



MINISTERO DELLO SVILUPPO ECONOMICO
DIREZIONE GENERALE PER LA LOTTA ALLA CONTRAFFAZIONE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI

DOMANDA DI INVENZIONE NUMERO	102009901786821
Data Deposito	25/11/2009
Data Pubblicazione	25/05/2011

Classifiche IPC

Titolo

METODO PER OTTENERE UNA MISCELA DI FATTORI BIOLOGICI ISOLATI DA COLOSTRO E MISCELA DI FATTORI BIOLOGICI ATTIVI DERIVATA DA COLOSTRO.

"METODO PER OTTENERE UNA MISCELA DI FATTORI BIOLOGICI ISOLATI DA COLOSTRO E MISCELA DI FATTORI BIOLOGICI ATTIVI DERIVATA DA COLOSTRO"

DESCRIZIONE

La presente invenzione riguarda un metodo per ottenere una miscela di fattori biologici isolati da colostro, attraverso uno o più passaggi di microdiafiltrazione che consente di separare le proteine di grandi dimensioni, come caseine e lattoalbumine ed i globuli di grasso dal permeato, in cui rimangono le proteine solubili nel siero, tra cui i fattori biologici di interesse. La miscela può essere ottenuta anche in forma sterile, eliminando cellule e microrganismi patogeni tramite una filtrazione sterilizzante.

La presente invenzione riguarda anche una miscela di fattori biologici isolati da colostro comprendente le proteine IgG, IgA, IGF-1 e TGF β 1 nelle seguenti quantità, indicate per mg di prodotto secco: 0,15 - 0,35 mg di IgG; 0,01 - 0,05 mg di IgA; 0,5 - 3,0 ng di IGF-1; 30 - 90 pg di TGF β 1.

Un altro oggetto dell'invenzione è rappresentato da una formulazione nutraceutica comprendente la miscela di fattori biologici isolati da colostro.

Inoltre, l'invenzione riguarda un integratore per il latte per neonati, o per il latte di continuazione o latte di crescita, o per il latte alimentare, comprendente la miscela dell'invenzione.

Infine, l'invenzione riguarda il latte per neonati, o il latte di continuazione o latte di crescita, sia in polvere che ricostituito, o il latte alimentare, addizionato con la miscela dell'invenzione.

L'allattamento al seno consiste nell'alimentazione di un neonato o di un bambino piccolo direttamente dal seno di una donna e non da un poppatoio o altro contenitore. I bambini hanno un riflesso di suzione che consente loro di succhiare ed inghiottire il latte. Per la maggior parte delle madri è possibile nutrire il proprio neonato (o i propri neonati nel caso di gemelli e

di nascite multiple) mediante allattamento al seno per i primi sei mesi, o anche più a lungo, senza integrazione con latte artificiale o alimenti solidi.

Le alternative all'allattamento al seno includono:

- latte materno, prodotto dalla stessa madre del neonato;
- latte naturale prodotto da una balia sana o proveniente da una banca del latte umano;
- un sostituto del latte naturale somministrato con una tazzina, che è un metodo più sicuro dell'impiego di un poppatoio e di una tettarella.

Nella maggior parte delle situazioni, il latte naturale costituisce la migliore sorgente di nutrizione per neonati umani, impedendo malattie, promuovendo la salute e riducendo i costi sanitari (ad eccezione delle situazioni in cui la madre stia assumendo particolari farmaci o sia infetta da tubercolosi o HIV). Gli esperti non concordano a proposito di quanto a lungo allattare al seno per ottenere i massimi benefici e a proposito dei

rischi associati all'impiego delle formulazioni di latte artificiale.

La World Health Organization (WHO) raccomanda un minimo di due anni di allattamento al seno e l'allattamento al seno esclusivo per i primi sei mesi di vita. La American Academy of Pediatrics (AAP) raccomanda almeno un anno di allattamento al seno e l'allattamento al seno esclusivo per i primi sei mesi di vita. L'allattamento al seno esclusivo per i primi sei mesi di vita "fornisce protezione continua contro la diarrea e le infezioni del tratto respiratorio", che sono più comuni in neonati allattati con un latte artificiale. Sia la World Health Organization (WHO) che la American Academy of Pediatrics (AAP) accentuano il valore dell'allattamento al seno per madri e bambini.

Durante l'allattamento al seno, sostanze nutritive ed anticorpi passano al bambino e anche il legame materno può essere rinforzato. La ricerca ha dimostrato una varietà di benefici associati all'allattamento al seno di un neonato.

Ad esempio, uno studio condotto dalla

University of Wisconsin, ha rilevato che donne adulte che sono state allattate al seno nella loro infanzia potevano avere un rischio inferiore di sviluppare il cancro al seno che non le loro controparti non allattate al seno.

Inoltre, in bambini a rischio di atopia (definito come almeno un genitore o un fratello/sorella avente atopia), la sindrome atopica può essere prevenuta o ritardata tramite allattamento al seno esclusivo per quattro mesi, benché questi benefici possano non essere più presenti dopo i quattro mesi di età. La dermatite atopica, che è la forma più comune di eczema, può essere ridotta tramite allattamento al seno esclusivo oltre le 12 settimane, in individui aventi una storia di atopia familiare.

Inoltre, sembra che l'allattamento al seno, introducendo glutine nella dieta, possa ridurre il rischio di sviluppare la malattia celiaca, anche se non è ancora chiaro se semplicemente ritardi i sintomi o offra protezione per tutta la vita.

Neonati alimentati esclusivamente al seno

hanno anche una minor possibilità di sviluppare il diabete mellito di tipo 1 che non le controparti con una minor durata dell'allattamento al seno ed una anticipata esposizione al latte bovino e agli alimenti solidi. Sembra che l'allattamento protegga anche dal diabete mellito di tipo 2, almeno in parte grazie ai suoi effetti sul peso del bambino; l'allattamento al seno sembra infatti associato ad un ridotto rischio di obesità nei bambini da 39 a 42 mesi.

L'allattamento al seno garantisce in aggiunta effetti benefici nei confronti di alcuni disturbi comuni dei neonati e dei bambini.

Ad esempio, esso fornisce protezione dalla diarrea: rispetto alle controparti alimentate con latte artificiale, la percentuale delle morti dovute a diarrea in neonati allattati al seno è più bassa. Inoltre, l'enterocolite necrotizzante, che colpisce principalmente i neonati prematuri, è da sei a dieci volte più comune in neonati alimentati esclusivamente con latte artificiale e tre volte più comune in neonati alimentati con una miscela di

latte naturale e latte artificiale, rispetto ai neonati allattati esclusivamente al seno. In neonati nati a più di 30 settimane, l'enterocolite necrotizzante era venti volte più comune nei neonati alimentati esclusivamente con latte artificiale.

Una più lunga durata di alcuni tipi di infezioni dell'orecchio medio (otite media con effusione) nei primi due anni di vita è associata ad un periodo più corto di allattamento al seno. Una ridotta intensità e durata di qualsiasi infezione da otite media è stata associata all'allattamento al seno.

Sembra che l'allattamento riduca i sintomi di infezioni delle vie respiratorie superiori in neonati prematuri sino a sette mesi dopo la dimissione dall'ospedale. Esso riduce anche il rischio di acquisire infezioni del tratto urinario nei neonati sino a sette mesi dal parto.

