

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 755 974**

51 Int. Cl.:

A23J 1/20 (2006.01)

C07K 14/79 (2006.01)

C07K 1/16 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.06.2014 PCT/US2014/043328**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.01.2015 WO15009400**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.06.2014 E 14737478 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 3021682**

54 Título: **Métodos de adsorción de lecho ampliados para el aislamiento de proteínas básicas de leche, incluyendo la lactoferrina**

30 Prioridad:

16.07.2013 US 201313942909

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

24.04.2020

73 Titular/es:

**MJN U.S. HOLDINGS LLC (100.0%)
225 North Canal Street, 25th Floor
Chicago, Illinois 60606, US**

72 Inventor/es:

**BANAVARA, DATTATREYA,;
ALVEY, JOHN D.,;
PETERS, JOSEPH ANDREW, y
GONZALEZ, JUAN M.,**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 755 974 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

Métodos de adsorción de lecho ampliados para el aislamiento de proteínas básicas de leche, incluyendo la lactoferrina

Campo técnico

- 5 La presente descripción se refiere a procesos mejorados para el aislamiento de proteínas básicas de la leche (por ejemplo, proteínas que tienen un valor de punto isoeléctrico (p_i) superior a 7,0) o péptidos, tales como lactoferrina, usando cromatografía de adsorción de lecho expandido.

Antecedentes

- 10 Las composiciones nutricionales para bebés generalmente buscan imitar la composición y la función de la leche materna humana. La lactoferrina es un miembro de 80 kDa de la familia de transferinas de las glicoproteínas de unión al hierro de la transferrina, y es una de las proteínas principales en la leche humana. La lactoferrina tiene la capacidad de unir reversiblemente dos cationes de hierro, incluso a pH bajo, y puede facilitar la absorción de hierro en el intestino humano. Funcionalmente, la lactoferrina regula la absorción de hierro y se puede unir a los radicales libres a base de hierro, así como donar hierro para una respuesta inmunológica. Adicionalmente, la lactoferrina presenta actividad antibacteriana. Así, sería útil incluir la lactoferrina en las fórmulas comerciales para bebés.

- 15 Sin embargo, el uso de lactoferrina en fórmulas para bebés se ha visto limitado por la falta de fuentes comercialmente útiles a gran escala. La lactoferrina bovina, que tiene aproximadamente el 69% de homología de secuencia con la lactoferrina humana, se puede obtener de la leche de vaca mediante una variedad de métodos de purificación, pero dichos procesos son ineficientes para un uso comercial generalizado. Por ejemplo, uno de tales métodos de purificación es revelado por QIAO-YAN DU ET AL: "One-Step Purification of Lactoferrin from Crude Sweet Whey Using Cation-Exchange Expanded Bed Adsorption", INDUSTRIAL & ENGINEERING CHEMISTRY RESEARCH, vol. 52, no. 7, 20 de febrero de 2013 (2013-02-20), páginas 2693-2699, XP055138170. Este método de purificación aísla la lactoferrina de una fuente de leche al establecer una columna de adsorción de lecho expandido que comprende una matriz en partículas, aplicando una fuente de leche a la matriz, seguido de la elución de la lactoferrina de la matriz con un tampón de elución que comprende cloruro de sodio 0,5 M. Este método se realiza en un modo fluidizado donde la matriz tiene una relación de expansión de al menos 1 durante la elución (2,0-2,4) y la elución se realiza en un modo expandido. La matriz comprende agarosa reticulada y carburo de tungsteno y la fuente de leche utilizada fue suero bovino. Otras lactoferrinas no humanas incluyen la lactoferrina porcina, lactoferrina equina, lactoferrina de búfalo, lactoferrina de cabra, lactoferrina murina y lactoferrina de camello, pero existen ineficiencias de producción similares.

- 20 La concentración de lactoferrina en el suero bovino, por ejemplo, generalmente es de sólo aproximadamente 10 a 100 mg/litro. La adsorción de lecho fluido estabilizado, también llamada adsorción de lecho expandido (de sus siglas en inglés, EBA) es un proceso para obtener proteínas de una materia prima, como la lactoferrina bovina de fuentes de leche de vaca. EBA permite el aislamiento de biomoléculas, tales como proteínas y plásmidos, directamente de un material de alimentación bruto utilizando una matriz cromatográfica en partículas, en la que la matriz permanece fluidizada durante la carga del material de alimentación y opcionalmente durante la elución. Debido a que la matriz se fluidifica durante la carga, los sólidos y los materiales no deseados pasan a través de la matriz, lo que evita el ensuciamiento del material cromatográfico. Así, EBA puede, en ciertas circunstancias, combinar los efectos de la centrifugación, filtración, concentración y purificación en un único proceso, ahorrando así tiempo y minimizando las etapas de purificación previas al procesamiento. Sin embargo, la tecnología EBA actual tiene varias desventajas para aislar la lactoferrina de las fuentes de leche. En particular, la tecnología EBA actual todavía usa un volumen relativamente grande de líquido y también usa una alta concentración de hidróxido de sodio (p. ej., 200 mM) durante la elución de la lactoferrina, lo que puede causar cambios estructurales irreversibles debido a la desnaturalización de la proteína.

