

PROCEDE DE PURIFICATION DE FRACTION DE PROTEINES CATIONIQUES ET FRACTION AINSI OBTENUE

La présente invention se rapporte à un procédé de purification de fractions
5 de protéiques cationiques par élimination des endotoxines ; elle se rapporte également aux fractions purifiées ainsi obtenues.

Les endotoxines sont les composants de la paroi des bactéries à Gram négatif. Libérées lors de la lyse ou destruction de ces bactéries, elles sont responsables des manifestations systémiques inflammatoires, telles que le choc septique, lors des infections par
10 ce type de bactéries. C'est pour cette raison qu'une limite de teneur en endotoxine est définie pour les médicaments ou les produits (tels que l'eau) injectables par les autorités comme la FDA (<https://www.fda.gov/inspections-compliance-enforcement-and-criminal-investigations/inspection-technical-guides/bacterial-endotoxinspyrogens>). Même en dehors d'utilisations injectables, les utilisations telles que dans le domaine cosmétique, celui des dispositifs médicaux, ou encore
15 de la nutrition exigent de plus en plus de réduire la teneur en endotoxines des ingrédients utilisés.

Les endotoxines, aussi appelées les lipopolysaccharides (LPS), sont constituées d'un lipide (lipide A) auquel est attachée une chaîne de glycane. La partie glycane est composée de deux parties, une partie appelée oligosaccharide central (core
20 oligosaccharide) et l'autre partie appelée polysaccharide de chaîne latérale O (antigène O) ; la Figure 1 illustre leur représentation schématique ([Maeshima & Fernandez 2013](#)). Chaque molécule de LPS a de multiples charges négatives provenant des groupes phosphate et acide du lipide A et de l'oligosaccharide central. Les endotoxines sont connues pour être stables thermiquement et chimiquement. La teneur en endotoxine s'exprime en UI (unité
25 internationale) qui équivaut à une UE (unité d'endotoxine) (3.4 Test for bacterial endotoxins, The International Pharmacopoeia – 9th edition) ; à titre indicatif, 1 ng de LPS correspond à environ 10 UE (WHO International Standard, 3rd IS for endotoxin), ceci peut être différent selon l'origine des souches de bactéries.

Dans le cadre du développements de médicaments à base de protéines issues
30 de procédés biotechnologiques et mettant en œuvre du matériel biologique, diverses méthodes de purification de protéines ont été développées afin d'éliminer des endotoxines ; ces méthodes sont par exemple une extraction par solvants, la chromatographie d'affinité (telles que résines greffées de polymyxine B, traitement qui n'est toutefois pas autorisé pour la préparation de produits alimentaires), des techniques membranaires (telle qu'ultrafiltration),

la chromatographie d'échangeur d'ions, la chromatographie d'interaction hydrophobe (Petsch, D., 2000. Endotoxin removal from protein solutions. *Journal of Biotechnology* 76, 97–119; Ongkudon, C.M., Chew, J.H., Liu, B., Danquah, M.K., 2012. Chromatographic Removal of Endotoxins: A Bioprocess Engineer's Perspective. *ISRN Chromatography* 2012, 1–9).

Cependant, il est connu que l'élimination d'endotoxines à partir d'une fraction de protéines cationiques est difficile à réaliser car la plupart des protéines cationiques telles que lysozyme (Petsch, D., Deckwer, W.-D., Anspach, F.B., 1998. Proteinase K Digestion of Proteins Improves Detection of Bacterial Endotoxins by the Limulus Amebocyte Lysate Assay: Application for Endotoxin Removal from Cationic Proteins. *Analytical Biochemistry* 259, 42–47), ribonucléase A et lactoferrine (Elass-Rochard, E., Roseanu, A., Legrand, D., Trif, M., Salmon, V., Motas, C., Montreuil, J., Spik, G., 1995. Lactoferrin-lipopolysaccharide interaction: involvement of the 28-34 loop region of human lactoferrin in the high-affinity binding to Escherichia coli 055B5 lipopolysaccharide. *Biochem J* 312, 839–845) ont des interactions fortes avec les molécules de LPS qui possèdent plusieurs charges négatives.

