

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 983**

51 Int. Cl.:

C07K 16/04

(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.05.2009 PCT/NL2009/050248**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.11.2009 WO09139624**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2009 E 09746801 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2280999**

54 Título: **Proceso para producir fracciones de leche ricas en inmunoglobulinas secretoras**

30 Prioridad:

15.05.2008 EP 08156217

15.05.2008 US 53244 P

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

01.12.2017

73 Titular/es:

**BIOSYS HEALTH INC. (100.0%)
Winterbotham Place, Marlborough & Queen
Streets, P. O. Box N-3026
Nassau, BS**

72 Inventor/es:

**HENSGENS, CHARLES MARIA HUBERT y
DE GROOT, NANDA**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 644 983 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

Proceso para producir fracciones de leche ricas en inmunoglobulinas secretoras

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un proceso para la producción de composiciones que son ricas en IgA secretora (S-IgA) por fraccionamiento de leche que contiene S-IgA, tal como se define en las reivindicaciones. Dichas composiciones se pueden utilizar en particular para uno o más entre tratamiento y/o prevención de infecciones y/o inflamación de las superficies mucosas, p.ej., tracto gastrointestinal, tracto urogenital, tracto respiratorio, cavidad nasal o cavidad oral, tratamiento y/o prevención de obesidad y enfermedades relacionadas o tratamiento y/o prevención de alergias alimentarias en seres humanos o animales que necesitan dicho tratamiento, p.ej., a través de la incorporación de dichas composiciones en productos farmacéuticos, productos alimentarios o productos cosméticos. En particular, la invención se refiere a un proceso para producir dichas fracciones de leche que comprende las etapas de desgrasado, filtración y concentración, tal como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes de la invención

Los anticuerpos encuentran muchas aplicaciones en la ciencia y la medicina. Es bastante sencillo generar nuevos anticuerpos contra una diana. Para la mayoría de las aplicaciones, se producen anticuerpos a través de las llamadas líneas celulares del hibridoma que se derivan de la fusión de un anticuerpo que produce linfocitos B con una línea celular inmortalizada. Dichas células del hibridoma pueden cultivarse fácilmente y se puede cosechar el anticuerpo desde el sobrenadante de cultivo. Otro método para la producción de anticuerpos es la cosecha desde suero de animales inmunizados. La tecnología para la cría de animales de granja está muy extendida y los establos para animales de granja son relativamente baratos.

Lleva demostrándose ya algunas décadas que la producción de anticuerpos específicos de inmunógeno en productos de la secreción mamaria de animales de granja es viable. Inicialmente, se obtuvieron los mejores resultados del calostro, es decir, el primer fluido lácteo que produce la hembra tras el nacimiento de la cría. La leche producida por la hembra después de la fase calostrada se denomina en el presente documento leche madura. El calostro es un producto en gran medida único que se produce a partir de un estado fisiológico y funcional preciso de la glándula mamaria. En los rumiantes, la principal diferencia en la composición entre el calostro y la leche madura es el muy alto contenido de inmunoglobulinas calostrales, siendo entre un 80-90 % de las mismas de la clase IgG. Los niveles de anticuerpo en la leche madura son más bajos en principio (aproximadamente un orden de magnitud), que los que se pueden conseguir en el calostro (Hodgkinson et al., WO 98/54226; Hastings. patente estadounidense No. 5.017.372). Los anticuerpos específicos de antígeno derivados de la leche empleados en la mayoría de los estudios clínicos y preclínicos, por tanto, se derivaban en realidad de calostro y pertenecían predominantemente a la clase IgG (Tollemar et al., Bone Marrow Transpl. 23: 283-290 (1999); Bostwick et al., patente estadounidense No. 5.773.000; Cordle et al., patente estadounidense No. 5.260.057).

La inmunoglobulina A (IgA) es un anticuerpo que desempeña un papel crucial en la inmunidad mucosal. IgG se encuentra en las secreciones en una forma específica, que se denomina S-IgA, que comprende dímeros de monómeros de IgA, unidos a través de la llamada cadena J y comprende además el llamado componente secretor que tiene un peso molecular de aproximadamente 435 kDa. En su forma secretora, es la principal inmunoglobulina en las secreciones mucosas, que incluyen las lágrimas, la saliva, el calostro humano /la leche madura, los jugos gastrointestinales, el fluido vaginal y las secreciones de la próstata y el epitelio respiratorio. Como tales, se pueden encontrar en las áreas de la mucosa del tracto gastrointestinal, el tracto respiratorio, el tracto urogenital y las cavidades oral/nasal, y actúan para prevenir la colonización de patógenos. IgA secretora puede sobrevivir en entornos duros, tales como los tractos digestivo y respiratorio, para proporcionar protección contra microbios que se multiplican en secreciones corporales. Estas propiedades hacen que S-IgA sea la inmunoglobulina preferente para su aplicación en productos para mejorar y/o mantener la salud, sobre todo para el tratamiento y/o prevención de infecciones y/o inflamación de las superficies de la mucosa, como la mucosa gastrointestinal y la mucosa del tracto respiratorio, aunque también la piel. Entre los ejemplos de dichos productos se incluyen fórmulas entéricas, tales como fórmulas para lactantes, nutrición clínica, alimentos y nutracéuticos funcionales; preparaciones farmacéuticas, preparaciones cutáneas y preparaciones de aerosol. Por lo tanto, no es sorprendente que se haya dedicado un gran esfuerzo a producir mayores niveles de IgA (secretora) en leche de rumiante.

En la patente estadounidense US 6.974.573 se describe un proceso para hiperinmunizar un animal de granja contra un antígeno a través del paso por la mucosa o las vías respiratorias y, posteriormente, la administración del antígeno a través de la glándula mamaria o los nódulos linfáticos supramamarios. Se describe el uso de la leche así obtenida directamente o tras su tratamiento para purificar los anticuerpos (IgA) específicos de antígeno.

El fraccionamiento por filtración de composiciones complejas, como la leche, para producir fracciones ricas en inmunoglobulina se ha descrito anteriormente en la técnica, si bien la inmensa mayoría de las divulgaciones de la técnica en este sentido se refieren al aislamiento de IgG, algo que por otra parte no es sorprendente dado el hecho de que es la principal inmunoglobulina en los productos de secreción mamaria bovinos. En la patente

estadounidense 2004/0167320 se describe un proceso y un aparato para separar moléculas de interés de mezclas complejas aplicando métodos de filtración de flujo tangencial. Entre las moléculas de interés adecuadas, de acuerdo con la patente estadounidense US 2004/0167320, se incluyen inmunoglobulinas. Esta solicitud de patente estadounidense contiene un ejemplo de la purificación de IgG1 de leche en bruto por diafiltración, describiéndose las condiciones y los parámetros del proceso con gran detalle. Sin embargo, no se describe la separación de las inmunoglobulinas S-IgA de la leche, más grandes.

En la patente estadounidense US 2003/0059512 se describe un método y un aparato para la separación de leche y productos de la leche que implican una o más etapas de filtración de flujo cruzado. En particular, en la patente estadounidense US 2003/0059512 se sugiere la separación de leche desgrasada en una fracción retenida rica en caseína y una fracción permeada con empobrecimiento de caseína, fluyendo dicho material permeado a un posterior módulo de filtración de flujo cruzado adecuado para formar una fracción retenida enriquecida con macromoléculas como albúmina e inmunoglobulinas, que se puede volver a separar y purificar para formar albúmina e inmunoglobulinas utilizando, p.ej., cromatografía o filtración de flujo cruzado. La patente estadounidense 2003/0059512 no contiene ninguna información específica de ejemplos que se refieran a la preparación de IgA, y menos aún fracciones de leche enriquecida S-IgA.

