

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 565 379**

51 Int. Cl.:

**C07K 1/18** (2006.01)

**C07K 14/47** (2006.01)

**C07K 14/52** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2012 E 12706623 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.12.2015 EP 2681230**

54 Título: **Método para aislar osteopontina usando alimentaciones que contienen caseinomacropéptido (CMP)**

30 Prioridad:

**03.03.2011 EP 11156826**

**03.03.2011 US 201161448775 P**

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

**04.04.2016**

73 Titular/es:

**ARLA FOODS AMBA (100.0%)**

**Sønderhøj 14**

**8260 Viby J, DK**

72 Inventor/es:

**BERTELSEN, HANS;**

**WEJSE, PETER LANGBORG y**

**TRÚGVASON, TRINE**

74 Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

Observaciones :

**Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

**ES 2 565 379 T3**

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

## DESCRIPCIÓN

Método para aislar osteopontina usando alimentaciones que contienen caseinomacropéptido (CMP)

### Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a un método para aislar osteopontina a partir de una alimentación procedente de leche, por ejemplo, una alimentación basada en suero de leche o lactosuero dulce. Particularmente, el método presente implica el uso de una estrecha ventana de pH y de conductancia específica de la alimentación procedente de leche, el cual, sorprendentemente, ha demostrado proporcionar un aislamiento muy eficaz de osteopontina a partir de alimentaciones químicamente complejas.

### Antecedentes

10 La osteopontina es una proteína ligante de calcio, rica en ácido siálico, muy fosforilada y ácida. La osteopontina contiene aproximadamente 28 moles de fosfato unido por mol de osteopontina y se une a aproximadamente 50 moles de Ca por mol de osteopontina.

15 La osteopontina (OPN) es una proteína bioactiva multifuncional que está implicada en numerosos procesos biológicos, tales como la remodelación ósea, la inhibición de la calcificación ectópica y la adhesión y la migración celulares, así como en varias funciones inmunes. La osteopontina presenta propiedades de tipo citocina y es un factor esencial en el inicio de respuestas inmunes por células T cooperadoras de tipo 1. La osteopontina está presente en la mayor parte de los tejidos y fluidos corporales, encontrándose las mayores concentraciones en la leche. Basándose en una función inhibitoria de la OPN en la calcificación ectópica, un modelo in vivo usando ratones deficientes en OPN mostró una calcificación disminuida tras la adición exógena de la proteína. Además, la OPN está  
20 implicada en la defensa del tracto urinario frente a la formación de piedras renales porque la OPN puede inhibir el crecimiento y la agregación de cristales de monohidrato de oxalato cálcico.

25 El papel biológico de la OPN en la leche no está claro; sin embargo, se podrían plantear hipótesis sobre varias funciones. Se ha comunicado que la osteopontina está implicada en el desarrollo y la diferenciación de la glándula mamaria, y se han observado niveles elevados de expresión de OPN en la glándula mamaria en la lactancia temprana. Además, la naturaleza muy aniónica de la proteína podría permitir que la OPN formara complejos solubles con iones de calcio e inhibiera por ello la cristalización y la precipitación accidentales de calcio en la leche.

30 En la bibliografía científica, la osteopontina es típicamente purificada a partir de hueso o leche y está típicamente presente en la leche bovina en una concentración de 20 mg/l. En la leche, la osteopontina es una proteína de suero pero también se puede asociar en cierta medida con las micelas de caseína dependiendo del nivel de  $\text{Ca}^{2+}$ . El lactosuero agrio es la materia prima preferida para la producción industrial de osteopontina. Se piensa que, cuando se forma lactosuero agrio, la osteopontina abandona las micelas de caseína como filtraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  en la fase de suero. Este aspecto hace que el lactosuero agrio sea una fuente directa de osteopontina. Por la misma razón, el lactosuero dulce tiene un contenido ligeramente menor de osteopontina. Además, el lactosuero dulce contiene caseinomacropéptido (CMP; del inglés, caseino macropéptide) procedente de la escisión enzimática de la kappa-caseína. El CMP presenta muchas similitudes bioquímicas con la osteopontina; ambos son glicoproteínas fosforiladas, ácidas, flexibles y pequeñas. Por esta razón, se cree que el CMP y la osteopontina son bastante similares en cuanto a su unión a resinas de intercambio iónico, lo que planteará un problema a la hora de purificar osteopontina a partir de una materia prima que contenga CMP. Otro aspecto es la probable degradación de la osteopontina por enzimas proteolíticas empleadas en la elaboración de queso. Estos tres aspectos pueden haber  
40 dado lugar a la evitación de esta materia prima para la purificación de osteopontina, tanto para producción industrial como para investigación científica.

### Técnica previa

45 En el Documento WO 02/28413 A1 se describe un método para producir una composición que contiene osteopontina a partir de materias primas tales como leche y lactosuero agrio por medio de intercambio aniónico a bajo pH. En el Documento WO 02/28413 A1 se pone énfasis en que ni la materia prima del proceso ni el producto resultante pueden contener cGMP, que es un tipo de CMP del que se sabe que se une a intercambiadores aniónicos y que inhibiría la unión de la osteopontina. El Documento WO 02/28413 A1 se considera la técnica previa más cercana.

50 En el Documento WO 01/149741 A2 se describe un proceso en el que se purifica osteopontina a partir de un material lácteo al mezclar el material lácteo con calcio soluble y ajustar el pH de la mezcla para que precipiten selectivamente los demás componentes proteicos del lactosuero mientras se queda la osteopontina en disolución.

### Sumario de la invención

55 Los presentes inventores han descubierto que, sorprendentemente y contrariamente a los prejuicios hallados en la técnica previa, se puede aislar osteopontina por intercambio aniónico con elevada producción y elevada pureza a partir de alimentaciones complejas procedentes de leche a pesar de la presencia de proteínas competidoras en la

alimentación. Los presentes inventores han hallado que la conductancia específica de la alimentación es particularmente importante para la producción y la pureza de la osteopontina y han identificado una ventana óptima de la conductancia específica para el aislamiento de osteopontina a partir de alimentaciones procedentes de leche.

5 De este modo, un aspecto de la invención se refiere a un método para aislar osteopontina a partir de una alimentación procedente de leche, método que comprende las operaciones de:

- 10 a) obtener una alimentación procedente de leche que comprende osteopontina, alimentación procedente de leche que tiene un pH en el intervalo de 3,6-6,5 a 25 °C y una conductancia específica en el intervalo de 0,4-1,0 S/m (4-10 mS/cm) a 25 °C, y en donde dicha alimentación procedente de leche comprende además caseinomacropéptido en una cantidad de al menos 1 % (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche,
- b) someter dicha alimentación procedente de leche a cromatografía de intercambio aniónico, que incluye poner la alimentación procedente de leche en contacto con un medio de intercambio aniónico,
- c) opcionalmente, lavar el medio de intercambio aniónico, y
- 15 d) recuperar la proteína unida al medio de intercambio aniónico, obteniéndose de este modo una composición que comprende osteopontina aislada.

Por ejemplo, la presente invención se puede referir a un método para aislar osteopontina a partir de una alimentación procedente de leche, método que comprende las operaciones de:

- 20 a) obtener una alimentación procedente de leche que comprende osteopontina, alimentación de leche que es una alimentación procedente de suero de leche, alimentación procedente de leche que tiene un pH en el intervalo de 3,6-6,5 a 25 °C y una conductancia específica en el intervalo de 0,4-1,0 S/m (4-10 mS/cm) a 25 °C, y en donde dicha alimentación procedente de leche comprende además
  - caseinomacropéptido en una cantidad de al menos 1 % (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche, y opcionalmente
  - alfa-caseína libre y beta-caseína libre,
- 25 b) someter dicha alimentación procedente de leche a cromatografía de intercambio aniónico, que incluye poner la alimentación procedente de leche en contacto con un medio de intercambio aniónico,
- c) opcionalmente, lavar el medio de intercambio aniónico, y
- d) recuperar la proteína unida al medio de intercambio aniónico, obteniéndose de este modo una composición que comprende osteopontina aislada.

30 Además de las ventajas anteriormente mencionadas, el presente método permite un uso más económicamente eficaz del medio de intercambio aniónico y una mayor producción de osteopontina por kilogramo de medio de intercambio aniónico.

Otra ventaja del presente método es una producción mejorada de osteopontina por ciclo de intercambio aniónico, como se demuestra en el Ejemplo 5.