Un procédé pour éliminer des endotoxines liées à une protéine cationique, notamment la lactoferrine, a été proposé dans le WO 2009/009706 (Glanbia Nutritionals) ; ce procédé comprend les étapes de a) liaison de la protéine à une résine échangeuse de cations ; b) élution de l'endotoxine à l'aide d'une solution à faible force ionique en l'absence d'agent tensioactif ajouté ; c) élution de la protéine avec une solution à forte force ionique. Ce procédé permet d'obtenir un isolat de lactoferrine contenant moins de 1 UI/mg d'endotoxines.

Un procédé similaire d'élimination des endotoxines liées à la lactoferrine a été proposé dans le WO 2010/112988 (Jean-Paul Perraudin) ; ce procédé permet d'obtenir un isolat de lactoferrine contenant moins de 50 pg/mg (soit environ 0,5 UI/mg) d'endotoxine.

Ces deux procédés montrent qu'à partir d'une fraction contenant une protéine cationique telle que la lactoferrine ayant une grande affinité avec les résines échangeuses de cations, après avoir fixé cette protéine cationique sur ces résines, les endotoxines liées à cette protéine cationique peuvent être dissociées et éliminées avec une solution de force ionique faible à moyenne (solution de NaCl à 0,25-0,5 M) sans détacher cette protéine cationique des résines échangeuses de cations. Cette affinité avec les résines échangeuses de cations est dépendante des charges positives (leur ampleur et leur localisation) issues des acides aminés cationiques constitutifs (lysine, arginine et histidine) des protéines cationiques. Cependant, ces procédés ne permettent pas d'éliminer efficacement les endotoxines présentes ou liées à

une protéine cationique ou une fraction de protéines cationiques ayant une affinité faible à moyenne avec les résines échangeuses de cation, puisque ces protéines seraient alors éluées en même temps que les endotoxines.

La présente invention propose un procédé permettant d'éliminer efficacement les endotoxines présentes dans une fraction de protéines cationiques ou liées à une protéine cationique ou une fraction de protéines cationiques quelles que soient l'ampleur et localisation de leurs charges positives.

La présente invention se rapporte ainsi à un procédé de purification d'une fraction de protéines cationiques comprend les étapes a) à d) suivantes :

a) obtention d'une solution :

- de pH compris entre 6,5 et 7,5 ;
- comprenant des protéines cationiques ayant toutes un point isoélectrique supérieur à 7,5 et des protéines acides ayant un point isoélectrique inférieurs à 6,5 en une teneur inférieure à 1% en poids par rapport aux poids des protéines totales ;
- de conductivité supérieure à 45 mS/cm, de préférence supérieure à 50 mS/cm ou 60 mS/cm ;

A titre d'illustration et sans caractère limitatif, une telle solution peut être choisie parmi :

- une solution contenant la lactoferrine issue de lait de vache éluee avec 100 mS/cm de solution de NaCl à partir de résines échangeuses de cations (ex. SP Sepharose Big Beads, Cytiva Life Sciences) ;
- une solution contenant une fraction totale des protéines cationiques issues de lait de vache éluee avec 10% de NaCl à partir de résines échangeuses de cations (ex. SPEC 70 SLS, Sartorius) ;
- une solution contenant une fraction totale des protéines cationiques issues de lait de vache (contenant la lactoperoxydase, les ribonucléases, la lactoferrine) avec 40 mS/cm de solution de NaCl à partir de résines échangeuses de cations (ex. SP Sepharose Big Beads, Cytiva Life Sciences), supplémentée avec la solution saturée de NaCl jusqu'à la conductivité de 60 mS/cm ;
- une solution concentrée de lactoferrine bovine par une ultrafiltration à partir d'un éluat à 100 mS/cm ;
- une solution d'isolat de protéines cationiques de lactosérum microfiltré (protéines/matière sèche >90%), supplémentée avec la solution saturée de NaCl jusqu'à la conductivité de 60 mS/cm ;