- 25 Adicionalmente, las fuentes de leche de mamíferos no humanos contienen otras proteínas útiles, que incluyen lactoperoxidasa, α -lactoalbúmina, β -lactoglobulina, inmunoglobulinas, glucopéptidos, glucomacropéptido, aislados de proteína de suero y lisozima. Estas proteínas y mezclas también pueden ser útiles como ingredientes alimenticios o suplementos nutricionales. Así, existe la necesidad de mejorar los procesos para aislar y purificar la lactoferrina y otras proteínas de las fuentes de leche a escala comercial para su uso en productos nutricionales, como las fórmulas para bebés.

Divulgación de la invención

- 30 Debe entenderse que tanto la descripción general anterior como la siguiente descripción detallada presentan realizaciones de la divulgación y están destinadas a proporcionar una visión general o marco para comprender la naturaleza y el carácter de la divulgación tal como se reivindica. La descripción sirve para explicar los principios y operaciones del tema reclamado. Otras características y ventajas adicionales de la

presente divulgación serán fácilmente evidentes para los expertos en la materia tras una lectura de la siguiente divulgación.

La presente divulgación proporciona procesos EBA mejorados para aislar proteínas de fuentes de leche. La presente divulgación proporciona un proceso para aislar una proteína de leche, tal como lactoferrina, de una fuente de leche que comprende establecer una columna de adsorción de lecho expandido que comprende una matriz de partículas, sometiendo una fuente de leche a un proceso de diafiltración, agregando citratos a la fuente de leche en una concentración que varía de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2,0% p/v de la fuente de leche, aplicando una fuente de leche a la matriz, eluyendo lactoperoxidasa con un tampón de elución que comprende aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3 M de solución de cloruro de sodio, y después eluyendo la lactoferrina de la matriz con un tampón de elución que comprende aproximadamente 0,3 a aproximadamente 2,0 M de cloruro de sodio. Se puede usar cualquier fuente de leche de mamífero en los presentes procesos, aunque en realizaciones particulares, la fuente de leche es una fuente de leche bovina. La fuente de leche comprende, en algunas realizaciones, leche entera, leche reducida en grasa, leche desnatada, suero, caseína o mezclas de los mismos.

15 **Mejor modo para llevar a cabo la invención**

Ahora se hará referencia en detalle a las realizaciones de la presente divulgación, uno o más ejemplos de los cuales se exponen a continuación. Cada ejemplo se proporciona a modo de explicación de la composición nutricional de la presente divulgación y no es una limitación.

Así, se pretende que la presente divulgación cubra dichas modificaciones y variaciones que entran dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes. Otros objetos, características y aspectos de la presente divulgación se describen en la siguiente descripción detallada o son evidentes. Un experto en la materia debe entender que la presente discusión es una descripción de realizaciones ejemplares solamente y no pretende limitar los aspectos más amplios de la presente divulgación.

Todas las referencias a características o limitaciones singulares de la presente divulgación deberán incluir la característica o limitación plural correspondiente, y viceversa, a menos que se especifique lo contrario o se implique claramente lo contrario en el contexto en el que se hace la referencia.

Todas las combinaciones de métodos o etapas del proceso tal como se usan en el presente documento se pueden realizar en cualquier orden, a menos que se especifique lo contrario o se implique claramente lo contrario en el contexto en el que se realiza la combinación referenciada.

Los métodos de la presente divulgación, que incluyen componentes de los mismos, pueden comprender, consistir o consistir esencialmente en los elementos esenciales y limitaciones de las realizaciones descritas en el presente documento, así como cualquier etapa adicional u opcional.

Como se usa en este documento, el término "aproximadamente" debe interpretarse para referirse a los dos números especificados en cualquier intervalo. Cualquier referencia a un intervalo debe considerarse como un soporte para cualquier subconjunto dentro de ese intervalo.