En la patente estadounidense US 4.644.056 se describe un proceso para preparar una solución de inmunoglobulinas lácticas o de calostro por tratamiento de calostros o leche. De acuerdo con dicho documento, se acidifica el calostro a un pH de 4,9-5,5 y se somete a filtración de flujo cruzado en una unidad de filtración con un tamaño de poro medio de 0,1-1,2 μm , tras lo cual se separan los componentes de bajo peso molecular a través de otra filtración de flujo cruzado en otra unidad de filtración con un límite de separación de 5-80 kDa. En los ejemplos se describe la diafiltración del calostro acidificado utilizando dichas unidades de filtración, produciendo soluciones que contienen principalmente IgG, si bien se notifica también la presencia de IgA, S-IgA e IgM en la solución utilizando inmunoelectroforesis. No obstante, el proceso divulgado en la patente estadounidense US 4.644.056 no es suficiente en absoluto para preparar eficientemente fracciones ricas en S-IgA a partir de leche (no calostrada o madura) en buenos rendimientos.

En el documento WO 2006/119560 describe un proceso para el enriquecimiento de IgA por cromatografía de intercambio catiónico, modificando así la composición del producto de proteína del producto resultante, y la patente europea EP 0 479 597 se centra en un proceso para la fabricación de un extracto/concentrado de IgA desprovisto de virus durante el cual se separa la caseína por precipitación con ácido y se obtienen IgA por precipitación salina. Dado el hecho de que existe una gran diferencia en el peso molecular, así como en la forma entre IgA e IgG por un lado y S-IgA por la otra, la aplicación de los procesos de aislamiento de IgG de la técnica anterior para aislar S-IgA no está del todo clara y mucho menos en los casos en los que se requiere una operación eficaz y rendimientos suficientes, es decir, hacer que el método sea adecuado para su aplicación a una producción a escala industrial. Tal como se puede deducir de todo esto, la técnica anterior aún no ha satisfecho la necesidad de contar con un proceso que se puede utilizar para producir eficientemente fracciones de leche ricas en S-IgA (no calostrales). Un objetivo de la presente invención es el de proporcionar dicho proceso.

Sumario de la invención

Los autores de la presente invención han logrado desarrollar un proceso que satisface dicha necesidad. En pocas palabras, la presente invención, tal como se define en las reivindicaciones independientes y con más detalle en las reivindicaciones dependientes y en las realizaciones que entran dentro de la principal reivindicación que se expone más adelante, proporciona un proceso para la producción de fracciones de leche ricas en inmunoglobulina A secretora, utilizando una o más etapas de filtración de membrana microporosas. La fracción de leche concentrada obtenida de acuerdo con la presente invención como tal es adecuada para su incorporación en productos farmacéuticos, productos alimentarios o productos cosméticos, si bien se contemplan también otros procesos corriente abajo. Un protocolo preferente del proceso de la presente invención proporciona el desgrasado, la microfiltración y la concentración por ultrafiltración a través de una serie de ciclos de diafiltración. Los autores de la invención han observado que el proceso de la invención no requiere la acidificación de la leche antes de dichas operaciones. El proceso no requiere ningún tipo de operación que implique una alta temperatura perjudicial para las inmunoglobulinas.

Tal como se ilustra en detalle en los ejemplos más adelante, el proceso de la presente invención permite de manera sencilla producir hasta un 75 % o más, en particular hasta un 85 %, de S-IgA presente originalmente en la leche. Tal como comprenderán las personas especializadas, la presente invención, en aspectos preferentes, implica el tratamiento de la leche que tiene un alto contenido de S-IgA específico de antígeno, como por ejemplo la leche obtenida de acuerdo con el método de hiperimmunización mucosal de animales de granja que se ha descrito.

El proceso de la invención, aparte de los altos niveles que se pueden conseguir de manera inesperada, ofrece ventajas de particular interés con vistas a su capacidad de aplicación a gran escala y de aplicación en las fábricas de productos lácteos existentes, así como la capacidad de control de los parámetros del proceso que influyen en la calidad y estabilidad de S-IgA.

Descripción de las figuras:

Figura 1: diagrama de flujo de un proceso integral de producción de fracción de leche de IgG secretora (S-IgA) de acuerdo con una de las realizaciones de la invención, que comprende un aparato de desnatado de la leche (1), un primer tanque de retención (4), un módulo de microfiltración (6) un segundo tanque de retención (10), un módulo de ultrafiltración (11), un aparato de secado por pulverización (12) y una fuente de agua (8). En el diagrama de flujo (2) representa una corriente de permeado UF, (3) representa una corriente de material retenido MF, (7) representa la corriente de permeado MF y (9) representa la corriente de material retenido UF.

Figura 2A: el porcentaje acumulativo del total de S-IgA en el permeado de microfiltración en relación con el volumen total de permeado. La línea con ● representa el permeado, la línea con ■ representa el material retenido y la línea con ▲ representa el total de S-IgA el valor combinado de material permeado y retenido. Los porcentajes se expresan como la media de la línea ▲.

Figura 2B: el porcentaje acumulativo de S-IgA específica de toxina A de *C. difficile* en el permeado de microfiltración en relación con el volumen total de permeado. La línea con ● representa el permeado, la línea con ■ representa el material retenido y la línea con ▲ representa el total de S-IgA específica de toxina A de *C. difficile*, el valor combinado de material permeado y retenido. Los porcentajes se expresan como la media de la línea ▲.

Figura 2C: el porcentaje acumulativo de IgG específica de toxina A de *C. difficile* en el material permeado de microfiltración en relación con el volumen total de permeado. La línea con ● representa el permeado, la línea con ■ representa el material retenido y la línea con ▲ representa el total de IgG específica de toxina A de *C. difficile*, el valor combinado de material permeado y retenido. Los porcentajes se expresan como la media de la línea ▲.

Descripción detallada de la invención

Por tanto, en un primer aspecto, la presente invención proporciona un proceso para la producción de una fracción de leche enriquecida con IgA secretora (S-IgA) que comprende:

- reducir el contenido de grasa de un volumen de leche en bruto que tiene un pH por encima de 5,5 a un valor por debajo de 5,5 % en peso separando la grasa de la leche a una temperatura inferior a 55 °C;
- someter la leche con bajo contenido de grasa que tiene un pH por encima de 5,5 a microfiltración utilizando una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio dentro del intervalo de 0,1 – 0,45 µm, produciendo un material permeado que contiene S-IgA y un material retenido rico en caseína; y
- concentrar el material permeado de la microfiltración produciendo la fracción de leche enriquecida en S-IgA.

Tal como se utilizan en el presente documento, los términos “IgA secretora” o “S-IgA” se refieren a la inmunoglobulina dimérica que comprende dos monómeros IgA, tal como se encuentra en las secreciones mucosas, incluyendo las lágrimas, la saliva, el calostro y la leche madura, los jugos intestinales y las secreciones del epitelio respiratorio. Tal como se ha señalado anteriormente, este dímero de IgA también comprende la cadena J así el llamado componente secretorio, con el resultado de un peso molecular de aproximadamente 435 kDa.

La expresión “fracción de leche enriquecida en S-IgA” se refiere a los productos obtenidos a través del proceso de la invención que contienen S-IgA en cantidades relativas significativamente superiores a las de la leche en bruto sin tratar sobre la base del material en seco. En particular, el proceso tiene como objeto separar S-IgA de los constituyentes de leche a granel, tales como lípidos y caseínas. El proceso también tiene como resultado la eliminación de pequeñas sustancias orgánicas e inorgánicas de la leche, como puedan ser pequeñas proteínas de suero, mono- y disacáridos y sales. Por lo tanto, la fracción de leche enriquecida en S-IgA de acuerdo con la invención comprende normalmente una combinación de inmunoglobulinas (S-IgA, IgA, IgM e IgG) y otras proteínas de suero, trazas de mono- y disacáridos y otros componentes que se encuentran normalmente en el suero. El producto que rinde este proceso puede estar en forma líquida (concentrado), así como en forma sólida, tal como se explica más adelante.

