



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 297 398**

(51) Int. Cl.:
C07K 14/47 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **04719003 .8**

(86) Fecha de presentación : **10.03.2004**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1613648**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **11.01.2006**

(54) Título: **Purificación de péptidos del calostro.**

(30) Prioridad: **11.03.2003 GB 0305552**
08.03.2004 GB 0405190

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
01.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
01.05.2008

(73) Titular/es: **Regen Therapeutics plc.**
73 Watling Street
London EC4M 9BJ, GB

(72) Inventor/es: **Georgiades, Jerzy, Alexander;**
Polanowski, Antoni;
Wilusz, Tadeusz y
Kruzel, Marian, L.

(74) Agente: **Carvajal y Urquijo, Isabel**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Purificación de péptidos del calostro.

5 Esta aplicación se relaciona con la purificación de péptidos a partir del calostro. La invención se interesa particularmente con la purificación de la colostrina a partir del calostro.

10 El colostrum, o calostro, es una secreción viscosa de la glándula mamaria caracterizada por la presencia de muchos elementos necesarios para los mamíferos recién nacidos para desarrollarse apropiadamente. Es la primera secreción láctea después del alumbramiento y contiene una alta concentración de inmunoglobulinas (IgG, IgM y IgA) y proteínas no-específicas. Se sustituye por leche materna madura aproximadamente cuatro a cinco días después del nacimiento. Comparado con la leche materna madura, el calostro tiene bajo contenido de azúcar, pero es más rico en lípidos, proteínas, sales minerales e inmunoglobulinas. También contiene diversas células que flotan tales como células granulares y estromales, neutrófilos, monocitos/macrófagos y linfocitos. También es rico en factores de crecimiento, hormonas y citoquinas.

20 Entre las proteínas presentes en el calostro, las caseínas son las más predominantes y conocidas para formar agregados (micelas), que son similares en todos los mamíferos. Muchas proteínas y péptidos se unen a aquellos agregados, por fuerzas iónicas e hidrófobas débiles. La red resultante de micelas proteínicas tiene la habilidad de atrapar muchos compuestos de peso molecular pequeño de diferente naturaleza, tales como lípidos, carbohidratos, y péptidos, que forman una solución homogénea única. Las micelas ayudan a distribuir estas micro-moléculas relativamente uniformes por todo el calostro, y también les previenen de la formación de agregados indeseados.

25 Un número de péptidos a partir de la leche con diversas actividades biológicas han sido reportados. Algunos péptidos existen naturalmente y alguno puede ser liberado vía proteólisis enzimática de las proteínas de leche materna. De particular interés son aquellos péptidos que existen naturalmente que se unen a las micelas de caseína. Además de la proteína caseína, calcio y fosfato, la micela también contiene citrato, iones inferiores, lipasa y enzimas del plasmin, y diversos péptidos atrapados en su estructura. Por consiguiente, el procedimiento de purificación y recuperación de muchos componentes derivados de la leche recientemente, se convierte en el esfuerzo más desafiante para la industria lechera.

30 En general, el procedimiento de recuperación de la leche inicia coagulando las caseínas con la adición de la quimosina para dar cuajadas, que luego se separan a partir del líquido, suero, después de lo cual se pueden procesar y madurar para producir una variedad de quesos. La quimosina rompe las moléculas kappa-caseína que causan un colapso global de micelas de caseína. Como consecuencia muchos componentes de una fracción soluble de leche llegan a ser atrapados en el precipitado y se pasan por alto. Particularmente los péptidos moleculares pequeños con un índice hidrófobo alto, tales como colostrina, se pueden perder.

40 El protocolo de purificación adicional para obtener la colostrina (Janusz *et al.*), consiste de la precipitación de la caseína dependiente del pH seguido por diversas etapas cromatográficas, que incluyen el intercambio iónico, afinidad y cribado molecular, combinado con la precipitación de sulfato de amonio. Aunque, este método es reproducible, es laborioso y difícil de escalar para aplicaciones industriales. Desde ese entonces numerosos protocolos, utilizando filtración de membrana, han sido desarrollados para la recuperación de péptidos de peso molecular bajo a partir de la leche y el calostro, pero todos estos han tenido deficiencias.

45 La filtración de flujo tangencial se utiliza en un protocolo estándar para la separación de componentes de leche en la industria lechera. Por ejemplo, en la Patente US 6, 268,487 titulada *Purification of Biologically Active Peptides from Milk by Kutzko et al.*, se revela un método para la separación de los componentes de leche por filtración de flujo tangencial.

50 También, una ultrafiltración se propone por Roger *et al.*, en una patente US 4,485,040, titulada: *Process for Obtaining an α -L actalbumin Enriched Product from Whey, y Uses Thereof*, para separar los componentes de leche en una membrana que tiene límite mayor de 5,000 (por ejemplo 50,000) a un pH entre 6.3 y 7 (por ejemplo 6.6) y una temperatura entre 30°C y 60°C.

55 El uso de ultrafiltración también se describe en la Patente US 4,816,563 Wilson *et al.*, titulada: *Process for Obtaining Transfer Factor from Colostrum, Transfer Factor so Obtained and Use Thereof*. De hecho, la filtración de la leche o calostro es hoy un procedimiento estándar en la industria lechera. Wilson *et al.*, describe el uso de un agente para preparar un factor de transferencia a partir del calostro. Los agentes apropiados son indicados para incluir alcoholes, cetonas y polietilenglicol. No hay, sin embargo, descripción de la recuperación de colostrina a partir del calostro.

60 La Patente US 5,216,129 revela un proceso para obtener el kappa-caseino-glicomacropéptido a partir de un producto de suero concentrado en proteínas. El proceso involucra el uso de etanol a una concentración del 5% al 25% basado en el volumen de la solución. El producto del suero no es la colostrina.

65 La Patente UK 1,438,008 revela un proceso para la extracción de un octapéptido específico de la piel de la rana utilizando alcohol.

JP520062796 revela un método de extracción de péptidos cíclicos de la raíz de *Ribia akane* Nakai utilizando, *inter alia*, un alcohol.

En J Pharm Pharmaceut Sci, Vol 5, 2002. MEC Lutsiak *et al*, "Analysis of peptide y lipopeptide contenido in liposomes", p 279-284, ahí se revela un método para extraer péptidos a partir de liposomas.

En Journal of Antibiotics, Vol XL, 1987, E Meyers *et al*, "Xylocandin: a new complex of antifungal péptidos I. Taxonomy, isolation y biological activity", p 1515-1519, ahí se revela un método de extracción de péptidos a partir de la bacteria *pseudomonas cepacia*.

En Acta Endocrinologica, vol 111, 1986, WF Blum *et al*, "Isolation y partial characterisation of six somatomedin-like péptidos from human plasma Cohn fracción IV", p 271-284, ahí se revela la extracción de péptidos similares a somatomedina a partir del plasma humano utilizando etanol.

En J Dairy Research, vol 54, 1987, DS Horne, "Ethanol stability of Casein micelles - a hypothesis concerning the role of calcium phosphate", p 389-395, ahí se revela una elaboración hipotética en la estructura de micelas de caseína y la liberación del calcio.

En Ir. J. Fd. Sci. Technol., vol 9, 1985, MM Hewedi *et al*, "Recovery of leche proteína by etanol precipitación", p 11-13, ahí se revela un método de precipitación de las proteínas de leche utilizando etanol.

La colostrina, también conocida como colostrina, polipéptido rico en prolina o PRP, se aisló primero en 1974 (Janusz *et al*, FEBS Lett., 49,276-279) a partir de calostro de ovino.