35 La "conductancia específica" (a la que a veces se hace referencia como "conductividad específica") de una disolución acuosa es una medida de la capacidad de la disolución para conducir electricidad. La conductancia específica puede ser determinada, por ejemplo, midiendo la resistencia a la corriente alterna de la disolución entre dos electrodos, y el resultado se presenta típicamente en unidades de milisiemens por centímetro (mS/cm). La medición de la conductancia específica puede ser llevada a cabo, por ejemplo, de acuerdo con el Método nº 120.1  
40 de la US Environmental Protection Agency (EPA).

### Breve descripción de las figuras

Figura 1. Efecto del pH de una alimentación procedente de lactosuero dulce sobre la pureza y la producción de osteopontina en una conductancia específica de 5,5 mS/cm.

45 Figura 2. Efecto de la conductancia específica de una alimentación procedente de lactosuero dulce sobre la pureza y la producción de osteopontina en un pH de 4,3.

Figura 3. Influencia de la conductancia específica de una alimentación procedente de lactosuero agrio sobre la pureza y la producción de OPN en un pH de 4,3.

**Descripción detallada de la invención**

Como se mencionó, un aspecto de la invención se refiere a un método para aislar osteopontina a partir de una alimentación procedente de leche, método que comprende las operaciones de:

- 5 a) obtener una alimentación procedente de leche que comprende osteopontina, alimentación procedente de leche que tiene un pH en el intervalo de 3,6-6,5 a 25 °C y una conductancia específica en el intervalo de 0,4-1,0 S/m (4-10 mS/cm) a 25 °C, y en donde dicha alimentación procedente de leche comprende además
- caseinomacropéptido en una cantidad de al menos 1 % (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche,
- 10 b) someter dicha alimentación procedente de leche a cromatografía de intercambio aniónico, que incluye poner la alimentación procedente de leche en contacto con un medio de intercambio aniónico,
- c) opcionalmente, lavar el medio de intercambio aniónico, y
- d) recuperar la proteína unida al medio de intercambio aniónico, obteniéndose de este modo una composición que comprende osteopontina aislada.

15 Las operaciones del método se llevan típicamente a cabo en secuencia, por ejemplo, las operaciones a), b), c) y d). Sin embargo, en ciertas realizaciones de la invención se omite la operación c) del método y, en este caso, el método comprende las operaciones a), b) y d).

20 En el contexto de la presente invención, la expresión "aislamiento de osteopontina" se refiere al enriquecimiento en osteopontina en un porcentaje ponderal de al menos 70% (peso/peso), preferiblemente de al menos 80% (peso/peso) y aún más preferiblemente de al menos 90% (peso/peso), con respecto al peso total de proteína recuperada del medio de intercambio aniónico durante la operación d). El aislamiento de osteopontina puede implicar, por ejemplo, el enriquecimiento en osteopontina en un porcentaje ponderal de al menos 95% (peso/peso), tal como al menos 97% (peso/peso), con respecto al peso total de proteína recuperada del medio de intercambio aniónico durante la operación d).

25 El método es particularmente útil para mejorar el enriquecimiento selectivo en osteopontina de una alimentación procedente de leche que comprende proteína adicional que tiene un punto isoeléctrico (pI) < 5,0, por ejemplo, alimentaciones procedentes de leche que contienen CMP. La expresión "enriquecimiento selectivo" debería entenderse como aumento de la relación molar entre osteopontina y la cantidad total de otras proteínas de la alimentación procedente de leche.

El punto isoeléctrico de una proteína se determina preferiblemente mediante enfoque isoeléctrico a 25 °C.

30 En el contexto de la presente invención, la expresión "alimentación procedente de leche" se refiere a la alimentación líquida que entra en contacto con el medio de intercambio aniónico.

La alimentación procedente de leche procede de leche de una o más fuentes de mamífero, por ejemplo, leche de mujer, vaca, oveja, cabra, búfala, camella, llama, yegua y/o cierva. En algunas realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche procede de leche bovina.

35 En el contexto de la presente invención, las expresiones "alimentación procedente de leche", "alimentación procedente de lactosuero dulce", "alimentación procedente de lactosuero agrio" y "alimentación procedente de suero de leche" se refieren a alimentaciones en donde al menos el 50% (peso/peso) de la proteína total proviene de leche, lactosuero dulce, lactosuero agrio o suero de leche, respectivamente. En algunas realizaciones preferidas de la invención, al menos el 90% (peso/peso) de, y preferiblemente sustancialmente toda, la proteína total de la

40 alimentación procedente de leche proviene de una leche, un lactosuero dulce, un lactosuero agrio o un suero de leche.

45 En el contexto de la presente invención, el término "leche" se refiere al líquido obtenido de las glándulas mamarias de los mamíferos durante la lactancia. El término "leche" se debería interpretar en sentido amplio y abarca tanto la leche cruda, es decir, el líquido obtenido directamente de las glándulas mamarias, como productos lácteos estandarizados tales como, por ejemplo, leche desnatada o leche entera, donde la concentración de la grasa láctea ha sido reducida con respecto a la de la leche cruda original.

"Lactosuero" es un término colectivo que se refiere al subproducto acuoso que se produce durante la fabricación de queso o caseína a partir de leche.

50 En el contexto de la presente invención, la expresión "lactosuero dulce" se refiere al lactosuero que se obtiene durante la coagulación de leche basada en cuajo, que tiene lugar, por ejemplo, durante la producción de queso amarillo.

En el contexto de la presente invención, la expresión "lactosuero agrio" se refiere al lactosuero que se obtiene

durante la acidificación química o biológica de la leche, que tiene lugar, por ejemplo, durante la producción de requesón o queso "quark" o en la producción de caseína/caseinatos.

5 En el contexto de la presente invención, la expresión "suero de leche", que también se conoce como "lactosuero nativo" o "suero lácteo", se refiere a leche de la que se han separado grasa láctea y micelas de caseína. Sin embargo, el suero de leche contiene típicamente algunas especies de caseína libres que se han disociado de las micelas de caseína nativas antes de que se separaran las micelas. Se puede producir suero de leche, por ejemplo, al microfiltrar una leche desnatada a través de un filtro o membrana que tiene poros con un tamaño de aproximadamente 0,1 micrómetros y recoger el filtrado resultante como suero de leche. Se puede producir suero de leche de acuerdo con Evans et al.

10 Como se entenderá, la leche, el lactosuero dulce, el lactosuero agrio o el suero de leche pueden haber sido sometidos a diversas operaciones de procesamiento para preparar la alimentación procedente de leche.

El procesamiento de leche o productos relacionados con la leche implica típicamente uno o más procesos de tratamiento térmicos, tales como una pasteurización (por ejemplo, 72 °C durante 15 segundos) o una alta pasteurización (por ejemplo, 85 °C durante 20 segundos).

15 Alternativa o adicionalmente, el procesamiento puede implicar una o más operaciones de filtración. Se puede utilizar una microfiltración para separar microorganismos o, alternativamente, para concentrar la caseína. Por ejemplo, se puede utilizar una ultrafiltración o una nanofiltración para concentrar la proteína de lactosuero o la proteína de suero de leche.

20 Alternativa o adicionalmente, el procesamiento puede implicar una o más operaciones de centrifugación, por ejemplo, para separar grasa de leche desnatada y/o separar microorganismos de la leche.

Alternativa o adicionalmente, el procesamiento puede implicar una o más operaciones de evaporación para separar agua y, de este modo, concentrar materia seca tales como proteínas y/o minerales.

25 El procesamiento puede también comprender uno o más ajustes del pH. Por ejemplo, se puede emplear una acidificación para coagular la caseína, y además puede ser importante un ajuste del pH cuando el procesamiento implica cromatografía de intercambio iónico.

En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende una o más corrientes de proceso procedentes de la producción de otras fracciones proteicas de la leche, tal como lactosuero filtrado y térmicamente tratado o lactosuero desprovisto de alfa lactalbúmina y/o beta-lactoglobulina.

30 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche comprende, o incluso consiste esencialmente en, una alimentación procedente de suero de leche. La alimentación procedente de leche puede ser, por ejemplo, un suero de leche, y preferiblemente un concentrado proteico de suero de leche, por ejemplo, en forma del producto de retención obtenido al ultrafiltrar suero de leche.