En el presente documento y en las reivindicaciones, el verbo “comprender” y su conjugación se utilizan en su sentido no exhaustivo para significar que los términos que siguen a la palabra están incluidos sin excluir artículos que no se mencionan de manera específica. Por otra parte, la referencia a un elemento con un artículo indefinido “un” o “una” no excluye la posibilidad de que esté presente más de un elemento, a no ser que el contexto dicte que pueda haber uno y solo uno de los elementos. El artículo indefinido “un” o “una” significan por lo tanto “al menos uno”.

La expresión “leche en bruto” tal como se utiliza en el presente documento se refiere a leche tal como se obtiene directamente de un mamífero. La leche en bruto antes de ser procesada de acuerdo con la invención puede tratarse en un procesado de la leche convencional, p. ej., enfriado o refrigeración, para su almacenamiento o similar. Dicho tratamiento, sin embargo, no deberá implicar temperaturas excesivas ni la adición de sustancias químicas y/o enzimas que pudieran causar el deterioro de las inmunoglobulinas. Debe advertirse que, tal como entenderán las personas especializadas en la técnica, el grado de daño causado a las inmunoglobulinas por el calentamiento dependerá de la temperatura aplicada, así como del periodo de tiempo que se expone la leche o la fracción de leche a dicha temperatura. En una realización preferente de la invención, se proporciona un proceso que no comprende ninguna etapa u operación en la que la temperatura excede 60 °C, preferentemente, no abarca ninguna etapa en la

que la temperatura excede 55 °C o, aún más preferentemente 50 °C, durante más de 5, 2, 1, 0,5 minutos. Se puede concebir que las necesidades de regulación requieran la inclusión en el proceso de al menos una etapa de pasteurización. Por lo tanto, en otra realización de la invención, el proceso sí que comprende una etapa de calentamiento de la leche o la fracción de leche, normalmente, a una temperatura por encima de 70 °C durante 40 segundos, preferentemente hasta 30 segundos.

Tal como se ha indicado anteriormente, el proceso de la invención comprende la etapa de reducción del contenido de grasa de un volumen de leche en bruto que tiene un pH que excede, 5,5, preferentemente, que excede 5,6, más preferentemente 5,7, siendo sobre todo preferente 5,8. De acuerdo con una realización particularmente preferente del proceso, el pH de la leche en bruto se encuentra en el intervalo de 6-7,5, más preferentemente dentro del intervalo de 6,3-7. Tal como conocen las personas especializadas en la técnica, el pH de la leche en bruto se encuentra normalmente dentro del intervalo de 6,5-6,8. De acuerdo con una realización particularmente preferente de la invención, el proceso no comprende la adición de ácido en cantidades que supongan la agregación de caseína. Sin desear vincularse a ninguna teoría, los autores de la invención creen que la agregación de la caseína antes de la microfiltración tiene un significativo impacto sobre el flujo de la membrana MF de manera que se disminuye la eficiencia global del proceso. Por otra parte, un pH bajo durante el proceso de agregación de caseína es perjudicial para las inmunoglobulinas. Es sobre todo preferente no acidular la leche en bruto antes de someterla al proceso de la presente invención.

Las grasas contenidas en la leche producida por los mamíferos están presentes en más de un 95 % como glóbulos esféricos con un diámetro en el intervalo de 0,1 a 20 µm. Para reducir el contenido de grasa de la leche en bruto, se puede emplear cualquier método conocido. La separación de los glóbulos de grasa de la leche, es decir, lo que se denomina desnatado, se basa normalmente en la diferencia entre la masa y el volumen (densidad) existente entre glóbulos y el líquido. Convencionalmente, se distinguen dos tipos de desnatado: el llamado desnatado espontáneo, proporcionando una capa enriquecida con glóbulos de grasa aglomerados, una operación que se realiza a 5-10 °C durante 10 – 16 horas, y el desnatado centrífugo en el que se somete leche entera a una rotación centrífuga de aproximadamente 4000 a 5000 rpm dentro de un apilamiento de discos cónicos, para separar de forma continua la nata y la leche desnatada. De acuerdo con una realización particularmente preferente de la invención, se reduce el contenido de grasa de la leche en bruto a un nivel por debajo de 0,1 % en peso, preferentemente menos de 0,075 % en peso. La reducción del contenido de grasa de la leche antes de la microfiltración puede potenciar en gran medida la eficacia del proceso ya que los glóbulos de grasa normalmente presentes en la leche pueden tener un efecto perjudicial para el proceso de filtración, p.ej., obstrucción del filtro y flujo reducido.

Después del desnatado, se somete a microfiltración (MF) la leche que tiene un pH por encima de 5,5. El término "microfiltración" debe entenderse en el presente documento por su significado habitual de un proceso de filtración que implica el paso a través de una membrana microporosa, que no dista fundamentalmente de la ultrafiltración o nanofiltración, excepto en lo que se refiere al tamaño de las moléculas que retiene. La microfiltración es un proceso de separación accionada por presión que emplea membranas de un tamaño de poro determinado para separar componentes en una solución o una suspensión sobre la base de su diferencia de tamaño. Aunque se pueden eliminar partículas más grandes mediante el uso de filtros de profundidad o que no son de membrana, únicamente un filtro de membrana con el tamaño de poro definido con precisión puede asegurar una retención cuantitativa.

De acuerdo con la invención, se utiliza una membrana microporosa que tiene un tamaño de poro promedio dentro del intervalo de 0,01-1,0 µm. El tamaño de poro (o diámetro de poro) es una medida de los diámetros de los poros. Es de particular preferencia el uso de una membrana microporosa que tenga un tamaño de poro promedio de 0,1-0,45 µm. El intervalo de los tamaños de poro puede estar normalmente distribuido y la distribución puede ser bastante restringida (p.ej., la relación del más grande al más pequeño puede ser menos de 2). En el caso de distribuciones grandes y heterogeneidad, el tamaño del poro será bastante menos predecible del caudal que en el caso de una membrana con una distribución del tamaño del poro restringida. Preferentemente, la distribución del tamaño del poro es la suficiente para que la desviación típica del tamaño del poro sea menos de 20 por ciento del tamaño del poro promedio. En otras realizaciones preferentes, la desviación típica del tamaño del poro es menos de 15, 10, 5 o 2 por ciento del tamaño del poro promedio. Los métodos para determinar las características del tamaño del poro de una membrana microporosa MF son conocidas entre las personas especializadas en la técnica.

Se dispone (en el mercado) de diferentes tipos de membranas MF, incluyendo microtamices, fabricados de materiales cerámicos, semiconductores o poliméricos, incluyendo por ejemplo, óxido de aluminio, óxido de zirconio, óxido de titanio o mezclas de los mismos, nitrato de silicio u otros compuestos a base de silicio o mezclas de los mismos, polisulfonas, fluoropolímeros, celulosa, resinas de poliolefina y poliéter sulfonas. Preferentemente, la membrana porosa de la presente invención es una membrana cerámica. Sin desear vincularse a ninguna teoría, los autores de la invención creen que las membranas cerámicas ofrecen ventajas con respecto a las membranas poliméricas en lo que se refiere a la robustez, la vida útil y desde el punto de vista económico, CIP y una pequeña distribución del tamaño del poro. Entre los ejemplos preferentes de una membrana de microfiltración cerámica que se pueden utilizar adecuadamente en el método de la presente invención se incluyen membranas cerámicas membralox, que se componen de un soporte de alúmina poroso y una capa de filtración de alúmina, zirconia o titania.