La presente divulgación se refiere a procesos mejorados para purificar proteínas de una materia prima, tal como una fuente de leche de mamífero, usando EBA. La fuente de leche puede ser, en ciertas realizaciones, leche entera, leche desnatada, leche baja en grasa o un producto derivado de la leche, tal como suero o caseína. Si bien la fuente de leche puede ser cualquier fuente de leche de mamífero, en realizaciones particulares, es una fuente de leche bovina, y más particularmente, suero bovino. En realizaciones particulares, la proteína objetivo es lactoferrina, aunque también se pueden aislar otras proteínas de la leche, tales como lactoperoxidasas o lactalbuminas. EBA es particularmente adecuado para manejar grandes volúmenes de material de alimentación crudo y, Así, es útil para producir cantidades comercialmente útiles de proteínas de leche purificadas. En algunas realizaciones, el proceso comprende los pasos de establecer una columna de adsorción de lecho expandido que comprende una matriz en partículas, aplicando una fuente de leche a la matriz y eluyendo la lactoferrina de la matriz con aproximadamente 0,3 a aproximadamente 2,0 M de cloruro de sodio. En otras realizaciones, la lactoferrina se eluye con aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,0 M de cloruro de sodio, mientras que en otras realizaciones adicionales, la lactoferrina se eluye con aproximadamente 0,7 a aproximadamente 0,9 M de cloruro de sodio.

La columna de adsorción de lecho expandido puede ser cualquiera conocida en la técnica, como las descritas en los documentos de patente de EE.UU. Nos. 7,812,138, 6,620,326 y 6,977,046. En algunas realizaciones, la columna debe estar equipada con al menos una entrada y al menos una salida, y puede operar tanto en modo expandido como en modo empaquetado. Más particularmente, en ciertas realizaciones, se aplica una fuente de leche a la columna en un modo expandido, y la elución se realiza en modo expandido o empaquetado. En realizaciones particulares, la elución se realiza en un modo expandido. Por ejemplo, la relación de expansión en el modo expandido puede ser de aproximadamente 1 a aproximadamente 3, o de aproximadamente 1,3 a aproximadamente 1,7. La tecnología EBA se describe más detalladamente en las solicitudes internacionales publicadas Nos. WO 92/00799, WO 02/18237, WO 97/17132.

La columna EBA comprende un material de matriz de partículas adsorbentes que comprende partículas pequeñas con una densidad alta, lo que permite un alto caudal en un modo expandido. El material de matriz particulada adsorbente puede ser cualquier matriz adecuada para EBA. La densidad y el tamaño de las partículas influyen en la caudal y la relación de expansión del sistema. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la densidad de partículas es de 1,3 g/ml o más, por ejemplo, al menos 1,5 g/ml, al menos 1,8 g/ml, al menos 2,0 g/ml o al menos 2,3 g/ml. En realizaciones particulares, el tamaño de partícula está en un intervalo de aproximadamente 1,5 a aproximadamente 3,5 mg/ml, o de aproximadamente 2,5 a 3,5 mg/ml. La densidad de las partículas adsorbentes como se usa en el presente documento se refiere a la densidad de las partículas en un estado completamente solvatado, en oposición a la densidad de las partículas adsorbentes secas.

Además, en algunas realizaciones, la distribución del tamaño de partícula de la matriz varía de aproximadamente 10 µm a aproximadamente 1000 µm. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, la distribución del tamaño de partícula varía de aproximadamente 25 µm a aproximadamente 1000 µm, o de aproximadamente 50 µm a aproximadamente 800 µm, o de aproximadamente 80 µm a aproximadamente 600 µm de tamaño. En otras realizaciones, el tamaño de partícula de la matriz es inferior a aproximadamente 300 µm, inferior a aproximadamente 150 µm o inferior a aproximadamente 120 µm. En realizaciones particulares, los tamaños de partícula varían de aproximadamente 40 a aproximadamente 150 µm, aproximadamente 40 a aproximadamente 120 µm, aproximadamente 40 a aproximadamente 100 µm, o aproximadamente 40 a aproximadamente 70 µm.

El punto isoeléctrico de la lactoferrina es de aproximadamente 8,9. Los métodos anteriores de EBA para aislar la lactoferrina utilizan hidróxido de sodio 200 mM como tampón de elución. Así, el pH del sistema aumenta a más de 12, y la estructura y la bioactividad de la lactoferrina pueden estar comprendidas por cambios estructurales irreversibles. Ahora se ha descubierto que una solución de cloruro de sodio se puede usar como un tampón de elución en el aislamiento de la lactoferrina de la matriz EBA. En ciertas realizaciones, el cloruro de sodio tiene una concentración de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 2,0 M. En otras realizaciones, el tampón de elución de lactoferrina tiene una concentración de cloruro de sodio de aproximadamente 0,3 M a aproximadamente 1,5 M, o aproximadamente 0,5 M a aproximadamente 1,0 M.

En ciertas realizaciones, el tampón de elución de lactoferrina se puede recircular una o más veces, reduciendo así el volumen de elución total. Por ejemplo, el tampón de elución se puede recircular 2, 3 o más veces. En algunas realizaciones, el tampón de elución se puede recircular de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 veces, o de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 veces. Una temperatura elevada de tampón de elución también puede, en ciertas realizaciones, mejorar la eficacia de la elución de lactoferrina. La temperatura del tampón de elución de cloruro de sodio puede ser, en ciertas realizaciones, de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 °C.