Ciertos usos terapéuticos de la colostrina, particularmente en el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, se describieron en WO98/14473. En esta aplicación de la patente, las características físicas de la colostrina, se describieron, como determinables en este momento. Aunque las características físicas eran correctas, la comprensión de la colostrina ha cambiado desde que esta aplicación se archivó. WO98/14473 también describió un método para extraer la colostrina a partir de calostro en bruto, que generalmente se refiere como al método "Janusz". Este método es actualmente el principio del método de extracción de la colostrina a partir del calostro. Tiene las desventajas que hasta la escala industrial es difícil de obtener y los rendimientos del método son bajos.

WO00/75173 describe un número de péptidos encontrados en la colostrina. WO02/46211 describe un número de otros péptidos que se pueden encontrar en colostrina.

US2890986 revela un método para recuperar un inactivador kallikrein del calostro de ganado., que involucra el calostro mezclado con metanol.

US4816563 revela un método de recuperación del factor de transferencia del calostro de vaca, que involucra calostros mezclados con isopropanol.

De considerable interés en la colostrina es la presencia de diversos polipéptidos que se pueden aislar solamente a partir del calostro, no de la leche madura. Durante los días siguientes al parto, la concentración de colostrina en una secreción de la glándula mamaria disparadamente disminuye hasta el final del tercer día después del parto. Tan corto tiempo de vida para algunos de los péptidos de la colostrina indica su importante papel en el desarrollo temprano del sistema inmune de los niños y la protección de los recién nacidos contra los traumas ambientales.

Más recientemente ha sido descubierto, que la colostrina existe en dos formas; libre y agregada (unida). Se piensa que las formas libres de la colostrina se requieren para proteger el mamífero recién nacido de estrés oxidativo, que aparece inmediatamente después del nacimiento. Las formas unida o agregada se diseñan para mantener esta función por periodos prolongados de tiempo después del nacimiento. La forma unida de la colostrina, además, está pensada para participar en el desarrollo y/o protección de diferentes órganos y sistemas. Esto tiene lugar cuando los problemas de estrés oxidativo disminuyen, y las concentraciones de colostrina libre comienzan a decaer. La forma unida de colostrina se libera lentamente en los fluidos corporales para modular las funciones fisiológicas cuando la forma libre se agota. Este modelo encuentra soporte en estudios sobre la gradual desaparición de péptidos específicos de la colostrina a partir del calostro después del parto.

El complejo de colostrina ahora se considera que consiste de al menos cinco subgrupos de péptidos; cada subgrupo tiene su propio patrón hidrófobo característico. La evidencia sugiere que estos péptidos tienen una tendencia a formar agregados, debido a la presencia de aminoácidos especialmente organizados no-polares, polares, aromáticos, cargados positivamente- y negativamente-. Adicionalmente, las composiciones de aminoácido de los péptidos y su carácter hidrófobo además sugieren esta habilidad agregada.

A partir de la información disponible actualmente, hemos encontrado que los péptidos de la colostrina tienen la mejor actividad biológica cuando ellos están presentes en su forma nativa. Cuando se purifican, empiezan a interactuar con cada uno, formando complejos unidos no-covalentemente con actividades biológicas aparentemente más débiles. Se considera que la colostrina es una mezcla de más de 62 péptidos separados, derivados de las proteínas precursor,

ES 2 297 398 T3

tales como anexina, beta-caseína, un homólogo de beta caseína hipotético y otros con ninguna homología a cualquier proteína específica en la actual base de datos GenBank.

Es un objetivo de la invención desarrollar un nuevo método para extraer y recuperar los péptidos de los fluidos que contienen materiales de peso molecular alto. Es un objetivo específico de la invención desarrollar un método de purificación de la colostrina a partir del calostro en bruto, así que la colostrina se puede producir con alto rendimiento en una forma en la cual será activa biológicamente y sustancialmente pura. El método de purificación debería producir la mayoría de los péptidos de la colostrina, ambas libre y unida o agregada. La colostrina purificada, libre de contaminantes y auto-agregados, tendrá más principios activos por unidad de peso. Otro objetivo de la invención es desarrollar un protocolo de purificación que proporcionara un conjunto consistente de péptidos caracterizados por actividades biológicas específicas.

Esta invención se basa en el descubrimiento inesperado que un simple método de extracción que se puede utilizar para extraer la colostrina en un grado de alta pureza a partir del calostro.

De acuerdo con un aspecto de la invención se proporciona un método para recuperar péptidos a partir del calostro de mamífero como se define en la reivindicación 1.

La invención es aplicable a la purificación de la colostrina a partir del calostro, y la siguiente descripción en su mayor parte se dirige a esta aplicación específica.

El alcohol puede ser cualquier alcohol capaz de formar una fase alcohólica que contenga los péptidos de la colostrina cuando se mezcla con el calostro, y capaz de precipitar los materiales de peso molecular alto no deseados.

El alcohol puede ser lineal o ramificado, y puede contener uno o más grupos hidroxilo; un grupo hidroxilo se prefiere. Preferiblemente, el alcohol contiene de 1 a 5 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 4 átomos de carbono, más preferiblemente de 1 a 3 átomos de carbono. Hemos encontrado que los mejores resultados se obtuvieron con el metanol o el etanol.

El alcohol deseablemente se acondiciona al calostro en una forma concentrada: preferiblemente el alcohol es al menos 80% puro, más preferiblemente al menos 95% puro, y se prefiere más considerablemente 100% puro.

La cantidad de alcohol adicionado al calostro es preferiblemente tal como para proporcionar una concentración de alcohol en la composición total del 40% (v/v) al 80% (v/v), más preferiblemente del 50% (v/v) al 70% (v/v), aún más preferiblemente del 55% (v/v) al 65% (v/v) y se prefiere más considerablemente 60% (v/v).

La etapa de mezcla del alcohol con el calostro en bruto (que se conoce como “extracción”), preferiblemente se realiza con agitación a temperatura ambiente por 10 a 30 minutos. Esto forma un precipitado que contiene las caseínas y otras proteínas, mientras la colostrina permanece en solución en la fase alcohólica. Es una característica importante, e inesperada, de la invención que los péptidos de la colostrina sustancialmente todos permanecen en solución en el alcohol, mientras que los otros componentes del calostro se precipitan.

El precipitado luego se puede separar de la fase alcohólica por cualquier método convencional, preferiblemente por centrifugación a aproximadamente 15,000 g, y la fase alcohólica que contiene el calostro se recupera. La colostrina luego se separa del alcohol, preferiblemente por evaporación, para formar una fase rica en colostrina (que es en su mayor parte una solución acuosa de colostrina) la cual se recupera.

La etapa de separación del alcohol a partir de los péptidos de la colostrina se puede realizar por evaporación o ultrafiltración extensiva, combinada con intercambio de agua o solución reguladora, pero se prefiere la evaporación. La evaporación se puede realizar a una temperatura usualmente en el rango de 10°C a 50°C. Se prefiere una temperatura de aproximadamente 30°C. La evaporación o filtración se puede realizar durante un periodo de tiempo de, por ejemplo, 30 minutos a 12 horas o más (por ejemplo durante la noche). Aunque la ultrafiltración es una opción viable, la recuperación es alta con la evaporación. Puede ser deseable eliminar alcohol por evaporación con vacío. Después de retirar el alcohol, se puede adicionar suficiente agua para la fase rica en colostrina para llevar el volumen de solución de trabajo a aproximadamente el volumen inicial.

En una modalidad preferida, el precipitado de la etapa de extracción con alcohol se lava posteriormente con otra cantidad de alcohol, y la fase alcohólica nuevamente se separa y recupera. Esta segunda fase alcohólica recuperada puede contener algunos péptidos de la colostrina que se llevaron en el precipitado en la primera extracción. La segunda fase alcohólica recuperada se puede adicionar directamente a la fase alcohólica recuperada de la primera extracción, o algo o todo el alcohol se puede eliminar primero. Después de que el alcohol ha sido eliminado, los restos se podrían adicionar directamente a la fase rica en colostrina.