Il latte materno ha un forte effetto anti-infettivo, poiché include fattori come lattoferrina (che si lega al ferro e inibisce la crescita di

batteri intestinali) e immunoglobuline G e A che proteggono dai microorganismi.

Il latte materno contiene anche il rapporto ideale tra gli amminoacidi cisteina, metionina e taurina per supportare lo sviluppo del sistema nervoso centrale e periferico.

Comparando le patologie sopra descritte con le attività di alcuni fattori attivi contenuti nel latte materno, risulta evidente che la causa principale di tali patologie è associata alla totale assenza di questi fattori attivi nel latte per bambini.

Questi fattori, IFN γ (interferone γ), TNF α (Tumor Necrosis Factor α), lattoferrina, TGF β 1 (Transforming Growth Factor β 1), IGF-1 (Insulin-like growth factor 1), immunoglobuline IgG e IgA, fattori del complemento, sostanze micro-nutritive e prebiotiche, sono presenti con concentrazioni differenti nei fluidi biologici di tutti i mammiferi a seconda della specie, della razza, del tipo di fluido e dell'origine geografica. Il latte ed il colostro degli erbivori è molto ricco in

anticorpi IgG, poiché non passano attraverso il filtro placentare e perciò devono essere assunti solamente attraverso l'allattamento al seno. Le vacche di razza Holstein e Frisian sono le più ricche in fattori attivi.

Molte delle malattie che colpiscono i neonati e i bambini nei primi mesi di vita sono dovute al fatto che il loro sistema immunitario non è completamente sviluppato e la suscettibilità alle infezioni batteriche e virali è elevata durante l'infanzia. Durante questo periodo, si verifica comunemente anche una sensibilizzazione allergica ad allergeni ambientali ed alimentari. Al tempo stesso, vi è una stretta interazione immunologica tra la madre e il proprio bambino durante la gestazione ed il periodo di allattamento al seno.

Il colostro ed il latte contengono infatti vari agenti immuno-modulatori ("fattori del colostro") che non solo possono agire direttamente per neutralizzare gli effetti nocivi degli agenti patogeni incontrati dal neonato, ma possono anche influenzare la maturazione del sistema immunitario

del neonato stesso.

Una descrizione delle funzioni mediate da questi fattori attivi sarà in grado di dimostrare meglio il loro ruolo fisiologico essenziale. Tra i molti componenti immunologici potenzialmente attivi identificati nel colostro, sono di particolare importanza le citochine. Le citochine sono piccole proteine solubili che agiscono in modo autocrino/paracrino legandosi a recettori cellulari specifici e orchestrando lo sviluppo e la funzione del sistema immunologico. Vari tipi di cellule possono produrre citochine: le cellule dell'immunità innata ed acquisita come monociti, macrofagi, linfociti T e B ma anche cellule non immunitarie, tra cui fibroblasti e cellule epiteliali mammarie.

Le citochine agiscono a basse concentrazioni, fino a 1 pg/ml, e vi sono prove sempre più numerose che nel colostro umano e bovino esse sono presenti in quantità tali da esercitare un effetto in vivo sul neonato. Per avere un effetto biologico sulla prole, i fattori del colostro devono passare dalla

madre ai figli in forma attiva ed essere presenti in concentrazioni fisiologicamente significative nel *lumen* intestinale del neonato.

Benché le citochine siano rilevabili nel latte umano e bovino durante tutto il periodo di allattamento, le concentrazioni più elevate sono state riscontrate nel colostro. Il latte artificiale per bambini non contiene citochine.

Tra queste proteine, sono degne di particolare considerazione $\text{TNF } \alpha$ e $\text{IFN } \gamma$, prototipi dell'immunità innata ed acquisita rispettivamente.

$\text{IFN } \gamma$ gioca un ruolo importante nel rafforzare l'attivazione dell'immunità mediata dalle cellule: attiva i neutrofili, i macrofagi e le cellule "natural killer". Elevati livelli di questa citochina nella mucosa intestinale sono stati correlati alla difesa del tratto intestinale da microorganismi. Inoltre $\text{IFN } \gamma$ esercita un ruolo inibitorio sulla sintesi delle immunoglobuline E (IgE) ed è stato perciò suggerito che una quantità corretta di questa citochina possa essere d'aiuto per impedire l'insorgere di allergie alimentari ed

ambientali.

La funzione fisiologica principale del $\text{TNF } \alpha$ è quella di reclutare neutrofili e monociti ai siti di infezione e attivarli per eliminare i microbi. Questa citochina è considerata una citochina pro-infiammatoria che, benché sia essenziale a bassa concentrazione, può esercitare effetti nocivi se prodotta in eccesso per un lungo periodo di tempo. Il sistema immunitario neonatale produce livelli di TNF estremamente bassi; tuttavia, bassi livelli di TNF sono permissivi per lo sviluppo di reazioni allergiche.

La lattoferrina è una glicoproteina che lega il ferro sintetizzata da granuli specifici in cellule polimorfonucleari e cellule epiteliali ghiandolari. Essa è una proteina bi-globulare ubiquitaria, presente nel latte, sulle superfici delle mucose, in plasma, saliva, lacrime, fluido seminale, endo-cervice, secrezioni vaginali, fluidi sinoviali, fluido cerebrospinale ed altri fluidi biologici. In condizioni infiammatorie, la sua produzione viene aumentata in periferia dai

neutrofili. Nel latte, essa gioca un ruolo basilare nei meccanismi di difesa della ghiandola mammaria degli animali che allattano, come pure delle infezioni microbiche intestinali dei neonati.

I batteri richiedono ferro per la crescita e la lattoferrina, chelando il ferro in particolari condizioni può inibirne la proliferazione. In aggiunta, la lattoferrina può uccidere direttamente taluni ceppi batterici o può indebolire la resistenza batterica aderendo alla loro superficie e compromettendo il loro legame alle cellule ospiti. Per queste ragioni, la lattoferrina è considerata un elemento basilare nel sistema di difesa innata dell'ospite.

La lattoferrina è anche responsabile dell'effetto fungistatico del latte umano ed è stato dimostrato che ha attività contro vari virus tra cui il virus dell'herpes, adenovirus, rotavirus e poliovirus.

La lattoferrina è particolarmente resistente alla degradazione proteolitica nel tratto digerente, è assorbita dall'intestino mediante

recettori specifici localizzati sui microvilli e, assunta oralmente, stimola la risposta immunitaria sia locale che sistemica. La lattoferrina gioca anche un ruolo nell'assorbimento di sostanze nutritive: può trasferire ioni metallici come ferro, manganese e zinco e facilita l'assorbimento degli zuccheri. Essa stimola inoltre la proliferazione delle cellule endoteliali intestinali e la crescita dei follicoli linfatici associati all'intestino. Questa proprietà suggerisce la possibilità di somministrare la lattoferrina ai neonati prematuri e a soggetti con la mucosa intestinale danneggiata. Inoltre, la lattoferrina regola la composizione appropriata della microflora intestinale, sopprimendo la crescita dei batteri patogeni e al tempo stesso promuovendo la moltiplicazione della microflora non patogena (ad esempio *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) che protegge la mucosa intestinale. Infine, la lattoferrina fornisce protezione dalla tossicità dei radicali dell'ossigeno. Questa proprietà può essere

particolarmente importante nel caso in cui gli alimenti per bambini, basati su latte vaccino modificato, contengano ferro minerale, che può essere una sorgente di radicali liberi dannosi.