- une poudre de la lactoferrine caprine reconstituée avec une solution saline à 5% ;
 - une poudre de lysozyme de blanc d'œuf reconstituée avec une solution NaCl à 0,5 M.
- 5 b) diafiltration de ladite solution de protéines cationiques avec l'eau exempte d'endotoxines, de préférence de l'eau osmosée ultrafiltrée, en utilisant une membrane de ultrafiltration de seuil de coupure de 5 à 50 kDa, la valeur de seuil de coupure est choisie en fonction de poids moléculaire de protéines cationiques de la solution, il est généralement compris entre 5 et 50 kDa mais peut être inférieur ou égal à 20 kDa ou entre 1 et 20 kDa ou entre 5 et 20 kDa ou de
- 10 20 kDa, inférieur ou égal à 10 kDa ou entre 1 et 10 kDa ou entre 5 et 10 kDa ou de 10 kDa, inférieur ou égal à 5 kDa ou entre 1 et 5 kDa ou de 5 kDa, ou de 1 kDa, la diafiltration est conduite jusqu'à l'obtention d'une conductivité inférieure ou égale à 10 mS/cm, de préférence inférieure ou égale 5 mS/cm, encore de préférence inférieure ou égale 1 mS/cm ; durant cette diafiltration faisant baisser la conductivité de la solution des protéines cationiques de
- 15 supérieure à 45 mS/cm à inférieure à 10 mS/cm, cette solution passe continuellement au travers d'un support d'échange d'anions, de préférence membranaire (ex. Sartobind Q, Sartorius Stedium Biotech) ou monolithique (ex. CIMmultus QA, BIA Separations), le support étant tel qu'il a peu d'effet d'exclusion stérique, afin d'adsorber et d'éliminer la quasi-totalité d'endotoxines présentes dans la solution ;
- 20 c) optionnellement, microfiltration avec une membrane de seuil de coupure compris entre 0,2 et 1,4 μm afin de réduire la charge microbienne ;
- d) optionnellement, un séchage par atomisation ou par lyophilisation de la solution afin d'obtenir un isolat de protéines cationiques en poudre.

La Figure 2 illustre une représentation schématique du procédé selon l'invention. Les Figure 3A et 3B illustrent les exemples de diagramme permettant la mise en œuvre de l'étape b) du procédé de selon l'invention.

Alternativement, la présente invention se rapporte à un procédé de purification d'un isolat de protéines cationiques comprend les étapes a) à d) suivantes :

- a) obtention d'une solution :
- 30 - de pH compris entre 6,5 et 7,5 ;
- comprenant des protéines cationiques ayant toutes un point isoélectrique supérieur à 7,5 et des protéines acides ayant un point isoélectrique inférieurs à 6,5 en une teneur inférieure à 1% en poids par rapport aux poids des protéines totales ;
- de conductivité inférieure à 1 mS/cm ;

Selon un mode de réalisation particulier, ce second procédé s'applique à l'isolat obtenu par le précédent procédé.

- b) passage de ladite solution à travers d'un support d'échange d'anions, de préférence membranaire (ex. Sartobind Q, Sartorius Stedium Biotech) ou monolithique (ex. CIMmultus QA, BIA Separations), le support étant tel qu'il a peu d'effet d'exclusion stérique, afin d'adsorber et d'éliminer la quasi-totalité d'endotoxines présentes dans la solution ; la solution est de préférence passée plusieurs fois à travers d'un support d'échange d'anions, de préférence, au moins 3 fois ;
- c) optionnellement, microfiltration avec une membrane ayant un seuil de coupure compris entre 0,2 et 1,4 μm afin de réduire la charge microbienne à un niveau acceptable pour la conformité du produit fini ;
- d) optionnellement, un séchage par atomisation ou par lyophilisation de la solution afin d'obtenir un isolat de protéines cationiques en poudre.