35 El contenido de osteopontina en la alimentación procedente de leche depende del tipo de alimentación específico. En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende osteopontina en una cantidad en el intervalo de 0,01-20% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender osteopontina en una cantidad en el intervalo de 0,05-5% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. La alimentación procedente de leche puede comprender, por ejemplo, osteopontina en una cantidad en el intervalo de 0,1-2% (peso/peso).

40 Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede comprender osteopontina en una cantidad en el intervalo de 0,1-1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

45 En el contexto de la presente invención, un producto, componente, método u operación de método del que se afirma que "consiste esencialmente en" uno o más subcomponentes o una o más actividades consiste en los uno o más subcomponentes específicamente mencionados o las una o más actividades específicamente mencionadas pero puede también incluir uno o más subcomponentes o actividades adicionales no citados que no afectan materialmente a la(s) característica(s) básica(s) y nueva(s) de la presente invención.

50 Como se mencionó anteriormente, el método presente es particularmente eficaz para aislar osteopontina de alimentaciones complejas, es decir, alimentaciones que contienen elementos moleculares que interfieren en el aislamiento de la osteopontina, tales como proteínas que tienen un pI inferior a 5,0. Se ha hallado que tales proteínas compiten con la osteopontina por los grupos funcionales del medio de intercambio aniónico.

Son ejemplos de proteínas que tienen un pI < 5,0: alfa-lactalbúmina, proteosa peptona-3, proteosa peptona-5 y proteosa peptona-8, y péptidos derivados de caseína tales como caseinomacropéptido y/o caseinofosfopéptidos. De este modo, la proteína adicional puede comprender una o más proteínas del grupo que consiste en alfa-lactalbúmina, proteosa peptona-3, proteosa peptona-5 y proteosa peptona-8, péptido derivado de caseína,

caseinomacropéptido, caseinofosfopéptido y combinaciones de los mismos. La alfa-caseína libre y la beta-caseína libre son otros ejemplos de proteínas que tienen un valor de  $pI < 5,0$ .

5 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  de al menos 0,1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  de al menos 0,5% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

10 Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  de al menos 2% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Como se entenderá, la proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  no incluye osteopontina pero incluye típicamente una o más proteínas distintas que tienen un  $pI$  en el intervalo especificado.

15 En otras realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 0,1-50% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 0,5-40% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 2-25% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

20 Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 0,1-20% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 0,3-15% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 0,5-10% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

30 En otras realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 1-50% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 10-45% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad de proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  en el intervalo de 15-40% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la proteína adicional que tiene un  $pI < 5,0$  tiene un  $pI < 4,5$  y preferiblemente un  $pI < 4,0$ .

35 En el contexto de la presente invención, el término "proteína" abarca grandes agregados de polipéptidos, cadenas polipeptídicas individuales y péptidos tales como dipéptidos y tripéptidos. Químicamente, las proteínas son polímeros que comprenden aminoácidos diferentes y/o idénticos unidos por los llamados enlaces peptídicos.

40 En el contexto de la presente invención, el término "CMP" o "caseinomacropéptido" se refiere a una pequeña proteína que se libera de la kappa-caseína tras la exposición a enzimas del cuajo. El CMP abarca tanto variantes glicosiladas como una variante no glicosilada de la proteína. A las variantes glicosiladas de la proteína se hace a veces referencia como caseino-glicomacropéptido (cGMP).

45 En otras realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche comprende, o incluso consiste esencialmente en, una alimentación procedente de lactosuero dulce. La alimentación procedente de leche puede ser, por ejemplo, lactosuero dulce y preferiblemente concentrado proteico de lactosuero dulce, por ejemplo, en forma del producto de retención obtenido por ultrafiltración de lactosuero dulce.

En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche puede comprender, o incluso consiste esencialmente en, una alimentación procedente de lactosuero agrio. La alimentación procedente de leche puede ser, por ejemplo, un lactosuero agrio y preferiblemente un concentrado proteico de lactosuero agrio, por ejemplo, en forma del producto de retención obtenido por ultrafiltración de lactosuero agrio.

50 En el contexto de la presente invención, las expresiones "concentrado proteico de suero de leche", "concentrado proteico de lactosuero dulce" y "concentrado proteico de lactosuero agrio" se refieren a una composición acuosa que contiene al menos el 80% (peso/peso) de la proteína total que estaba presente en el suero de leche, en lactosuero dulce o el lactosuero agrio originales, respectivamente, y que tiene un contenido proteico total de al menos 25% (peso/peso) con respecto al peso de la composición acuosa en estado seco.

55 Sin embargo, en otras realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche no es una alimentación procedente de lactosuero agrio.

5 En realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche, por ejemplo, una alimentación procedente de lactosuero dulce, comprende CMP en una cantidad de al menos 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche, por ejemplo, una alimentación procedente de lactosuero dulce, puede comprender CMP en una cantidad de al menos 5% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche, preferiblemente al menos 10% (peso/peso) y aún más preferiblemente al menos 15% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

10 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche, por ejemplo, una alimentación procedente de lactosuero dulce, comprende CMP en una cantidad en el intervalo de 1-40% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche, por ejemplo, una alimentación procedente de lactosuero dulce, puede comprender CMP en una cantidad en el intervalo de 5-35% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche, preferiblemente en el intervalo de 10-30% (peso/peso) y aún más preferiblemente en el intervalo de 15-25% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

15 Los presentes inventores han observado que, sorprendentemente, se forma un precipitado durante el presente proceso cuando la alimentación se basa en suero de leche o un concentrado del mismo. El precipitado causa problemas durante el proceso de intercambio aniónico y reduce su solidez.

Los inventores han investigado el precipitado y han hallado indicios de que contiene especies de caseína precipitadas, que estaban presentes en forma disuelta como beta-caseína libre o alfa-caseína libre.

20 En el contexto de la presente invención, las expresiones "beta-caseína libre" y "alfa-caseína libre" se refieren a moléculas de beta-caseína y moléculas de alfa-caseína que no están unidas a las micelas de caseína nativas de los productos lácteos. Dicha beta-caseína libre o alfa-caseína libre incluye moléculas individuales disueltas de beta-caseína o alfa-caseína o pequeños agregados de alfa-caseína y/o beta-caseína. Se sabe que, por ejemplo, las moléculas individuales de beta-caseína forman pequeñas micelas de beta-caseína, las cuales son también un ejemplo de beta-caseína libre.

De este modo, en algunas realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche comprende además alfa-caseína libre y beta-caseína libre. La alfa-caseína libre y la beta-caseína libre están típicamente presentes en la alimentación procedente de suero de leche.

30 Los inventores han hallado que este problema de precipitación puede ser resuelto separando el precipitado de las alimentaciones procedentes de leche antes del intercambio aniónico. De este modo, en algunas realizaciones preferidas de la invención, la operación a) del método implica separar el precipitado del líquido acidificado que va a formar la alimentación procedente de leche. Dicha separación puede implicar, por ejemplo, la centrifugación o filtración del líquido acidificado.

35 Otra solución al problema del precipitado es utilizar la alimentación con un pH en que la precipitación esté limitada o incluso ausente, por ejemplo, un pH en el intervalo de 5,0-6,5.

Por lo tanto, la alimentación procedente de leche puede tener un pH en el intervalo de 5,0-6,5 y preferiblemente en el intervalo de 5,0-6,0.

40 Cuando se lleva a cabo el intercambio aniónico en este intervalo de pHs se sugiere además utilizar una temperatura de alimentación/proceso superior a 15 °C, tal como 20-40 °C. En este intervalo de temperaturas la beta-caseína disuelta forma pequeñas micelas de beta-caseína, que no se han de confundir con las micelas de caseína nativas de la leche, y parece que estas micelas de beta-caseína interfieren menos en el proceso de intercambio aniónico que las moléculas de beta-caseína individuales.

Por lo tanto, la temperatura de la alimentación procedente de leche y del material de intercambio aniónico durante la operación b) puede estar en el intervalo de 15-40 °C y preferiblemente en el intervalo de 20-38 °C.