Il colostro ed il latte sono particolarmente ricchi di fattori di crescita, tra i quali il Transforming Growth Factor β (TGF β , fattore di crescita trasformante) e l'Insulin-like Growth Factor I (IGF I, fattore di crescita simile all'insulina I) svolgono una funzione fondamentale.

TGF β ha un effetto critico sulla produzione di immunoglobuline A (IgA), che sono il principale effettore umorale dell'immunità delle mucose. Il colostro ed il latte materno nel primo periodo di allattamento contengono un'abbondante quantità di TGF β , che potrebbe avviare la produzione di IgA nei neonati.

TGF β ha anche un ruolo inibitorio: inibisce la proliferazione di timociti, cellule T, cellule B e cellule "natural killer". Inoltre, esso inibisce alcune funzioni differenziative dei linfociti tra cui la produzione di immunoglobuline da parte dei

linfociti B umani. TGF β 1 può inoltre interagire con altre linfocine e modulare selettivamente la risposta di IgA.

IGF I regola la crescita delle cellule beta nelle isole di Langerhans, la loro sopravvivenza ed il loro metabolismo e fornisce protezione dal diabete di tipo 1. IGF-1 stimola il trasporto del glucosio nei muscoli umani e la sintesi delle proteine muscolari.

Insulina e IGF I sembrano in grado di stimolare la proliferazione e la differenziazione cellulare; per questa capacità di modulare la proliferazione, oltre che l'adesione e la migrazione delle cellule, il fattore di crescita IGF I ha un ruolo importante in molte patologie, come il cancro e la psoriasi.

Gli anticorpi (noti anche come immunoglobuline, o Ig) sono gammaglobuline presenti nel sangue ed in altri fluidi biologici dei vertebrati, utilizzate dal sistema immunitario per identificare e neutralizzare sostanze estranee, come batteri e virus. Essi sono tipicamente

costituiti da unità strutturali basilari aventi ciascuna due catene polipeptidiche "pesanti", di dimensioni maggiori e due catene polipeptidiche "leggere", di dimensioni inferiori, unite a formare, ad esempio, monomeri con una sola unità, dimeri con due unità o pentameri con cinque unità.

Gli anticorpi sono prodotti da un tipo di globuli bianchi chiamato cellule B. Vi sono differenti tipi di catene pesanti, che identificano diversi isotipi di immunoglobuline. Nei mammiferi sono noti cinque differenti isotipi di anticorpi (IgA, IgD, IgE, IgG e IgM), che differiscono per le loro proprietà biologiche e funzionali e nella capacità di riconoscere diversi antigeni. Il riconoscimento di un antigene da parte di un anticorpo lo contrassegna per l'attacco da parte di altre componenti del sistema immunitario. Gli anticorpi possono anche neutralizzare direttamente i loro bersagli, ad esempio mediante il legame ad una parte di un agente patogeno necessaria per scatenare un'infezione.

Gli anticorpi che si legano sulla superficie

dei batteri attraggono il primo componente della cascata del complemento e avviano l'attivazione del sistema del complemento "classico", che determina la soppressione dei batteri.

Le immunoglobuline G (IgG) sono coinvolte principalmente nella risposta anticorpale secondaria che si verifica approssimativamente dopo un mese dal riconoscimento degli antigeni. Le IgG possono legarsi a molti tipi di agenti patogeni, ad esempio virus, batteri e funghi e proteggono l'organismo provocando agglutinazione ed immobilizzazione di tali patogeni, attivando il complemento (percorso classico), opsonizzandoli per la fagocitosi e neutralizzando le loro tossine. Esse hanno pure un ruolo importante nella citotossicità mediata da cellule dipendente da anticorpi. Le IgG forniscono la maggior parte dell'immunità basata su anticorpi.

IgG è l'unico isotipo che può passare attraverso la placenta umana, fornendo così protezione al feto nell'utero. Unitamente alle IgA secrete nel latte materno, le IgG assorbono

attraverso la placenta forniscono al neonato l'immunità umorale prima che si sviluppi il suo sistema immunitario.

Si è trovato che l'immunointegrazione con anticorpi del latte bovino protegge dalle malattie del tratto gastrointestinale. Le immunoglobuline più abbondanti nel colostro sono IgG.

Le immunoglobuline A (IgA) sono sintetizzate dai linfociti B, più precisamente dalle plasmacellule, o cellule B effettrici. Esse possono essere sintetizzate in forma monomerica o dimerica. Hanno due funzioni importanti: garantiscono l'immunità mucosale e l'immunità neonatale. Il ruolo di IgA nelle mucose è estremamente importante, poiché la maggior parte dei microbi penetra nell'organismo attraverso i soli due sistemi in comunicazione con l'ambiente esterno: il sistema digestivo ed il sistema respiratorio.

Le IgA sono estremamente importanti anche perché vengono trasmesse come primo sistema di difesa dalla madre al bambino che non è in grado di produrre anticorpi durante i primi sei mesi. Il

latte materno è infatti particolarmente ricco di IgA, che proteggono dai microbi il suo sistema digestivo.

Il sistema del complemento è rappresentato da una pluralità di fattori proteici che operano insieme per eliminare i patogeni che infettano l'organismo, dopo il loro riconoscimento da parte degli anticorpi. Il complemento ha un ruolo principale nel meccanismo di difesa dai microbi, essendo coinvolto sia nell'immunità specifica che nell'immunità non specifica. La soppressione dei microorganismi, la rimozione degli immuno-complessi, l'induzione e l'intensificazione delle risposte anticorpali costituiscono le funzioni biologiche principali del complemento.

Le sostanze micro-nutritive e gli oligosaccaridi possono svolgere funzioni importanti come sostanze prebiotiche durante la crescita e lo sviluppo del neonato. Le sostanze prebiotiche possono essere definite come ingredienti alimentari non digeribili che influenzano in modo benefico l'organismo mediante la stimolazione selettiva

della crescita e/o dell'attività di uno o di un numero limitato di batteri nel colon, che possono migliorare la salute dell'ospite.

La concentrazione delle sostanze micro-nutritive tra colostro e latte naturale (2 mesi dopo il parto) risente di variazioni, tra cui una riduzione del contenuto di ferro, zinco, potassio e sodio ed un aumento del contenuto di calcio e fosforo, probabilmente per soddisfare i requisiti nutrizionali del neonato. La gamma di sostanze micro-nutritive è influenzata dall'età materna, dall'aumento di peso della madre durante la gravidanza, dall'intervallo di tempo tra le gravidanze, dall'età gestazionale del neonato e dal peso alla nascita.

Gli oligosaccaridi e i glico-coniugati sono alcuni dei componenti bioattivi più importanti del latte. Il loro ruolo primario sembra essere quello di fornire protezione da agenti patogeni agendo come inibitori competitivi per i siti di legame sulle superfici epiteliali dell'intestino. È stato anche provato che alcuni di questi componenti

agiscono come promotori di crescita per la microflora benefica del colon. La concentrazione massima di queste molecole è presente nel colostro.

