 0,8 °C и/или конформация хололактоферрина имеет пик температуры плавления 88,38 +/- 0,8 °C.

52. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин способен связывать железо.

53. Композиция по п. 52, в которой по меньшей мере 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% или 90% очищенного лактоферрина способны связывать железо.

54. Композиция по п. 52, в которой по меньшей мере 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% очищенного лактоферрина способны связывать железо.

55. Композиция по п. 52, в которой по меньшей мере 99,1%, 99,2%, 99,3%, 99,4%, 99,5%, 99,6%, 99,7%, 99,8% или 99,9% очищенного лактоферрина способны связывать железо.

56. Фармацевтическая композиция или композиция по любому из пп. 52-55, в которой способность связывать железо оценивают с помощью DSC.

57. Композиция, содержащая лактоферрин, в которой лактоферрин очищали из необработанного молочного продукта, и в которой очищенный лактоферрин содержит нативную конформацию, нативная конформация содержит конформацию аполактоферрина и/или хололактоферрина, и конформация аполактоферрина имеет пик температуры плавления 60,2 +/- 0,8 °C и/или конформация хололактоферрина имеет пик температуры плавления 88,38 +/- 0,8 °C.

58. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин содержит посттрансляционную модификацию.

59. Композиция по п. 58, в которой посттрансляционная модификация включает гликозилирование.

60. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин имеет среднюю молекулярную массу по меньшей мере 79000-86000 Да.

61. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин является высушенным.

62. Композиция по п. 61, в которой очищенный лактоферрин сушат с помощью сублимационной сушки/лиофилизации, сушки в псевдоожоженном слое или низкотемпературной распылительной сушки.

63. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой композиция дополнительно содержит молекулу железа.

64. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин образует комплекс с молекулой железа.

65. Композиция по п. 63 или п. 64, в которой молекула железа включает Fe^{2+} или Fe^{3+} .

66. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин образует комплекс с молекулой меди, цинка, марганца и/или галлия.

67. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой очищенный лактоферрин образует комплекс с молекулой цинка.

68. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой композиция содержит эндотоксин на уровне 5 EU/кг или меньше.

69. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой натуральный молочный продукт не подвергали обработке.

70. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой натуральный молочный продукт не подвергали обработке перед очисткой лактоферрина.

71. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой натуральный молочный продукт не подвергали химической, ферментативной, кислотной или термической обработке перед очисткой лактоферрина.

72. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой натуральный молочный продукт не подвергали термической обработке перед очисткой лактоферрина.

73. Композиция по любому из пп. 71 или 72, в которой термическая обработка включает температуру 50°C или выше, 51°C или выше, 52°C или выше, 53°C или выше, 54°C или выше, или 55°C или выше.

74. Композиция по п. 71 или п. 72, в которой термическая обработка включает температуру 50°C или выше, 51°C или выше, 52°C или выше, 53°C или выше, 54°C или выше, или 55°C или выше.

75. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой натуральный молочный продукт сепарировали на обезжиренное молоко и сливки перед очисткой лактоферрина.

76. Композиция по п. 75, в которой сепарация на обезжиренное молоко и сливки

включает сепарацию в холодной чаше.

77. Композиция по любому из вышеуказанных пунктов, в которой натуральный молочный продукт подвергали кислотной обработке перед очисткой лактоферрина.

78. Композиция по п. 77, в которой кислотная обработка включает удаление нерастворимых казеинов.

79. Композиция по п. 77 или п. 78, в которой кислотную обработку проводят при pH 4,0 или выше.

80. Способ оценки чистоты композиции, содержащей лактоферрин, включающий количественное определение соотношения лактоферрин:лактопероксидаза.

81. Способ по п. 80, в котором соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью масс-спектрометрии.

82. Способ по п. 81, в котором масс-спектрометрия включает времяпролетную масс-спектрометрию с лазерной ионизацией и десорбцией из жидкой матрицы (MALDI-TOF).

83. Способ по п. 81 или п. 82, в котором оценка с помощью масс-спектрометрии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе.

84. Способ по п. 83, в котором пики, соответствующие лактоферрину, включают пики, соответствующие полноразмерному посттрансляционно модифицированному лактоферрину, и необязательно пики ионизации, соответствующие лактоферрину.

85. Способ по п. 83 или п. 84, в котором полноразмерный посттрансляционно модифицированный лактоферрин содержит пик, имеющий m/z в диапазоне от 79000 до 86000, пик ионизации, соответствующий лактоферрину, включает пики, имеющие m/z в диапазоне от 41000 до 42000, и пик, соответствующий лактопероксидазе, включает пик, имеющий m/z в диапазоне от 77000 до 78000.

86. Способ по п. 81, в котором масс-спектрометрия включает масс-спектрометрию с линейной квадрупольной орбитальной ловушкой Velos.

87. Способ по п. 86, в котором оценка включает количественное определение PSM, соответствующих лактоферрину, и PSM, соответствующих лактопероксидазе.

88. Способ по п. 80, в котором соотношение лактоферрин:лактопероксидаза оценивают с помощью жидкостной хроматографии.

89. Способ по п. 88, в котором жидкостная хроматография представляет собой высокоэффективную жидкостную хроматографию (HPLC).

90. Способ по п. 88 или п. 89, в котором оценка с помощью жидкостной хроматографии включает количественное определение площади под пиком, соответствующим лактоферрину, и площади под пиком, соответствующим лактопероксидазе.

91. Способ по любому из пп. 83-90, в котором пик, соответствующий лактопероксидазе в композиции, находится ниже предела обнаружения.

92. Способ оценки чистоты композиции, содержащей лактоферрин, включающий количественную оценку активности лактопероксидазы с помощью ферментативного

анализа лактопероксидазы.

93. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, дополнительно включающий количественное определение массового процентного содержания лактоферрина в композиции.

94. Способ по п. 93, в котором процентное содержание лактоферрина оценивают с помощью масс-спектрометрии, жидкостной хроматографии или ELISA.

95. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, дополнительно включающий количественное определение массового процентного содержания лактоферрина в композиции.

96. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, дополнительно включающий оценку нативной конформации лактоферрина с помощью кругового дихроизма.

97. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, дополнительно включающий оценку статуса посттрансляционной модификации лактоферрина.

98. Способ по п. 97, в котором оценка посттрансляционной модификации включает оценку статуса гликозилирования лактоферрина.

99. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, дополнительно включающий оценку средней молекулярной массы лактоферрина.

100. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, дополнительно включающий оценку конформационного статуса лактоферрина.

101. Способ по п. 100, в котором конформационный статус оценивают с помощью ELISA.

102. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, дополнительно включающий оценку статуса лактоферрина в отношении связывания металла.

103. Способ по любому из вышеуказанных пунктов, дополнительно включающий оценку уровня эндотоксина композиции.

104. Способ производства любой из вышеуказанных композиций.

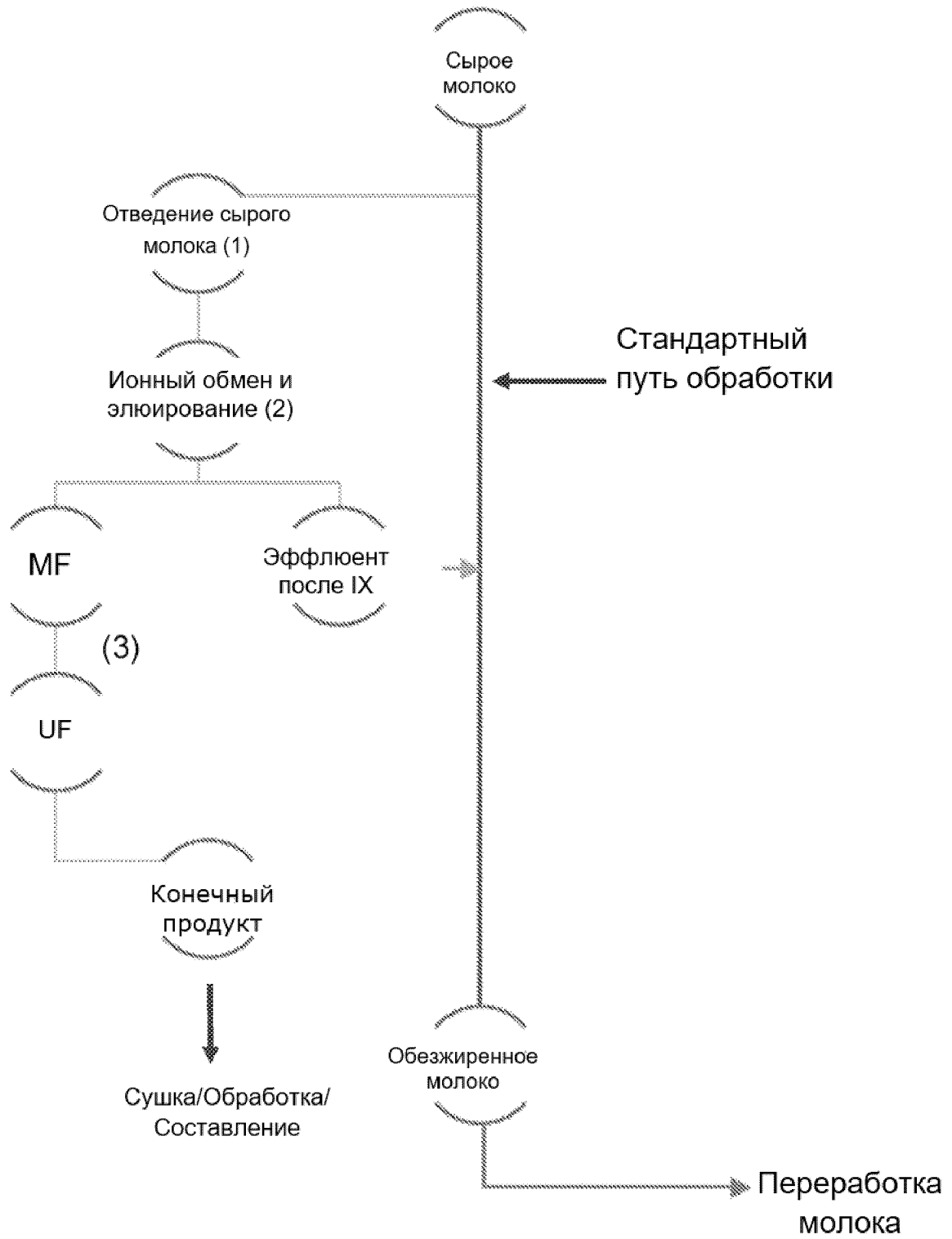
105. Способ по п. 104, включающий одну или более стадий, выбранных из группы, состоящей из: хроматографии, фильтрации и сушки.