En lo que se refiere al modo de filtración MF y/o la configuración del módulo de filtro, la invención no está limitada en particular. Se pueden distinguir fundamentalmente dos modos de filtración diferentes, es decir, filtración con flujo directo (FFD), también conocido como filtración de "extremo muerto", en la que se aplica la corriente de alimentación perpendicular a la cara de la membrana por la que se pretende hacer pasar el 100 % del fluido a través de la membrana, y filtración de flujo tangencial (FFT), también conocida como filtración de flujo cruzado, en la que la corriente de alimentación pasa paralela a la cara de la membrana a medida que pasa una porción a través de la membrana (material permeado) mientras que el resto (material retenido) vuelve a circular hasta el depósito de alimentación. Entre los ejemplos de diferentes módulos de filtro conocidos en la técnica que se pueden emplear en uno de estos modos de filtración se incluyen módulos de fibra hueca, módulos arrollados en espiral, módulos tubulares y módulos de placa.

Las condiciones aplicables durante la microfiltración pueden variar según se desee a fin de aumentar el rendimiento total de S-IgA y/u optimizar el tiempo y la eficiencia del procesado. En un proceso típico de acuerdo con la invención, se filtra la leche desnatada con un flujo de 10-100 l/m² h, preferentemente 10-60 l/m²h, siendo sobre todo preferente 20-50 l/m²h y especialmente 30-35 l/m² h. El proceso MF implica normalmente una presión interna antes del filtrado dentro del intervalo de 1-bar, preferentemente 2-4,5 bar y especialmente 3-4 bar. La presión de salida está comprendida normalmente dentro del intervalo de 0,5-5 bar, preferentemente 1-3,5 bar. Preferentemente, pues, la presión aplicada tiene como resultado una presión de transmembra dentro del intervalo de 1,5-5 bar, más preferentemente 2-4,5 bar, siendo sobre todo preferente 3-4 bar. Para el proceso MF se mantiene normalmente la temperatura dentro del intervalo de 10-55 °C, preferentemente dentro del intervalo de 15-40 °C, siendo sobre todo preferente dentro del intervalo de 20-35 °C, y especialmente dentro del intervalo de 25-30 °C. Los inventores creen que estas temperaturas proporcionan el óptimo compromiso entre el flujo, la permeación de S-IgA y la estabilidad de inmunoglobulina molecular.

De acuerdo con la invención, la microfiltración produce un material permeado que contiene S-IgA y un material retenido rico en caseína. Tal como comprenderán las personas especializadas en la técnica, esto significa que el material retenido contiene la porción principal de la caseína de la leche y el material permeado contiene la principal porción de la proteína de suero de la leche que incluye las inmunoglobulinas de la leche. Por lo tanto, sobre la base del peso de los sólidos secos, el contenido de S-IgA del permeado es más alto que el contenido de S-IgA de la leche en bruto.

De acuerdo con la invención, posteriormente, se concentra el material permeado de la microfiltración. El término "concentración", tal como se utiliza en este contexto se refiere a cualquier proceso que elimine cantidades sustanciales de agua, así como mono- y disacáridos y otros pequeños componentes de la leche de la fracción permeada. Se puede aplicar cualquier proceso conocido por las personas especializadas en la técnica, si bien de acuerdo con algunas realizaciones, no deberá implicar temperaturas que excedan 55 °C, preferentemente 10-15°C.

En una realización particularmente preferente de la invención, se proporciona un proceso tal como se ha definido en el presente documento, en el que el material permeado de la microfiltración se concentra sometiendo a ultrafiltración. La ultrafiltración (UF) es una filtración de membrana en la que la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Los sólidos y los solutos de alto peso molecular suspendidos quedan retenidos, mientras que el agua y los solutos de bajo peso molecular atraviesan la membrana. Básicamente, la ultrafiltración no dista de la microfiltración o la nanofiltración, excepto en lo que se refiere al tamaño de las moléculas que retiene.

De acuerdo con la invención, se puede utilizar una membrana porosa que tiene un valor de límite del filtro dentro del intervalo de 1 -100 kDa. El valor del "peso molecular límite" ("MWCO") se utiliza en su sentido normal, que indica la capacidad de una membrana microporosa para retener un porcentaje dado de una molécula de determinado peso molecular en solución (normalmente 90 % de retención). Es particularmente preferente utilizar una membrana que tenga un valor del peso molecular límite dentro del intervalo de 10-100 kDa, siendo sobre todo preferente dentro del intervalo de 50-100 kDa.

Los diferentes tipos de membranas UF están disponibles (en el mercado), fabricadas de materiales cerámicos, semiconductores o poliméricos, incluyendo por ejemplo óxido de aluminio, óxido de zirconio, óxido de titanio o mezclas de los mismos, nitrato de silicio u otros compuestos a base de silicio o mezclas de los mismos, polisulfonas, fluoropolímeros, celulosa, resinas de poliolefina y poliéter sulfonas. Preferentemente, la membrana UF porosa de la presente invención es una membrana porosa polimérica, si bien también se contempla en la invención el uso de una membrana cerámica. En lo que se refiere al modo de filtración U y/o configuración del módulo de filtro, la invención no está limitada en particular. Tanto el modo de filtración de flujo directo (FFD) como el modo de filtración de flujo tangencial (FFT) pueden ser adecuados para los fines de la invención. Entre los ejemplos de diferentes módulos de filtro conocidos en la técnica que se pueden utilizar en uno de estos modos de filtración se incluyen módulos de fibra hueca, módulos arrollados en espiral, módulos tubulares y módulos de placa.

Las condiciones que se apliquen durante la ultrafiltración dependerán de una serie de variables, tal como entenderán las personas especializadas en la técnica. El profesional entrenado sabrá cómo llevar a cabo el proceso y optimizarlo en cada circunstancia en concreto. En un proceso típico de acuerdo con la invención, se filtra el material

permeado de la microfiltración con un flujo de 1-50 l/m²h, preferentemente 2,5-40 l/m²h y especialmente 5-30 l/m²h. El proceso UF implica normalmente una presión de entrada ante el filtro dentro del intervalo de 1-6 bar. La presión de salida oscila normalmente dentro del intervalo de 0,5-5 bar. Preferentemente, la presión aplicada tiene como resultado una presión de transmembra dentro del intervalo de 1,5-6 bar. Para el proceso UF, normalmente, se mantiene la temperatura dentro del intervalo de 10-40 °C, preferentemente dentro del intervalo de 10-25 °C.

La operación de ultrafiltración produce la fracción de leche rica en S-IgA como material retenido y el material permeado empobrecido en S-IgA, que comprende principalmente sales y moléculas orgánicas pequeñas.

Normalmente, el material retenido de UF obtenido contiene proteína en cantidades comprendidas entre 30-90 % en peso, preferentemente 40-85 % en peso, sobre la base del peso de los sólidos secos. Dicha proteína comprende las inmunoglobulinas de interés en combinación con otras proteínas de leche, principalmente proteína de suero, trazas de mono-disacáridos y otros pequeños componentes de la leche. Dependiendo de la membrana utilizada, la etapa UF se puede optimizar para eliminar fracciones de proteínas de suero (así como otras proteínas) que tienen pesos moleculares por debajo de 10 kDa, preferentemente por debajo de 50 kDa, siendo sobre todo preferente por debajo de 100 kDa, del material retenido de UF que contiene S-IgA. Para este fin, preferentemente, se usa una membrana UF que tiene un MWCO dentro del intervalo de 5-15 kDa o dentro del intervalo de 40-60 kDa o dentro del intervalo de 80-120 kDa, respectivamente. También podrán penetrar la membrana de UF pequeñas moléculas orgánicas, así como inorgánicas. Por tanto, la etapa de concentración por UF también puede eliminar significativas fracciones de sustancias como sales y mono- y disacáridos contenidos en la leche.