Opcionalmente, la siguiente eliminación del alcohol, otra etapa de centrifugación se puede realizar con el fin de separar cualquier precipitado formado durante el alcohol eliminado de la fracción solubilizada restante.

En una modalidad ventajosa particularmente de la invención, un agente de precipitación se adiciona tanto a la fase alcohólica, como, preferiblemente, a la fase rica en colostrina (preferiblemente después de cualquier etapa de

centrifugación adicional). El propósito del agente de precipitación es inducir la precipitación de los péptidos de la colostrina. Hemos encontrado que el sulfato de amonio es particularmente apropiado como el agente de precipitación, pero otros materiales que pueden cumplir el mismo propósito se podrían utilizar en lugar de, o en adición. Los agentes de precipitación más efectivos son las sales con aniones de carga múltiple tales como sulfato, fosfato, y citrato. En cuanto a los cationes se refieren, iones monovalentes se deberían utilizar con NH_4^+ que se prefiere al K^+ , y el K^+ que se prefiere al Na^+ . Los agentes de precipitación típicos son sulfatos, fosfatos y citratos de sodio, potasio y amonio, pero el sulfato de amonio es más preferido. El agente de precipitación puede estar en lugar de un polímero orgánico, tal como el polietilenglicol. La precipitación con un agente de precipitación además baja la contaminación de la caseína y además purifica la fracción peptídica de la colostrina, que permite la formación de una mezcla consistente de péptidos libre de IgG esencialmente para ser aislada en aproximadamente dos días. Este proceso hace posible el aislamiento rápido de péptidos de la colostrina.

El agente de precipitación deseablemente se acondiciona en una cantidad apropiada para proporcionar una saturación del 30% (peso/volumen) a 80% (peso/volumen), preferiblemente una saturación del 40% (peso/volumen) a 60% (peso/volumen), y se prefiere más considerablemente una saturación del 50% (peso/volumen). Los porcentajes de saturación se refieren a la saturación del agente de precipitación, tal como sulfato de amonio, en líquido. El agente de precipitación preferiblemente se adiciona como una solución saturada (i.e. saturación 100% (peso/volumen)) en agua.

Sin embargo, el agente de precipitación también se puede adicionar en forma cristalina, en pequeñas cantidades, seguido por una vigorosa agitación para evitar la saturación local, por aproximadamente 30 minutos por ejemplo, después de cada adición. Esto se puede continuar hasta que el agente de precipitación total se ha disuelto. Esta técnica puede tomar varias horas, por consiguiente se prefiere menos.

La adición del agente de precipitación causa que los péptidos de la colostrina se precipiten a partir de la solución. Cuando la adición se complete, la mezcla preferiblemente se deja durante un periodo de tiempo, usualmente 30 minutos, posiblemente con agitación, o, preferiblemente, con balanceo.

En esta etapa, la mezcla comprende una fase líquida acuosa y un precipitado. La fase líquida contiene el agente de precipitación disuelto en esta, y, posiblemente, algo del material de peso molecular alto que no se precipitó durante la etapa de extracción con alcohol. El precipitado contiene los péptidos de la colostrina. La fase líquida posteriormente se separa del precipitado, preferiblemente por centrifugación a aproximadamente 15,000 g de fuerza centrífuga, y el precipitado se recupera.

El precipitado recuperado preferiblemente se disuelve en agua, utilizando la cantidad mínima de agua necesaria, seguido por la diálisis, usualmente en PBS 0.01M (solución salina de fosfato estandarizada) o agua. La etapa de diálisis se realiza para eliminar el exceso de iones, aunque algunos iones de los iones del agente de precipitación pueden permanecer. La solución para la diálisis luego se puede clarificar por centrifugación, luego se liofiliza. El material final contiene péptidos de la colostrina separados, que se pueden almacenar a -20°C para su uso futuro en la preparación de un producto farmacéutico, nutricional y otras composiciones. Estas se pueden preparar por métodos convencionales.

Varias pruebas de control de calidad se pueden realizar, para asegurar que el material final es apropiado para utilizar en la preparación de un medicamento. Tales pruebas son conocidas por aquellos de habilidad en el oficio, pero pueden involucrar SDS PAGE; perfil isoelectroenfoque; análisis de aminoácidos; determinación de la composición antigénica de la colostrina por medio del método de ELISA utilizando anticuerpos monoespecíficos; determinación de la capacidad para inducir las citoquinas tales como interferón gamma ($\text{IFN-}\gamma$); factor de necrosis tumoral (TNF) y determinación de las propiedades antioxidantes. El material final no debería contener ninguna proteína de peso molecular alto. Si las pruebas de control de calidad indican la presencia de impurezas, el material final puede necesitar que sea además purificado. Existen varios métodos por los cuales las impurezas se pueden eliminar del material final, tales como cromatografía de permeación sobre gel, cromatografía de hidroxipatita, cromatografía de fase reversa, ultrafiltración y fraccionamiento por ácido perclórico.

Un ejemplo de cromatografía de permeación sobre gel involucra las siguientes etapas. El material, a partir del cual las impurezas tienen que ser eliminadas, se reconstituye en solución reguladora de fosfato 100 mM, pH 7.2 (concentración - 2.0 mg/ml). Diez mililitros de material reconstituido recientemente se aplican sobre una columna (diámetro 2.5 cm x largo 90 cm) empacada con Bio-Gel P30 (BioRad) y equilibrada con la misma solución reguladora. La cromatografía se desarrolla durante la noche a una velocidad de flujo de 20 ml/hora. Las muestras (4 ml) se recolectan y la mezcla final del material correspondiente a las proteínas y péptidos de peso molecular bajo ($>18\text{K}$) se hace de acuerdo con distribución SDS PAGE.

Un ejemplo de cromatografía de hidroxipatita involucra las siguientes etapas. El material, a partir del cual las impurezas tienen que ser eliminadas, se reconstituye en solución reguladora de fosfato 10 mM, pH 6.5 (concentración - 2.0 mg/ml). Diez mililitros del material reconstituido recientemente se aplican sobre una columna (diámetro 0.7 cm x largo 6 cm) empacada con Bio-Gel HTP (Bio-Rad) y equilibrada con la misma solución reguladora. La cromatografía se desarrolla a una velocidad de flujo de 0.25 ml/min. La columna se lava con solución reguladora de equilibrio para eliminar todo el material no ligado. Posteriormente, la elución se lleva a cabo con un gradiente lineal de solución reguladora de fosfato (10 mM a 500 mM). Las muestras (4 ml) se recolectan y la mezcla final del material correspondiente a las proteínas y péptidos de bajo peso molecular ($>18\text{K}$) se hace de acuerdo con la distribución SDS PAGE.

Un ejemplo de Cromatografía Líquida de Alta Resolución de fase reversa involucra las siguientes etapas. El material, a partir del cual las impurezas tienen que ser eliminadas, se reconstituye en 0.1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA) a una concentración - 2.0 mg/ml. Cinco mililitros de material reconstituido recientemente se aplican sobre una columna (diámetro 8 mm x largo 150 mm) empacada con Nucleosil 100 10 μ m C18 (Knauer) y equilibrada con 20% de acetonitrilo en 0.1% de TFA. La cromatografía se desarrolla a una velocidad de flujo de 1.0 ml/min. La columna se lava con solución reguladora de equilibrio para eliminar todo el material no ligado. Posteriormente, la elución se lleva a cabo con 100% de acetonitrilo en 0.1% de TFA. Las muestras (2 ml) se recolectan y la mezcla final de material correspondiente a las proteínas y péptidos de peso molecular bajo (>18K) se hace de acuerdo con la distribución SDS PAGE.