La Figure 4 illustre une représentation schématique d'un dispositif permettant la mise en œuvre du procédé alternatif selon l'invention.

La présente invention se rapporte encore à une fraction de protéines cationiques susceptible d'être obtenue ou telle qu'elle est obtenue par les procédés selon l'invention et telle qu'elle a une teneur en endotoxine inférieure à 5 UI/mg de protéines, de préférence inférieur à 1 UI/mg de protéines, encore de préférence inférieur à 0,1 UI/mg de protéines.

Selon un mode de réalisation les protéines cationiques de la fraction sont issues du lait ; elles peuvent alors être majoritairement constituées de lactoferrine ou majoritairement constituées de lactopéroxydase ou majoritairement constituées de ribonucléases ou encore contenir du TGF- β en une teneur supérieure à 20 $\mu\text{g/g}$, de préférence, supérieure à 50 $\mu\text{g/g}$, tout préférentiellement entre 100 et 200 $\mu\text{g/g}$ de protéines. Par majoritairement constitué, on entend une fraction comprenant au moins 50%, mais également supérieur à 90% ou 95% en poids de protéines par rapport au poids de la matière sèche. Les fractions selon l'invention peuvent également contenir majoritairement un mélange de protéines cationiques du lait ou du lactosérum.

Figures

Figure 1 : représentation schématique d'un LPS ([Maeshima & Fernandez 2013](#)) ;

Figure 2 : Représentation schématique du procédé de purification de l'isolat de protéines cationiques ;

Figure 3 : Exemples de diagramme du procédé de purification de l'isolat de protéines cationiques ; A : procédé combinant diafiltration et support échangeur d'anions en parallèle ; B : procédé combinant diafiltration et support échangeur d'anions en série

Figure 4 : Représentation schématique du procédé alternatif de purification de l'isolat de protéines cationiques.

EXEMPLES

Exemple 1 : essai en paillasse avec un concentrat liquide de lactoferrine bovine

- 1) Un concentrat liquide de la lactoferrine issue de lait de vache a été obtenu selon un procédé industriel de chromatographie échangeuse de cations, SP Sepharose Big
10 Beads (Cytiva Sweden) dans une colonne à flux radial (Albert Handtmann Armaturenfabrick GmbH) en passant le lait de vache écrémé pasteurisé, puis en éluant successivement avec une solution de NaCl à 36 mS/cm et celle à 110 mS/cm, enfin le 2^e éluat a été concentré sur une ultrafiltration de MWCO 20 kDa.
La concentration en protéines est de 13 mg/mL, la pureté de lactoferrine bovine sur
15 protéines est de 95%, la conductivité de cette solution est de 65 mS/cm, et le pH est de 6,8 (« Concentrat LF 1 »).
- 2) 75 mL de ce concentrat liquide de la lactoferrine bovine à 65 mS/cm a été diafiltré à l'échelle paillasse en utilisant ÄKTA flux s (Cytiva Sweden) avec un module fibre creuse d'ultrafiltration Start AXH (MWCO de 10 kDa). Une diafiltration a été réalisé
20 avec de l'eau déminéralisé ultrapure préparée par Milli-Q (Millipore) de façon discontinue jusqu'à 5 mS/cm ; lorsque le volume du rétentat a atteint 50 % du volume initial, de l'eau ultrapure a été ajoutée au volume initial, ce qui a été répété 5 fois. Ainsi, le concentrat de lactoferrine bovine déminéralisé a été obtenu (« Concentrat LF 2 »).
La même procédure de diafiltration décrit ci-dessus a été réalisée, mais cette fois, le
25 concentrat (rétentat) a été passé en parallèle à travers d'une cartouche de membrane échangeuse d'anions de type Q (ammonium quaternaire), Sartobind® Q nano 3 mL (Sartorius Stedim) au débit de 15 mL/min en recirculation pendant 80 minutes durant une baisse progressive de conductivité de 65 à 5 mS/cm par cette diafiltration. Ainsi, le concentrat de lactoferrine bovine déminéralisé par diafiltration et traité par
30 membrane échangeuse d'anions a été obtenu (« Concentrat LF 3 »).
- 3) La concentration d'endotoxines dans chaque concentrat déminéralisé de lactoferrine obtenu par diafiltration a été mesurée par le test LAL (lysate d'améboocytes de limules) en chromogénie cinétique de Lonza. Parallèlement, la concentration en lactoferrine bovine dans chaque concentrat a été mesurée par la méthode HPLC PI (colonne C18

