

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680016015.0

[51] Int. Cl.

C07K 1/22 (2006.01)

A61P 37/04 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/04 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 4 月 30 日

[11] 公开号 CN 101171261A

[22] 申请日 2006. 5. 10

[21] 申请号 200680016015.0

[30] 优先权

[32] 2005. 5. 10 [33] AU [31] 2005902372

[86] 国际申请 PCT/AU2006/000607 2006. 5. 10

[87] 国际公布 WO2006/119560 英 2006. 11. 16

[85] 进入国家阶段日期 2007. 11. 9

[71] 申请人 墨累古尔本合作有限公司

地址 澳大利亚维多利亚

[72] 发明人 安德鲁·布朗 彼得·霍布曼

理查德·佩因 迈克尔·罗尼

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 刘晓东 顾晋伟

权利要求书 3 页 说明书 23 页

[54] 发明名称

免疫球蛋白级分及其方法

[57] 摘要

本发明涉及用作食品添加剂的含有 IgA 的组合物的制备。更具体地，本发明涉及制备富集 IgA 的乳制品提取物组合物的方法以及这样的组合物。

1. 一种制备富集 IgA 的乳产品提取物组合物的方法, 所述组合物包含从乳产品提取的 IgA 和 IgG, 其中所述 IgA 与 IgG 的相对含量与所述乳产品中的 IgA 与 IgG 的相对含量相比增加, 所述方法包括:

提供:

乳产品源;

阳离子交换树脂; 和

流动相;

使所述乳产品与所述阳离子交换树脂接触, 使得与 IgG 相比 IgA 优先吸附于其上;

用所述流动相从所述阳离子交换树脂洗脱富集 IgA 的级分; 和
收集洗脱的富集 IgA 的级分。

2. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述乳产品选自全乳、脱脂乳、乳清、优选奶酪乳清、初乳。

3. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中与所述阳离子交换树脂接触的所述乳产品的量是约 16 柱体积到约 300 柱体积。

4. 根据权利要求 1 或 2 的方法, 其中与所述阳离子交换树脂接触的所述乳产品的量是约 16 柱体积到约 40 柱体积。

5. 根据权利要求 1 至 4 中任一项的方法, 其中在洗脱富集 IgA 的级分之前, 以低离子强度 ($< 0.008 \text{ M}$ 的盐或其等同物) 的缓冲液或水清洗所述阳离子交换树脂以除去保留在柱中的乳产品。

6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的方法, 其中用含有 $0.05\text{-}0.4 \text{ M NaCl}$ ($0.29\text{-}2.34\% \text{ w/v}$) 或等同的离子强度的流动相进行洗脱。

7. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的方法, 其中用含有 $0.08\text{-}0.35 \text{ M NaCl}$ ($0.47\text{-}2.05\% \text{ w/v}$) 或等同的离子强度的流动相进行洗脱。

8. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的方法, 其中用含有 0.17 M NaCl ($1\% \text{ w/v}$) 或等同离子强度的流动相进行洗脱。

9. 根据权利要求1至8中任一项的方法，其中用pH在5.5-7.5范围内的流动相进行洗脱。
10. 根据权利要求1至9中任一项的方法，其中所述阳离子交换树脂包括Sephacrose珠。
11. 根据权利要求10的方法，其中所述Sephacrose珠在45-300 μm 的粒径范围内。
12. 根据权利要求1至11中任一项的方法，其中在所述乳产品与所述树脂接触的步骤期间，所述阳离子交换树脂经受约6-90升每升树脂每小时的流量。
13. 根据权利要求12的方法，其中所述接触流量为约6-70升每升树脂每小时。
14. 根据权利要求12的方法，其中所述接触流量为约6-40升每升树脂每小时。
15. 根据权利要求1至14中任一项的方法，其中所述方法为连续方法或分批方法。
16. 根据权利要求1至14中任一项的方法，其中所述方法为连续方法。
17. 根据权利要求1至16中任一项的方法，由其得到的富集IgA的乳产品提取物组合物包含至少1:8的IgA:IgG比率，优选至少1:4，更优选至少1:2。
18. 根据权利要求1至16中任一项的方法，由其得到的富集IgA的乳产品提取物组合物包含至少2% w/w的IgA含量，优选至少10% w/w，更优选至少20% w/w。
19. 根据权利要求1至18中任一项的方法，其中进一步处理富集IgA