De acuerdo con una realización preferente de la invención, se proporciona un proceso tal como se ha definido en el presente documento, comprendiendo dicho proceso uno o más ciclos de diafiltración en los que se combina el material retenido de la microfiltración con un líquido de diafiltración y se somete la combinación de material retenido de la microfiltración y líquido de diafiltración a posteriores etapas de microfiltración y concentración. Hay varias maneras de realizar la diafiltración. En las diafiltraciones continuas, se añade el líquido de diafiltración al depósito de alimentación de la muestra de MF, preferentemente, a la misma velocidad que se genera el filtrado. En una diafiltración discontinua, se diluye primero la solución y después se vuelve a concentrar hasta el volumen de partida. A continuación, se repite este proceso hasta que se obtiene el rendimiento requerido de S-IgA desde la corriente de alimentación de MF. En el proceso de la presente invención, preferentemente se usa un modo de operación de diafiltración continua. En el proceso de la presente invención, con cada volumen de diafiltración o ciclo de diafiltración, se extraerá una fracción de la S-IgA contenida originalmente en el depósito de alimentación de la muestra de MF. El "volumen de diafiltración" (o "diavolumen") se define en el presente documento como el volumen de filtrado recuperado en comparación con la cantidad de material retenido con la MF. Cuando el volumen del filtrado extraído es igual al volumen del material retenido cuando empiezan las operaciones de diafiltración, se ha procesado 1 diavolumen. Por consiguiente, el término "ciclo de diafiltración" se refiere al tratamiento, es decir, eliminación y recogida, de 1 diavolumen del depósito de alimentación de la muestra de MF, normalmente se somete colectivamente a la(s) etapa(s) de concentración corriente arriba las fracciones del material permeado por MF de S-IgA obtenido en todos los ciclos de diafiltración y/o con el volumen de diafiltración completo.

Los líquidos adecuados para su uso como líquido de diafiltración de acuerdo con la presente invención incluyen agua y soluciones acuosas. Preferentemente, el líquido de diafiltración es agua o una fracción acuosa de la leche. De acuerdo con una realización particularmente preferente de la invención, el líquido de diafiltración es un material permeado de la ultrafiltración.

De acuerdo con una realización preferente de la invención, se proporciona un proceso, tal como se ha definido en el presente documento, que comprende al menos 6 ciclos de diafiltración, lo que significa que se recoge el volumen de permeado de MF, excluyendo el volumen de permeado de MF inicial, de 6 veces el volumen de material retenido de la MF cuando empieza la diafiltración. Incluso más preferentemente, se proporciona un proceso tal como se ha definido en el presente documento que comprende al menos 6, 8, 10 o 12 ciclos de diafiltración, incluso más preferentemente, al menos 13 o 14, siendo sobre todo preferente, al menos 15 ciclos de diafiltración. Por razones prácticas, el número de ciclos de diafiltración en el proceso de la presente invención no excederá 30, preferentemente, no excederá 20.

La expresión "factor de concentración volumétrico" (VCF) describe la relación entre el volumen de alimentación inicial y el volumen de material retenido. Por ejemplo, si se procesan 20 l de material de alimentación hasta que hayan atravesado 18 l a través del filtro y quedan 2 l en el material retenido, se obtiene una concentración de diez veces, por tanto el factor de concentración volumétrico es 10. Preferentemente, el FCV en la etapa de microfiltración está dentro del intervalo de 1,5-8, más preferentemente dentro del intervalo de 2-6, siendo sobre todo preferente 2.5-4. El FCV en la etapa de ultrafiltración normalmente está dentro del intervalo de 10-30, siendo sobre todo preferente dentro del intervalo de 15-25.

En otra realización más preferente, se proporciona un proceso tal como se define en el presente documento, en el que el material permeado de MF se diluye con agua o una solución acuosa, preferentemente, agua estéril, cuando se somete a la etapa de UF, para eliminar mono- y di-sacáridos y otros componentes de la leche pequeños. Esto es de particular interés cuando el proceso de la presente invención utiliza el material permeado de la ultrafiltración

como líquido de diafiltración, tal como se ha descrito anteriormente en el presente documento. Normalmente, se añade agua al depósito de alimentación de la muestra de UF en un volumen dentro del intervalo de 40-60 % del volumen del material retenido tras la concentración UF inicial con un FCV dentro del intervalo de 10-30.

- 5 Una vez completado el proceso de diafiltración de acuerdo con la invención, se puede someter la fracción enriquecida en S-IgA contenida en el depósito de alimentación de muestra UF a un posterior tratamiento corriente abajo, p.ej., para eliminar el agua y/o para seguir purificando el S-IgA.

10 En un aspecto preferente de la invención, se proporciona un proceso, tal como se ha definido en el presente documento, en el que se recoge la fracción enriquecida en S-IgA obtenida tras la operación final de diafiltración, tras lo cual se separa el agua de dicha fracción, p.ej., utilizando un evaporador de vacío y/o se somete dicha fracción a una posterior etapa de filtración para reducir el contenido microbiano de la misma y/o se somete dicha fracción a secado por pulverización, liofilización, o se utiliza como material de alimentación en un proceso de cromatografía para purificación de S-IgA.

15 La posterior etapa de filtración mencionada se aplica normalmente para reducir la carga bacteriana de la fracción enriquecida en S-IgA, que puede ser deseable en el caso en el que no se haya reducido dicha carga bacteriana en un grado suficiente en la primera etapa de microfiltración y/o porque se haya podido introducir contaminación microbiana durante una operación posterior, p.ej., en partes "contaminadas" del sistema. Preferentemente, la etapa comprende una filtración de tipo extremo muerto utilizando una membrana microporosa que tienen un tamaño de poro promedio de 0,05-0,5 μm , más preferentemente 0,1-0,3 μm .

20 Secado por pulverización se refiere a cualquier proceso que implique la rotura de mezclas líquidas en pequeñas gotas (atomización) y la rápida eliminación del disolvente de la mezcla en un aparato de secado por pulverización, en el que existe una potente fuerza motriz para la evaporación del disolvente desde las gotas. El secado por pulverización de acuerdo con la presente invención se puede realizar adecuadamente pulverizando el material retenido de UF enriquecido en S-IgA en una atmósfera a una temperatura de 100-200 °C, preferentemente 125-175 °C.

30 El "secado por congelación" o "liofilización" es un método de secado en frío que implica la congelación del líquido retenido de UF seguido de la eliminación o evaporación por sublimación del agua.