300 Å, 0.1% TFA/CH₃CN gradient, détection à 280 nm). Les résultats sont exprimés en UI/mg de lactoferrine bovine.

	Concentrat LF 1	Concentrat LF 2	Concentrat LF 3
Endotoxines (UI/mg LF)	55,8	50,9	0,084

Tableau 1 - Endotoxines présentes dans les concentrats de lactoferrine bovine

Exemple 2 : essai en paillasse avec un isolat liquide de lactoferrine bovine

- 5 1) Un microfiltrat liquide de la lactoferrine issue de lait de vache a été obtenu selon un procédé industriel de chromatographie échangeuse de cations, SP Sepharose Big Beads (Cytiva Sweden) dans une colonne à flux radial (Albert Handtmann Armaturenfabrick GmbH) en passant le lait de vache écrémé pasteurisé concentré par osmose inverse à 130 g/L de matière sèche, puis en éluant successivement avec une
10 solution de NaCl à 38 mS/cm et celle à 10%, ensuite le 2^e éluat a été concentré sur une ultrafiltration de MWCO 20 kDa, puis diafiltré sur une ultrafiltration de MWCO 10 kDa avec l'eau osmosée jusqu'à 1 mS/cm, enfin le rétentat diafiltré a été microfiltré sur une membrane céramique à 0,8 µm en double couche (Membrarox[®], Pall Corporation).
- 15 2) Cet isolat liquide de lactoferrine bovine a été dilué avec de l'eau déminéralisé ultrapure préparée par Milli-Q (Millipore) pour avoir la concentration en protéines est de 16 mg/mg (p/v) et la pureté de lactoferrine bovine sur protéines est de 95%, la conductivité de cette solution est de 0,15 mS/cm, et le pH est de 6,9 (« Isolat LF 1 »). 75 mL de cet isolat liquide de lactoferrine a été passé à travers d'une cartouche de
20 Sartobind[®] Q nano 3 mL (Sartorius Stedim) au débit de 13 mL/min en recirculation pendant 90 minutes. (« Isolat LF 2 »)
- 25 3) La concentration d'endotoxines dans chaque isolat de lactoferrine a été mesurée par le test LAL (lysate d'amœbocytes de limules) en chromogénie cinétique de Lonza. Parallèlement, la concentration en lactoferrine bovine dans chaque concentrat a été mesurée par la méthode HPLC PI (colonne C18 300 Å, 0.1% TFA/CH₃CN gradient, détection à 280 nm). Les résultats sont exprimés en UI/mg de lactoferrine bovine.