45 La alimentación procedente de leche puede comprender, por ejemplo, una cantidad total de alfa-caseína libre y beta-caseína libre de al menos 0,5% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad total de alfa-caseína libre y beta-caseína libre de al menos 2% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. La alimentación procedente de leche puede comprender, por ejemplo, una cantidad total de alfa-caseína libre y beta-caseína libre de al menos 10% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

55 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende una cantidad total de alfa-caseína libre y beta-caseína libre en el intervalo de 0,5-40% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad total de alfa-caseína libre y beta-caseína libre en el intervalo de 2-20% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. La alimentación procedente de leche puede

comprender, por ejemplo, una cantidad total de alfa-caseína libre y beta-caseína libre en el intervalo de 5-15% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

5 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende alfa-lactalbúmina en una cantidad de al menos 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender alfa-lactalbúmina en una cantidad de al menos 10% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche, preferiblemente de al menos 20% (peso/peso) y aún más preferiblemente de al menos 30% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

10 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende alfa-lactalbúmina en una cantidad en el intervalo de 1-50% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender alfa-lactalbúmina en una cantidad en el intervalo de 5-40% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche, preferiblemente en el intervalo de 10-35% (peso/peso) y aún más preferiblemente en el intervalo de 12-30% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

15 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos 15% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche, preferiblemente de al menos 30% (peso/peso) y aún más preferiblemente de al menos 40% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

20 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende beta-lactoglobulina en una cantidad en el intervalo de 1-70% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender beta-lactoglobulina en una cantidad en el intervalo de 10-65% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche, preferiblemente en el intervalo de 20-60% (peso/peso) y aún más preferiblemente en el intervalo de 35-55% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

25 Se sabe que las caseínas precipitan en valores de pH de, o por debajo de, aproximadamente 4,6. Por lo tanto, en algunas realizaciones de la invención se prefiere que la alimentación procedente de leche que tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 3,6 – 4,6 tenga una concentración relativamente pequeña de caseína, tal como a lo sumo 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

30 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche comprende a lo sumo 0,1% de caseína (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche. Incluso se puede preferir que la alimentación procedente de leche comprenda a lo sumo 0,01% de caseína (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.

35 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche comprende una cantidad total de proteína en el intervalo de 6-250 g/l de alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad total de proteína en el intervalo de 50-150 g/l de alimentación procedente de leche. Incluso se puede preferir que la alimentación procedente de leche comprenda una cantidad total de proteína en el intervalo de 75-125 g/l de alimentación procedente de leche.

40 Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad total de proteína en el intervalo de 50-250 g/l de alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad total de proteína en el intervalo de 50-150 g/l de alimentación procedente de leche. Incluso se puede preferir que la alimentación procedente de leche comprenda una cantidad total de proteína en el intervalo de 75-150 g/l de alimentación procedente de leche.

45 También se puede preferir que la alimentación procedente de leche pueda comprender una cantidad total de proteína en el intervalo de 75-250 g/l de alimentación procedente de leche.

50 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche comprende una cantidad total de proteína de al menos 6 g/l de alimentación procedente de leche. Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede comprender una cantidad total de proteína de al menos 50 g/l de alimentación procedente de leche. Incluso se puede preferir que la alimentación procedente de leche comprenda una cantidad total de proteína de al menos 75 g/l de alimentación procedente de leche.

55 En algunas realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche tiene un pH en el intervalo de 3,8-6,0 a 25 °C. Preferiblemente, el pH de la alimentación procedente de leche a 25 °C está en el intervalo de 4,0-5,5. Aún más preferiblemente, el pH de la alimentación procedente de leche a 25 °C está en el intervalo de 4,2-5,0, tal como, por ejemplo, en el intervalo de 4,3-4,5.

La conductancia específica deseada de la alimentación procedente de leche se puede obtener, por ejemplo:



– concentrando la alimentación procedente de leche mediante la eliminación parcial de agua y/o la adición de sal(es), lo que da lugar a una conductancia específica aumentada, o

– desalando la alimentación procedente de leche mediante la eliminación de sal(es) y/o la adición de agua, lo que da lugar a una conductancia específica reducida.

5 Las técnicas para eliminar agua y/o sal(es) de un líquido acuoso son bien conocidas por la persona experta en este campo técnico.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche tiene una conductancia específica en el intervalo de 0,45-0,9 S/m (4,5-9,0 mS/cm) a 25 °C. Por ejemplo, la conductancia específica de la alimentación procedente de leche puede estar en el intervalo de 0,5-0,8 S/m (5,0-8,0 mS/cm) a 25 °C. En algunas realizaciones preferidas de la invención puede ser aún más preferible que la conductancia específica de la alimentación procedente de leche esté en el intervalo de 0,55-0,7 S/m (5,5-7,0 mS/cm) a 25 °C.

10 La alimentación procedente de leche puede tener, por ejemplo, una conductancia específica en el intervalo de 0,4-0,7 S/m (4-7 mS/cm) a 25 °C. Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede tener una conductancia específica en el intervalo de 0,7-1,0 S/m (7-10 mS/cm) a 25 °C. Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede tener una conductancia específica en el intervalo de 0,5-0,8 S/m (5-8 mS/cm) a 25 °C.

En algunas realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche tiene una conductancia específica en el intervalo de 0,4-0,7 S/m (4-7 mS/cm) a 25 °C y un pH en el intervalo de 3,6-5,0 a 25 °C.

En otras realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche tiene una conductancia específica en el intervalo de 0,7-1,0 S/m (7-10 mS/cm) a 25 °C y un pH en el intervalo de 5,0-6,5 a 25 °C.

20 En otras realizaciones preferidas de la invención, la alimentación procedente de leche tiene una conductancia específica en el intervalo de 0,5-0,8 S/m (5-8 mS/cm) a 25 °C y un pH en el intervalo de 4,0-5,5 a 25 °C.

Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede tener una conductancia específica en el intervalo de 0,5-0,6 S/m (5-6 mS/cm) a 25 °C y un pH en el intervalo de 4,2-5,0 a 25 °C.

25 En algunas realizaciones de la invención, la alimentación procedente de leche tiene un pH en el intervalo de 3,6 a 6,5 y

- si el pH está en el intervalo de 3,6-5,0, la conductancia específica es

al menos 0,4 S/m (4 mS/cm) y

a lo sumo  $\text{cond}_{\text{max}} = 0,138 \text{ S/m (1,38 mS/cm)} \cdot \text{pH} + 0,103 \text{ S/m (1,03 mS/cm)}$ , y

- si el pH está en el intervalo de 5-6,5, la conductancia específica es

30 al menos  $\text{cond}_{\text{min}} = 0,133 \text{ S/m (1,33 mS/cm)} \cdot \text{pH} - 0,267 \text{ S/m (2,67 mS/cm)}$  y

a lo sumo  $\text{cond}_{\text{max}} = 0,138 \text{ S/m (1,38 mS/cm)} \cdot \text{pH} + 0,103 \text{ S/m (1,03 mS/cm)}$ .

De este modo, si el pH de una alimentación de estas realizaciones es, por ejemplo, 6,0, la conductancia específica es

al menos  $\text{cond}_{\text{min}} = 0,133 \text{ S/m (1,33 mS/cm)} \cdot 6,0 - 0,267 \text{ S/m (2,67 mS/cm)} = 0,53 \text{ S/m (5,3 mS/cm)}$  y

35 a lo sumo  $\text{cond}_{\text{max}} = 0,138 \text{ S/m (1,38 mS/cm)} \cdot 6,0 + 0,103 \text{ S/m (1,03 mS/cm)} = 0,93 \text{ S/m (9,3 mS/cm)}$ .

Por ejemplo, la alimentación procedente de leche puede tener un pH en el intervalo de 3,6 a 5,0 y una conductancia específica de

al menos 0,4 S/m (4 mS/cm) y

a lo sumo  $\text{cond}_{\text{max}} = 0,138 \text{ S/m (1,38 mS/cm)} \cdot \text{pH} + 0,103 \text{ S/m (1,03 mS/cm)}$ .

40 Alternativamente, la alimentación procedente de leche puede tener un pH en el intervalo de 5,0 a 6,5 y una conductancia específica de

al menos  $\text{cond}_{\text{min}} = 0,133 \text{ S/m (1,33 mS/cm)} \cdot \text{pH} - 0,267 \text{ S/m (2,67 mS/cm)}$  y

a lo sumo  $\text{cond}_{\text{max}} = 0,138 \text{ S/m (1,38 mS/cm)} \cdot \text{pH} + 0,103 \text{ S/m (1,03 mS/cm)}$ .

45 Las conductividades específicas y los valores de pH se miden en alimentaciones que tienen una temperatura de 25 °C a menos que se afirme otra cosa.

En algunas realizaciones de la invención el medio de intercambio aniónico comprende una fase sólida y uno o más grupos catiónicos.

Preferiblemente, al menos algunos de los grupos catiónicos están fijados a la superficie de la fase sólida y/o a la superficie de poros que son accesibles a través de la superficie de la fase sólida.