I fattori attivi descritti sono tra le componenti principali che rendono il latte materno differente dal latte artificiale e condizionano perciò in modo positivo la salute del neonato. Ad esempio, il latte artificiale non contiene citochine (in particolare IFN γ e TNF α), né fattori di crescita (TGF β 1 e IGF-1), né immunoglobuline, né fattori del complemento e limita pertanto lo sviluppo del sistema immunitario e lo svolgimento corretto delle funzioni biologiche e di crescita dei neonati.

La lattoferrina è presente nelle formulazioni artificiali a base di latte bovino commercialmente modificate in quantità molto inferiori alla concentrazione media nel latte umano; il latte artificiale a base di soia usato per bambini che soffrono di intolleranza al lattosio non ne contiene. Al tempo stesso, il latte bovino non è appropriato per neonati umani, poiché le

concentrazioni relative dei fattori attivi e delle altre proteine del siero sono notevolmente differenti tra latte umano e bovino.

Solamente gli oligosaccaridi ed i glicconiugati bovini possono essere vantaggiosamente usati in prodotti a base di latte come componenti bioattivi per la nutrizione umana, poiché la loro struttura chimica è simile a quella delle sostanze prebiotiche contenute nel latte umano.

Riassumendo, risulta evidente che il latte umano naturale offre il valore nutrizionale migliore per i neonati.

I fattori attivi precedentemente descritti sono presenti in e possono essere ottenuti da molti fluidi biologici e organi di mammiferi come sangue, latte, saliva, fegato, oppure possono essere ottenuti tramite ingegneria genetica. Tuttavia, ciascuna di queste fonti presenta alcuni problemi di sicurezza e/o costo che non possono essere ancora gestiti; viceversa il colostro, oltre a non presentare problemi di sicurezza, è la fonte più ricca di fattori attivi, e perciò la più

vantaggiosa.

Il colostro è normalmente prodotto in quantità che superano le esigenze del neonato. Problemi tecnici ed igienici relativi alla raccolta ed al trattamento del colostro bovino ne hanno tuttavia limitato finora l'utilizzo da parte delle industrie casearie e alimentari su larga scala. Le basse temperature di coagulazione del colostro interferiscono con la pastorizzazione e l'elevato contenuto di proteine determina problemi nei processi industriali.

Diverse ricerche hanno dimostrato che il colostro bovino è facilmente assorbito dagli esseri umani, è sino a 40 volte più ricco di fattori immunitari del colostro umano e solamente il colostro bovino contiene particolari glicoproteine e inibitori delle proteasi che sono estremamente efficaci nel proteggere i componenti attivi del colostro stesso dalla distruzione da parte degli enzimi digestivi e degli acidi contenuti nello stomaco degli esseri umani adulti. Il colostro bovino è perciò sicuro per il consumo da parte

degli esseri umani.

Vi sono numerosi prodotti preparati dal colostro bovino (concentrati di colostro bovino) venduti in Europa. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, le indicazioni cliniche non sono chiare o non sono supportate da dati clinici e i prodotti stessi non soddisfano sempre standard qualitativi appropriati per la medicina sperimentale. È essenziale che i rapporti sulle proprietà dei concentrati di colostro forniscano informazioni sui componenti attivi presenti, tra cui la concentrazione dei fattori attivi. Questa informazione è richiesta per soddisfare i requisiti legali applicabili nel valutare le prove dell'efficacia.

L'approccio generale per l'uso del colostro per la nutrizione umana è quello di usare colostro raccolto sino a 24 ore dal parto; è da notare tuttavia che la composizione del colostro cambia rapidamente anche durante le prime ore dal parto e, in particolare, la concentrazione dei fattori attivi subisce una diminuzione esponenziale, sino a

divenire talmente bassa che i fattori stessi non possono essere misurati; la concentrazione sarebbe, al tempo stesso, troppo bassa per qualsiasi attività biologica.

In aggiunta, l'uso del colostro presenta alcuni problemi industriali che non sono stati ancora risolti. Il colostro contiene, tra i suoi componenti, alcuni forti fattori di crescita; esso è in grado di promuovere la crescita di cellule umane in coltura 240 volte più di qualsiasi metodo di coltura senza provocare mutazioni o danneggiamenti alle cellule. Tale sorprendente proprietà ne complica l'uso umano. Il colostro è sterile nella ghiandola mammaria, ma durante la raccolta e lo stoccaggio viene in contatto con batteri e virus che, nonostante la cura, sono presenti in ambienti non sterili. I batteri e i virus, anche in piccolissime quantità nello stadio iniziale, proliferano assai rapidamente durante il congelamento, lo scongelamento (fasi piuttosto lunghe a causa della composizione stessa del colostro) ed il trattamento industriale e

raggiungono valori inaccettabili per le leggi in vigore, ma anche pericolosi per gli esseri umani.

L'uso di agenti bloccanti non solo è proibito negli integratori alimentari, ma è anche privo di utilità poiché la capacità di proliferazione mediata dai fattori attivi va oltre la possibilità di bloccarli efficacemente. L'alternativa più semplice è quella di irradiare il colostro. L'Unione Europea ha ammesso tale trattamento negli integratori alimentari solamente per breve tempo. Tuttavia, l'etichettatura obbligatoria di prodotto irradiato sull'imballaggio è un messaggio commerciale sgradevole, anche se il prodotto non è effettivamente radioattivo ma innocuo. Tuttavia, si suppone che pochissime madri darebbero ai loro bambini un prodotto irradiato. Inoltre, l'irradiazione con raggi γ può essere attuata con intensità da 1 a 25 kGy. Il colostro raccolto nella prima ora dal parto è molto ricco in fattori attivi ed estremamente viscoso. Il dosaggio per rendere il colostro sterile è da 10 a 25 kGy, a seconda della viscosità del lotto, della carica batterica e

dell'imballaggio: i primi due fattori sono variabili occasionali, perciò è preferibile operare con la massima quantità di radiazioni permessa (25 kGy). Con 25 kGy, le due citochine interferone γ e TNF α vengono distrutte; gli altri fattori attivi sono ridotti all'80%. Alcuni fattori attivi, come le IgG subiscono modificazioni inaccettabili nella struttura molecolare. Inoltre, i componenti allergenici sono mantenuti e spesso subiscono modificazioni nella loro struttura tridimensionale che li rendono ancora più allergenici. Il procedimento è troppo variabile, instabile ed insicuro, con problemi commerciali, e perciò non applicabile.

Il procedimento più comunemente usato per prodotti già commercializzati prevede la sterilizzazione dei fattori attivi tramite calore, seguita da liofilizzazione. Le condizioni termiche, tuttavia, annullano la possibilità di mantenere attivi i fattori nel prodotto finale: il drastico shock termico infatti provocherebbe la denaturazione delle proteine e la perdita di

attività di questi fattori. In particolare, il complemento viene distrutto a 54°C e all'aumentare della temperatura via via vengono degradati gli altri fattori, sino a 122°C (temperatura applicata al latte artificiale) quando tutti i fattori sono distrutti, mentre la caseina e la lattoalbumina preservano la loro carica allergenica. Per questa ragione, nei prodotti commerciali ottenuti dopo sterilizzazione, non viene dichiarato il contenuto dei fattori attivi.

Un altro problema inerente la purificazione dei fattori attivi dal colostro bovino è la necessaria eliminazione preliminare delle caseine, che possono provocare molti problemi allergici e ostacolare la separazione di proteine meno abbondanti e più piccole. Le caseine possono essere rimosse dopo la loro coagulazione (precipitazione), seguita da una filtrazione, tuttavia le condizioni richieste per realizzare la coagulazione, in particolare un basso valore del pH, provocano la denaturazione di molte proteine, tra cui i fattori attivi di interesse.