Un ejemplo de fraccionamiento del ácido perclórico involucra las siguientes etapas. El material, a partir del cual las impurezas tienen que ser eliminadas, se reconstituye en solución reguladora de fosfato 10 mM, pH 7.2 (concentración - 2.0 mg/ml). Se adiciona ácido perclórico (HClO₄ 0.45 M) hasta la concentración de 0.15 M y la mezcla se agita a temperatura ambiente por 1 hora. El precipitado resultante se elimina por centrifugación y el sobrenadante, que contiene el CLN purificado se ajusta a pH 7.0 con KOH 1M y se deja durante la noche. Los cristales de KClO₄ se eliminan por filtración con filtro y el sobrenadante se dializa contra agua durante la noche. En otra modalidad de la invención el fraccionamiento de ácido perclórico se utiliza como un sustituto de la etapa de precipitación de sulfato de amonio.

Un ejemplo de ultrafiltración involucra las siguientes etapas. El material, a partir del cual las impurezas tienen que ser eliminadas, se reconstituye en solución reguladora de fosfato 10 mM, pH 7.2 (concentración - 2.0 mg/ml). La ultrafiltración se realiza en Centricon Plus Ultracell PL-10 o Hollow fiber Amicon H1P10-20 utilizando protocolos estándar de ultrafiltración.

Como se menciona anteriormente, hemos encontrado que el calostro contiene una fracción proteínica en la forma de micelas. Se ha observado que la colostrina se puede recuperar en un rendimiento alto cuando el calostro en bruto se pre-trata con un material que rompe la micela, seguido por un agente que restituye la micela, en diversos niveles de pH, antes de la extracción con alcohol. Por consiguiente, en una ventajosa modalidad de la invención, el calostro en bruto se pre-acondiciona con un material que rompe la micela, el cual induce el colapso de las micelas, luego con un agente que restituye la micela, el cual se considera que desintegra las estructuras de la caseína en calostro, liberando más péptidos de la colostrina.

Preferiblemente el material que rompe la micela es un agente de quelación del calcio, tal como EDTA (ácido etilendiamina-N,N',N'-tetraacético), que también une el Mg²⁺, o EGTA (ácido etilenglicol-O,O'-bis(2-amino-etil)-N,N,N',N'-tetraacético) con características similares. El propósito de esta es liberar al menos alguno de, preferiblemente una mayoría de, péptidos atrapados entre las micelas de caseína.

El material que rompe la micela preferiblemente se adiciona en una cantidad para producir una solución que contiene una concentración del material que rompe la micela en solución de 25-250 mM. La mezcla se agita y se deja en reposo por un periodo de 10 - 30 minutos. El alcohol se puede adicionar inmediatamente después de la adición del material de disolución de la micela, o, en una modalidad más preferida, la adición del material que rompe la micela se sigue con la adición de un material que restituye la micela, antes de la adición del alcohol. El material que restituye la micela es preferiblemente una fuente de iones de Ca²⁺ tal como CaCl₂. El material que restituye la micela tiene la capacidad de volver a formar las micelas proporcionando iones de calcio esenciales para la formación de la micela (recalcificación).

En una modalidad preferida, el calostro se acondiciona a un pH de 5.5 a 8.0, más preferiblemente 5.5-7.5 antes de la adición del material que rompe la micela, el material que restituye la micela o el alcohol. Más preferiblemente, los calostros se acondicionan a un pH de sustancialmente 6.5-7.5. Aún más preferiblemente, el calostro se acondiciona a un pH de sustancialmente 7.0 a 7.5, se prefiere más considerablemente 7.4. El acondicionamiento del pH se puede lograr por la adición de ácido o base bajo el control de un medidor de pH.

Una mezcla consistente de péptidos esencialmente libres de IgG se puede aislar en un alto rendimiento utilizando el método de acuerdo con la invención. Mediante la neutralización simultáneamente de las fuerzas iónicas e hidrofóbicas, podemos obtener una combinación fisiológica óptima de péptidos. La producción de péptidos de la colostrina producidos por la extracción con metanol, de acuerdo con la presente invención, es generalmente más o menos 500-600 mg por litro de calostro. Utilizando el pre-tratamiento con EDTA y cloruro de calcio, la producción incrementó hasta más o menos 4000-5000 mg por litro calostro. Esto se compara con un anterior oficio de producción de más o menos 200-300 mg por litro calostro utilizando el método de Janusz descrito en WO98/14473.

Los siguientes péptidos se pueden separar a partir del calostro por el método de la presente invención:

(i) los péptidos revelados en WO00/75173, i.e., LQTPQPLLQVMMEPQGD (SEQ ID 1); MPQNFYKLPQM (SEQ ID 2); VLEMKFPPPPQETVT (SEQ ID 3); LKPFKPKLKEVFPFP (SEQ ID 4); SEQP (SEQ ID 5); DKE (SEQ ID 6); DPPPQS (SEQ ID 7); LNF (SEQ ID 8); VLPPNVG (SEQ ID 9); KYKLQPE (SEQ ID 10); SEEMP (SEQ ID 11); DSQPPV (SEQ ID 12); FPPPK (SEQ ID 13); WMEV (SEQ ID 14); DLEMPVLPEFPFPV (SEQ ID 15); LFFFLPWNVLP (SEQ ID 16); MQPPPLP (SEQ ID 17); DQPPDVEKPDLPQFQVQS (SEQ ID 18); VYPFTG PIPN (SEQ ID 19); SLPQNILPL (SEQ ID 20); TQTPVVVPPF (SEQ ID 21); LQPEIMGVPKVKETMVPK (SEQ ID 22).

ID 22); HKEMPFKYPVEPFTESQ (SEQ ID 23); SLTLTDVEKLHLPLPLVQ (SEQ ID 24); SWMHQPP (SEQ ID 25); QPLPPTVMFP (SEQ ID 26); MHQPPQPLPPTVMFP (SEQ ID 27); PQSVLS (SEQ ID 28); LSQPKVLPVPQ KAVPQRDMPIQ (SEQ ID 29); AFLLYQE (SEQ ID 30); FLLYQEPVLGPVR (SEQ ID 31); RGPFPILV (SEQ ID 32); o ATFNRYQDDHGEEILKSL (SEQ ID 33).

(ii) los péptidos revelados en WO02/46211, i.e., LVYPFTGPIPNLQNL (SEQ. ID 34); MIVVRLQNEVPE (SEQ. ID 35); SLSQSKVLPV (SEQ. ID 36); LQTQTPVV (SEQ. ID 37); EMPFPKY (SEQ. ID 38); PVEPFT (SEQ. ID 39); VPPFLQ (SEQ. ID 40); PMFLQ (SEQ. ID 41); EHMFV (SEQ. ID 42); TDRD (SEQ. ID 43); VQPT (SEQ. ID 44); PKVK (SEQ. ID 45); DDDE (SEQ. ID 46); TEEV (SEQ. ID 47); YQQE (SEQ. ID 48); FPPQ (SEQ. ID 49); GFGI (SEQ. ID 50); LQS (SEQ. ID 51); VVV (SEQ. ID 52); GGK (SEQ. ID 53); DMV (SEQ. ID 54); ESQ (SEQ. ID 55); GRV (SEQ. ID 56); VEE (SEQ. ID 57); IGN (SEQ. ID 58); FFQ (SEQ. ID 59); RMF (SEQ. ID 60); FPP (SEQ. ID 61); MHH (SEQ. ID 62); NTE (SEQ. ID 63).