- 5 En algunas realizaciones de la invención la fase sólida del medio de intercambio aniónico comprende uno o más componentes seleccionados del grupo que consiste en una pluralidad de partículas, un filtro y una membrana.

Por ejemplo, la fase sólida puede comprender, o incluso consiste esencialmente en, un polisacárido. Se prefieren particularmente los polisacáridos reticulados. Son ejemplos de polisacáridos útiles: celulosa, agarosa y/o dextrano.

- 10 Alternativamente, la fase sólida puede comprender, o incluso consiste esencialmente en, un polímero no carbohidrato. Son ejemplos de polímeros no carbohidratos útiles: metacrilato, poliestireno y/o estireno-divinilbenceno.

- 15 En algunas realizaciones preferidas de la invención los grupos catiónicos comprenden, o incluso consisten esencialmente en, grupos amino. Los grupos amino terciario son particularmente preferidos y dan lugar a grupos amonio cuaternario bajo condiciones de pH apropiadas. Los grupos amonio cuaternario proporcionan unas características de intercambio aniónico fuerte al medio de intercambio aniónico.

Alternativa o adicionalmente, los grupos catiónicos pueden comprender uno o más grupos amino primario o secundario. Una cantidad sustancial de grupos amino primario o secundario proporciona típicamente unas características de intercambio aniónico débil al medio de intercambio aniónico.

- 20 La carga óptima de proteína por ciclo depende del diseño del sistema para cromatografía de intercambio aniónico y de las características del medio de intercambio aniónico.

Las condiciones de procesamiento durante la cromatografía de intercambio aniónico, incluyendo la presión, el caudal, etc., dependen de la implementación real del proceso, el equipo empleado y el medio de intercambio aniónico utilizado.

- 25 Típicamente, la temperatura de la alimentación procedente de leche durante la operación b) es suficientemente baja para evitar el crecimiento microbiano y un daño térmico a la proteína y al medio de intercambio aniónico pero suficientemente elevada para proporcionar una viscosidad aceptable.

En algunas realizaciones de la invención la temperatura de la alimentación procedente de leche durante la operación b) está en el intervalo de 2-40 °C. Preferiblemente, la temperatura de la alimentación procedente de leche durante la operación b) está en el intervalo de 4-20 °C, e incluso más preferiblemente en el intervalo de 6-12 °C.

- 30 En *Scopes* se pueden hallar más detalles relativos a la cromatografía de intercambio aniónico y su implementación industrial.

- 35 En algunas realizaciones preferidas de la invención el método de la invención comprende una operación c) de lavado del medio de intercambio aniónico con una disolución de lavado después de que el medio haya estado en contacto con la alimentación procedente de leche. Las disoluciones de lavado útiles son típicamente disoluciones acuosas de pH neutro o débilmente ácidas capaces de separar las moléculas débilmente unidas del medio de intercambio aniónico. Uno puede emplear, por ejemplo, agua desmineralizada o una disolución acuosa de cloruro sódico y pH neutro, por ejemplo, NaCl 0,1 M, como líquido de lavado.

En otras realizaciones preferidas de la invención, el método de la presente invención no contiene la operación c).

- 40 La operación d) de la presente invención implica recuperar la osteopontina unida al medio de intercambio aniónico. La recuperación se lleva típicamente a cabo poniendo el medio de intercambio aniónico en contacto con un eluyente y recogiendo el eluato resultante, es decir, el eluyente más las moléculas liberadas del medio de intercambio aniónico.

- 45 Normalmente, el eluyente es una disolución acuosa que tiene una fuerza iónica y/o un pH suficientes para liberar del medio de intercambio aniónico la osteopontina unida. Son ejemplos de eluyentes útiles las disoluciones acuosas 1,0 M, de pH neutro, de una sal tal como NaCl, CaCl<sub>2</sub>, KCl, MgCl<sub>2</sub> o una combinación de las mismas.

La composición recuperada puede ser sometida a operaciones de procesamiento adicionales para, por ejemplo, desmineralizar y concentrar la composición y transformarla posteriormente en un polvo.

- 50 De esta manera, en algunas realizaciones preferidas de la invención, la composición recuperada es además sometida a una o más de las operaciones de procesamiento seleccionadas del grupo que consiste en concentración, diafiltración, evaporación de disolvente, secado por pulverización, y sustitución de cationes unidos a proteína.

Por ejemplo, la composición recuperada puede ser sometida a una operación de concentración.

Alternativamente o además, la composición recuperada puede ser sometida a una operación de diafiltración.

Alternativamente o además, la composición recuperada puede ser sometida a una operación de evaporación.

Alternativamente o además, la composición recuperada puede ser sometida a una operación de secado por pulverización.

5 En una realización preferida de la invención, la composición recuperada es sometida a las operaciones siguientes:

i) concentración, por ejemplo, por ultrafiltración;

ii) diafiltración, por ejemplo, frente a agua;

iii) opcionalmente, otra operación de concentración, por ejemplo, por evaporación;

10 iv) sustitución de cationes poniendo la composición acuosa de la operación ii) o iii) en contacto con una sal de calcio soluble en agua, por ejemplo,  $\text{CaCl}_2$ ;

v) pasteurización; y

vi) secado por pulverización para convertir la composición pasteurizada en un polvo.

15 El método presente puede ser implementado como un proceso discontinuo o como un proceso semidiscontinuo. Por ejemplo, el proceso semidiscontinuo puede ser implementado poniendo en funcionamiento unas columnas de intercambio aniónico primera y segunda y llevando a cabo la operación b) sobre la primera columna de intercambio aniónico, mientras que las operaciones c) y/o d) se llevan a cabo sobre la segunda columna de intercambio aniónico, y viceversa.

De esta manera, en algunas realizaciones preferidas de la invención, el método para aislar osteopontina de una alimentación procedente de leche comprende las operaciones de:

20 a) obtener una alimentación procedente de leche que comprende osteopontina, alimentación procedente de leche que es un concentrado proteico de lactosuero dulce, alimentación procedente de leche que tiene un pH en el intervalo de 3,6-6,5 a 25 °C y una conductancia específica en el intervalo de 0,4-1,0 S/m (4-10 mS/cm) a 25 °C, y en donde dicha alimentación procedente de leche comprende además caseinomacropéptido en una cantidad de al menos 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche,

25 b) someter dicha alimentación procedente de leche a cromatografía de intercambio aniónico, que incluye poner la alimentación procedente de leche en contacto con un medio de intercambio aniónico;

c) opcionalmente, lavar el medio de intercambio aniónico; y

30 d) recuperar la proteína unida al medio de intercambio aniónico, obteniéndose de este modo una composición que comprende osteopontina aislada.

En otras realizaciones preferidas de la invención, el método para aislar osteopontina de una alimentación procedente de leche comprende las operaciones de:

35 a) obtener una alimentación procedente de leche que comprende osteopontina, alimentación de leche que es un concentrado proteico de suero de leche, alimentación procedente de leche que tiene un pH en el intervalo de 3,6-6,5 a 25 °C y una conductancia específica en el intervalo de 0,4-1,0 S/m (4-10 mS/cm) a 25 °C, y en donde dicha alimentación procedente de leche comprende además caseinomacropéptido en una cantidad de al menos 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche y alfa-caseína libre y beta-caseína libre;

40 b) someter dicha alimentación procedente de leche a cromatografía de intercambio aniónico, que incluye poner la alimentación procedente de leche en contacto con un medio de intercambio aniónico;

c) opcionalmente, lavar el medio de intercambio aniónico; y

d) recuperar la proteína unida al medio de intercambio aniónico, obteniéndose de este modo una composición que comprende osteopontina aislada.

### Ejemplos

45 Ejemplo 1. Enriquecimiento en osteopontina de un concentrado de lactosuero dulce de conductancia controlada

Protocolo

Los siguientes experimentos de purificación se llevaron a cabo mediante un equipo de cromatografía rápida para proteínas en fase líquida (FPLC; del inglés, *fast protein liquid chromatography*) provisto de la resina Q-Sepharose Bigbeads para intercambio aniónico fuerte, empaquetada en una columna de 13,3 ml (170 mm x 10 mm). En todos los experimentos se mantuvo el caudal a 3,33 ml/min durante toda la carga, el lavado y la elución. La materia prima era un producto de aislamiento de proteína de lactosuero dulce, y se cargaron 70 g de proteína total en la columna durante cada experimento. Se analizó el contenido de CMP en la materia prima. Se diluyeron muestras de la materia prima hasta una concentración final de proteína de 10% (peso/volumen) y a continuación se ajustaron el pH (pH de 3,0 – 5,7 a 4,7 mS/cm) y la conductancia específica (2,3 – 10,3 mS/cm en un pH de 4,3) mediante la adición de HCl y NaCl, respectivamente. Las proteínas no unidas fueron separadas de la columna mediante lavado con 3 volúmenes de lecho de una disolución 100 mM de NaCl, pH de 5,0. Posteriormente, las proteínas unidas fueron eluidas mediante el paso de una disolución 1 M de NaCl, pH de 5,0, a través de la columna hasta que no se detectó más proteína en el eluato.