Ad esempio, la domanda di brevetto WO2008/119186 riguarda l'arricchimento in TGF β del colostro commerciale; conformemente al procedimento descritto, la fase di coagulazione della caseina può essere eseguita con due tipi di polisaccaridi, pectina o carragenina λ . Nel primo caso, la caseina viene separata mediante micro-filtrazione (con pori da 0,1 μm) e il siero-colostro risultante arricchito in TGF β viene precipitato con acidi a pH 5,1 per recuperare i fattori di crescita. È probabile tuttavia che tale valore di pH acido provochi la denaturazione della struttura del TGF β . Inoltre, i pori sono sufficientemente piccoli da bloccare anche gli agenti patogeni (risulta così una microfiltrazione sterilizzante) ma possono essere facilmente intasati dagli agglomerati di caseina. Una volta che i pori sono occlusi perciò, altre proteine, anche se di dimensioni inferiori, non possono passare attraverso la membrana e il permeato ottenuto è scarsamente arricchito in fattori di crescita.

Per la precipitazione con carragenina λ ,

viceversa, la porzione serica del colostro deve essere scartata, poiché TGF β co-precipita con il polisaccaride. Il precipitato di caseina arricchito in fattori di crescita tuttavia non subisce alcun trattamento di sterilizzazione per eliminare agenti patogeni.

Da ultimo, tale domanda di brevetto non fornisce alcun dato sulla concentrazione dei fattori di crescita nel prodotto finale né sulla loro attività biologica.

La domanda di brevetto WO2007/074135 riguarda una composizione nutritiva comprendente un prodotto derivato da colostro e componenti prebiotici, che garantisce un miglioramento della regolazione e la stimolazione dello sviluppo del sistema immunitario. Benché arricchito in proteine del siero, il prodotto derivato dal colostro contiene ancora caseine, in un rapporto rispetto alle proteine del siero compreso tra 50:50 e 80:20. Le caseine sono parzialmente eliminate tramite idrolisi enzimatica seguita dalla loro separazione. Il prodotto ottenuto è quindi sottoposto a

microfiltrazione. Tuttavia, poche informazioni sono fornite relativamente al procedimento per ottenere il prodotto derivato da colostro ed al contenuto dei fattori attivi presenti in esso. L'unica quantità disponibile, per quanto riguarda i fattori attivi di interesse, è fornita per la lattoferrina che può essere opzionalmente aggiunta alla composizione.

Appare perciò evidente che sussiste la necessità, condivisa anche dalle autorità regolamentanti, che riconoscono la superiorità dell'allattamento al seno, di rendere il latte artificiale più sicuro e più simile al latte umano naturale. In vista di ciò, integrare il latte artificiale con i fattori attivi sopra menzionati significa essere in grado di fornire al neonato, al bambino pretermine ed al bambino in fase di crescita, un nutrimento che è estremamente simile al latte materno.

In particolare, sussiste la necessità di fornire una miscela sterile derivata dal colostro che comprenda i fattori attivi IgG, IgA, IGF-1, TGF

$\beta 1$, e preferibilmente anche lattoferrina, transferrina, C4A, IL-2, IFN γ e TNF α , in concentrazioni definite, che possa essere impiegata nella produzione di latte artificiale, per aumentare la somiglianza del latte così ottenuto con il latte materno. Sussiste l'ulteriore necessità di fornire una formulazione nutraceutica comprendente la citata miscela sterile derivata da colostro. Benché detta formulazione nutraceutica possa essere impiegata nella nutrizione in generale, è preferibile che sia impiegata per integrare il latte artificiale convenzionale per la nutrizione dei neonati. Preferibilmente, la formulazione nutraceutica citata può esistere come formulazione liquida o in polvere, pronta per essere aggiunta al latte artificiale convenzionale in quantità definite, prima della ricostituzione del latte per bambini con acqua.

Uno scopo della presente invenzione è perciò quello di fornire una miscela di fattori biologici isolati dal colostro che comprenda i fattori attivi IgG, IgA, IGF-1, TGF $\beta 1$, e preferibilmente anche

lattoferrina, transferrina, C4A, IL-2, IFN γ e TNF α , particolarmente adatta per il nutrimento umano. Alla luce di tale scopo, un compito dell'invenzione è quello di fornire una miscela di fattori biologici derivati da colostro, contenente detti fattori attivi in quantità determinate e definite. Un altro compito è quello di fornire una formulazione per utilizzo nutraceutico, comprendente la miscela di fattori biologici sopra descritta. Tale formulazione può essere impiegata, ad esempio, come integratore del latte artificiale per bambini e neonati.

Un altro scopo dell'invenzione è quello di fornire un nuovo metodo per trattare il colostro al fine di ottenere la miscela sterile di fattori biologici sopra citata, in modo che essa risulti adatta per il nutrimento umano, anche per persone allergiche alle proteine del latte. Entro tale ambito, un compito è quello di fornire un metodo per trattare il colostro in modo tale da ottenere detta miscela, in cui i fattori biologici sono presenti in quantità determinate e definite.

Da ultimo, uno scopo dell'invenzione è quello di fornire un metodo altamente affidabile, realizzabile in modo piuttosto semplice ed economicamente competitivo per trattare colostro, il quale metodo sia in grado di preservare al tempo stesso la presenza e l'attività dei fattori biologici contenuti nel colostro stesso.

Tali fini, come pure ulteriori scopi che risulteranno più chiari in seguito, sono raggiunti da un metodo per ottenere una miscela di fattori biologici isolati da colostro, comprendente le fasi di:

a) microdiafiltrazione di colostro intero, previamente diluito con acqua o con una soluzione acquosa salina comprendente ioni farmaceuticamente accettabili a dare un volume V_1 , detta microdiafiltrazione comprendente almeno un passaggio di filtrazione del colostro intero diluito attraverso una membrana ceramica cilindrica con porosità compresa tra 2 e 6 micron, ad una temperatura compresa tra 2°C ad 20°C, e ad una pressione transmembranica (tmp) compresa tra 0,2

bar e 2 bar , ottenendo una frazione di retentato ed una frazione di permeato;

b) raccolta del permeato così ottenuto fino a che il suo volume totale V_2 ammonta almeno al 40% del volume V_1 di colostro intero diluito iniziale;

c) opzionale filtrazione sterilizzante del permeato; e

d) opzionale allontanamento dell'acqua contenuta nel permeato.

È preferibile che il volume totale V_2 del permeato ottenuto nel corso della fase b) ammonti almeno al 50% del volume V_1 del colostro intero diluito iniziale.

In una forma di realizzazione preferita del metodo della presente invenzione, la fase a) può essere ripetuta in maniera ciclica, sottoponendo nuovamente il retentato ottenuto in un ciclo di microdiafiltrazione ad un successivo passaggio di microdiafiltrazione; in tal caso si ottiene di volta in volta una successiva frazione di retentato ed una successiva frazione di permeato, che viene unita alle frazioni di permeato ottenute in

precedenza, finché il volume totale V_2 , ottenuto come somma delle frazioni riunite del permeato ottenuto in fase b) ammonta alla percentuale desiderata del volume V_1 di colostro intero diluito iniziale (almeno il 40% o almeno il 50% del volume V_1).