En ciertas realizaciones, la fuente de leche comprende lactoperoxidasa. La lactoperoxidasa se une a la matriz EBA con menor afinidad que la lactoferrina y, así, se eluye con una disolución de cloruro de sodio que tiene una concentración de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 0,3 M antes de eluir la lactoferrina. En algunas realizaciones, el tampón de elución de lactoperoxidasa se recircula varias veces para reducir el arrastre de lactoperoxidasa a la fracción de lactoferrina. Por ejemplo, el tampón se puede recircular 1, 2, 3 o más veces, o aproximadamente 1-10 veces o aproximadamente 1-5 veces. Además, la lactoperoxidasa se puede aislar del tampón si se desea. En otras realizaciones, se puede realizar un lavado intermedio de lactoperoxidasa durante la etapa de aplicar la fuente de leche a la columna de EBA (carga de material de alimentación). Se cree que el lavado de parte o la totalidad de la lactoperoxidasa durante la carga de la columna mejora la unión de la lactoferrina a la matriz, mejorando así el rendimiento de la lactoferrina.

La fuente de leche se somete a un procedimiento de diafiltración antes de cargarla en la columna EBA. Por ejemplo, en realizaciones que usan suero lácteo como fuente de leche, la fuerza iónica del suero puede dificultar la adsorción de proteínas básicas, como la lactoferrina, en la matriz EBA. La diafiltración es una forma de filtración por membrana utilizada en la industria para purificar y concentrar disoluciones macromoleculares, como las disoluciones que contienen proteínas. Durante la diafiltración, la presión hidrostática fuerza un líquido contra una membrana semipermeable. Se agrega agua continuamente a la corriente de alimentación para mantener el mismo volumen de la alimentación. Los sólidos suspendidos y los solutos de alto peso molecular se retienen, mientras que los solutos de bajo peso molecular pasan a través de la membrana. Sin limitarse a ninguna teoría en particular, se cree que la diafiltración de la fuente de leche, como el suero, aumentará la adsorción de proteínas a la matriz EBA. Además, la diafiltración también puede eliminar o reducir los iones de lactosa y minerales que pueden interferir con la adsorción de proteínas básicas a la matriz EBA. Así, la diafiltración también puede reducir el volumen total de líquido utilizado durante todo el proceso si se desea. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la fuente de leche comprende suero diafiltrado, y más particularmente, suero bovino diafiltrado.

Las proteínas básicas en suero y leche son una fracción menor del contenido total de proteínas. Es posible que las interacciones moleculares de estas proteínas también puedan dificultar la adsorción a la matriz EBA. Aunque no está sujeto a ninguna teoría en particular, se cree que los citratos pueden alterar la estructura del agua alrededor de las proteínas y evitar estas interacciones moleculares. En consecuencia, en algunas

realizaciones, los citratos se agregan a la fuente de leche antes de aplicar la fuente de leche a la columna EBA. Los citratos que se pueden agregar a la fuente de leche incluyen citrato de sodio, citrato de potasio, citrato de magnesio y similares. La concentración de sales de citrato puede variar de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 2% p/v de la fuente de leche, mientras que en otras realizaciones, la concentración de sal de citrato puede variar de aproximadamente 0,2% a aproximadamente 0,8% p/v de la fuente de leche. Por ejemplo, cuando la fuente de leche es suero, la concentración puede ser, en algunas realizaciones, de aproximadamente 0,02% a aproximadamente 0,8% p/v (suponiendo 0,8% de proteína y 9% de sólidos para suero). En algunas realizaciones, sobre una base de proteína, la cantidad de sal de citrato puede variar de aproximadamente 0,025: 1 a aproximadamente 1:1, mientras que en otras realizaciones, la proporción puede ser de aproximadamente 0,05:1 a aproximadamente 0,1:1.

En otras realizaciones, el método comprende además agregar sales de hierro a la fuente de leche, tal como suero. Alternativamente, el pH de alimentación se puede cambiar para liberar el hierro unido de la lactoferrina. Una vez más, al no estar limitado por la teoría, variar el porcentaje de saturación de hierro de la lactoferrina puede mejorar aún más la unión de la lactoferrina a la matriz, mejorando así la recuperación total de la lactoferrina de la fuente de leche. Cualquier sal de hierro soluble en agua es adecuada para este propósito, incluyendo sulfato ferroso y cloruro férrico. La concentración de la sal de hierro depende del nivel de lactoferrina en la alimentación. La relación de lactoferrina a la fuente de hierro puede variar de aproximadamente 200-1000 mg de hierro por kg de lactoferrina.