的乳产品提取物组合物，以减少存在的非 IgA 蛋白质和/或盐的量。

20. 一种富集 IgA 的乳产品提取物组合物，其中 IgA 与 IgG 的比率为至少 1:8，优选至少 1:4，更优选至少 1:2。

21. 一种富集 IgA 的乳产品提取物组合物，其通过权利要求 1 至 19 中任一项的方法得到。

22. 权利要求 20 或 21 的富集 IgA 的乳产品提取物组合物作为食品物质或营养品的用途。

23. 根据权利要求 22 的用途，其中所述食品物质为婴儿食品物质或营养品。

24. 权利要求 20 或 21 的富集 IgA 的乳产品提取物组合物在制备用于治疗或预防由病毒、细菌、真菌及它们的毒素引起的疾病的药物中的用途。

25. 权利要求 20 或 21 的富集 IgA 的乳产品提取物组合物作为靶向病原体的营养品成分的用途，所述病原体引起人粘膜表面例如鼻、眼、耳、肺、乳房和阴道的感染。

免疫球蛋白级分及其方法

技术领域

本发明涉及用作食品添加剂的含有 IgA 的组合物的制备。更具体地，本发明涉及制备富集 IgA 的乳制品提取物组合物的方法以及这样的组合物。

背景技术

根据以前在本领域作的工作理解本发明。然而，以下的讨论并非承认或认可任何引用的材料在本申请的优先权日之前在澳大利亚被公开、使用或是作为公知常识的一部分。

免疫球蛋白 A (IgA)是在人的分泌物(包括乳汁)中主要的免疫球蛋白，其为机体提供抵抗病原体的保护，其结合到引起疾病的病毒、细菌、真菌及它们的毒素。IgA 为婴儿提供抵抗上述病原体的必需保护。当口服时 IgA 抗体是有效的，这是因为其抵抗肠内酶的降解，因此使得其理想地作为营养品(nutraceuticals)或食品补充剂。IgA 可与益生菌联用以抑制或降低由病原体引起的副作用。应用包括将 IgA 作为营养品成分以靶向病原体，所述病原体引起人粘膜表面例如鼻、眼、耳、肺、乳房部和阴道的感染。此外，含有 IgA 的产品适于肠和口部健康应用。由于通常存在于牛奶中的 IgA 水平低，以商业规模提高 IgA 产量的现有方法是通过免疫方案以提高牛奶中的水平。典型地，牛奶包含比率为约 1:8 的 IgA 和 IgG。

目前在全世界以实际上相同的方式使用实质上相同的方法生产用于食品消费的含有 IgA 的组合物。最常见的生产方法被称为超免疫法，借助此法给大量的牛施用致免疫物质(例如病毒)以产生超免疫应答。作为超免疫应答的结果，由赋予免疫性的牛产生的牛奶含有增加量的 IgA，也称为“超免疫奶”。然后使用标准的膜技术浓缩所述超免疫奶以产生含有约 5%w/w IgA 的乳产品提取物，所述提取物可用作食品补充

剂，例如婴儿配方奶。

该生产超免疫奶的方法的固有问题在于，免疫法方案通常需最多达三个月在牛内产生超免疫应答，并且还需一个月收获足够数量的超免疫奶以生产商业数量的含有 IgA 的乳产品提取物。另外，与本发明的方法相比，此方法还是昂贵的。

由于可变的糖基化，IgA 具有在约 4.5-6.5 范围内的酸性等电点或 pI，通常认为其不能以具有商业价值的量吸附到阳离子交换树脂上。本发明的方法令人惊奇地使得可以通过调节装载和洗脱条件，通过阳离子交换色谱从乳产品（例如脱脂乳）中分级 IgA。这样的方法以前还未以商业规模实现。

此外，本发明的方法还可包括在纯化乳产品的其它组分（例如乳铁传递蛋白、乳过氧化物酶或生长因子）的现有方法中，作为其一部分。此方法的一个实例是其中乳产品与阳离子交换树脂接触，随着流动相离子强度的增加，通过依次洗脱，首先洗脱富集 IgA 的级分，随后是贫 IgA 的乳过氧化物酶级分，然后是乳铁传递蛋白级分。

发明概述

本发明涉及制备富集 IgA 的乳产品提取物组合物的方法，其不需要超免疫牛并因此避免了与此相关的时间和成本。

因此，本发明的目的在于提供富集 IgA 的乳产品提取物组合物以及其方法，所述方法可以以商业规模使用，其克服了现有技术中的至少一些缺点。术语“富集 IgA 的”意为在洗脱的乳产品提取物中 IgA:IgG 的比率与在分级之前的乳产品中的 IgA:IgG 的比率相比增加。

根据本发明的一个方面，提供了制备富集 IgA 的乳产品提取物组合物的方法，所述组合物包含从乳产品中提取的 IgA 和 IgG，其中 IgA 与 IgG 的相对含量与乳产品中 IgA 与 IgG 的相对含量相比升高，所述方法包括：