Più preferibilmente, la microdiafiltrazione secondo la fase a) del metodo può essere condotta in continuo, ricostituendo il volume della frazione di retentato parzialmente o interamente, aggiungendo in modo continuo acqua o una soluzione acquosa salina comprendente ioni accettabili dal punto di vista farmaceutico; il procedimento di microdiafiltrazione in continuo può essere realizzato finché il volume totale V_2 del permeato ottenuto nella fase b) ammonta alla percentuale desiderata del volume V_1 di colostro intero diluito iniziale (almeno il 40% o almeno il 50% del volume V_1).

Come si è detto in precedenza, la concentrazione dei fattori attivi del colostro diminuisce esponenzialmente subito dopo il parto:

il colostro raccolto durante la prima ora dal parto è perciò quello più ricco di fattori attivi che sia possibile ottenere. Per tale ragione, esso costituisce il materiale di partenza preferito per la presente invenzione. D'altro canto, si deve notare che il colostro della prima ora dal parto è più difficile da trattare rispetto al colostro successivo, a causa della sua più elevata viscosità. Il fatto che la presente invenzione consenta il trattamento del colostro della prima ora e l'ottenimento di una miscela sterile dei suoi fattori attivi è perciò un risultato importante.

In particolare, come si è accennato precedentemente, il problema dell'alta viscosità del colostro della prima ora può essere ridotto mediante diluizione del colostro con un medium appropriato prima di sottoporlo alla microdiafiltrazione. Preferibilmente, il colostro intero può essere diluito con almeno 10 parti in volume di acqua o di una soluzione acquosa salina comprendente ioni accettabili sotto il profilo farmaceutico, ottenendo il volume indicato come V1.

A titolo di esempio, una soluzione salina utilizzabile per diluire il colostro può essere costituita da 0,03 moli di KCl e 0,02 moli di NaCl per litro d'acqua.

In un'applicazione preferita del caso descritto in precedenza, in cui il retentato ottenuto da un passaggio di microdiafiltrazione venga successivamente sottoposto ad altri passaggi di microdiafiltrazione secondo la fase a), è preferibile che tale retentato venga ricostituito con acqua o con una soluzione acquosa salina comprendente ioni accettabili dal punto di vista farmaceutico, in tal modo ricostituendo, interamente o parzialmente, il volume V1 del colostro diluito inizialmente.

La microdiafiltrazione secondo la presente invenzione permette di rimuovere in gran parte da colostro intero (ossia senza scrematura iniziale) la frazione lipidica, le caseine e le lattoalbumine, che costituiscono una percentuale molto rilevante delle proteine del colostro e che è desiderabile eliminare dal prodotto finale al fine

di evitare problemi allergici. Nel metodo secondo la presente invenzione, la combinazione dei valori della pressione transmembrana, delle dimensioni dei pori della membrana ceramica cilindrica e della diluizione del colostro consente di trattenere la frazione lipidica, le caseine e lattoalbumine del colostro intero (non scremato) nel retentato, mentre le altre proteine solubili, i fattori biologici attivi in particolare, e le sostanze oligo-nutrienti passano attraverso la membrana nel permeato. La dimensione dei pori della membrana rappresenta un punto cruciale del processo, in quanto la caseina forma un colloide che rende impossibile la filtrazione del colostro su membrane a porosità inferiore.

La tecnica della microdiafiltrazione favorisce l'eliminazione progressiva della frazione lipidica, delle caseine e delle lattoalbumine, evitando che queste intasino i pori della membrana. Per garantire l'efficacia del processo di filtrazione è infatti importante evitare l'occlusione dei pori della membrana, non solo a causa della conseguente

caduta di permeazione e quindi della diminuzione di efficienza del processo, ma anche a causa del fatto che i fattori biologici attivi vengono adsorbiti sullo strato di lipidi, caseine e lattoalbumine trattenute sulla superficie della membrana, determinando una indesiderata perdita di queste sostanze attive nel permeato.

La microdiafiltrazione deve essere realizzata ad una temperatura compresa tra 2°C e 20°C; in particolare, sia la soluzione di colostro intero diluito che deve essere sottoposta a microdiafiltrazione, sia il permeato risultante (o i permeati in caso si realizzino fasi successive di microdiafiltrazione), devono essere mantenuti ad una temperatura compresa entro tale intervallo per tutta la durata del processo. Il raffreddamento è necessario poiché l'elevata velocità di flusso e l'elevato valore di pressione cui il sistema di filtrazione opera originano un riscaldamento che potrebbe provocare la degradazione termica dei fattori biologici attivi da preservare, oltre che un indesiderato aumento di una eventuale carica

batterica.

Al termine della microdiafiltrazione, il contenuto di caseine e lattoalbumine è ridotto sostanzialmente rispetto alla loro concentrazione iniziale nel colostro intero, raccolto ad esempio durante la prima ora dopo il parto; inoltre, altri aggregati di grandi dimensioni vengono filtrati, come i globuli di grasso, almeno il 90% dei quali sono ritenuti nel filtro.

Una forma di realizzazione preferita della presente invenzione prevede che il permeato ottenuto nel corso della fase b) sia sottoposto ad una successiva fase c) di filtrazione sterilizzante, operata con un filtro avente porosità pari a 0,22 micron. Questa seconda filtrazione permette di eliminare tutte le cellule presenti nel colostro, compresi quindi i microorganismi patogeni. In questo modo si genera una soluzione sterile, che risulta sicura per gli usi umani. Eventualmente, prima di realizzare la filtrazione sterilizzante, la soluzione viene fatta passare attraverso un pre-filtro di porosità

nominale 1,2 - 1,5 micron, per trattenere eventuali molecole ed aggregati di grosse dimensioni ancora presenti nella soluzione, evitando l'ostruzione dei piccoli pori della membrana sterilizzante. In sostanza, l'eventuale prefiltrazione serve ad allungare il tempo di vita del filtro sterilizzante da 0,22 micron.

Vantaggiosamente, perciò, questo procedimento consente di ottenere una miscela di fattori biologici attivi isolati da colostro intero, priva delle componenti allergeniche e completamente sterile da un punto di vista microbiologico. La soluzione sterile così ottenuta può essere impiegata come tale in diverse applicazioni. Tuttavia, la produzione e la manipolazione di soluzioni sterili, ad esempio introdotte in fiale, è complessa e laboriosa dal punto di vista industriale e poco pratica per l'utente finale. È quindi preferibile eliminare l'acqua dal permeato ottenuto al termine della microdiafiltrazione b) o dal permeato ottenuto al termine della filtrazione sterilizzante c), sottoponendolo a liofilizzazione.

La liofilizzazione viene operata in un ambiente controllato, generalmente ad una temperatura massima di 20°C. Essa è particolarmente utile anche perché è un "processo gentile" che elimina l'acqua a temperature che non superano 30°C, senza provocare stress al prodotto e conseguente rischio di denaturare i componenti.

La liofilizzazione rappresenta quindi la soluzione più conveniente, che inoltre genera un prodotto (una miscela liofilizzata di fattori biologici isolati da colostro) più facile da maneggiare rispetto alla soluzione sterile. Il solido risultante dalla soluzione filtrata sterilmente, dopo liofilizzazione, presenta una carica batterica controllata; inoltre un composto liofilizzato è "quiescente" da un punto di vista microbiologico, poiché si trova allo stato di polvere in assenza di acqua. Esso può essere perciò conservato a temperatura ambiente per lungo tempo, può essere facilmente trasportato senza particolari precauzioni ed è completamente solubile.