35 La posterior purificación de S-IgA puede implicar normalmente intercambio iónico, interacción hidrofóbica, modo mixto, cromatografía de afinidad y/o cromatografía por exclusión de tamaño o cualquier otro método de cromatografía conocido, todos ellos procesos utilizados generalmente en el campo de purificación de inmunoglobulina. En una realización de la invención preferente en particular, se proporciona un método, tal como se ha descrito en el presente documento, que comprende la etapa adicional de someter la fracción enriquecida en S-IgA a purificación por cromatografía de afinidad. En la cromatografía de afinidad, se separan las proteínas sobre la base de una interacción reversible con un ligando. El proceso de cromatografía de afinidad de la presente invención se basa normalmente en la interacción específica entre inmunoglobulinas, o más específicamente (S)-IgA, y un ligando. Dicho ligando se acopla a una matriz de cromatografía. Se puede utilizar un ligando con una alta afinidad para las regiones de la cadena ligera, es decir, la cadena κ o λ , la cadena pesada, es decir, la cadena α , el componente secretor o la cadena J o una combinación de dos o más regiones o partes específicas de regiones, p.ej., la cadena pesada y el componente secretor, la cadena pesada y la cadena J, la cadena pesada, el componente secretor y la cadena J. Entre los ejemplos adecuados de dicho ligando se incluyen ligandos naturales o cultivados con tejido sobre la base de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo derivados de mamíferos, aves y otras especies como fuente, p.ej., fracciones Fab monoclonales, fracciones de dominio variable de cadena simple o cualquier otro ligando conocido en la técnica. Se puede llevar a cabo una purificación adicional siguiendo la descripción anterior, si se sabe que la fracción enriquecida en S-IgA contiene anticuerpos contra un antígeno específico, p.ej., si la leche se obtiene de un animal inmunizado contra un antígeno específico, y el objetivo es obtener específicamente estos anticuerpos con una alta pureza, se puede utilizar el antígeno específico como ligando para la purificación por afinidad del (S)-IgA. De acuerdo con la presente invención, se aplica la fracción retenida de UF, opcionalmente tras las operaciones de tratamiento previo adecuadas, tales como concentración, a una columna de cromatografía en condiciones que favorezcan la unión específica del (S)-IgA al ligando. La unión del ligando (S)-IgA es específica y reversible y el material sin unir se lava a través de la columna. Se recupera la diana (S)-IgA cambiando las condiciones para favorecer su elución, o bien específicamente utilizando un ligando competitivo, o bien de forma no específica, cambiando el pH, la concentración iónica o la polaridad. A continuación, se recoge el (S)-IgA en una forma purificada y concentrada.

60 Otro aspecto de la invención se refiere a leche que se utiliza como leche en bruto en un proceso descrito en el presente documento. De acuerdo con una realización preferente, dicha leche se obtiene de animales de granja, tal como se ha indicado anteriormente. En un aspecto particularmente preferente de la invención, se proporciona un proceso, tal como se ha definido en el presente documento, en el que la leche es leche madura recogida después de la fase calostrual de un animal de granja, preferentemente, un animal de granja seleccionado del grupo que consiste en ganado bovino y cabras. Las expresiones "leche madura" y "leche no calostrual" se utilizan en el presente documento indistintamente para referirse a la leche secretada después de la fase calostrual que comprende los

primeros 4 a 7 días después del parto. Normalmente la leche madura se diferencia del calostro por contener cantidades menores de proteínas, entre ellas anticuerpos, y normalmente es constante durante hasta 300 días.

En una realización particularmente preferente de la invención, dicha leche se obtiene de un animal que ha sido inmunizado con uno o más antígenos como para inducir la secreción de S-IgA específica para dichos antígenos en la leche. Normalmente, la leche madura que se produce de esta forma contiene S-IgA específica de antígeno en cantidades de al menos 0,5 µg/ml, más preferentemente al menos 15 µg/ml, siendo sobre todo preferente al menos 50 µg/ml. La inmunización de los animales de granja para obtener leche no calostroal que contiene títulos de S-IgA específicos de antígeno se ha descrito en la patente estadounidense US 6.974.573 y la patente estadounidense relacionada US 7.074.454. En un aspecto particularmente preferente de la invención, se proporciona un proceso tal como se ha descrito en el presente documento, en el que la inmunización del animal comprende la administración a dicho animal de una primera composición que comprende dicho uno o más antígenos a través de la mucosa o las vías respiratorias para hiperinmunizar al animal y la posterior administración de una segunda composición que comprende dicho uno o más antígenos en la glándula mamaria o un nódulo linfático supramamario de dicho animal. Este proceso de inmunización ha sido descrito en la patente estadounidense US 6.974.573, haciéndose referencia de manera específica a la divulgación de dicho documento por su explicación detallada y las realizaciones preferibles del proceso.

Si bien la invención no está limitada a ningún antígeno específico y/o anticuerpos específicos de antígeno, entre los antígenos de interés en particular se incluyen los derivados de *Clostridium* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Helicobacter* spp., *Escherichia* spp., *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Cholera* spp., *Moraxella* spp., *Haemophilus* spp., virus (p.ej., Rotavirus, Norovirus), parásitos (e.g. *Gardia lamblia*), levaduras (e.g. *Candida* spp.) y mohos. Los antígenos de interés de acuerdo con la invención pueden incluir por ejemplo componente celulares, toxinas, factores de virulencia, factores de adhesión, factores de colonización, enzimas, péptidos, polisacáridos unidos a membrana/capsulares de un microorganismo de interés, preferentemente de uno o más de los microorganismos antes mencionados, así como proteínas de membrana exterior y factores de virulencia derivados de un virus, preferentemente, los que se han mencionado en el presente documento.

Otra realización de la invención se refiere a un proceso, tal como se ha descrito en el presente documento, en el que la leche se obtiene de un animal de granja que no ha sido sometido a (hiper)inmunización activa. Los procesos de la presente invención proporcionan un producto en forma de producto permeado de microfiltración de leche en bruto.

Tal como entenderán las personas especializadas en el este campo, dichos productos se presentarán normalmente en forma de polvos deshidratados y/o líquidos concentrados y normalmente tendrán un contenido de S-IgA en cantidades de al menos 0,02 % en peso, sobre la base del peso en seco total, preferentemente al menos 0,10 % en peso y siendo lo más preferente al menos 0,25 % en peso. Además de las inmunoglobulinas y otros sólidos derivados de la leche, los productos pueden contener cantidades sustanciales de agua y otros materiales vehículo. El producto obtenido después de la microfiltración y la concentración sin posteriores etapas de purificación (o antes de ellas) contiene normalmente hasta un 5 % en peso de S-IgA, sobre la base del peso seco. Tal como podrán entender las personas especializadas en la técnica, las posteriores etapas de purificación, en particular los procesos de cromatografía de afinidad que se han descrito, que se realizan después de las etapas de microfiltración y concentración de la invención pueden tener como resultado productos que contienen hasta un 100 % en peso de S-IgA.

Los productos descritos son muy adecuados para su incorporación en todo tipo de productos (composiciones) para mantener y/o mejorar la salud, en particular, productos farmacéuticos, productos cosméticos y/o productos alimentarios para su uso en la prevención y/o tratamiento de infecciones y/o inflamaciones de la mucosa y/o la piel en un paciente que lo necesita. Dicho paciente puede ser un ser humano, aunque también puede ser un animal. En una realización preferente, dicho paciente es un ser humano. Entre los ejemplos preferentes de dichos productos de acuerdo con la invención se incluyen formas de dosis oral de productos farmacéuticos sólidos, como comprimidos, cápsulas, polvos y píldoras, así como fórmulas semi sólidas o líquidas, normalmente para administración oral o tópica o inyección, como soluciones, suspensiones, cremas, pomadas y formulaciones de aerosol. El producto puede ser una fórmula entérica, especialmente una fórmula para lactantes; nutrición clínica; un alimento funcional y/o un nutracéutico. Los términos "nutracéutico" y "alimento funcional", tal como se utilizan en el presente documento se refieren a productos alimentarios y bebidas que se consumen como parte de la dieta habitual, pero que, según se ha demostrado, suponen beneficios fisiológicos y/o reducen el riesgo de enfermedades crónicas más allá de las funciones nutricionales básicas. El producto puede ser una composición terapéutica o cosmética para su aplicación sobre la piel, como por ejemplo una crema, una loción o una pomada. El producto se puede proporcionar para su administración en el tracto respiratorio inferior, p.ej., una formulación de aerosol, o en el tracto respiratorio superior, p.ej., una solución para tomar. En otra realización, se proporcionan composiciones para su administración en la mucosa de la cavidad oral y/o nasal, p.ej., una solución, suspensión o pomada. La composición puede ser para su administración en el tracto urogenital, p.ej., una crema, una loción u otra fórmula líquida.