106. Способ по п. 104, включающий каждую из стадий хроматографии, фильтрации и сушки.

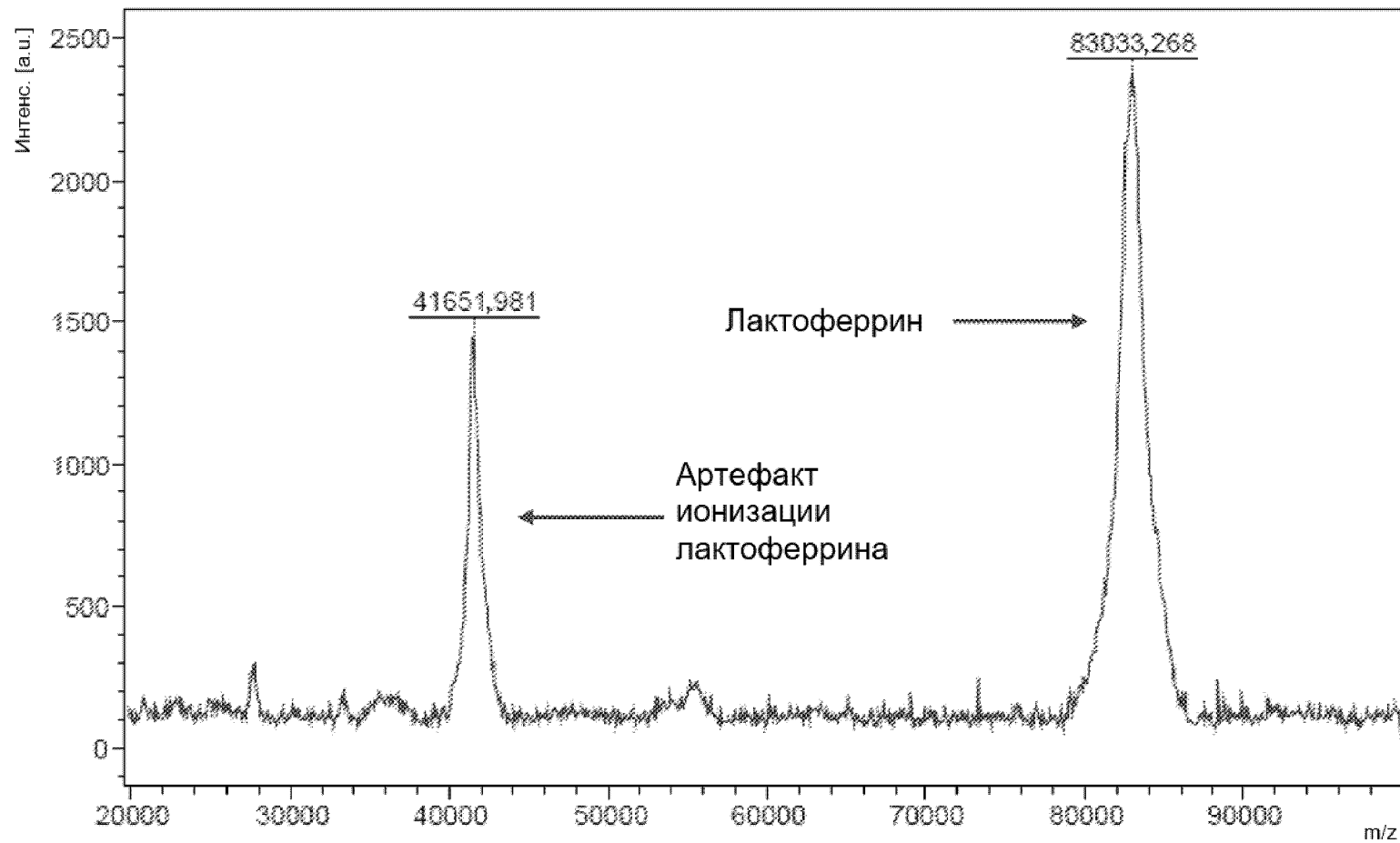
107. Фармацевтическая композиция, содержащая любую из вышеуказанных композиций и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

108. Способ лечения заболевания или состояния, при этом способ включает введение фармацевтической композиции, содержащей любую из вышеуказанных композиций.