Para cada muestra de eluato se analizaron los contenidos de osteopontina (OPN), CMP y proteína total utilizando las técnicas siguientes.

#### 15 Determinación de proteína total

El contenido de proteína total del eluato se midió mediante una digestión estándar por el método Kjeldahl del modo descrito en *Cohen*.

Cuantificación de OPN mediante un método de HPLC

20 Principio analítico: La muestra se filtró a través de un filtro de 0,22  $\mu\text{m}$  y se sometió a HPLC con una columna MonoQ HR 5/5 (1 ml) de Pharmacia y detección a 280 nm. Se calculó la concentración de la muestra mediante el método del patrón externo (comparación con el área del pico de un patrón con un contenido de OPN conocido). Un requisito previo para este procedimiento analítico es que las muestras comprendan OPN relativamente pura según se determina, por ejemplo, mediante SDS-PAGE (Laemmli, 1970), a causa de la baja especificidad del método.

Reactivos: patrón de OPN, agua Milli Q de calidad HPLC, NaCl (Merck), Tris HCl (Sigma).

25 Tampón A: NaCl 10 mM, Tris HCl 20 mM, pH de 8,0.

Tampón B: NaCl 0,8 M, Tris HCl 20 mM, pH de 8,0.

Se construyó una curva de calibración patrón a partir de 5 patrones en el intervalo de concentraciones de 1-10 mg/ml de patrón de OPN en tampón A. Todos los patrones se filtraron a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de ser cargados en la columna.

30 Muestreo y pretratamiento: Las muestras para el análisis se diluyeron con agua Milli Q de calidad HPLC si estaban fuera del intervalo de la curva de calibración patrón. En algunos casos también fue necesaria una dilución para permitir la unión de la OPN a la resina de intercambio aniónico si estaba presente gran cantidad de NaCl del eluyente. Para el análisis se inyectó una cantidad equivalente a 25  $\mu\text{l}$  de OPN en concentración de 1-10 mg/ml. Las muestras se filtraron a través de filtros de 0,22  $\mu\text{m}$  antes de ser inyectadas en el sistema de HPLC.

35 Condiciones de la HPLC: Caudal de 1 ml/min; volumen de inyección de 25  $\mu\text{l}$ ; gradiente: B al 0% 0-3 min, B al 0-60% 3-17 min, B al 60-100% 17-30 min, B al 100% 30-33 min, B al 100-0% 33-34 min, B al 0% 34-40 min.

Cálculo y expresión de los resultados: La concentración de OPN en cada muestra se calculó por referencia a la curva patrón y observando las diluciones empleadas.

40 Se calculó la pureza mediante la proporción entre OPN y proteína total utilizando el factor de Jones específico para OPN de 7,17 ya que la mayor parte o toda la proteína determinada mediante la digestión por el método Kjeldahl era OPN en el contexto real.

Cuantificación de las proteínas principales del lactosuero por HPLC

Separación y cuantificación de proteínas principales del lactosuero, alfa-lactalbúmina,  $\beta$ -lactoglobulina y CMP (caseino-glicomacropéptido), mediante cromatografía de permeación en gel.

45 La cromatografía de permeación en gel se llevó a cabo utilizando 2 columnas de TSKgel 3000PWxl (7,8 mm x 30 cm) conectadas en serie con una precolumna PWxl fijada (6 mm x 4 cm) (Tosohass, Japón).

La disolución de patrones para la calibración del sistema consistía en 225 mg de CMP, 225 mg de alfa-lactalbúmina y 50 mg de  $\beta$ -lactoglobulina, disueltos en 500,0 ml de tampón de fosfato 0,02 M, pH de 7,5.

50 Pretratamiento de las muestras: Se disolvieron muestras pulverulentas en tampón de fosfato en concentración de 1 mg/ml y se dejaron las disoluciones durante la noche para la solubilización. Alternativamente, se diluyeron muestras líquidas con tampón de fosfato para obtener un contenido de proteína de aproximadamente 0,1%. Si el contenido de

proteína era inferior a 0,1%, la muestra era sometida a medición sin diluir. Todas las muestras se filtraron a través de filtros de 0,22 µm antes de ser inyectadas en la columna.

Cálculo y expresión de los resultados: El porcentaje de proteína individual en la muestra se calculó de acuerdo con  $A \times 0,1 \times F$ , en donde

5

B

A = área medida en la muestra

0,1 = factor de conversión para una disolución al 0,1%

F = factor de dilución (100.000/peso de muestra en miligramos)

B = área calculada de proteína individual en la disolución de patrón al 0,1%

10 Resultados

Contenido de CMP

El contenido de CMP en la materia prima de lactosuero dulce fue 20,1%, pero el CMP resultó sorprendentemente indetectable en las composiciones enriquecidas en OPN del Ejemplo 1.

15

Efecto del pH de la alimentación sobre la pureza y la producción de osteopontina: La primera serie de experimentos con variación del valor del pH de la alimentación aplicada, mostrada en la Figura 1, muestra que la producción de OPN (miligramos de OPN en 70 g de proteína total en la alimentación) aumenta conforme aumenta el pH de 3 a aproximadamente 4,3. La elevada producción se mantiene cuando se aumenta el pH más allá de 4,3. La pureza de la OPN en las preparaciones de OPN obtenidas es muy alta en valores bajos de pH pero, cuando se aumenta el pH por encima de aproximadamente 4,5, la pureza decae lentamente pero aún es aceptable hasta un pH de aproximadamente 6,5. Sin embargo, la mejor producción de OPN de elevada pureza se obtiene en la ventana de pHs de 3,8-5,5, y particularmente en el intervalo de pHs de 4,3-4,5.

20

25

Efecto de la conductancia específica de la alimentación sobre la pureza y la producción de osteopontina: En la Figura 2 se muestran los resultados de la serie de experimentos con conductancia específica variable. A baja conductancia específica la producción es elevada mientras que la pureza es baja. Al aumentar la conductancia específica aumenta la pureza, que alcanza el 100% con una conductancia de aproximadamente 5,5 mS/cm. Cuando se aumenta más la conductancia específica la pureza permanece elevada, mientras que la producción de OPN comienza a decaer cuando la conductancia específica excede de aproximadamente 10 mS/cm. Sin embargo, parece que la mejor producción de OPN de elevada pureza se obtiene en el intervalo de conductancias específicas de 4,5-9,0 mS/cm, y particularmente en el intervalo de 5-8 mS/cm.

30

Discusión/conclusión

35

Efecto del pH: En la Figura 1 se ve que, en un valor de pH por debajo de aproximadamente 3,6, disminuye la carga de la OPN y, por lo tanto, disminuye su unión a los grupos catiónicos de la resina. En valores de pH por encima de aproximadamente 4,5 la pureza de la OPN comienza a disminuir ya que otras proteínas de la alimentación llegan a cargarse negativamente y comienzan a unirse a la resina. De este modo, hemos identificado una ventana de valores de pH óptimos en el intervalo de 3,6-6,5 para aislar OPN de elevada pureza y con alta producción aun cuando la alimentación contenga una gran cantidad de CMP. En la preparación de OPN resultante el CMP no es detectable.

40

Efecto de la conductancia específica: En la Figura 2 se ve que, en una conductancia específica por debajo de aproximadamente 4 mS/cm, disminuye la pureza de la OPN ya que otras proteínas pueden unirse a la resina. En conductancias específicas por encima de aproximadamente 6 mS/cm, la unión de la OPN a la resina se vuelve más débil y la producción disminuye lentamente, aunque ésta es aceptable hasta una conductancia específica de aproximadamente 10 mS/cm. De esta manera, hemos identificado un estrecho intervalo de aproximadamente 4-10 mS/cm que es óptimo para la producción de OPN. En este estrecho intervalo se puede aislar OPN con elevada producción y elevada pureza incluso a partir de una materia prima que contenga CMP en una concentración de aproximadamente 20%.