Los productos pueden ser comprimidos, cápsulas, polvos, píldoras, soluciones, suspensiones, productos alimentarios líquidos o sólidos, bebidas, lociones, cremas, pomadas y formulaciones de aerosol que comprenden un producto de los procesos que se han descrito en el presente documento.

Dichos productos se pueden utilizar para el bienestar general y se utilizan normalmente para uno o más entre tratamiento y/o prevención de infecciones y/o inflamación de las superficies de la mucosa, p.ej., el tracto gastrointestinal, el tracto urogenital, el tracto respiratorio, la cavidad nasal o la cavidad oral, tratamiento y/o prevención de la obesidad y enfermedades relacionadas, o tratamiento y/o prevención de alergias alimentarias.

Ejemplos

Ejemplo 1

Se recogió leche en bruto que contenía inmunoglobulinas específicas dirigidas contra *Clostridium difficile* y sus toxinas (toxina A y toxina B) de 3 vacas Holstein-Friesian. No se enfrió la leche después de ordeñarla, sino que se calentó directamente a 40 °C. Se procesó la leche en bruto a 40 °C sobre una centrífuga Clair Milky con una capacidad de 125 l/h para separar la nata de la leche. Se colocó la leche desnatada obtenida (40 l) en el tanque del sistema de la planta piloto de microfiltración. Se utilizó una planta piloto TetraPak MSF-7 equipada con 7 filtros de 0,1 mm EP3730 Membralox con porosidad gradiente con un área de filtración total de 2,52 m² para separar las proteínas de suero de las caseínas. Se mantuvo la temperatura de la leche en el proceso a 25-30°C.

Se realizó la ultrafiltración con un límite del peso molecular del filtro de 50 KDa y un área de filtro de 2,0 m². El permeado de este proceso se utiliza como líquido de diafiltrado para la microfiltración. Se llevó a cabo la ultrafiltración a temperatura ambiente, controlando así el flujo para que se produjera suficiente líquido de diafiltración para realizar la diafiltración en la microfiltración. Como tal, el flujo sobre la ultrafiltración fue del orden de 40 l/m²h.

Se puso en funcionamiento la planta piloto con agua en el arranque del experimento. El uso de los módulos de filtro de porosidad gradiente aseguró una presión de transmembra uniforme en toda el área de la membrana. Se llevaron a cabo los experimentos con una presión de entrada antes del filtro de 3,75 bar y una presión de salida de 2,55 bar después del filtro. El resultado es una presión de transmembra de 3,15 bar y una caída de presión de 1,2 bar. Las presiones no cambiaron mucho durante el transcurso del experimento. Se dirigieron los flujos del material permeado y retenido al tanque del sistema. Después de 10 minutos de estabilización, en los que se mezcló la leche desnatada con el agua presente en el volumen muerto de la planta piloto (15 l), se dirigió el flujo del material permeado a un vaso de recogida y se recogió el permeado en volúmenes de 10 litros. Cada 10 litros, se tomó una muestra del material permeado y retenido para su análisis. Después de 40 litros de permeado, el tanque del sistema de la planta piloto quedó vacío y el concentrado de la leche desnatada había ocupado el volumen muerto de la planta piloto. Llegado ese momento, se añadieron 10 litros del material permeado del ultrafiltrado al tanque del sistema. Se repitió esta misma operación hasta que se detuvo el experimento a 300 l de permeado.

A 300 l de permeado se habían realizado eficazmente 17,3 diafiltraciones en la leche, siendo los primeros 40 l de permeado la concentración de la leche. El factor de concentración de la leche desnatada oscila entre 0,73 y 2,67 en la etapa de concentración y, durante la diafiltración, es entre 1,60 y 2,67. A 300 l de permeado, el total de S-IgA, S-IgA específica de toxina A de *C. difficile* e IgG específica de toxina A de *C. difficile* se encontraron en el permeado en porcentajes de 96,6 %, 97,1 % y 105,4 %, respectivamente. Según lo esperado, el total de S-IgA y S-IgA específica de toxina A de *C. difficile* tuvieron una curva de permeación similar. Estas curvas sin embargo son más lentas que IgG específica de toxina A de *C. difficile*. El nivel de IgG era ya de un 97 % a 140 l de permeado, por tanto a 6,7 diafiltraciones. La S-IgA necesita aproximadamente 10 diafiltraciones más para alcanzar el mismo nivel. Los pesos moleculares de IgG (que consisten en 2 cadenas ligeras y 2 cadenas pesadas), S-IgA (un dímero con una cadena J adicional y un componente secretor) y IgM kDa (una estructura pentámera combinada con cadenas J) son 180, 435 KDa y 900 kDa, respectivamente. Las estructuras de S-IgA e IgG son diferentes, ya que IgG se puede considerar una proteína globular y la S-IgA con su configuración cola-a-cola en la región Fc tiene una región Fc más de tipo dogal. Esta diferencia de forma y tamaño desempeña muy probablemente un papel en la diferencia de las diafiltraciones necesarias para filtrar la S-IgA en un alto rendimiento desde la leche. Los flujos sobre la membrana de microfiltración con los parámetros mencionados (25-30 °C, presión interna 3,75 bar, presión externa 2,55 bar) fueron 30-35 l/m²h.

En las figuras 2A, 2B y 2C se puede observar la permeación del total de S-IgA, S-IgA específica toxina A de *C. difficile* e IgG, respectivamente. En la Tabla 1, se indica la diferencia en el número de ciclos de diafiltración realizados para recuperar IgG y S-IgA.

Tabla 1: Comparación de la recuperación de S-IgA e IgG. Los porcentajes de permeado se expresan como porcentajes de la cantidad inicialmente presente en la leche en bruto

	% Material permeado	Número de diafiltraciones	Volumen de permeado (l)
S-IgA	>75 %	>16	>280 l
igG	>95 %	6	130 l

REIVINDICACIONES

1. Proceso para la producción de una fracción de leche enriquecida en IgA secretora (S-IgA), que comprende:

- 5 - reducir el contenido de grasa de un volumen de leche en bruto que tiene un pH por encima de 5,5 a un valor por debajo del 0,5 % en peso separando la grasa de la leche a una temperatura inferior a 55 °C;
- someter la leche con bajo contenido de grasa, que tiene un pH por encima de 5,5, a microfiltración utilizando una membrana porosa que tiene un tamaño de poro promedio dentro del intervalo de 0,1 – 0,45 µm, produciendo un material permeado que contiene S-IgA y un material retenido rico en caseína; y
- 10 - concentrar el material permeado de la microfiltración produciendo una fracción de leche enriquecida en S-IgA.

2. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el pH de la leche durante la microfiltración está dentro del intervalo de 6-7,5.

15 3. Proceso de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en el que se concentra el material permeado de la microfiltración sometiéndolo a ultrafiltración utilizando una membrana porosa que tiene un valor límite de filtro dentro del intervalo de 1 -100 kDa, preferentemente 50-100 kDa, produciendo la fracción de leche rica en S-IgA como material retenido y un permeado con empobrecimiento en S-IgA.

20 4. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que dicho proceso comprende uno o más ciclos de diafiltración en los que se combina el material retenido de la microfiltración con el líquido de diafiltración y la combinación del material retenido de microfiltración y el líquido de diafiltración se somete a etapas de microfiltración y concentración posteriores.

25 5. Proceso de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende uno o más ciclos de diafiltración, en el que el material permeado de la ultrafiltración se utiliza como líquido de diafiltración.

 6. Proceso de acuerdo con la reivindicación 4 o la reivindicación 5, en donde el proceso comprende al menos 6 ciclos de diafiltración.

30 7. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en donde el proceso comprende al menos 8 ciclos de diafiltración.

 8. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, en donde el proceso comprende al menos 10 ciclos de diafiltración.

35 9. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 8, en donde el proceso comprende al menos 15 ciclos de diafiltración.