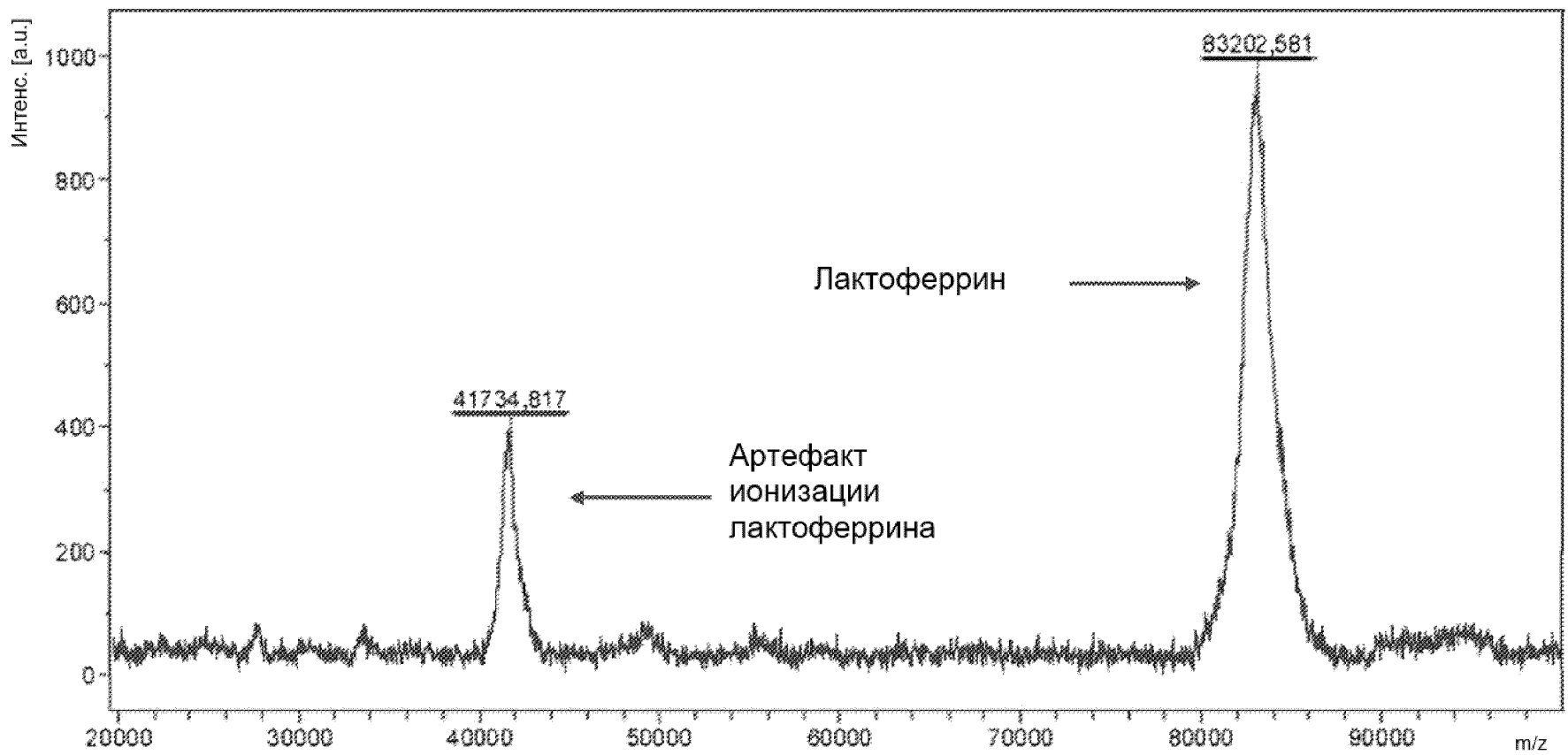
По доверенности



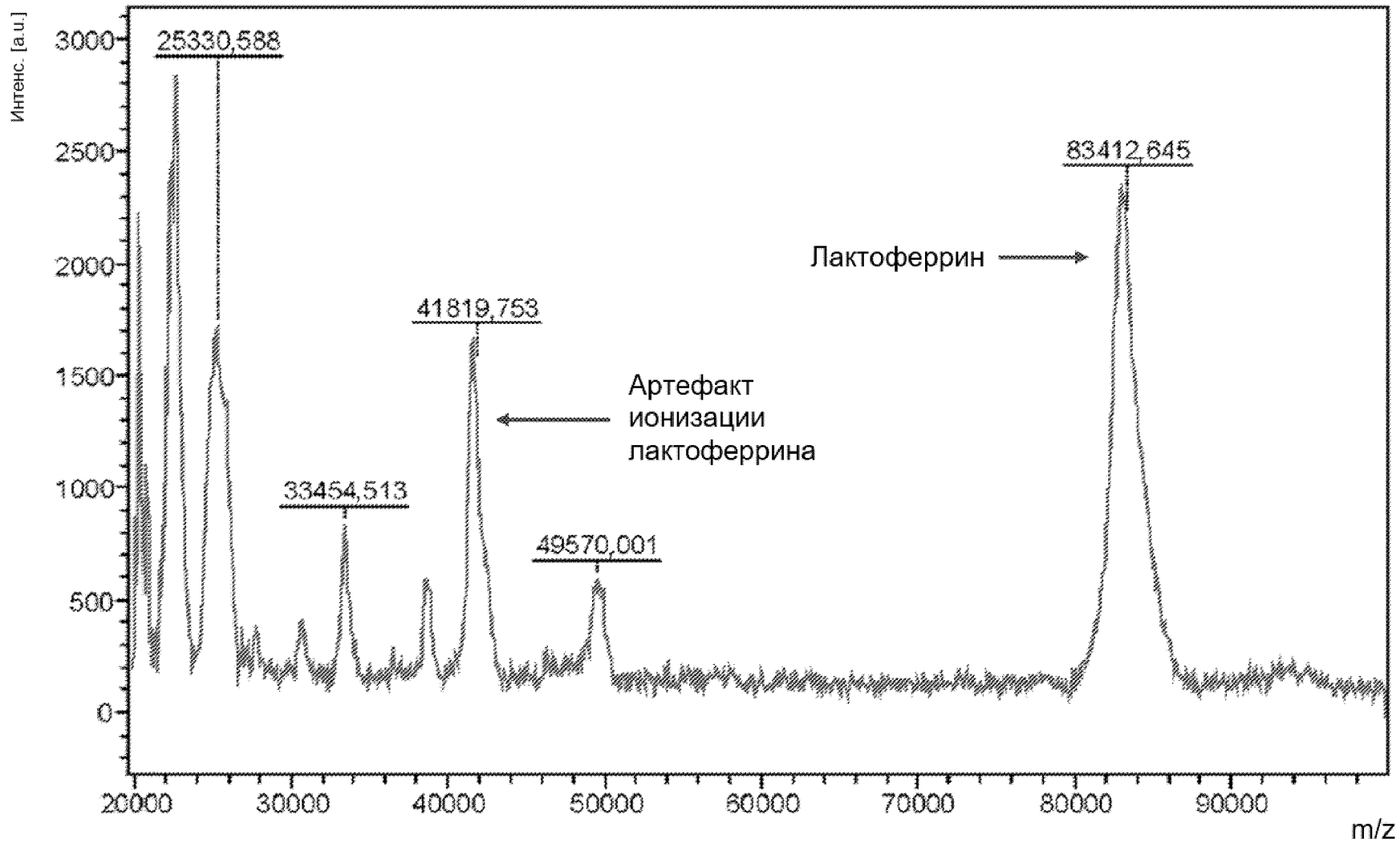
Фиг. 1



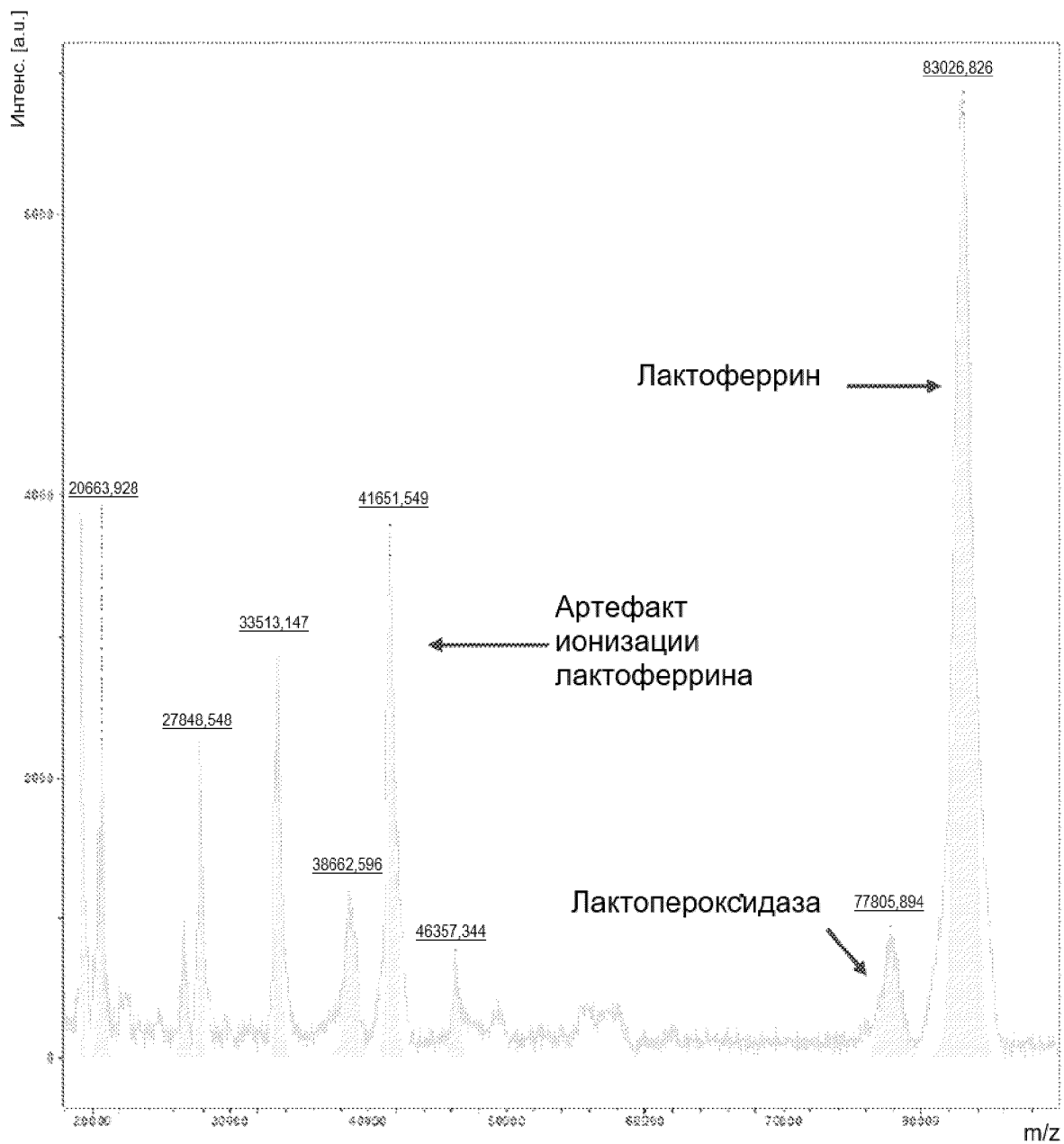
Фиг. 2А



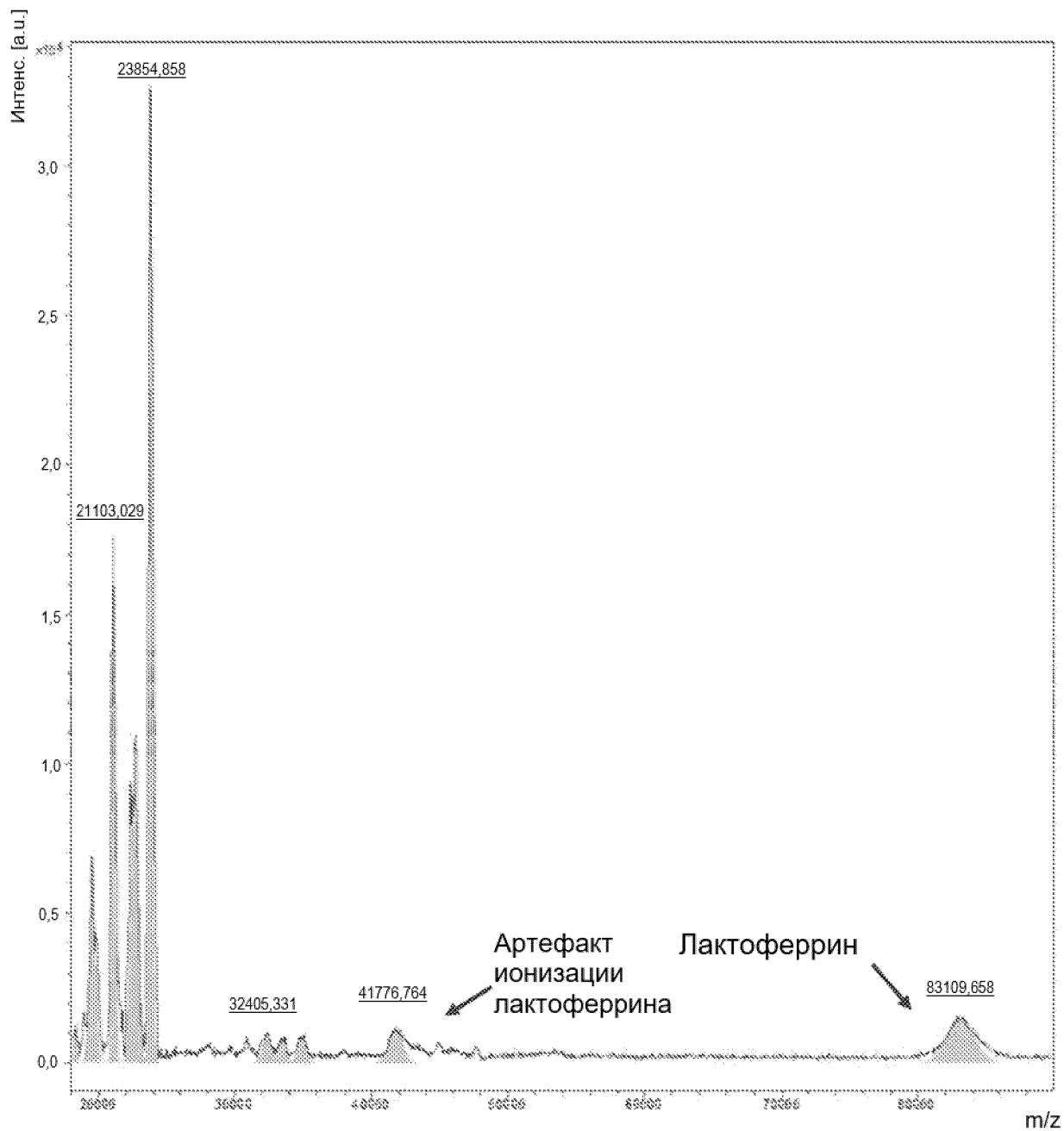
Фиг. 2В



Фиг. 3А