En otras realizaciones, la temperatura de la fuente de leche cruda puede tener un impacto en la adsorción a la matriz EBA. Por consiguiente, en ciertas realizaciones, la fuente de leche está a una temperatura de menos de 4,44 °C (40 °F), por ejemplo entre aproximadamente 0 y 4,44 °C (32 y 40 °F), o entre aproximadamente 1,66 y 4,44 °C (35 y 40 °F).

La caudal durante la elución de lactoferrina puede ser de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 l/h. En algunas realizaciones, el caudal es de aproximadamente 125 a aproximadamente 175 l/h, o de aproximadamente 130 a aproximadamente 160 l/h.

Los materiales de matriz útiles en el sistema EBA incluyen los descritos en el documento EP 0538 350 y las patentes de EE.UU Nos. 6,620,326, 6,977,046, 7,812,138 y 7,368,141. En general, la matriz comprende partículas que pueden adsorber la proteína deseada. En ciertas realizaciones, la matriz comprende partículas que tienen un núcleo no poroso de densidad alta recubierto con un material adsorbente poroso. La densidad y el diámetro de las partículas de la matriz determinan la caudal a la que las partículas se pueden exponer sin ser expulsadas de la columna. En ciertas realizaciones, la densidad de las partículas es de al menos 1,5 g/ml, particularmente de aproximadamente 2,5 a aproximadamente 3,5 g/ml (húmedo) y el tamaño medio de partícula varía de aproximadamente 80 a aproximadamente 600 µm.

En algunas realizaciones, la matriz de partículas es al menos parcialmente permeable a la proteína a aislar para proporcionar suficiente capacidad de unión. Las partículas en la matriz pueden tener cualquier estructura de composición y forma. En realizaciones particulares, las partículas comprenden un material de núcleo no poroso recubierto con un material base adsorbente. El núcleo no poroso tiene una densidad más alta que la partícula en su conjunto. Por ejemplo, el núcleo no poroso puede, en ciertas realizaciones, tener una densidad de al menos 4,0 g/ml. Más particularmente, la matriz puede comprender un material de tipo conglomerado o un material de tipo pelicular. Un material de conglomerado comprende al menos dos núcleos no porosos rodeados por el material base adsorbente. Por ejemplo, una matriz de conglomerado comprende en algunas realizaciones diferentes tipos y tamaños de materiales no porosos unidos por el material base adsorbente, tales como dos o más partículas de densidad alta unidas por agarosa. Un material de tipo pelicular comprende, en algunas realizaciones, partículas, en el que cada partícula contiene un único material central de densidad alta recubierto con una capa del material base adsorbente. Por ejemplo, el material pelicular en algunas realizaciones comprende una perla de vidrio recubierta con agarosa o una partícula de acero inoxidable recubierta con agarosa.

La partícula, como se indicó, comprende un núcleo no poroso de densidad alta con un material poroso que rodea el núcleo. En ciertas realizaciones, el material base adsorbente comprende además un ligando. En ciertas realizaciones, el núcleo no poroso constituye típicamente como máximo el 50% del volumen total de la partícula adsorbente, tal como como máximo el 40%, preferiblemente como máximo el 30%. Ejemplos de materiales de núcleo no porosos adecuados son compuestos inorgánicos, metales, metales pesados, no metales elementales, óxidos metálicos, óxidos no metálicos, sales metálicas y aleaciones metálicas, etc., siempre que se cumplan los criterios de densidad anteriores. Ejemplos de tales materiales centrales son silicatos metálicos borosilicatos metálicos; cerámica incluyendo diboruro de titanio, carburo de titanio, diboruro de circonio, carburo de circonio, carburo de tungsteno, carburo de silicio, nitruro de aluminio, nitruro de silicio, nitruro de titanio, óxido de itrio, polvo de silicio metálico y disiluro de molibdeno; óxidos y sulfuros metálicos, incluidos magnesio, aluminio, titanio, vanadio, cromo, circonio, hafnio, manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre y óxido de plata; óxidos no metálicos; sales metálicas, incluido sulfato de bario; elementos metálicos, incluidos tungsteno, circonio, titanio, hafnio, vanadio, cromo, manganeso, hierro, cobalto, níquel, indio, cobre, plata, oro, paladio, platino, rutenio, osmio, rodio e iridio, y aleaciones de elementos metálicos,

tales como aleaciones formadas entre dichos elementos metálicos, p. ej. acero inoxidable; formas cristalinas y amorfas de carbono, que incluyen grafito, negro de carbón y carbón. Los materiales de núcleo no porosos preferidos son perlas de carburo de tungsteno, tungsteno, acero y titanio, tales como perlas de acero inoxidable.