Forme di realizzazione preferite della

presente invenzione contemplano l'utilizzo di colostro di provenienza umana o proveniente da animali domestici, selezionati tra bovini, ovini, equini e caprini. Il colostro bovino, ad esempio, offre i vantaggi di essere disponibile in abbondanti quantità, di contenere elevate concentrazioni di fattori attivi e di essere compatibile con le funzioni biologiche dell'organismo umano, una volta eliminate le proteine allergeniche; inoltre, il colostro raccolto da vacche pluripare è più ricco di quello di vacche primipare. Al fine di garantire la ricchezza in fattori biologici nel prodotto finale è inoltre preferibile che il colostro venga raccolto nell'arco della prima ora successiva al parto.

È da notare che il metodo dell'invenzione offre il vantaggio di garantire l'ottenimento di una miscela di fattori biologici isolati dal colostro in forma biologicamente efficace poiché evita l'uso di qualsiasi trattamento che potrebbe causare denaturazione delle proteine e modificare

la struttura tridimensionale di tali fattori (come elevate temperature o bassi valori di pH).

Un altro aspetto dell'invenzione riguarda una miscela di fattori biologici isolati da colostro, che comprende IgG, IgA, IGF-1 e TGF β 1 nelle seguenti quantità, indicate per mg di prodotto secco:

- 0,15 - 0,35 mg di IgG;
- 0,01 - 0,05 mg di IgA;
- 0,5 - 3,0 ng di IGF-1;
- 30 - 90 pg di TGF β 1.

Preferibilmente, la miscela di fattori biologici isolati da colostro può contenere, in aggiunta ai fattori sopra citati, anche almeno uno o più dei seguenti fattori, scelti dal gruppo costituito da: lattoferrina, transferrina, fattore del complemento C4A, interleuchina 2 (IL-2), interferone γ (IFN γ) e TNF α , nelle seguenti quantità, indicate per mg di prodotto secco:

- 0,5 - 3,5 μ g di lattoferrina;
- 0,3 - 1,3 μ g di transferrina;
- 5,0 - 15,0 ng di C4A;

- 2,0 - 5,0 pg di IL-2;
- 3,0 - 9,0 pg di IFN γ ;
- 2,0 - 7,0 pg di TNF α .

Un contenuto di fattori biologici compreso all'interno di tali intervalli è tale da garantire effetti benefici per l'organismo che assumerà la miscela. È importante sottolineare il fatto che questi valori si riferiscono al contenuto di fattori biologici nella loro forma attiva e funzionale; essi infatti, per assolvere il loro ruolo fisiologico nell'organismo, non devono essere denaturati, poiché la perdita di struttura provoca una conseguente perdita di funzionalità.

Il colostro è la sorgente naturale più ricca nei fattori biologici di interesse e, rappresentando il primo nutrimento per i neonati, è ricco anche di oligo-elementi e sostanze prebiotiche. Preferibilmente quindi, la miscela dei fattori biologici isolati dal colostro può anche comprendere calcio (Ca), magnesio (Mg), manganese (Mn), sodio (Na), potassio (K), rame (Cu), zinco (Zn) e ferro (Fe).

Un ulteriore aspetto dell'invenzione si riferisce ad una formulazione nutraceutica comprendente la miscela di fattori biologici descritta precedentemente.

Dal momento che il colostro rappresenta il primo nutrimento dei neonati, una formulazione comprendente fattori biologici normalmente presenti in esso si rivela particolarmente utile nell'integrazione del latte per uso alimentare.

La presente invenzione riguarda quindi, in un altro aspetto, un integratore per il latte per i neonati, per il latte di continuazione o latte di crescita, o per latte alimentare, comprendente la miscela di fattori biologici descritta in precedenza.

Da ultimo, un ulteriore aspetto dell'invenzione riguarda il latte per i neonati, il latte di continuazione o latte di crescita, sia in polvere che ricostituito o il latte alimentare, addizionato con la miscela di fattori biologici isolati da colostro.

In conclusione, si è dimostrato come il metodo

secondo l'invenzione raggiunga pienamente i suoi scopi, poiché è in grado di fornire una miscela di fattori biologici isolati da colostro nella loro forma attiva e funzionale dal punto di vista fisiologico, particolarmente adatta per il nutrimento umano e, in caso sia richiesto, sterile. L'invenzione raggiunge il suo scopo anche poiché fornisce un nuovo metodo per ottenere una miscela di fattori del colostro adatta per l'alimentazione umana anche da parte di persone allergiche alle proteine del latte.

ESEMPIO

In un reattore da 500 l sono state miscelate diverse taniche di colostro bovino raccolto durante la prima ora dopo il parto da vacche pluripare, per un peso finale di 50 Kg. La miscela è stata diluita con 450 l di una soluzione salina avente una concentrazione 0,03 M di KCl e 0,02 M di NaCl.

La miscela diluita è stata quindi sottoposta ad una microdiafiltrazione attraverso una membrana avente porosità pari a 4 μm , con una superficie filtrante dell'estensione di circa 1 m^2 , impostando

i parametri dell'impianto in modo che il valore della pressione transmembrana (TMP) nella cartuccia di filtrazione risultasse compreso tra 0,8 bar e 1,4 bar (specificamente, si è fatto in modo da mantenerlo tra 0,9 bar e 1,0 bar). In ingresso alla cartuccia è stato posizionato un prefiltro a maglia grossolana ed uno scambiatore che permette di mantenere la temperatura del prodotto ad un valore di temperatura inferiore a 16°C.

La miscela è stata microdiafiltrata nelle condizioni sopra descritte fino a raccogliere un volume di permeato pari a 250 l. Il volume del retentato è stato quindi ripristinato al valore iniziale di 500 l aggiungendo 250 l di soluzione salina 0,03 M di KCl e 0,02 M di NaCl.

La microdiafiltrazione è stata proseguita nelle medesime condizioni sopra descritte, unendo il permeato a quello ottenuto nel primo ciclo di filtrazione, fino a raccogliere altri 410 l di permeato.

Il volume totale di permeato raccolto ammontava perciò a 660 l.

Il permeato della microdiafiltrazione è stato a questo punto concentrato su di una membrana per nanofiltrazione utilizzando una cartuccia con *cut-off* pari a 400 Da ed applicando una pressione transmembrana (TMP) di 14 bar, fino a raggiungere un volume finale di 150 l. 25 l di permeato sono stati poi fatti passare nuovamente attraverso la cartuccia. Questo passaggio di concentrazione per nanofiltrazione non è essenziale per la riuscita del processo, ma consente di aumentare sensibilmente la produttività del successivo *step* di liofilizzazione.

La miscela concentrata così ottenuta, ancora abbastanza torbida, è stata filtrata mediante un filtropressa caricato con cartoncini di porosità 1,5 μm , ottenendo una soluzione opalescente. Altri 35 l del permeato di nanofiltrazione sono stati fatti passare attraverso quest'ultimo apparato filtrante. Si noti che anche questa filtrazione non rappresenta una fase critica del processo, tuttavia permette di illimpidire la soluzione evitando l'intasamento del prefiltro da 0,5 μm utilizzato

nel passaggio successivo.