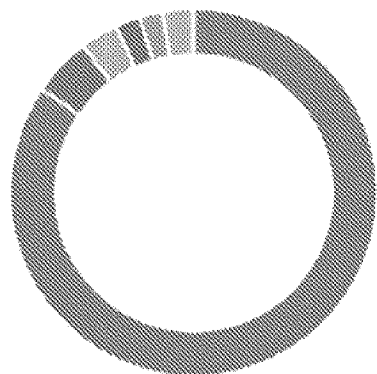


Фиг. 3В



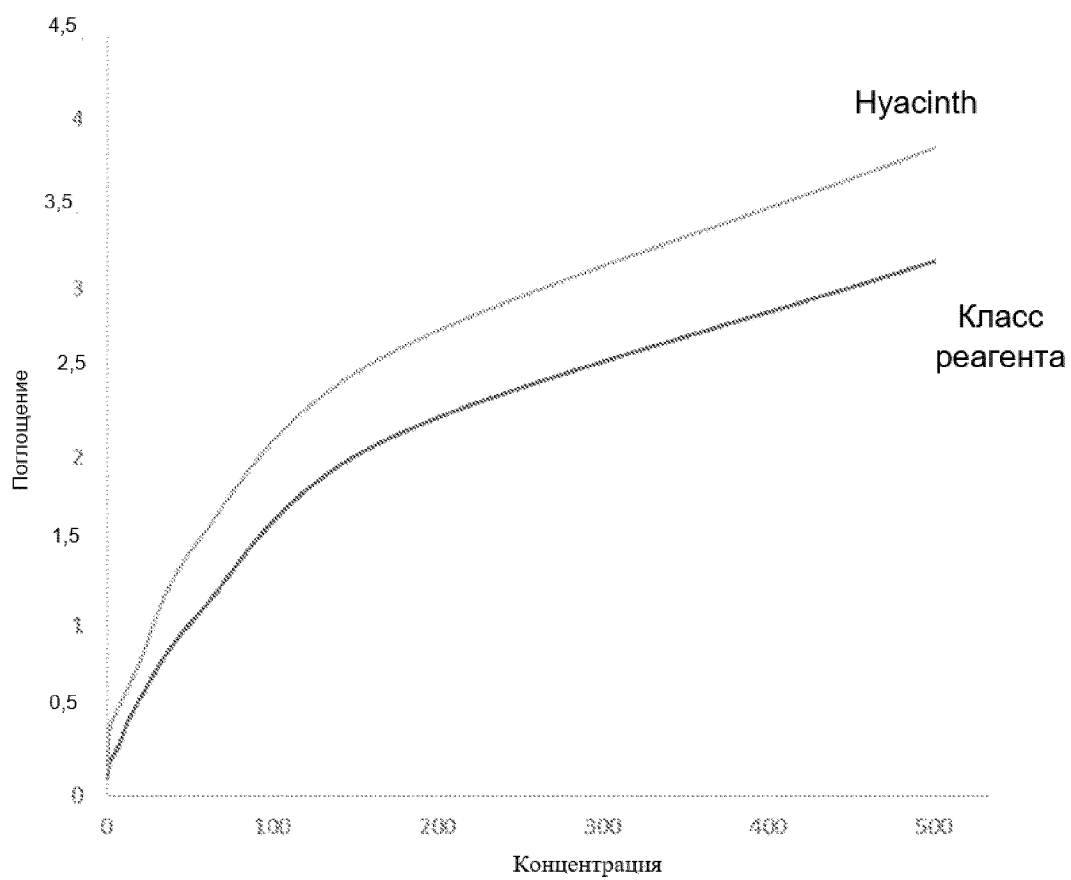
Фиг. 3С

Результаты МС АРІ белков Hyacinth,
выполненные с помощью линейной ловушки квадрупольной
орбитальной ловушки Velos