5 El material base poroso, en ciertas realizaciones, es una matriz base polimérica utilizada para cubrir y mantener múltiples (o un único) núcleo de materiales juntos y para unir un ligando adsorbente. La matriz de base polimérica comprende, en realizaciones venideras, polímeros orgánicos naturales o sintéticos, típicamente seleccionados entre i) polisacáridos naturales y sintéticos y otros polímeros basados en
10 carbohidratos, que incluyen agar, alginato, carragenano, goma guar, goma arábica, goma ghatti, goma de tragacanto, goma karaya, goma de algarroBILLA, goma xantana, agarosas, celulosas, pectinas, mucinas, dextranos, almidones, heparinas, quitosanos, almidones hidroxilados, hidroxipropil almidones, carboximetil almidones, hidroxietil celulosas, hidroxipropil celulosas y carboximetil celulosas; ii) polímeros y monómeros orgánicos sintéticos que dan como resultado polímeros, incluidos polímeros acrílicos, poliamidas, poliimididas, poliésteres, poliéteres, compuestos de vinilo poliméricos, polialquenos y derivados sustituidos de los mismos, así como copolímeros que comprenden más de uno de estos polímeros funcionalmente y derivados
15 sustituidos de los mismos. ; y iii) mezcla de los mismos. En realizaciones particulares, el material de base polimérico es un polisacárido, tal como agarosa.

En ciertas realizaciones, el material de matriz puede unir una gran cantidad de la proteína deseada por unidad de volumen del adsorbente. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, al menos el 50% del volumen de
20 partículas comprende el material base adsorbente, preferiblemente al menos 70%, más preferiblemente al menos 80% y lo más preferiblemente al menos 90% del volumen de las partículas adsorbentes. En realizaciones particulares, el material base adsorbente incluye al menos un ligando.

El análisis del tamaño de partícula se puede realizar utilizando un análisis de imagen computarizado de la población de cuentas que proporciona el número de partículas en cualquier diámetro de partícula dado en
25 relación con el número total de partículas analizadas en la medición específica. Normalmente, el número total de partículas analizadas estará en el intervalo de 250-500 partículas). Estos datos de tamaño de partícula se pueden transferirse al porcentaje de volumen representado por cada tamaño de partícula mediante una transformación matemática rutinaria de los datos, calculando el volumen de cada cuenta y relacionándolo con el volumen total ocupado por todas las cuentas contadas en la medición.

30 La distribución del tamaño de partícula según la descripción se define preferiblemente de modo que más del 90% de las partículas se encuentren entre 20 y 500% del diámetro medio de partícula, más preferiblemente entre 50 y 200% del diámetro medio de partícula, lo más preferible entre 50 y 150% del diámetro medio de partícula.

La forma preferida de una sola partícula adsorbente es sustancialmente esférica. Sin embargo, la forma
35 general de las partículas normalmente no es crítica. Así, las partículas pueden tener otros tipos de formas redondeadas, p. formas elipsoides, en forma de gotitas y forma alargada. Sin embargo, para ciertas aplicaciones (por ejemplo, cuando las partículas se usan en una configuración de lecho fluidizado), se prefiere que al menos el 95% de las partículas sean sustancialmente esféricas.

40 Algunas realizaciones, la matriz comprende perlas de carburo de tungsteno recubiertas con agarosa. Una fuente comercialmente disponible de perlas de carburo de tungsteno recubiertas con agarosa es FastLine® SP de Upfront Chromatography A/S.

La preparación del material en partículas útil en los métodos descritos en la presente memoria se puede realizar mediante diversos métodos conocidos per se (p. ej., mediante procesos convencionales conocidos por el experto en la materia, véase, por ejemplo, los documentos EP 0 538 350 B1 o WO 97/17132) Por
45 ejemplo, por polimerización en bloque de monómeros; polimerización en suspensión de monómeros; gelación en bloque o suspensión de materiales formadores de gel, p. ej., por calentamiento y enfriamiento (p. ej., de agarosa) o por adición de "catalizadores" de gelificación (p. ej., agregando un ion metálico adecuado a alginatos o carragenanos); bloqueo o suspensión de la reticulación de materiales solubles adecuados (p. ej., reticulación de dextranos, celulosas o almidones o gelatinas, u otros polímeros orgánicos con, por ejemplo, epíclorhidrina o divinilsulfona); formación de polímeros de sílice por acidificación de soluciones de sílice (p. ej., disoluciones de bloque o suspensión); procedimientos mixtos, p. ej. polimerización y gelificación; procedimientos de pulverización; y revestimiento de lecho fluido de partículas que controlan la densidad; emulsiones de enfriamiento de partículas que controlan la densidad suspendidas en matrices de bases poliméricas en solventes oleosos calentados; o suspendiendo partículas de control de densidad y sustancia
50 activa en una solución adecuada de monómero o copolímero seguido de polimerización.