(iii) los nonapéptidos revelados en WO98/14473, i.e., VESYVPLFP (SEQ. ID 64).

De esta manera la invención se puede utilizar en procesos para aislar cualquiera de los péptidos identificados por la SEQ. ID 1-64, ya sea individualmente, en un grupo seleccionado, o todos juntos.

La invención puede ser aplicada a cualquier calostro de mamífero, aunque el calostro ovino, bovino o humano se utiliza más comúnmente.

Adicionalmente, el punto inicial para el proceso de separación de acuerdo con la invención no necesita ser calostro como el obtenido directamente del mamífero. Es evidente que el calostro puede ser tratada antes de que sea sometido al método de separación de acuerdo con la invención, por ejemplo, puede ser sin grasa. De esta manera, la invención se puede aplicar, con la ventaja de un derivado del calostro, a condición que el derivado todavía contenga la colostrina.

Las referencias al % de composiciones aquí relacionadas al porcentaje del material en partes por peso, a menos que se indique de otra manera.

La referencia se hace ahora con los dibujos acompañantes, en los cuales:

Figura 1 es un gráfico que resume el protocolo de extracción/purificación para la colostrina; y

Figura 2 muestra los resultados del análisis SDS page descrito abajo.

La invención además será descrita con referencia a los siguientes ejemplos.

Protocolos de Purificación - Para cada ejemplo comparativo, se utilizaron 10 ml de calostro mezclado. Los calostros se recolectaron a partir de las ovejas a diferentes tiempos después del parto y se congelaron hasta el experimento. El protocolo utilizado en los siguientes ejemplos fue idéntico, con la excepción del acondicionamiento inicial de la materia prima ya sea por pH o EDTA, según lo indicado abajo.

Ejemplo 1 - 10 ml de calostro mezclado en bruto (pH ~ 6.5).

Ejemplo 2 - 10 ml del calostro mezclado en bruto (pH ~ 6.5) se acondiciona con EDTA 25mM, seguido por la adición de CaCl_2 50 mM (recalcificación).

Ejemplo 3 - 10 ml del calostro mezclado acondicionado a pH 7.4.

Ejemplo 4 - 10 ml de calostro mezclado acondicionado a pH 7.4 con EDTA 25 mM, seguido por la adición de CaCl_2 50 mM (recalcificación).

La misma fuente del calostro mezclado en bruto (alícuotas de 10 ml) se utilizó para acondicionar el material inicial a un tratamiento de pH específico o EDTA/ CaCl_2 por 1 hora antes de la adición del metanol. 100% del metanol se adicionó, hasta una concentración final del 60% a cada muestra del calostro. La mezcla se agitó por 30 minutos a temperatura ambiente, y luego se centrifugó a 15,000 g. El sobrenadante se eliminó, y el alcohol se dejó evaporar a partir del sobrenadante en un secador, hasta que el volumen del sobrenadante se redujo a más o menos 8.0 ml (esto toma más o menos 30-60 minutos). Una cantidad igual de sulfato de amonio saturado (100%) se adicionó al sobrenadante para obtener una concentración final del 50% de sulfato de amonio. La mezcla de sobrenadante/sulfato de amonio luego se balanceó suavemente durante la noche a 4°C, permitiendo que los péptidos de la colostrina precipitaran. La preparación se centrifugó a 15,000 g para formar un pellet, que contiene los péptidos de la colostrina. El pellet se disolvió en agua destilada y se dializó contra PBS (solución salina de fosfato estandarizada) 0.01M durante la noche. Los péptidos de la colostrina preparados por este método se pueden analizar en diversas pruebas y almacenar a -20°C.

Ensayo de Recuperación de la Proteína - La concentración de la proteína se puede tomar leyendo la densidad óptica de la solución a 280 nm antes de la congelación. Los resultados de recuperación de la proteína se muestran en la Tabla 1, abajo.

ES 2 297 398 T3

TABLA 1

Ejemplo/Muestra	OD 280nm	Volumen (ml)	Producción (mg)
1- Calostro al Natural pH 6.5	0.83	2.0	1.66
2- Calostro/EDTA/pH 6.5	0.86	2.0	1.72
3- Calostro pH 7.4	3.97	2.0	7.94
4- Calostro/EDTA/pH 7.4	9.44	2.0	18.88

Los resultados indican que la recuperación de la proteína a partir de alícuotas de 10 ml originales de calostro es altamente dependiente del pH. Estos rendimientos son más altos que aquellos utilizando el método de Janusz y se obtuvieron utilizando un proceso más fácil y rápido.

Ensayo de Reconocimiento del Antígeno - El perfil antigénico del material final se determinó por el método de ELISA basado en los anticuerpos preparados contra nueve péptidos sintéticos, para los cuales las secuencias han sido identificadas previamente y se enumeran en la Tabla 2.

TABLA 2

Clase de Antígeno	Secuencia	Título
A-1	LQTPQPLLQVMMEPQGD	>25,600
A-3	VLEMKFPPPPQETVT	>25,600
B-8	DLEMPVLPVEFPFV	>25,600
B-9	LFFFLPVVNVLP	>25,600
C-2	SLPQNILPL	>25,600
C-11	LSQPKVLPVPQKAVPQDPMPIQ	>25,600
D-1	ATFNRYQDDHGEEILKSL	>25,600
LF	KCRRWEWRMKKLGAPSIPSITCVRRAF	>25,600
IgG 2	Molécula Total	0

Las clases de antígeno A, B, C y D se explican en WO00/75173. LF es un fragmento de lactoferrina, que tiene una propiedad antibacteriana, los fragmentos del anticuerpo de IgG-2 sirven como un indicador de la pureza de colostrina.

Brevemente, Las placas de ELISA de 96 pozos se cubrieron con las muestras de colostrina recuperada de acuerdo con el protocolo 1-4 (aproximadamente 10 microgramos de proteína por 1 ml de solución reguladora de bicarbonato 0.1 M (pH 9.0). Las placas se incubaron a 37°C por 3 horas, se lavaron con solución reguladora de acoplamiento, y se bloquearon con una solución estándar de albúmina de suero de bovino (BSA). Se midieron 50 microlitros de diluyente BSA (solución 0.75%) con una pipeta en cada pozo y 50 microlitros de muestra de suero (anticuerpo de conejo purificado Proteína A contra antígeno específico), diluido de acuerdo con el título inicial, se adicionaron a la columna A de cada fila. Se hicieron diluciones seriales 1:2, pasándolas por las placas. Las placas se incubaron, se cubrieron, por 60 minutos a temperatura ambiente, luego se lavan 4 tiempos con solución PBS. Un volumen de 50 microlitros de anticuerpos conjugados peroxidasa IgG-rábano picante de cabra anti-conejo (dilución 1:1000 en BSA) se midió con una pipeta en cada pozo y se incubó por 60 minutos a temperatura ambiente. Las placas luego se lavaron 4 veces con solución de lavado PBS y 50 microlitros de sustrato (ácido 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico)-sal de amonio) se adicionó a cada pozo, y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente. La reacción colorimétrica se detuvo por la adición de 50 microlitros de 1% de SDS a cada pozo, y las placas se leyeron en un lector de placa Dynatech (a 405 nm).

Los resultados de estos experimentos (títulos promedio) se muestran en la Tabla 3 abajo. Los valores están en Unidades/ml x 10³. Una Unidad se define como una dilución final para el reconocimiento de antígeno. Es claro que la recuperación de péptidos individuales para los cuales los materiales finales se probaron (A-1; A-3; B-8; B-9; C-2; C-11; D-1; Lf y IgG-2) fue más alta para las extracciones hechas a pH 7.4 (Experimento 3 y 4). En ambos casos los antígenos fueron reconocidos generalmente a las diluciones más altas analizadas.