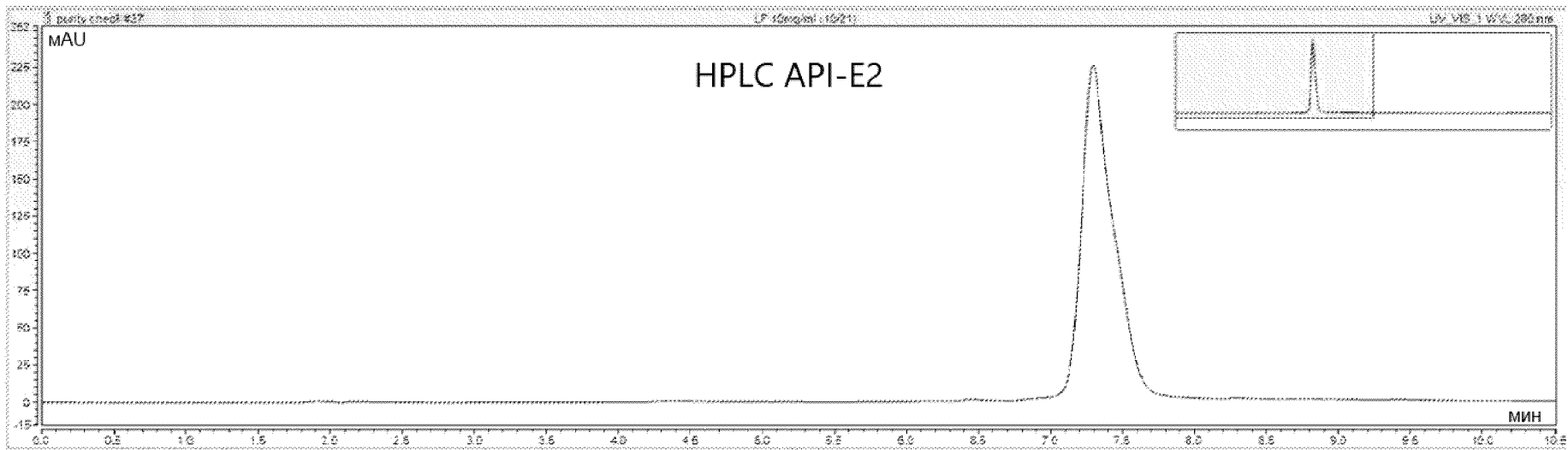


← Лактоферрин

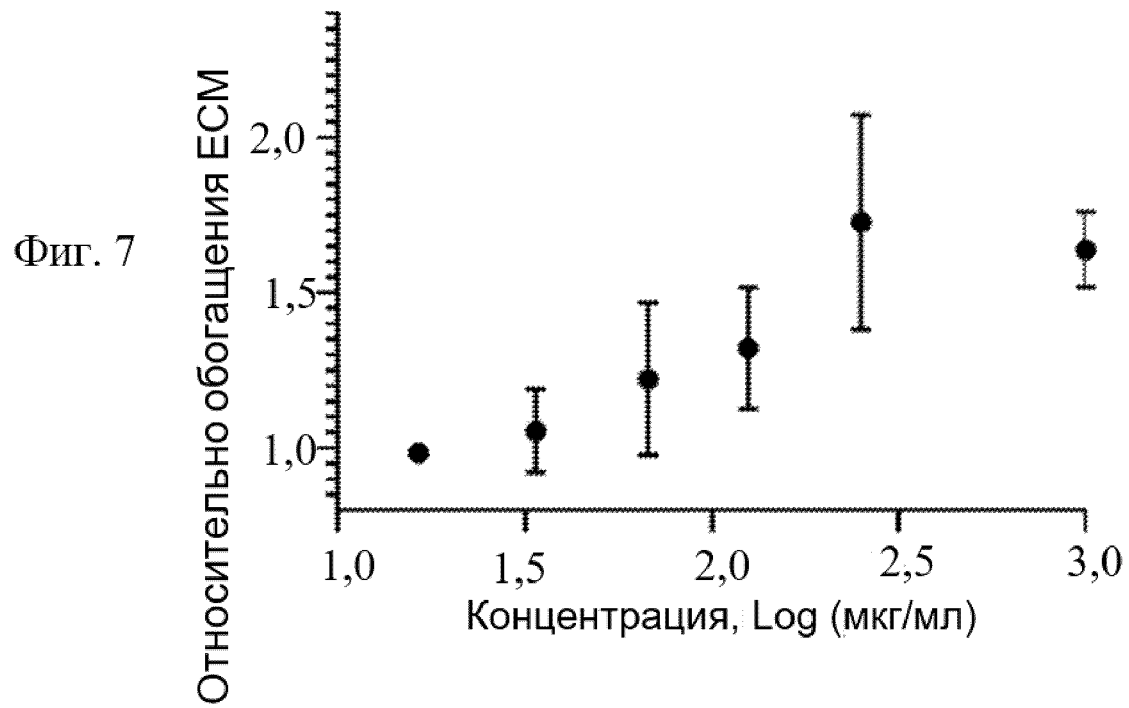
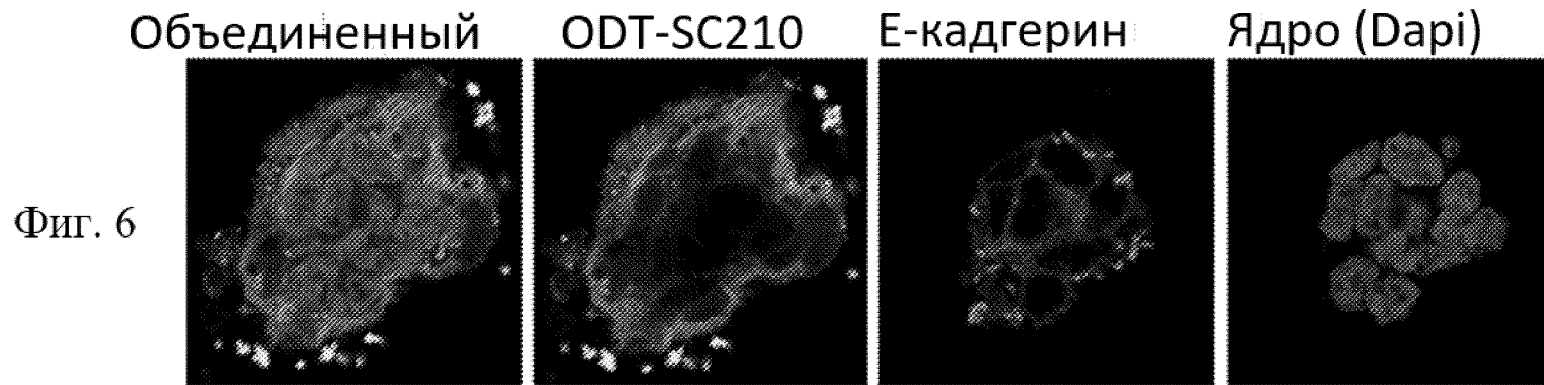
Фиг. 4