En algunas realizaciones, se obtiene un material en partículas que comprende agarosa como matriz de base polimérica y perlas de acero como el material del núcleo calentando una mezcla de agarosa en agua (a aproximadamente 95 °C), agregando las perlas de acero a la mezcla y transfiriendo la mezcla a un aceite caliente (p. ej., aceites vegetales), emulsionando la mezcla agitando vigorosamente (opcionalmente

agregando un emulsionante convencional) y enfriando la mezcla. El experto en la materia apreciará que el tamaño de partícula (es decir, la cantidad de matriz de base polimérica (aquí: agarosa) que se incorpora en cada partícula se puede ajustar variando la velocidad del mezclador y el proceso de enfriamiento, después de la producción primaria de una preparación de partículas, la distribución del tamaño de partícula se puede definir adicionalmente mediante tamizado y/o elutriación en lecho fluido.

La matriz porosa, tal como la agarosa polimérica, en ciertas realizaciones, se derivatiza químicamente con un compuesto de bajo peso molecular denominado en el presente documento ligando, de modo que el adsorbente comprende un ligando con afinidad por las proteínas. El ligando constituye la funcionalidad de adsorción del medio adsorbente o la estructura principal polimérica de la partícula adsorbente tiene una funcionalidad de unión incorporada per se. Productos químicos de ligando bien conocidos, tales como intercambiadores de cationes, p. ej. se ha demostrado que el ácido sulfónico es una herramienta eficaz para la purificación de proteínas de suero como la lactoferrina y la lactoperoxidasa. Estas proteínas tienen carga positiva, incluso a pH neutro, y se puede obtener interacción selectiva con un intercambiador catiónico. Otras proteínas requieren una interacción de unión más sofisticada con el ligando para obtener una adsorción selectiva.

Dichos ligandos de afinidad, como los restos que se pueden cargar, se pueden unir a la matriz base mediante métodos conocidos por el experto en la materia, p. ej. como se describe en "Immobilized Affinity Ligand Techniques" by Hermanson et al., Academic Press, Inc., San Diego, 1992. En los casos en que la matriz de base polimérica no tiene las propiedades para funcionar como sustancia activa, la matriz de base polimérica (o matrices donde se usa una mezcla de polímeros) se puede derivatizar para funcionar como sustancia activa en los procedimientos de activación o derivatización. Así, los materiales que comprenden grupos hidroxilo, amino, amida, carboxilo o tiol se pueden activar o derivatizar usando diversos productos químicos de activación, p. ej. productos químicos como bromuro de cianógeno, divinilsulfona, epiclorhidrina, bisepoxiranos, dibromopropanol, dialdehído glutárico, carbodiimidas, anhídridos, hidrazinas, periodatos, benzoquinonas, triazinas, tosيلات, tresilatos e iones diazonio. Los ejemplos de métodos para derivatización química y ligandos específicos útiles en ciertas realizaciones se describen en el documento WO 98/08603.

La concentración de ligando puede afectar la fuerza de adsorción en ciertas realizaciones. Por ejemplo, en una realización, el adsorbente lleva ligandos para la adsorción de la proteína deseada en una concentración de al menos 20 nM, tal como al menos 30 mM o al menos 40 mM, preferiblemente al menos 50 mM y lo más preferiblemente al menos 60 mM.

Un subconjunto de adsorbentes se puede caracterizar en términos de su capacidad de unión a la albúmina de suero bovino (BSA). Este subconjunto de adsorbentes son normalmente aquellos que comprenden un ligando seleccionado del grupo que consiste en i) ligandos que comprenden grupos aromáticos o heteroaromáticos (radicales) de los siguientes tipos como grupos funcionales: ácidos benzoicos tales como ácidos 2-aminobenzoicos, ácidos 3-aminobenzoicos, 4-aminobenzoico, ácido 2-mercaptobenzoico, ácido 4-amino-2-clorobenzoico, ácido 2-amino-5-clorobenzoico, ácido 2-amino-4-clorobenzoico, ácido 4-aminosalicílico, ácido 5-aminosalicílico, 3,4- ácidos diaminobenzoicos, ácido 3,5-diaminobenzoico, ácido 5-aminoisoftálico, ácido 4-aminoftálico; ácidos cinámicos tales como ácidos hidroxicinámicos; ácidos nicotínicos tales como ácidos 2-mercaptonicotínicos; ácidos naftoicos tales como ácido 2-hidroxi-1-naftoico; quinolinas tales como 2-mercaptoquinolina; ácidos tetrazolacéticos tales como ácido 5-mercapto-1-tetrazolacético; tiadiazoles tales como 2-mercapto-5-metil-1,3,4-tiadiazol; bencimidazoles tales como 2-amino-bencimidazol, 2-mercaptobencimidazol y 2-mercapto-5-nitrobencimidazol; benzotiazoles tales como 2-aminobenzotiazol, 2-amino-6-nitrobenzotiazol, 2-mercaptobenzotiazol y 2-mercapto-6-etoxibenzotiazol; benzoxazoles tales como 2-mercaptobenzoxazol; tiofenoles tales como tiofenol y 2-aminotiofenol; Ácido 2- (4-aminofeniltio) acético; ácidos sulfónicos aromáticos o heteroaromáticos y ácidos fosfónicos, como el ácido 1-amino-2-naftol-4-sulfónico y fenoles como el 2-amino-4-nitrofenol.