	Isolat LF 1	Isolat LF 2
Endotoxines (UI/mg LF)	62,7	<0,05

Tableau 2 - Endotoxines présentes dans les isolats de lactoferrine bovine

Exemple 3 : essai en paillasse avec un isolat liquide de lactoferrine bovine

- 30 1) Un microfiltrat liquide de la lactoferrine issue de lait de vache a été obtenu selon un procédé industriel de chromatographie échangeuse de cations, SP Sepharose Big

Beads (Cytiva Sweden) dans une colonne à flux radial (Albert Handtmann Armaturenfabrick GmbH) en passant le lait de vache écrémé pasteurisé, puis en éluant successivement avec une solution de NaCl à 36 mS/cm et celle à 110 mS/cm, ensuite le 2e éluat a été concentré sur une ultrafiltration de MWCO 20 kDa, puis diafiltré sur une ultrafiltration de MWCO 10 kDa avec l'eau osmosée jusqu'à 1 mS/cm, enfin le rétentat diafiltré a été microfiltré sur une membrane céramique à 1,4 µm en double couche (Membrarox[®], Pall Corporation).

La concentration en protéines est de 147 mg/mL, la pureté de lactoferrine bovine sur protéines est de 95%, la conductivité de cette solution est de 0,8 mS/cm, et le pH est de 6,8 (« Isolat LF 3 »).

- 2) 70 mL de cet isolat liquide de lactoferrine a été passé à travers d'une cartouche de Sartobind[®] Q nano 3 mL (Sartorius Stedim) au débit de 6 mL/min (« Isolat LF 4 »). L'isolat liquide de lactoferrine récupéré (65 mL) a été passé à travers de la cartouche de Sartobind[®] Q nano 3 mL, puis à nouveau l'isolat liquide de lactoferrine récupéré a été passé à travers de la cartouche de Sartobind[®] Q nano 3 mL, en tout 3 passages (« Isolat LF 5 »).

L'isolat liquide de lactoferrine récupéré (60 mL) a été passé à travers de la cartouche de Sartobind[®] Q nano 3 mL en recirculation pendant 30 minutes au débit de 6 mL/min en tout 6 passages équivalents (« Isolat LF 6 »).

L'isolat liquide de lactoferrine récupéré (55 mL) a été passé à travers de la cartouche de Sartobind[®] Q nano 3 mL en recirculation pendant 37 minutes au débit de 6 mL/min en tout 10 passages équivalents (« Isolat LF 7 »).

- 3) La concentration d'endotoxines dans chaque isolat de lactoferrine a été mesurée par le test LAL (lysate d'amœbocytes de limules) en chromogénie cinétique de Lonza. Les résultats sont exprimés en UI/mg de protéines.

	Isolat LF 3	Isolat LF 4	Isolat LF 5	Isolat LF 6	Isolat LF 7
Endotoxines (UI/mg protéines)	59,8	7,2	4,6	2,2	1,5

Tableau 3 - Endotoxines présentes dans les isolats de lactoferrine bovine

Exemple 4 : essai en paillasse avec un isolat liquide de protéines cationiques contenant TGF-β issues lait de vache

- 1) Une fraction de protéines cationique contenant TGF-β issues de lait de vache a été obtenue selon le procédé écrit dans l'Exemple 1 du Brevet EP 1912513. La teneur en

TGF- β 2 analysé par le kit ELISA (Quntikine TGF-2, R&D Systems) dans le microfiltrat obtenu avant le séchage par atomisation était 115 μ g/g protéines.

- 2) Cet isolat liquide de protéines cationiques contenant du TGF- β a été dilué avec de l'eau déminéralisé ultrapure préparée par Milli-Q (Millipore) pour avoir une concentration en protéines de 2.6 mg/mg (p/v), la conductivité de cette solution est de 0,89 mS/cm, et le pH est de 7,1 (« Isolat de protéines cationiques de lait 1»). 50 mL de cet isolat liquide de protéines cationiques de lait a été passé en recirculation au travers d'une cartouche de Sartobind[®] Q nano 3 mL (Sartorius Stedim) au débit de 5 mL/min pendant 70 minutes. (« Isolat de protéines cationiques de lait 2»)
- 3) La concentration d'endotoxines dans chaque isolat liquide de protéines cationiques de lait a été mesurée par le test LAL (lysate d'amœbocytes de limules) en chromogénie cinétique de Lonza. Les résultats sont exprimés en UI/mg de protéines.