45

Se han llevado a cabo diversos experimentos adicionales explorando la ventana reivindicada de pH/conductancia específica en alimentaciones basadas en lactosuero dulce, y los experimentos adicionales confirman las conclusiones anteriormente mencionadas.

Ejemplo 2. Enriquecimiento en osteopontina de un concentrado de lactosuero agrio de conductancia controlada

50

El siguiente experimento de purificación se llevó a cabo con un equipo para FPLC similar al del Ejemplo 1. Sin embargo, la materia prima era un concentrado de lactosuero agrio que tenía un contenido de proteína total de 10% (peso/peso), y se cargaron aproximadamente 70 g de proteína total en la columna.

El lactosuero agrio concentrado se diluyó en diferentes grados para dar lugar a conductividades específicas en el intervalo de 2,5 a 10 mS/cm. Se midieron la OPN y la proteína total en la alimentación y el eluato mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1. Se ajustó el pH a 4,3 mediante la adición de HCl y se aplicó la materia prima a la columna de intercambio aniónico. Las proteínas no unidas fueron separadas de la columna mediante lavado con 3 volúmenes de lecho de una disolución 0,1 M de NaCl, y las proteínas unidas fueron posteriormente eluidas mediante el paso de una disolución 1 M de NaCl a través de la columna hasta que no se detectó más proteína en el eluato.

En la Figura 3 se muestra la influencia de la conductancia específica sobre la pureza y la producción de OPN durante el enriquecimiento en OPN de un lactosuero agrio concentrado.

Los datos de la Figura 3 muestran un enriquecimiento del lactosuero agrio en OPN mediante el procedimiento descrito. Como en el Ejemplo 1, donde se empleó lactosuero dulce como materia prima, se observa de nuevo que una baja conductancia específica en la alimentación aumenta la producción a costa de la pureza del producto. Sin embargo, puesto que las alimentaciones procedentes de lactosuero agrio no contienen grandes cantidades de CMP, el efecto no es tan perjudicial para el enriquecimiento en OPN como en el caso en que la alimentación procede de lactosuero dulce. La alimentación procedente de lactosuero agrio contiene componentes menores cuya unión puede ser minimizada mediante los mismos ajustes paramétricos que los empleados para evitar la unión de CMP. De esta manera, se puede observar que el estrecho intervalo óptimo para aislamiento de OPN identificado en el Ejemplo 1 se aplica también al aislamiento de OPN a partir de lactosuero agrio.

Hemos llevado a cabo diversos experimentos adicionales explorando la ventana reivindicada de pH/conductancia específica en alimentaciones basadas en lactosuero agrio, y los experimentos adicionales confirman los hallazgos anteriormente mencionados.

Ejemplo 3. Enriquecimiento en osteopontina de un concentrado de suero de leche de conductancia controlada

De acuerdo con los ejemplos previos, se puede utilizar suero de leche como materia prima para la producción de OPN mediante el método descrito. Se produjo suero de leche por microfiltración (tamaño de los poros del filtro de aproximadamente 0,1  $\mu\text{m}$ ) de leche desnatada a 24 grados para separar la caseína micelar. A continuación se ajustó el pH de muestras de suero de leche a 4,3 o 4,7 mediante HCl y se sometieron las muestras a diafiltración para obtener conductancias específicas en el intervalo de 4-10 mS/cm y un contenido de proteína total de aproximadamente 5% o 10% (peso/peso). Posteriormente, las muestras de suero de leche modificadas fueron enriquecidas en OPN por intercambio aniónico a aproximadamente 5 °C del modo descrito en el Ejemplo 1.

Resultados y observaciones

Las pruebas realizadas demostraron que también se pueden utilizar alimentaciones procedentes de suero de leche en el presente proceso.

Sorprendentemente, durante el proceso se observó una precipitación no identificada que daba lugar a la obstrucción o contaminación del material de intercambio aniónico después de algunos ciclos de intercambio aniónico. El problema de precipitación se resolvió filtrando el suero de leche acidificado a través de papel de filtro antes del intercambio aniónico. Hemos visto indicios de que el precipitado está relacionado con especies de caseína disueltas, tales como alfa-caseína libre y beta-caseína libre, que permanecen en el suero de leche cuando se separan las micelas de caseína nativas.

Discusión/conclusión

Se produce suero de leche por microfiltración de leche desnatada con objeto de separar caseínas, mientras que los lactosueros dulce y agrio están desprovistos de caseína por precipitación de las caseínas por la acción del cuajo o el ácido, respectivamente. De esta manera, las tres categorías de alimentaciones procedentes de leche están esencialmente exentas de caseína micelar, que interferiría en los procedimientos cromatográficos de intercambio aniónico a causa de la precipitación y floculación de caseínas.

Hemos visto indicios de que las caseínas disueltas causan problemas durante el intercambio aniónico. Este problema puede ser resuelto filtrando las alimentaciones procedentes de leche antes del intercambio aniónico usando, por ejemplo, un microfiltro.

Alternativamente, la operación de intercambio aniónico puede ser llevada a cabo en un pH en que la precipitación esté limitada o incluso ausente, por ejemplo, en un pH en el intervalo de 5,0-6,5. Cuando se lleva a cabo el intercambio aniónico en este intervalo de pHs se sugiere además emplear una temperatura de alimentación/proceso superior a 15 °C, tal como 20-40 °C. En este intervalo de temperaturas, la beta-caseína disuelta forma pequeñas micelas de beta-caseína, que no hay que confundir con las micelas de caseína nativas, y estas micelas de beta-caseína interfieren menos en el proceso de intercambio aniónico que las moléculas de beta-caseína individuales.

Ejemplo 4. Enriquecimiento en osteopontina de un concentrado de lactosuero dulce sin conductancia controlada

El siguiente experimento de purificación se llevó a cabo con un equipo para FPLC similar al del Ejemplo 1. La

5 materia prima era un producto de aislamiento de lactosuero dulce y se cargó aproximadamente 1 g de proteína total en la columna. Antes de su carga en la columna, el lactosuero dulce fue concentrado por ultrafiltración, sometido a diafiltración después de la adición de un volumen igual de agua y finalmente diluido de nuevo con un volumen igual de agua. La conductancia específica resultante era 2,1 mS/cm. Se midieron el CMP y la proteína total en la alimentación y el eluato mediante los métodos descritos en el Ejemplo 1. No se pudo medir la cantidad de OPN en la alimentación ni en el eluato a causa de proteínas que interfirieron. Los datos de OPN de la Tabla 1 se estiman a partir de producciones conocidas en experimentos del Ejemplo 1.

10 Se ajustó el pH a 4,3 mediante la adición de HCl y se aplicó la materia prima a la columna de intercambio aniónico. Las proteínas no unidas fueron separadas de la columna mediante lavado con 3 volúmenes de lecho de agua, y las proteínas unidas fueron posteriormente eluidas mediante el paso de una disolución 1 M de NaCl a través de la columna hasta que no se detectó más proteína en el eluato.

Tabla 1. Resultados del intercambio aniónico de un lactosuero dulce de baja conductancia

	Materia prima	Eluato
Proteína total, mg	979	192
OPN, mg	2,9	2,8
Pureza de la OPN, %	0,3	1,5
GMP, mg	193	186
Pureza del GMP, %	19,7	97

15 Discusión/conclusión: Los datos de la Tabla 1 muestran un enriquecimiento en proteínas de lactosuero agrio mediante el procedimiento descrito. Sin embargo, el enriquecimiento en OPN es sólo en menor grado porque la OPN constituye una fracción menor de las proteínas de lactosuero agrio en la alimentación. Puesto que, por ejemplo, el CMP se une también a la resina y está presente en la alimentación en elevada concentración, esta proteína acapara una gran cantidad de la capacidad ligante de la resina. Por lo tanto, este procedimiento no es satisfactorio para la producción de OPN.

20 Ejemplo 5. Comparación y conclusión (comparando el Ejemplo 1 con el Ejemplo 4)

En la Tabla 2 siguiente se comparan algunas características de los procesos de los Ejemplos 1 y 4.