TABLA 3

Experimento	A-1	A-3	B-8	B-9	C-2	C-11	D-1	Lf	IgG-2	Control	Experimento
1	6400	6400	128000	6400	25600	25600	3200	1600	0	0	1
2	12800	12800	12800	6400	25600	25600	3200	6400	0	0	2
3	25600	12800	25600	25600	25600	25600	25600	25600	0	0	3
4	25600	25600	25600	25600	25600	25600	12800	12800	0	0	4

Análisis de aminoácidos - La composición del aminoácido de la colostrina purificada de acuerdo con la presente invención confirma el alto contenido de la prolina (~20%) y aminoácidos ácidos. La Tabla 4 muestra alto grado de similitud en la composición del aminoácido entre la colostrina descrita previamente y esta presente invención.

TABLA 4

Análisis de aminoácidos del CLN

Amino Ácido	Colostrina		
	Original *	Original**	Novedoso***
Asp/Asn	3.42	3.05	2.80
Ser	5.66	5.70	5.05
Glu/Gln	15.48	15.29	15.77
Gly	3.15	3.13	3.03
His	2.54	2.45	2.14
Arg	2.32	2.45	3.34
Thr	5.73	5.69	5.30
Ala	2.78	2.99	2.13
Pro	21.07	20.92	22.50
Tyr	1.36	1.55	1.54
Val	9.27	10.34	11.10
Met	3.33	3.08	1.70
Lys	5.30	5.19	4.93
Ile	3.17	2.92	3.42
Leu	11.04	11.27	10.47
Phe	4.38	4.42	4.77
* - de acuerdo con M. Janusz et al. ref. (FEBS LETTERS 1974, 49, 276-279)			
** - de acuerdo con los resultados medios obtenidos en otro trabajo utilizando el protocolo Janusz et al.			
*** - de acuerdo con el método de acuerdo con la invención			

Ensayos Biológicos: La potencia del CLN producido de acuerdo con este protocolo novedoso ha sido probada en comparación con el método clásico y probó ser similar en las siguientes actividades: 1) reducción de los aductos 4HNE-proteína; 2) reducción de niveles intracelulares de ROS; 3) inhibición de la depleción del glutatión 4HNE-mediada; y 4) inhibición de la activación 4HNE-inducida de c-Jun quinasas NH2-terminal.

Análisis de SDS PAGE. Electroforesis en gel 1D 15% de poliacrilamida se realizó bajo condiciones de reducción. La tinción con 1% Azul de Coomassie muestra contundentes similitudes entre las preparaciones finales del CLN obtenido de acuerdo con la presente invención y el método clásico.

La Figura 2 muestra los resultados del análisis SDS PAGE. Las muestras se rehidrataron, se probaron para contenidos de proteína y la cantidad igual de la proteína se sometió a 1D 15% gel SDS PAGE seguido por tinción con Azul de Coomassie. En el dibujo STD representa los marcadores de peso molecular; 1 representa la colostrina de acuerdo con Janusz *et al.*; 2 representa la colostrina de acuerdo con la presente invención; y 3 representa la colostrina de acuerdo con la presente invención modificada por EDTA/CaCl₂. Como para los análisis SDS PAGE, la colostrina obtenida de acuerdo con la presente invención es sustancialmente idéntica al material referencia (método de Janusz). También la modificación con EDTA/CaCl₂ proporciona material similar, aunque, hay un incremento en la composición de la proteína de alto peso molecular.

Es evidente que la invención puede ser modificada dentro del alcance de las reivindicaciones. Por ejemplo la etapa de precipitación de sulfato de amonio se puede sustituir con el fraccionamiento de ácido perclórico como se describe previamente. Aunque el punto inicial para el método se describe como calostro en bruto o calostro sin grasa, será apreciado que otra forma de calostro o calostro purificado parcialmente se puede utilizar como el punto inicial. Por ejemplo, el método de la presente invención podría utilizar y además purificar los péptidos de la colostrina que han sido previamente purificados por los métodos del oficio antes conocidos, tal como el método de Janusz.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el aspirante es solamente para conveniencia del lector. No forma parte del documento de patente Europea. Aún cuando se ha tenido gran cuidado en recopilar las referencias, los errores u omisiones no se pueden excluir y la EPO desconoce toda responsabilidad a este respecto.

Documentos Patentes citados en la descripción

- US 6268487 B [0007]
- US 4485040 A [0008]
- US 4816563 A, Wilson [0009] [0022]
- US 5216129 A [0010]
- GB 1438008 A [0011]
- JP 520062796 B [0012]
- WO 9814473 A [0019] [0019] [0056] [0057]
- WO 0075173 A [0020] [0057] [0069]
- WO 0246211 A [0020] [0057]
- US 2890986 A [0021]
- GB 0305552 A [0076]

Literatura no-patente citada en la descripción

- MEC LUTSIK *et al.* Analysis of peptide and lipopeptide content in liposomes. *J Pharm Pharmaceut Sci*, 2002, vol. 5, 279-284 [0013]
- E MEYERS *et al.* Xylocandin: a new complex of antifungal peptides I. Taxonomy, isolation and biological activity. *Journal of Antibiotics*, 1987, vol. XL, 1515-1519 [0014]
- WF BLUM *et al.* Isolation and partial characterisation of six somatomedin-like peptides from human plasma Cohn fraction IV. *Acta Endocrinologica*, 1986, vol. 111, 271-284 [0015]
- DS HORNE. Ethanol stability of Casein micelles - a hypothesis concerning the role of calcium phosphate. *J Dairy Research*, 1987, vol. 54, 389-395 [0016]
- MM HEWEDI *et al.* Recovery of milk protein by ethanol precipitation. *Ir. J. Fd. Sci. Technol.*, 1985, vol. 9, 11-13 [0017]
- JANUSZ *et al.* *FEBS Lett.*, 1974, vol. 49, 276-279 [0018]
- M. JANUSZ *et al.* *FEBS LETTERS*, 1974, vol. 49, 276-279 [0071]

REIVINDICACIONES

1. Un método para recuperar los péptidos a partir de calostro de mamífero, o un derivado de calostro, dicho método que comprende: la mezcla del calostro con un alcohol para formar una fase alcohólica y un precipitado, la fase alcohólica que incluye el alcohol y al menos alguno de los péptidos que se recuperaran; la separación de la fase alcohólica del precipitado; y la recuperación de la fase alcohólica, en donde dichos péptidos recuperados contienen la colostrina.

2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el alcohol es el metanol o el etanol.

3. Un método de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, que además comprende la etapa para remover al menos algo del alcohol a partir de la fase alcohólica recuperada para dejar una fase de péptidos concentrada, y la recuperación de la fase de péptidos concentrada.

4. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, 2 o 3, que además comprende la disolución de un agente de precipitación en ya sea la fase alcohólica recuperada o en la fase de péptidos concentrada, siendo dicho agente de precipitación capaz de inducir la precipitación de al menos alguno de los péptidos.

5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3 o 4, en donde el agente de precipitación es sulfato de amonio.

6. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que además comprende la adición de EDTA al calostro antes de la adición del alcohol.

7. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la mezcla contiene micelas de la proteína a las cuales los péptidos se unen, dicho método que además comprende la etapa de adición de un material que rompe la micela en el fluido, antes de la adición del alcohol, el material que rompe la micela que es capaz de inducir el rompimiento de las micelas en el fluido.

8. Un método de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el material que rompe la micela es EDTA o EGTA.

9. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, que además comprende la adición de CaCl_2 a la mezcla antes de la adición del alcohol.