	Isolat de protéines cationiques de lait 1	Isolat de protéines cationiques de lait 2
Endotoxines (UI/mg protéines)	9,75	0,099

Tableau 4 - Endotoxines présentes dans les isolats de protéines cationiques de lait contenant TGF- β

REVENDICATIONS

1. Procédé de purification d'une fraction de protéines cationiques comprenant les étapes suivantes :

5 a) obtention d'une solution :

- de pH compris entre 6,5 et 7,5 ;
- comprenant des protéines cationiques ayant toutes un point isoélectrique supérieur à 7,5 et des protéines acides ayant un point isoélectrique inférieurs à 6,5 en une teneur inférieure à 1% en poids par rapport aux poids des protéines totales ;

10 - de conductivité supérieure à 45 mS/cm ;

b) diafiltration de ladite solution de protéines cationiques avec l'eau exempte d'endotoxines, de préférence de l'eau osmosée ultrafiltrée, en utilisant une membrane de ultrafiltration de seuil de coupure de 5 à 50 kDa jusqu'à l'obtention d'une conductivité inférieure ou égale à 10 mS/cm, de préférence inférieure ou égale 5 mS/cm, encore de préférence inférieure ou égale 1 mS/cm ; durant cette diafiltration, cette solution passe continuellement à travers d'un support d'échange d'anions, de préférence membranaire ou monolithique ;

c) optionnellement, microfiltration avec une membrane de seuil de coupure compris entre 0,2 et 1,4 μm ;

d) optionnellement, un séchage par atomisation ou par lyophilisation de la solution.

20

2. Procédé de purification d'un isolat de protéines cationiques comprenant les étapes suivantes :

a) obtention d'une solution :

- de pH compris entre 6,5 et 7,5 ;
- comprenant des protéines cationiques ayant toutes un point isoélectrique supérieur à 7,5 et des protéines acides ayant un point isoélectrique inférieurs à 6,5 en une teneur inférieure à 1% en poids par rapport aux poids des protéines totales ;
- de conductivité inférieure à 1 mS/cm ;

25

b) passage de ladite solution à travers d'un support d'échange d'anions, de préférence membranaire ou monolithique; la solution est de préférence passée plusieurs fois à travers d'un support d'échange d'anions, de préférence, au moins 3 fois ;

30

c) optionnellement, microfiltration avec une membrane ayant un seuil de coupure compris entre 0,2 et 1,4 μm ;

d) optionnellement, un séchage par atomisation ou par lyophilisation de la solution afin d'obtenir un isolat de protéines cationiques en poudre.

3. Fraction de protéines cationiques susceptible d'être obtenue par le procédé selon la
5 revendication 1 ou la revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a une teneur en endotoxine inférieure à 0,1 UI/mg de protéines.

4. Fraction de protéines cationiques obtenue par le procédé selon la revendication 1 ou la
revendication 2, caractérisée en ce qu'elle a une teneur en endotoxine inférieure à 5 UI/mg de
10 protéines, de préférence inférieur à 1 UI/mg de protéines, encore de préférence inférieur à 0,1 UI/mg de protéines.

5. Fraction de protéines cationiques selon la revendication 3 ou la revendication 4, caractérisée
en ce que les protéines cationiques de la fraction sont issues du lait.

15

6. Fraction de protéines cationiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 5,
caractérisée en ce que les protéines cationiques sont majoritairement constituées de
lactoferrine.

20 7. Fraction de protéines cationiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 5,
caractérisée en ce que les protéines cationiques sont majoritairement constituées de
lactopéroxydase.

8. Fraction de protéines cationiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 5,
25 caractérisée en ce que les protéines cationiques sont majoritairement constituées de
ribonucléases.

9. Fraction de protéines cationiques selon l'une quelconque des revendications 3 à 5,
caractérisée en ce que les protéines cationiques contiennent du TGF- β supérieure à 20 μ g/g
30 de protéines.