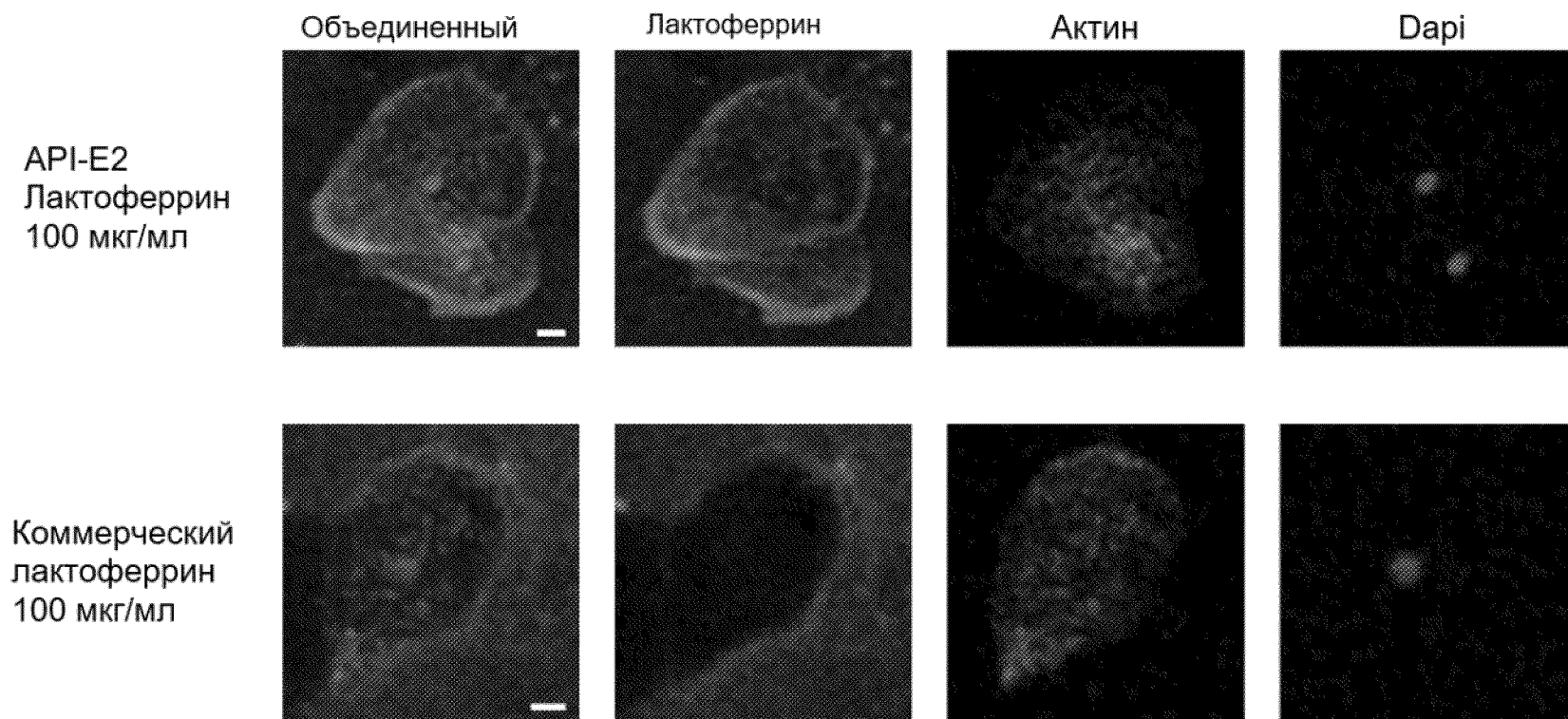
Фиг. 5А



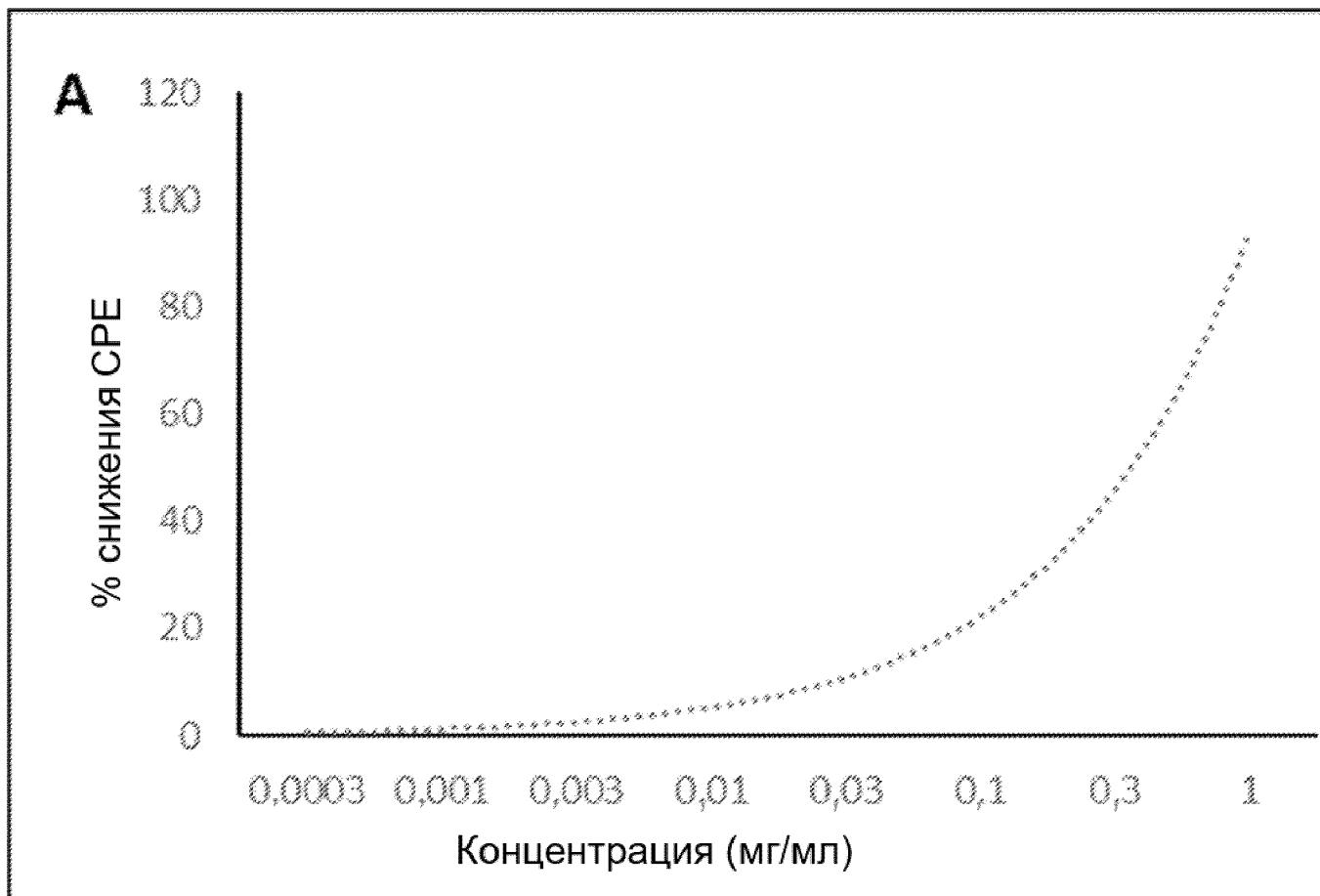
Фиг. 5В



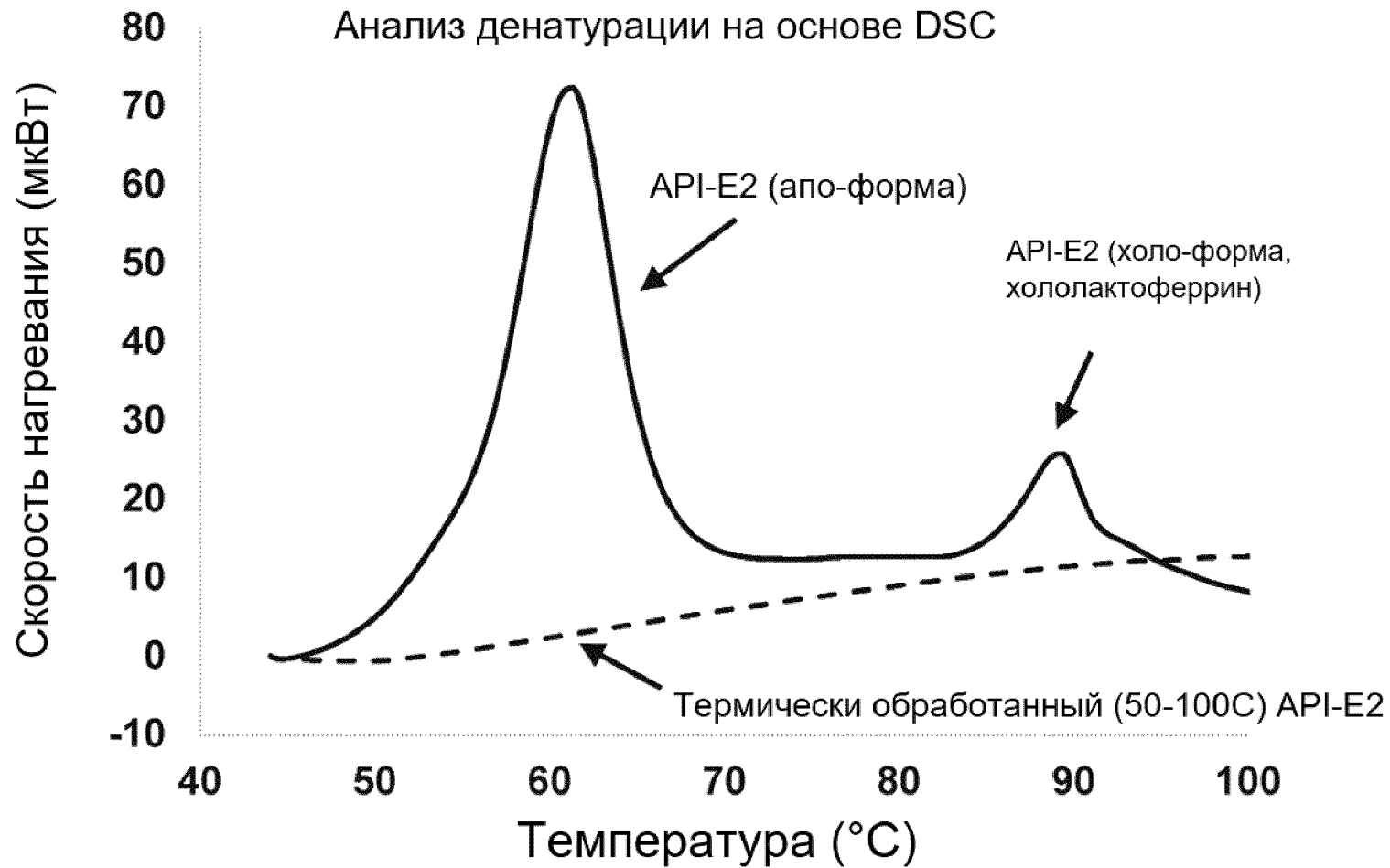
Лактоферрин API-E2 демонстрирует более сильное связывание ECM