10. Un método de acuerdo con la reivindicación 7 o 8, que además comprende la adición de un material que restituye la micela al fluido, antes de la adición del alcohol, con el fin de volver a formar las micelas de la proteína.

11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en donde el material que restituye la micela es CaCl_2 .

12. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el fluido se preacondiciona a un pH en el rango de 6.5-7.5 antes de la adición del alcohol.

13. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el alcohol adicionado al fluido en una cantidad suficiente para producir una concentración de alcohol, basado en el volumen total del fluido, entre 40-80% (v/v).

14. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el alcohol adicionado al fluido en una cantidad suficiente para producir una concentración de alcohol, basado en el volumen total del fluido, entre 50-70% (v/v).

15. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el alcohol adicionado al fluido en una cantidad suficiente para producir una concentración de alcohol, basado en el volumen total del fluido, entre 55-65% (v/v).

16. Un método de acuerdo con cualquier reivindicación precedente, en donde el alcohol adicionado al calostro es sustancialmente 100% puro.

FIGURA 1

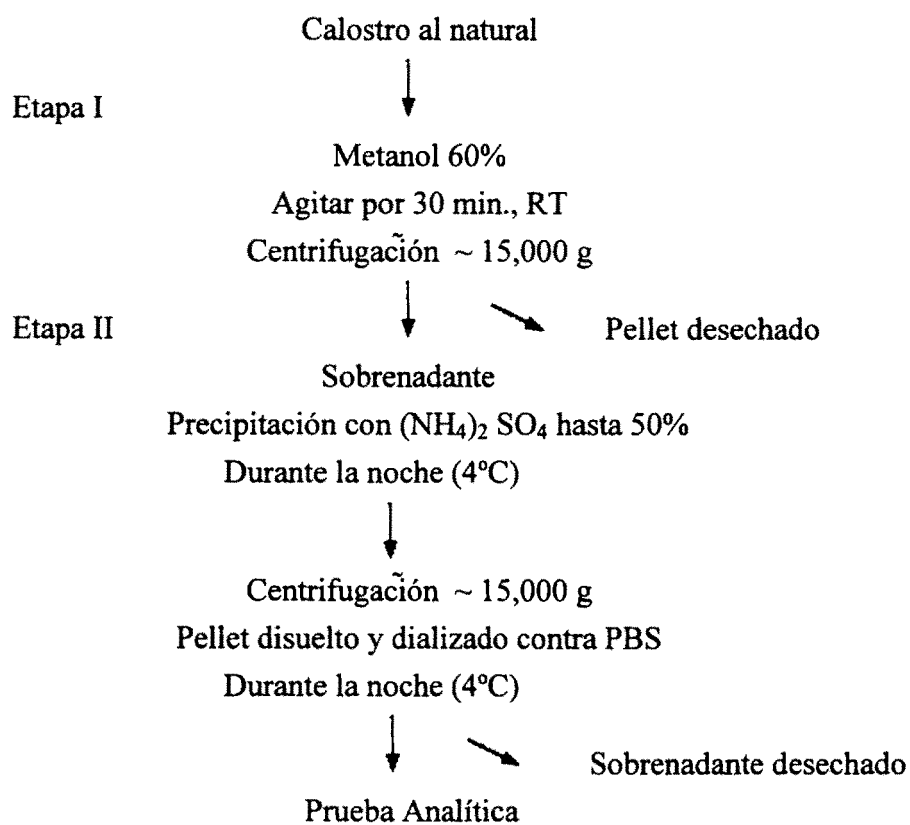
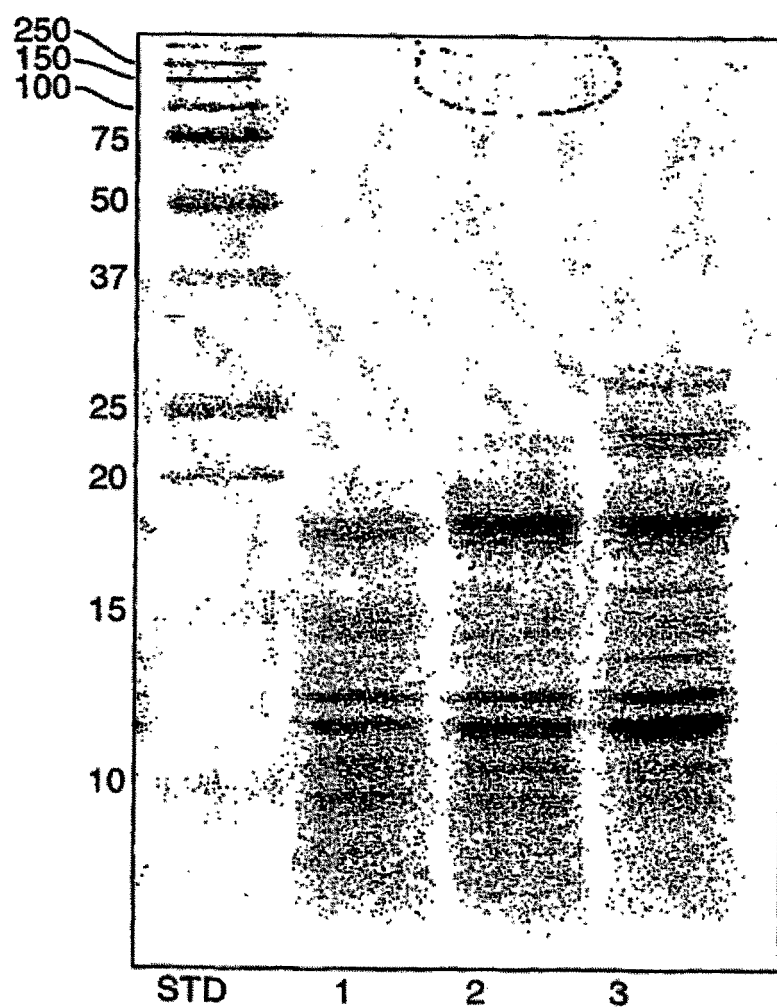


FIGURA 2



ES 2 297 398 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> ReGen Therapeutics plc
- <120> Purificación de Péptidos de la Colostrina
- 5 <130> PAC/20362WO
- <150> GB0305552.2
- <151> 2003-03-11
- 10 <160> 64
- <170> PatentIn version 3.1
- <210> 1
- <211> 17
- 15 <212> PRT
- <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
- <400> 1
- 20
- Leu Gln Thr Pro Gln Pro Leu Leu Gln Val Met Met Glu Pro Gln Gly**
1 5 10 15
- 25 **Asp**
- <210> 2
- <211> 11
- 30 <212> PRT
- <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
- <400> 2
- 35
- Met Pro Gln Asn Phe Tyr Lys Leu Pro Gln Met**
1 5 10
- 40 <210> 3
- <211> 15
- <212> PRT
- <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
- 45 <400> 3
- Val Leu Glu Met Lys Phe Pro Pro Pro Pro Gln Glu Thr Val Thr**
1 5 10 15
- 50
- <210> 4
- <211> 15
- 55 <212> PRT
- <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
- <400> 4
- 60
- Leu Lys Pro Phe Pro Lys Leu Lys Val Glu Val Phe Pro Phe Pro**
1 5 10 15
- 65 <210> 5
- <211> 4
- <212> PRT

ES 2 297 398 T3

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

 $\langle 400 \rangle$ 5

5 ser Glu Gln Pro
1

<210> 6

 $\langle 211 \rangle$ 310 $\langle 212 \rangle$ PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 6