Se proporcionan ejemplos para ilustrar algunas realizaciones de la composición nutricional de la presente divulgación, pero no deben interpretarse como ninguna limitación al respecto. Otras realizaciones dentro del alcance de las reivindicaciones en el presente documento serán evidentes para un experto en la materia a partir de la consideración de la especificación o práctica de la composición nutricional o los métodos descritos en el presente documento. Se pretende que la especificación, junto con el ejemplo, se considere solo a modo de ejemplo, con el alcance de la divulgación indicado por las reivindicaciones que siguen al ejemplo.

Ejemplo

Producción de lactoperoxidasa y lactoferrina

La lactoperoxidasa y la lactoferrina se separaron del suero bovino utilizando un método EBA. Se usó un adsorbente de carburo de tungsteno recubierto con agar FastLine® SP, con una altura de lecho asentado de 40 cm y un volumen total de 3140 ml. El suero se cargó en la columna con un caudal de aproximadamente 240 l/h. El caudal durante el enjuague y elución fue de aproximadamente 148-158 l/h. La lactoperoxidasa se eluyó con NaCl 250 mM y la lactoferrina se eluyó con NaCl 0,8 M. La recirculación del eluyente redujo el

ES 2 755 974 T3

volumen total de eluyente de 55 l a 39 l utilizados sin perder la cantidad total de lactoferrina recuperada del suero.

- 5 La concentración de lactoferrina y lactoperoxidasa se determinó por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) de fase inversa en una columna de poliestireno-divinilbenceno. La lactoferrina purificada se obtuvo de cromatografía frontal A/S y se usó como estándar. El estándar de lactoperoxidasa bovina se obtuvo de Worthington Biochemical Corp. La muestra se recibió en soluciones acuosas, enriquecida con lactoferrina y soluciones estándar de lactoperoxidasa para preparar una curva de adición estándar de dos puntos, filtrada y recolectada en viales silanizados para inyección en el sistema HPLC. Las proteínas se eluyeron con acetonitrilo usando un gradiente lineal de 20-90% y se detectaron a 214 nm.
- 10 La recuperación total de lactoferrina fue del 63%. En general, el proceso de NaCl produce aproximadamente 40 g de lactoferrina por 1000L, mientras que el proceso de NaOH produce 27 g de lactoferrina por 1000 L.

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para aislar la lactoferrina de una fuente de leche, que comprende:
establecer una columna de adsorción de lecho expandido que comprende una matriz de partículas,
5 someter una fuente de leche a un proceso de diafiltración,
agregar citratos a la fuente de leche en una concentración que varía de 0,01% a 2,0% p/v de la fuente de leche,
aplicar la fuente de leche a la matriz, y
10 eluir lactoperoxidasa con un tampón de elución que comprende una solución de cloruro de sodio de 0,2 a 0,3 M, y después
eluir la lactoferrina de la matriz con un tampón de elución que comprende 0,3 a 2,0 M de cloruro de sodio en el que la elución de lactoferrina se realiza a una temperatura de 30 a 50 °C.
2. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además recircular el tampón de elución al menos una vez.
- 15 3. El proceso de la reivindicación 1, en el que la elución se realiza en un modo fluidizado.
4. El proceso de la reivindicación 3, en el que la elución se realiza a una caudal de aproximadamente 100 a aproximadamente 200 l/h.
5. El proceso de la reivindicación 3, en el que la matriz tiene una relación de expansión de al menos 1 durante la elución.
- 20 6. El proceso de la reivindicación 1, en el que la elución se realiza en un modo expandido.
7. El proceso de la reivindicación 1, que comprende además agregar una sal de hierro a la fuente de leche.
8. El proceso de la reivindicación 1, en el que la matriz comprende agarosa reticulada y carburo de tungsteno.
9. El proceso de la reivindicación 1, en el que la matriz tiene una densidad de aproximadamente 2.5 a aproximadamente 3.5 mg/mL.
- 25 10. El proceso de la reivindicación 1, en el que la fuente de leche es una fuente de leche bovina.
11. El proceso de la reivindicación 10, en donde la fuente de leche es leche entera, leche desnatada, leche baja en grasa, suero, caseína o una combinación de las mismas.
12. El proceso de la reivindicación 11, en el que la fuente de leche es suero bovino.