Фиг. 8

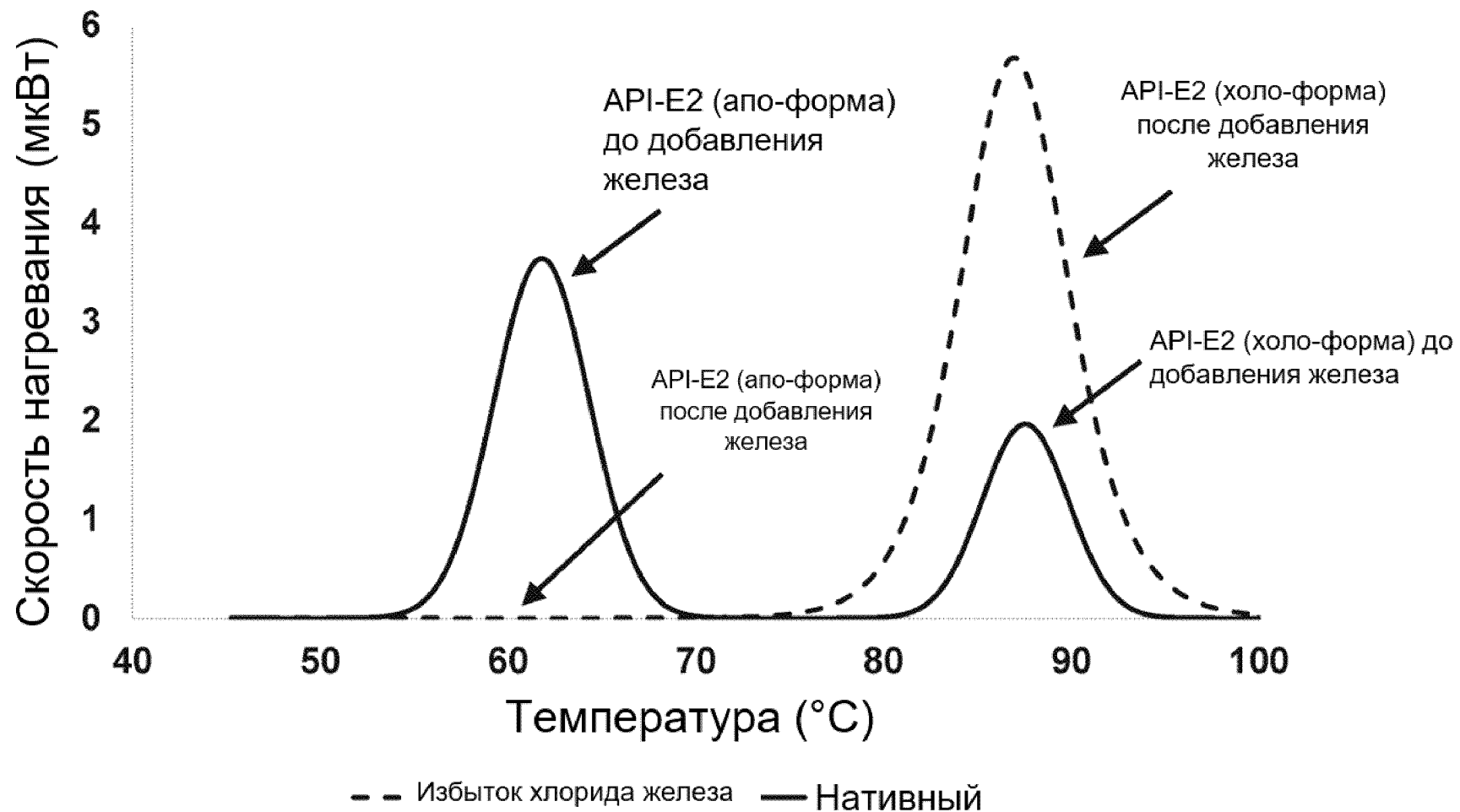


Фиг. 9



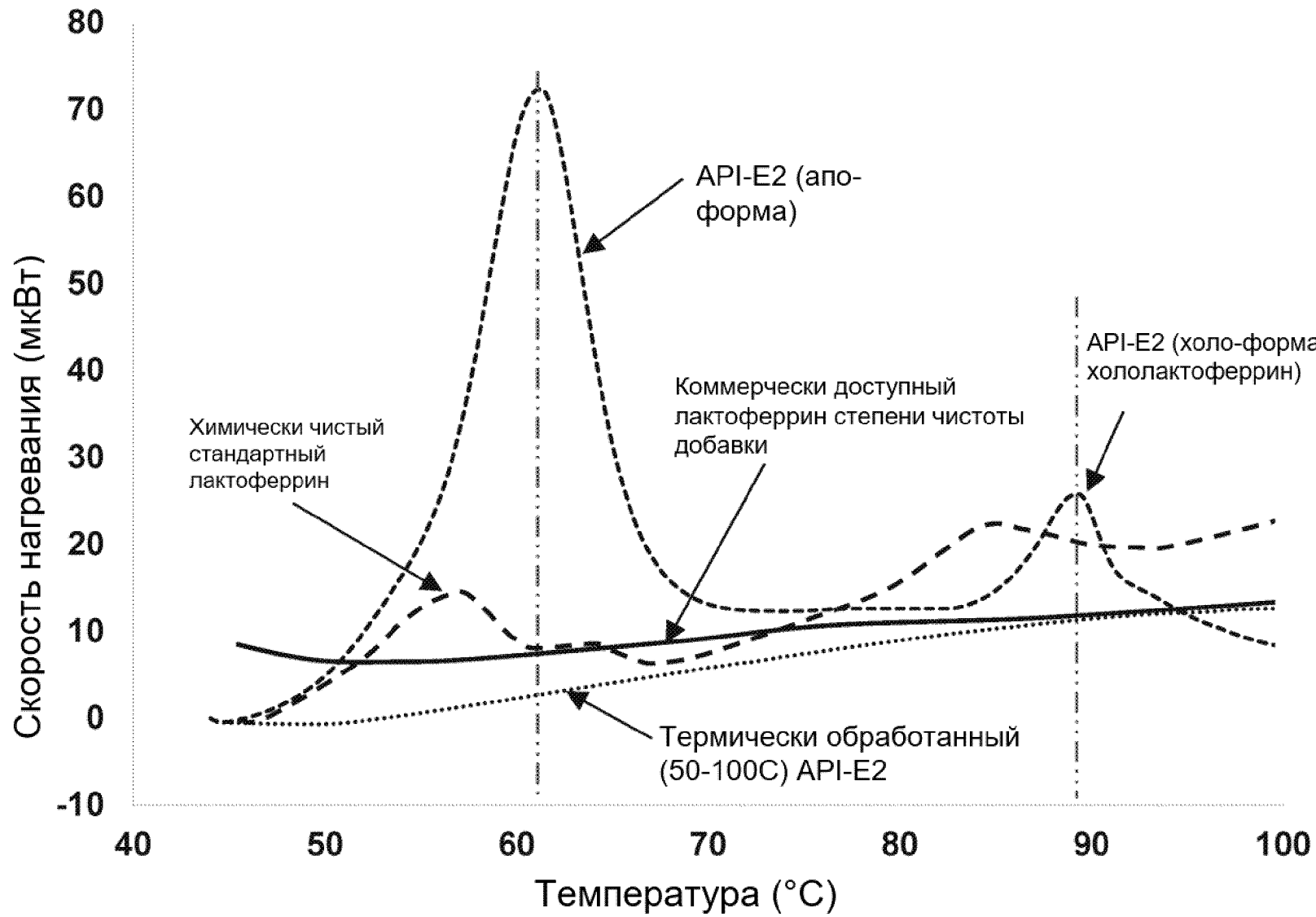
Фиг. 10

Анализ связывания железа на основе DSC

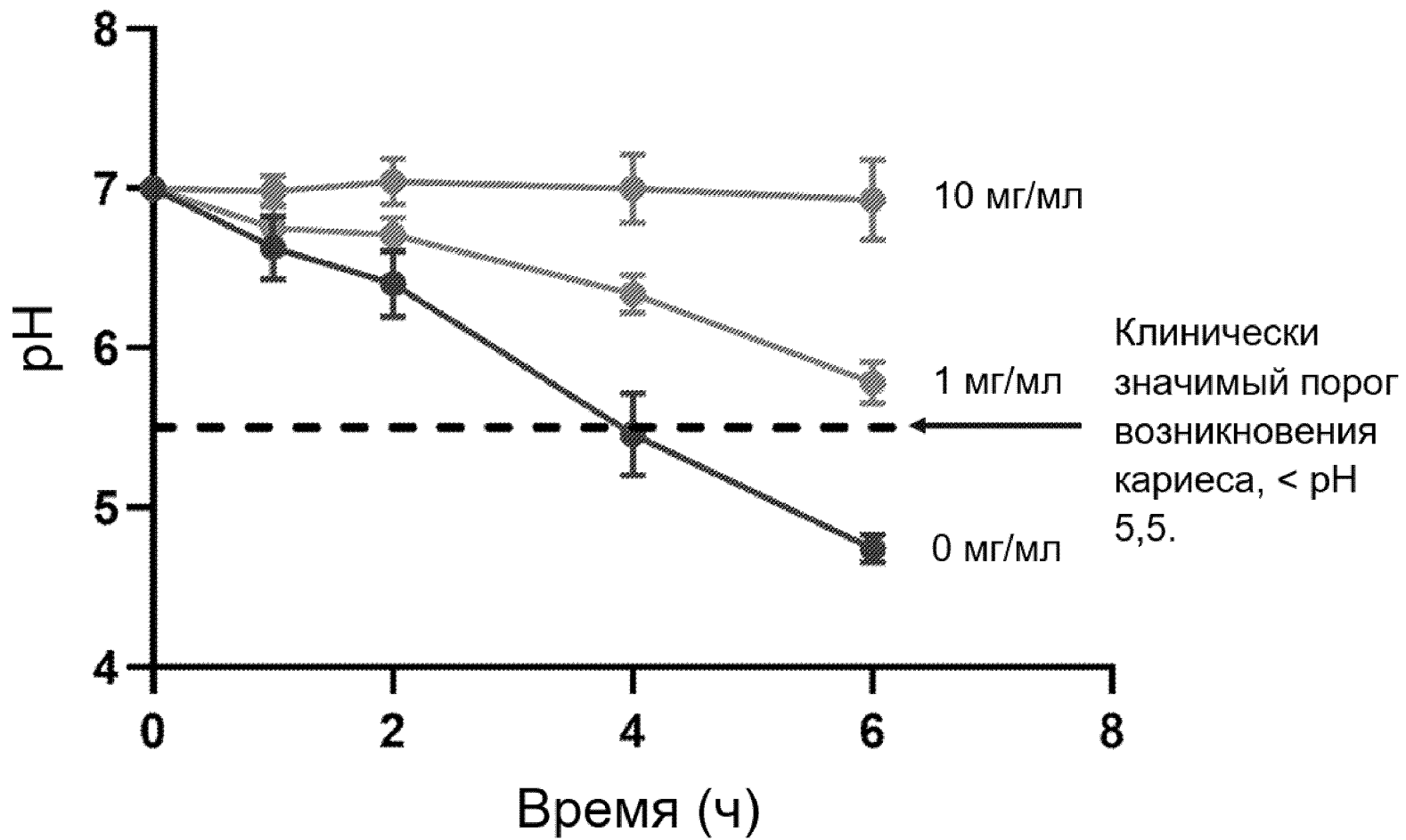


13/18

Фиг. 11А

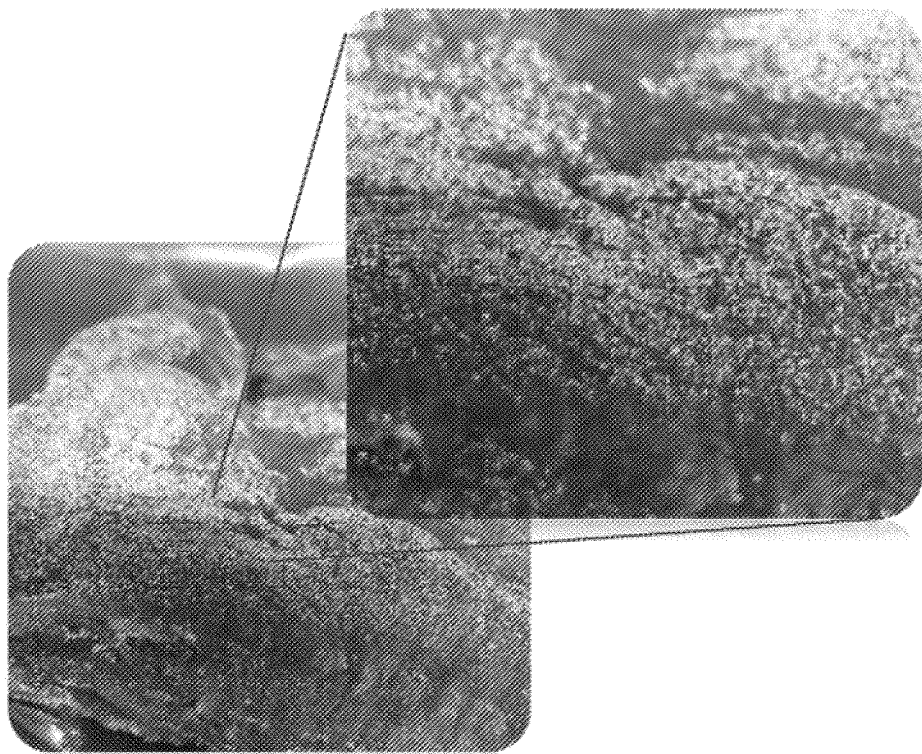