Tabla 2. Características de los Ejemplos 1 y 4

	Ejemplo 1	Ejemplo 4
pH	4,3	4,3
Conductancia específica, mS/cm	6,0	2,1
Carga de proteína por ml de resina, g/ml	5,26	0,074
OPN estimada de la proteína en la materia prima, %	0,3	0,3
Factor de enriquecimiento en OPN	333	5
Pureza de la OPN en el eluato, %	100	1,5

#### Conclusión

25 Como se resume en la Tabla 2, el método del Ejemplo 1 es mucho más específico para enriquecer en OPN que el método del Ejemplo 4. De este modo, se puede cargar mucha más proteína en la columna por ciclo y la producción de OPN por ciclo es mucho mayor con el método del Ejemplo 1. Este método da lugar a OPN prácticamente pura, mientras que predomina el CMP en el producto del Ejemplo 4.

**Referencias**

- Cohen* Julius B. Cohen, *Practical Organic Chemistry*, 1910
- 5 *Evans et al.* Evans et al. , "Comparison of composition, sensory, and volatile components of thirty-four percent whey protein and milk serum protein concentrates", J. Dairy Sci. 92: 4773-4791, 2009
- Scopes* Protein Purification: Principles and Practice; Robert K. Scopes; 3ª edición, Springer Verlag New York, Inc., ISBN 0-387-94072-3
- WO 02/28413 A1
- WO 01/149741 A2
- 10 WO 99/33415 A1



**REIVINDICACIONES**

1. Un método para aislar osteopontina a partir de una alimentación procedente de leche, método que comprende las operaciones de:
  - 5 a) obtener una alimentación procedente de leche que comprende osteopontina, alimentación procedente de leche que tiene un pH en el intervalo de 3,6-6,5 a 25 °C y una conductancia específica en el intervalo de 0,4-1,0 S/m (4-10 mS/cm) a 25 °C, y en donde dicha alimentación procedente de leche comprende además
    - caseinomacropéptido en una cantidad de al menos 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche,
  - 10 b) someter dicha alimentación procedente de leche a cromatografía de intercambio aniónico, que incluye poner la alimentación procedente de leche en contacto con un medio de intercambio aniónico,
  - c) opcionalmente, lavar el medio de intercambio aniónico, y
  - d) recuperar la proteína unida al medio de intercambio aniónico, obteniéndose de este modo una composición que comprende osteopontina aislada.
- 15 2. El método según la Reivindicación 1, en donde la alimentación procedente de leche comprende caseinomacropéptido (CMP) en una cantidad en el intervalo de 1-40% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.
3. El método según la Reivindicación 1 o 2, en donde la alimentación procedente de leche comprende CMP en una cantidad de al menos 5% (peso/peso).
- 20 4. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alimentación procedente de leche comprende además proteína adicional que tiene un punto isoeléctrico (pI) < 5,0.
5. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alimentación procedente de leche comprende una alimentación procedente de suero de leche.
6. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alimentación procedente de leche comprende una alimentación procedente de lactosuero dulce.
- 25 7. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alimentación procedente de leche tiene un pH en el intervalo de 5,0-6,5.
8. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 1-6, en donde la alimentación procedente de leche tiene un pH en el intervalo de 3,8-5,5 a 25 °C.
- 30 9. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la operación a) de obtención de la alimentación procedente de leche implica separar el precipitado de un líquido acidificado que va a formar la alimentación procedente de leche.
10. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alimentación procedente de leche comprende alfa-lactalbúmina en una cantidad de al menos 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.
- 35 11. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alimentación procedente de leche comprende beta-lactoglobulina en una cantidad de al menos 1% (peso/peso) con respecto a la cantidad total de proteína de la alimentación procedente de leche.
12. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alimentación procedente de leche comprende una cantidad total de proteína en el intervalo de 6-250 g/l de alimentación procedente de leche.
- 40 13. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la alimentación procedente de leche tiene una conductancia específica en el intervalo de 0,45-0,90 S/m (4,5-9,0 mS/cm) a 25 °C.
14. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 1-12, en donde la alimentación procedente de leche tiene una conductancia específica en el intervalo de 0,4-0,7 S/m (4-7 mS/cm) a 25 °C.
- 45 15. El método según cualquiera de las Reivindicaciones 1-12, en donde la alimentación procedente de leche tiene una conductancia específica en el intervalo de 0,7-1,0 S/m (7-10 mS/cm) a 25 °C.

16. El método según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la composición recuperada es además sometida a una o más de las operaciones de procesamiento seleccionadas del grupo que consiste en concentración, diafiltración, evaporación de disolvente, secado por pulverización, y sustitución de cationes unidos a proteína.

5

Fig. 1

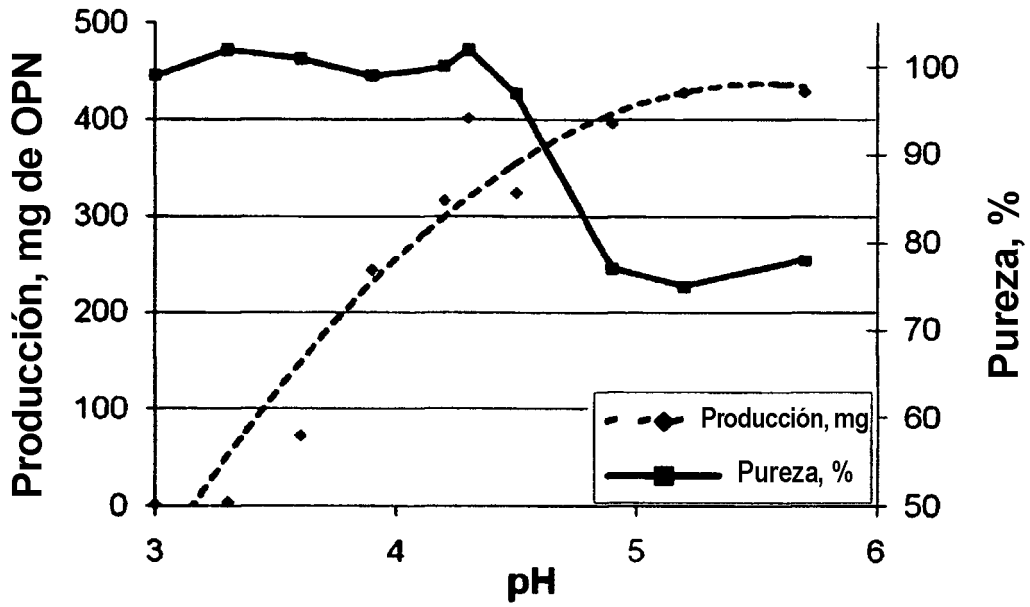


Fig. 2

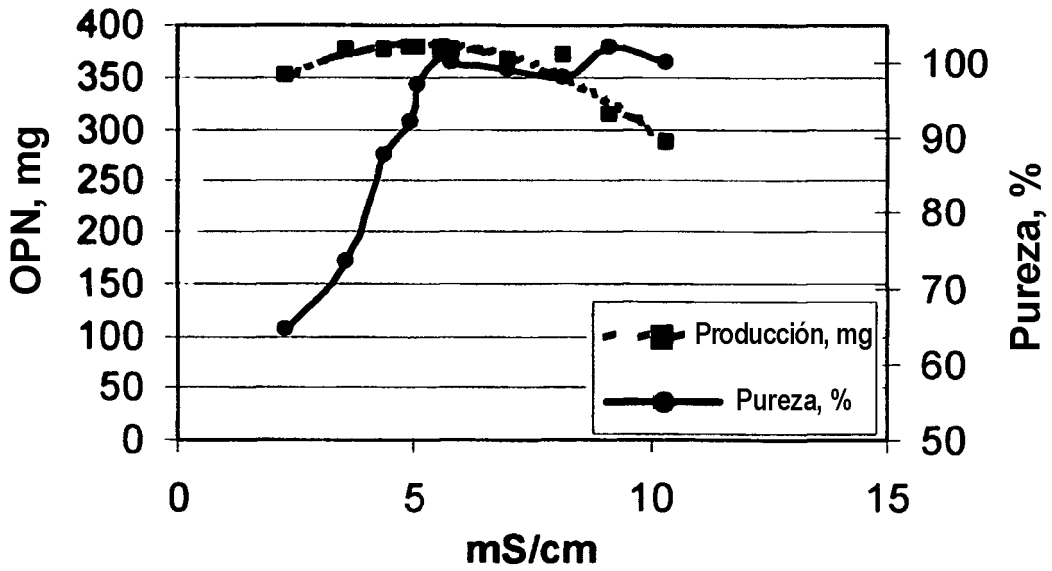


Fig. 3