40 10. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el proceso produce una fracción de leche enriquecida en S-IgA que contiene un 75 % o más de la S-IgA presente originalmente en la leche en bruto.

45 11. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el proceso produce una fracción de leche enriquecida en S-IgA que contiene un 85 % o más de la S-IgA presente originalmente en la leche en bruto.

 12. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la microfiltración se realiza utilizando una membrana cerámica y la ultrafiltración se realiza utilizando una membrana polimérica.

50 13. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el proceso no comprende ninguna etapa ni operación en las que la temperatura exceda de 60 °C durante más de 2 minutos.

 14. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que se recoge el material retenido de la ultrafiltración obtenido después de la operación de diafiltración final y se seca por pulverización, se liofiliza o se utiliza como material de alimentación en un proceso de cromatografía para la purificación de S-IgA.

60 15. Proceso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que la leche es leche madura recogida después de la fase calostroal de un animal de granja, preferentemente un animal de granja seleccionado del grupo que consiste en ganado bovino y cabras.

 16. Proceso de acuerdo con la reivindicación 15, en el que el animal ha sido inmunizado con uno o más antígenos para inducir secreción en la leche de S-IgA específica para dichos antígenos.

65 17. Proceso de acuerdo con la reivindicación 16, en el que la inmunización del animal comprende la administración a dicho animal de una primera composición que comprende uno o más de dichos antígenos a través de la mucosa o

las vías respiratorias para hiperinmunizar al animal y la posterior administración de una segunda composición que comprende dicho uno o más antígenos en la glándula mamaria o un nódulo linfático supramamario de dicho animal.

Fig 1

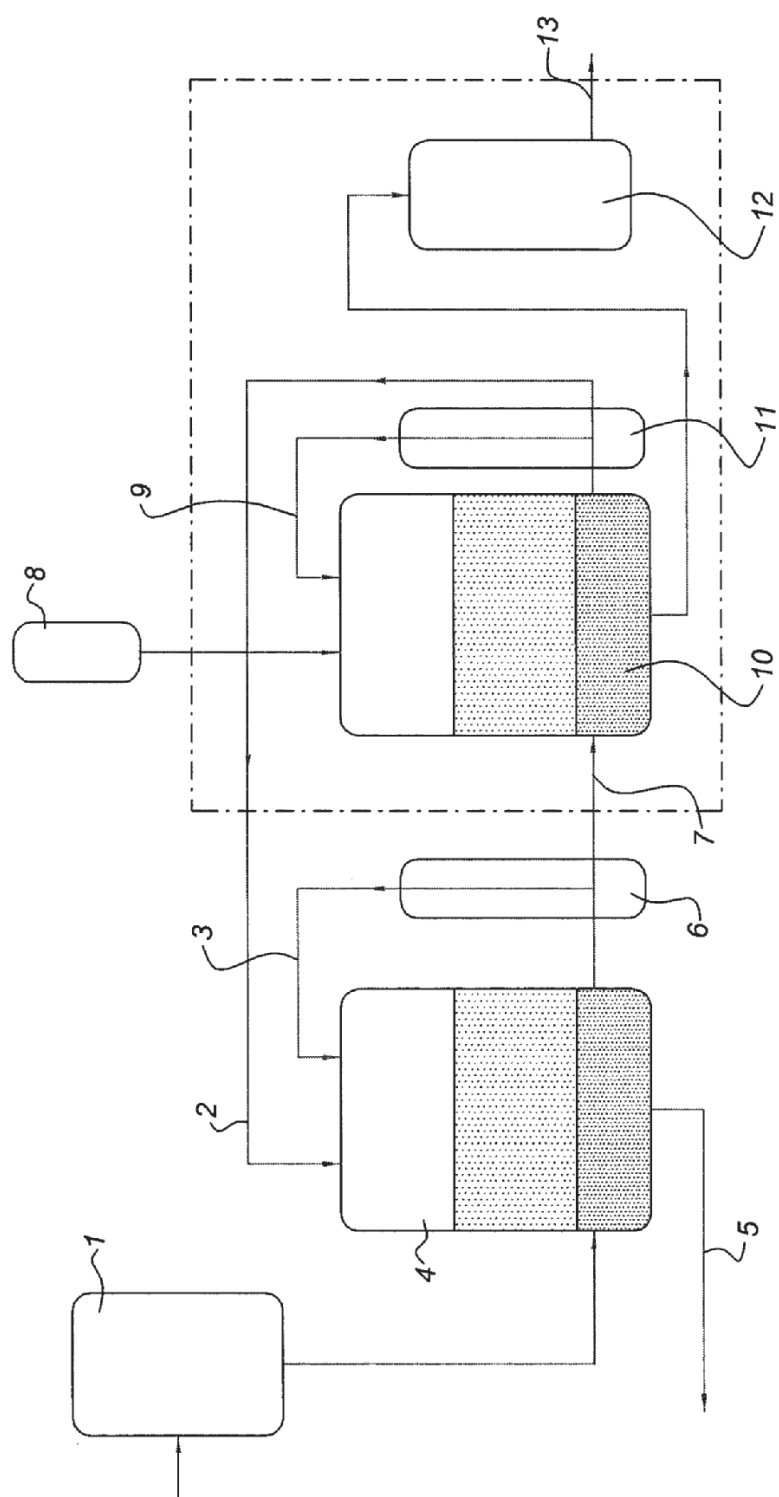


Fig 2a

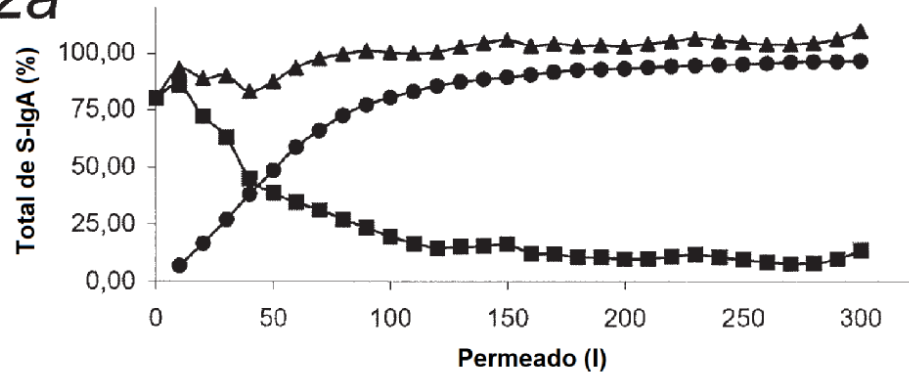


Fig 2b

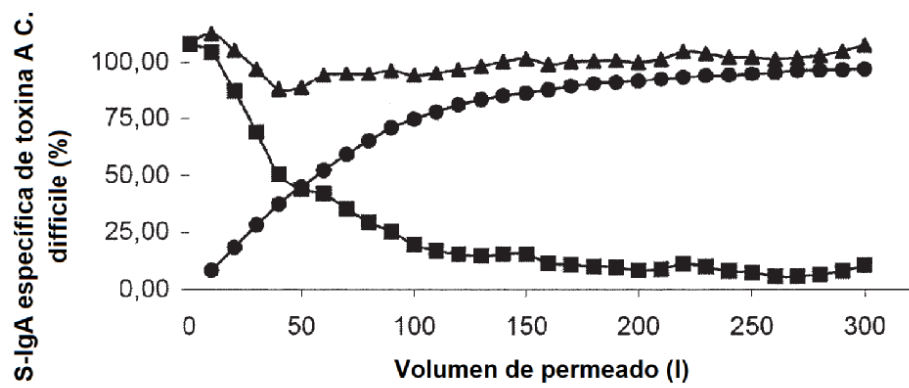


Fig 2c