Фиг. 11В

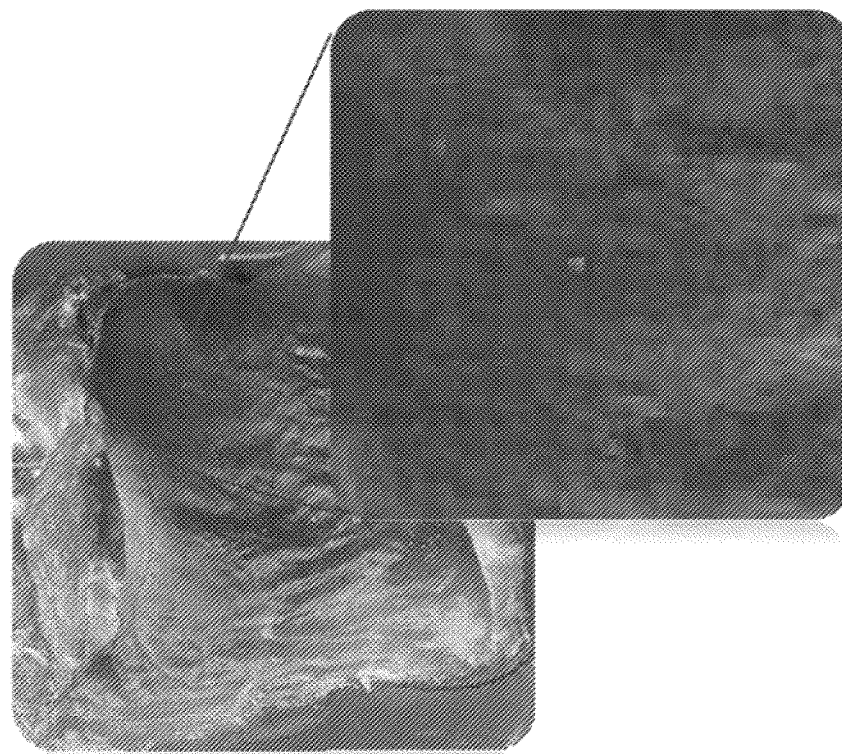


Фиг. 12

Без обработки



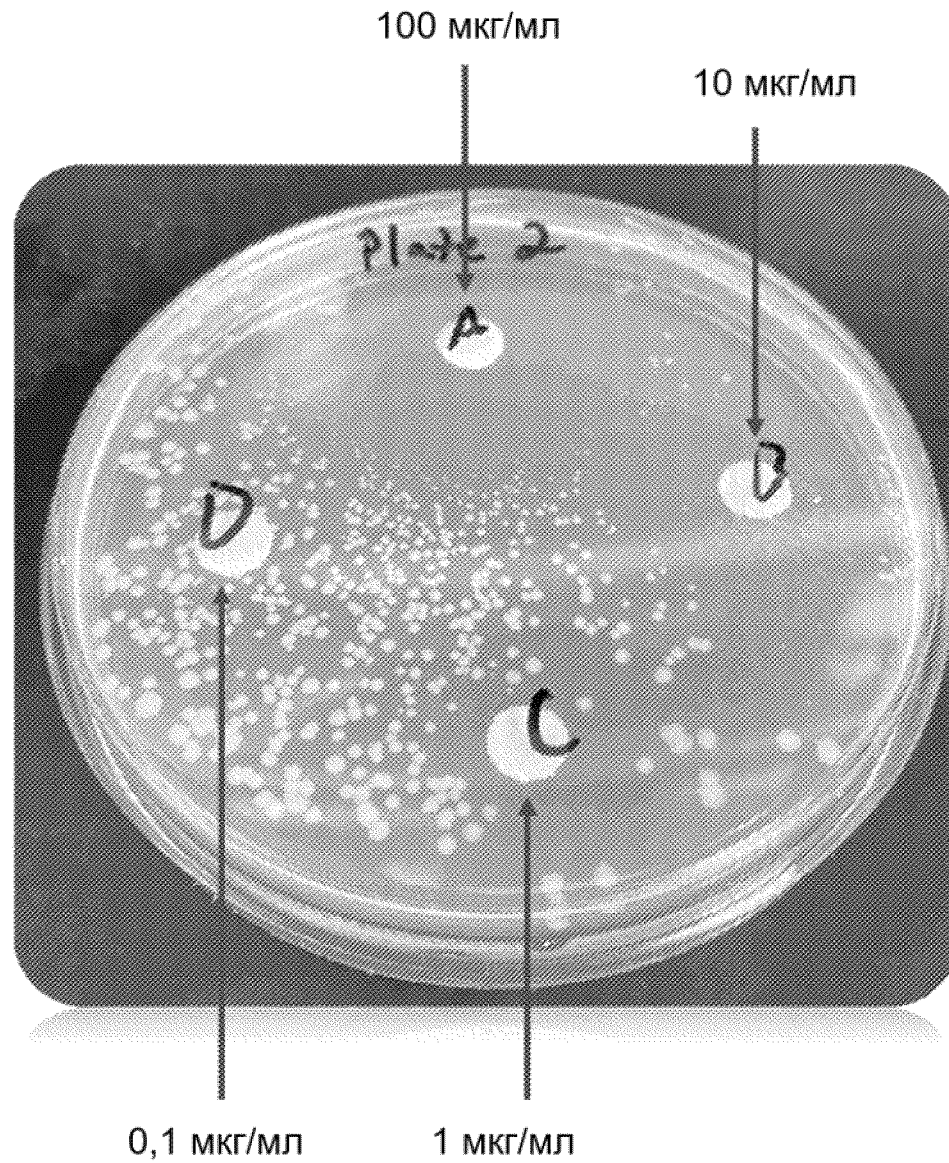
Обработка API-E2



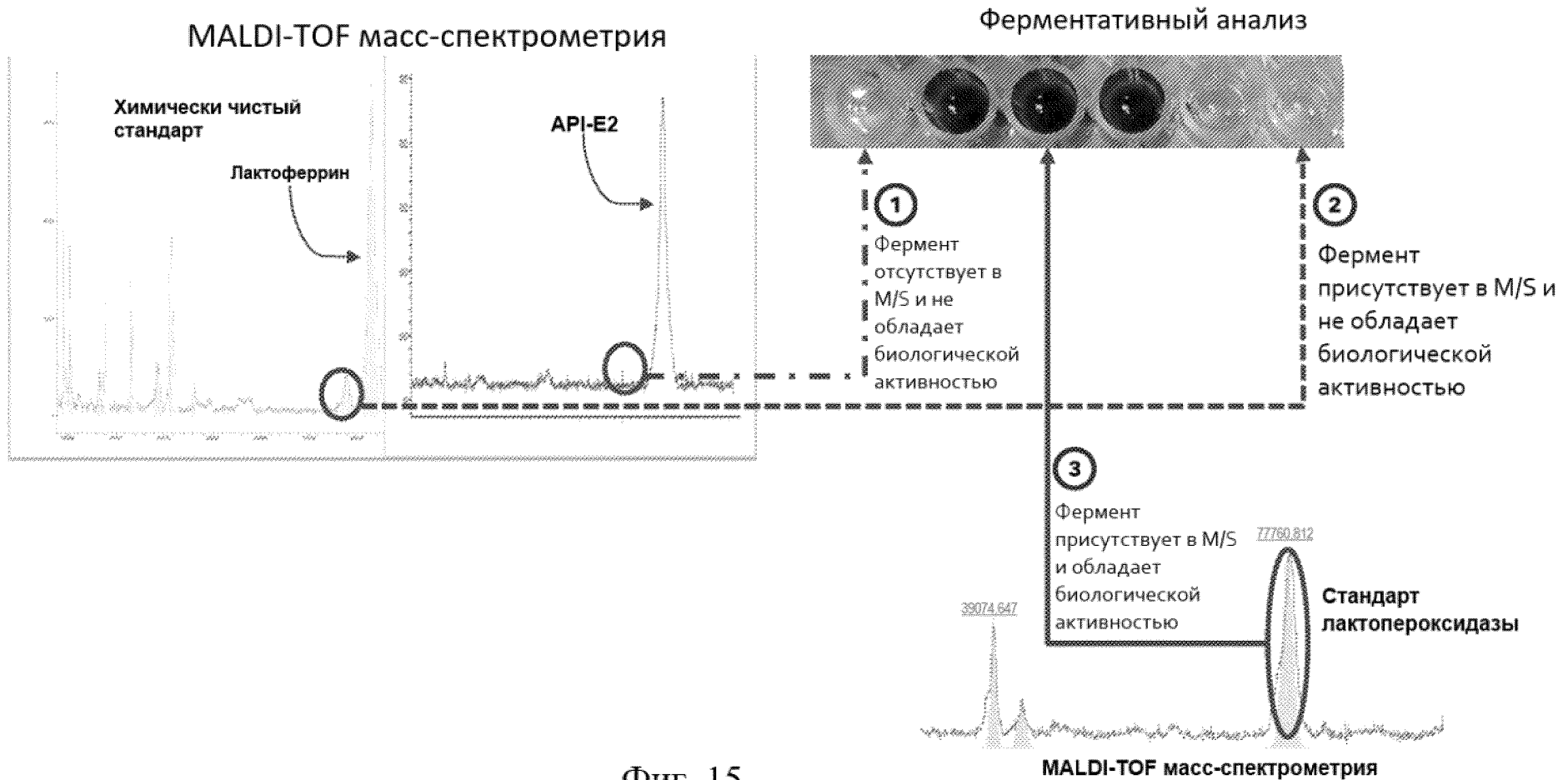
16/18

Фиг. 13

Фиг. 14



Анализ активности лактопероксидазы



Фиг. 15