Il volume finale del prodotto concentrato così ottenuto è di 210 l.

Il prodotto prefiltrato è stato quindi caricato in un liofilizzatore filtrandolo attraverso due apparati disposti in serie ed attrezzati con un prefiltro con porosità 0,5 µm ed un filtro sterilizzante con porosità 0,22 µm.

Il ciclo adottato per la liofilizzazione è rappresentato nella tabella seguente:

STEP	TEMPERATURA	DURATA
Congelamento	-36 °C	3 ore
Ia rampa	0 °C	10 ore
IIa rampa	+10 °C	14 ore
IIIa rampa	+20 °C	Mantenimento (60 ore)

Si è valutato quindi il contenuto di dieci fattori biologici mediante kit disponibili in commercio, che determinano la quantità di fattori presenti in forma attiva.

I fattori biologici misurati ed i kit usati per la loro valutazione, sono riportati di seguito:

TGF β 1	Human TGF β 1 Quantikine Elisa Kit DB100B (R&D systems)
IGF-1	Human IGF-1 Quantikine Elisa Kit DG100 (R&D systems)
IFN γ	Bovine IFN-gamma DuoSet kit DY2300 (R&D systems)
TNF α	Bovine TNF-alpha TNFSF1A DuoSet kit DY2279 (R&D systems)
IL-2	Bovine IL-2 DuoSet kit DY2465 (R&D systems)
IgG	Bovine IgG ELISA Quantitation set E10-121 (Bethyl)
IgA	Bovine IgA Elisa Quantitation set E10-118 (Bethyl)
Transferrina	Bovine transferrin Elisa Quantitation set E10-122 (Bethyl)
Lattoferrina	Bovine lactoferrin Elisa Quantitation set E10-126 (Bethyl)
C4A	ELISA human C4A kit (BD-OptEIA)

I risultati analitici conseguiti sul prodotto liofilizzato tramite i kits sopra elencati sono riportati nell'elenco seguente:

Lattoferrina: 1,952 μ g per 1 mg di prodotto liofilizzato.

Transferrina: 0,830 μ g per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

IgA: 0,030 mg per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

IgG: 0,260 mg per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

IGF-1: 1,630 ng per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

IL-2: 3,700 pg per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

IFN γ : 6,160 pg per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

TNF α : 4,600 pg per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

C4A: 10,800 ng per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

TGF β 1: 64,000 pg per 1 mg di prodotto

liofilizzato.

RIVENDICAZIONI

1. Metodo per l'ottenimento di una miscela di fattori biologici isolati da colostro, comprendente le seguenti fasi:

a) microdiafiltrazione di colostro intero, previamente diluito con acqua o con una soluzione acquosa salina comprendente ioni farmaceuticamente accettabili a dare un volume V_1 , detta microdiafiltrazione comprendente almeno un passaggio di filtrazione del colostro intero diluito attraverso una membrana ceramica cilindrica con porosità compresa tra 2 e 6 micron, ad una temperatura compresa tra 2°C ad 20°C , e ad una pressione transmembranica (tmp) compresa tra 0,2 bar e 2 bar , ottenendo una frazione di retentato ed una frazione di permeato;

b) raccolta del permeato così ottenuto fino a che il suo volume totale V_2 ammonta almeno al 40% del volume V_1 di colostro intero diluito iniziale;

c) opzionale filtrazione sterilizzante del permeato; e

d) opzionale allontanamento dell'acqua

contenuta nel permeato.

2. Metodo secondo la rivendicazione 1 in cui il volume totale di permeato V2 ottenuto in fase b) ammonta almeno al 50% del volume V1 del colostro intero diluito iniziale.

3. Metodo secondo la rivendicazione 1 e/o 2 in cui la fase a) viene ripetuta ciclicamente, risottoponendo il retentato ottenuto nel ciclo antecedente ad ulteriore microdiafiltrazione, ottenendo una successiva frazione di retentato ed una successiva frazione di permeato, ed unendo quest'ultima con le frazioni di permeato antecedenti, fino a che il volume V2 totale delle frazioni di permeato unite secondo fase b) ammonta alla percentuale specificata del volume V1 di colostro intero diluito iniziale.

4. Metodo secondo la rivendicazione 1 e/o 2 in cui la microdiafiltrazione secondo fase a) è condotta in continuo, ricostituendo il volume della frazione di retentato parzialmente o interamente mediante aggiunta continuata di acqua o di soluzione acquosa salina comprendente ioni

farmaceuticamente accettabili, fino a che il volume totale di permeato V2 ottenuto secondo fase b) ammonta alla percentuale specificata del volume V1 di colostro intero diluito iniziale.

5. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni antecedenti in cui, in fase a), si diluisce il colostro intero impiegato inizialmente con almeno dieci parti in volume di acqua o di soluzione acquosa salina comprendente ioni farmaceuticamente accettabili, a dare il volume V1.

6. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni 1-3 o 5 in cui, prima di ripetere la filtrazione secondo fase a), si ricostituisce il retentato con acqua o soluzione acquosa salina comprendente ioni farmaceuticamente accettabili, ristabilendo interamente o parzialmente il volume V1 impostato inizialmente al colostro intero mediante diluizione.

7. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni antecedenti in cui in passaggio c) si sottopone il permeato come da passaggio b) ad una filtrazione sterilizzante finale attraverso un

filtro con porosità di 0,22 micron.

8. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni 1-6 oppure secondo la rivendicazione 7, in cui, in passaggio d), si sottopone il permeato come da passaggio b), oppure il filtrato sterile ottenuto da esso in passaggio c), a liofilizzazione, onde ottenere una miscela liofilizzata di fattori biologici isolati da colostro.

9. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti in cui il colostro intero impiegato in fase a) proviene da umani o da animali domestici, scelti dal gruppo consistente di bovini, ovini, equini, e caprini.

10. Metodo secondo una o più delle rivendicazioni precedenti, in cui il colostro intero è colostro intero di prima ora post parto.

11. Miscela di fattori biologici isolati da colostro, comprendente, per mg di prodotto secco:

- 0,15-0,35 mg di IgG;
- 0,01-0,05 mg di IgA;
- 0,5-3,0 ng di IGF-1;

- 30-90 pg di TGF β 1.

12. Miscela come da rivendicazione 11, comprendente inoltre, per mg di prodotto secco:

- 0,5-3,5 μ g di lattoferrina;
- 0,3-1,3 μ g di transferrina;
- 5,0-15,0 ng di C4A;
- 2,0-5,0 pg di IL-2;
- 3,0-9,0 pg di IFN γ ;
- 2,0-7,0 pg di TNF α .

13. Miscela di fattori come da rivendicazione 11-12, comprendente Ca, Mg, Mn, Na, K, Cu, Zn e Fe.

14. Formulazione nutraceutica, comprendente la miscela come da una o più delle rivendicazioni 11-13.

15. Integratore per latte per neonati, per latte di continuazione o latte di crescita, o per latte alimentare, comprendente la miscela come da una o più delle rivendicazioni 11-13.

16. Latte per neonati, o latte di continuazione o latte di crescita in polvere o ricostituito, o latte alimentare, addizionato con la miscela come da una o più delle rivendicazioni 11-13.