15 Asp Lys Glu
1

<210> 7

20 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

25 $\langle 400 \rangle$ 7

Asp Pro Pro Pro Pro Gln Ser
1 5

<210> 8

30 $\langle 211 \rangle$ 3

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

35 $\langle 400 \rangle$ 8

Leu Asn Phe
1

40 $\langle 210 \rangle$ 9

<211> 7

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

45
<400> 9

Val Leu Pro Pro Asn Val Gly
1 5

50
 $\langle 210 \rangle$ 10

<211> 7

<212> PRT

55 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino

 $\langle 400 \rangle$ 10

60 Lys Tyr Lys Leu Gln Pro Glu
1 5

<210> 11

<211> 5

65 <212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

ES 2 297 398 T3

	<400> 11	
		Ser Glu Glu Met Pro 1 5
5	<210> 12	
	<211> 6	
	<212> PRT	
10	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 12	
		Asp Ser Gln Pro Pro Val 1 5
15	<210> 13	
	<211> 5	
20	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 13	
25		Phe Pro Pro Pro Lys 1 5
30	<210> 14	
	<211> 5	
	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
35	<400> 14	
		Val Val Met Glu Val 1 5
40	<210> 15	
	<211> 15	
	<212> PRT	
45	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 15	
50		Asp Leu Glu Met Pro Val Leu Pro Val Glu Pro Phe Pro Phe Val 1 5 10 15
	<210> 16	
55	<211> 12	
	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
60	<400> 16	
		Leu Phe Phe Phe Leu Pro Val Val Asn Val Leu Pro 1 5 10
65	<210> 17	
	<211> 7	
	<212> PRT	

ES 2 297 398 T3

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 17

5 Met Gln Pro Pro Pro Leu Pro
1 5

<210> 18

<211> 18

10 <212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 18

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

Gln Ser

20 <210> 19

$\langle 211 \rangle$ 10

<212> PRT

25 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 19

30 val Tyr Pro Phe Thr Gly Pro Ile Pro Asn
1 5 10

 $\langle 210 \rangle$ 20

<211> 9

<212> PRT

35 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 20

40 Ser Leu Pro Gln Asn Ile Leu Pro Leu
1 5

<210> 21

<211> 10

45 <212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 21

50 Thr Gln Thr Pro Val Val Val Pro Pro Phe
1 5 10

<210> 22

55 $\langle 211 \rangle$ 18

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de Ovino

60 <400> 22

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

65 **Pro Lys**

<210> 23

ES 2 297 398 T3

<211> 18
 <212> PRT
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 5
 <400> 23
 His Lys Glu Met Pro Phe Pro Lys Tyr Pro Val Glu Pro Phe Thr Glu
 1 5 10 15
 10
 ser Gln
 <210> 24
 15
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 20
 <400> 24
 Ser Leu Thr Leu Thr Asp Val Glu Lys Leu His Leu Pro Leu Pro Leu
 1 5 10 15
 25
 val Gln
 <210> 25
 <211> 7
 <212> PRT
 30
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 <400> 25
 35
 Ser Trp Met His Gln Pro Pro
 1 5
 <210> 26
 40
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Péptidos de la Colostrina de Ovino
 45
 <400> 26
 Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe Pro
 1 5 10
 50
 <210> 27
 <211> 15
 <212> PRT
 55
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 <400> 27
 Met His Gln Pro Pro Gln Pro Leu Pro Pro Thr Val Met Phe Pro
 1 5 10 15
 60
 <210> 28
 <211> 6
 65
 <212> PRT
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino

ES 2 297 398 T3

<400> 28

Pro Gln Ser Val Leu Ser

5

1

5

<210> 29

<211> 22

10 <212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 29

15

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

Arg Asp Met Pro Ile Gln
20

20

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

25 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 30

Ala Phe Leu Leu Tyr Gln Glu
1 5

30

<210> 31

<211> 13

35 <212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 31

40

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

<210> 32

45

<211> 8

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

50 <400> 32

Arg Gly Pro Phe Pro Ile Leu Val
1 5

<210> 33

55

<211> 18

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

60

<400> 33

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

65

Ser Leu

<210> 34

ES 2 297 398 T3

<211> 19
 <212> PRT
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 5
 <400> 34
 Leu Val Tyr Pro Phe Thr Gly Pro Ile Pro Asn Ser Leu Pro Gln Asn
 1 5 10 15
 10
 Ile Leu Pro
 <210> 35
 <211> 13
 15
 <212> PRT
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 <400> 35
 20
 Met Ile Val Val Arg Leu Leu Gln Asn Glu Val Pro Glu
 1 5 10
 <210> 36
 25
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 <400> 36
 30
 Ser Leu Ser Gln Ser Lys Val Leu Pro Val
 1 5 10
 35
 <210> 37
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 40
 <400> 37
 Leu Gln Thr Gln Thr Pro Val Val
 1 5
 45
 <210> 38
 <211> 7
 <212> PRT
 50
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 <400> 38
 Glu Met Pro Phe Pro Lys Tyr
 1 5
 55
 <210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
 60
 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino
 <400> 39
 65
 Pro Val Glu Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 40

ES 2 297 398 T3

<211> 6

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

5

<400> 40

Val pro pro Phe Leu Gln
1 5

10

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

15 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 41

Pro Met Phe Leu Gln
1 5

20

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

25 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 42

Glu His Met Phe Val
1 5

30

<210> 43

 $\langle 211 \rangle$ 4

35 <212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 43

Thr Asp Arg Asp
1

40

<210> 44

 $\langle 211 \rangle$ 4

45 <212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 44

Val Gln Pro Thr
1

50

<210> 45

55 $\langle 211 \rangle$ 4

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

60 <400> 45

Pro Lys Val Lys
1

<211> 4

<212> PRT

ES 2 297 398 T3

	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 46	
5		Asp Asp Asp Glu 1
	<210> 47	
	<211> 4	
10	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de Ovino	
	<400> 47	
15		Thr Glu Glu Val 1
	<210> 48	
20	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
25	<400> 48	
		Tyr Gln Gln Glu 1
30	<210> 49	
	<211> 4	
	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
35	<400> 49	
		Phe Pro Pro Gln 1
40	<210> 50	
	<211> 4	
	<212> PRT	
45	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 50	
		Gly Phe Gly Ile 1
50	<210> 51	
	<211> 3	
	<212> PRT	
55	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 51	
		Leu Gln Ser 1
60	<210> 52	
	<211> 3	
	<212> PRT	
65	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	

ES 2 297 398 T3

<400> 52

val val val
1

5

<210> 53

<211> 3

<212> PRT

10 <213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 53

gly gly lys
1

15

<210> 54

<211> 3

20

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 54

25

asp met val
1

<210> 55

30

<211> 3

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

35

<400> 55

glu ser gln
1

40

<210> 56

<211> 3

<212> PRT

45

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 56

gly arg val
1

50

<210> 57

<211> 3

55

<212> PRT

<213> Péptidos de la Colostrina de ovino

<400> 57

60

val glu glu
1

65

<210> 58

<211> 3

ES 2 297 398 T3

	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
5	<400> 58	
		Ile Gly Asn 1
10	<210> 59	
	<211> 3	
	<212> PRT	
15	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 59	
20		Phe Phe Gln 1
	<210> 60	
	<211> 3	
25	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 60	
30		Arg Met Phe 1
35	<210> 61	
	<211> 3	
	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
40	<400> 61	
45		Phe Pro Pro 1
	<210> 62	
	<211> 3	
50	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 62	
55		Met His His 1
	<210> 63	
	<211> 3	
60	<212> PRT	
	<213> Péptidos de la Colostrina de ovino	
	<400> 63	
65		Asn Thr Glu 1

ES 2 297 398 T3

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

5 <213> peptides de la Colostrina de ovino

<400> 64

10 Val Glu Ser Tyr Val Pro Leu Phe Pro

1

5

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65