提供：

乳产品源;

阳离子交换树脂; 和

流动相;

使乳产品与阳离子交换树脂接触,使得 IgA 与 IgG 相比优先吸附在阳离子交换树脂上;

用流动相洗脱所述阳离子交换树脂; 以及

收集洗脱的富集 IgA 的级分。

对本领域的技术人员而言,显而易见的是: 在富集 IgA 的乳产品提取物组合物的制备中,所述乳产品不必局限于全牛奶,而是其它乳产品也可用作原料。

在本发明的另一方面中,提供一种方法,其中所述乳产品选自全乳、脱脂乳、乳清和初乳。

生产富集 IgA 的乳产品提取物组合物的特定条件可以变化,并仍产生富集 IgA 的级分。

因此,在本发明一个优选的方面中,提供一种方法,其中采用含有 0.05-0.4M NaCl (0.29-2.34 % w/v)或等同离子强度、优选 0.08-0.35M NaCl (0.47-2.05 % w/v)、更优选约 0.17M NaCl (1 % w/v)或等同离子强度的流动相进行洗脱。在替代方案中,可以使用其它合适的等同离子强度的流动相溶液。

在本发明的另一方面中,流动相的 pH 为 4.5-9,优选 5.5-7.5,最优选 pH 约 6.5。

在本发明的另一方面中,在所述接触步骤期间,所述乳产品吸附于阳离子交换柱的流量可为 6-90 升每升树脂每小时(h)(线性流速 60-900 cm/h)。优选地,使用的流量为 6-70 升每升树脂每小时(h)(线性流速 60-700 cm/h),更优选为 6-40 升每升树脂每小时(h)(线性流速 60-400

cm/h)。在这些流量下，已发现对于 IgA 的最佳分级，与阳离子交换树脂接触的乳产品的量为约 16-300 柱（床）体积，优选 16-200 柱体积，更优选 16-40 柱体积。

在本发明的另一方面，在洗脱富集 IgA 的级分之前，用低离子强度的缓冲液(< 0.008 M 的盐或其等同物)或水清洗阳离子交换树脂，以除去残留在柱中的乳产品。

此外，在本发明中可使用不同类型的阳离子交换树脂，其中优选 Sepharose 阳离子交换树脂珠，例如 SP Sepharose Big Beads。进一步优选的是粒径范围为 45-300 μm 的树脂珠。

在本发明的另一方面中，提供一种方法，其中阳离子交换树脂包括 Sepharose 珠，优选在 45-300 μm 的粒径范围内。

本发明的方法可作为连续方法或作为分批方法使用，优选连续方法。随后可处理洗脱的富集 IgA 的级分以降低其中的盐含量。

脱脂乳含有约 1-2.5% 的 IgG w/w 和 0.05-0.1 % 的 IgA w/w，牛血清含有 20% 的 IgG w/w 和 0.4% 的 IgA w/w。发明人发现，采用本发明的方法获得的乳产品提取物浓缩物（洗脱物）令人惊奇地含有比预期更低水平的 IgG w/w，其中 IgA:IgG 的比率通常在 1:2 的级别上，这等同于 IgA 浓缩了八至十六倍。使用 ELISA(酶联免疫吸附法)试剂盒进行 IgA 和 IgG 的定量。对于那些想要在食品物质中提供增加的 IgA 水平或作为营养品的人来说，IgA:IgG 比率的增加具有重要的意义。之前未知在阳离子交换色谱洗脱物中 IgA 的存在和 IgA 与 IgG 的相对量（比率）。

因此，本发明的另一方面提供一种方法，其中所得的富集 IgA 的乳产品提取物组合物包含至少 1:8 的 IgA:IgG 比率，优选 1:4，更优选至少 1:2。

可进一步处理富集 IgA 的乳产品提取物组合物，以减少存在的非 IgA 蛋白质的量。这可通过膜过滤、柱色谱、透析或其它已知的方法实现。对于标准化的食品物质或营养品的生产而言，这些无关蛋白质的去除可以认为是重要的。

在本发明的另一方面中，提供富集 IgA 的乳产品提取物组合物，其中 IgA:IgG 的比率至少为 1:8，优选为 1:4，更优选为至少 1:2。

根据本发明的另一方面，提供通过本发明的方法得到的富集 IgA 的乳产品提取物组合物。此外，本发明的乳产品提取物可被用作食品物质或营养品，优选作为婴儿食品物质或营养品。

本发明的结果尤其令人惊奇，因为认为免疫球蛋白属于具有酸性等电点的一类蛋白质，因此不大可能保留在阳离子树脂上，或以与 IgG 相比优先结合 IgA 的方式保留在阳离子树脂上。

应当理解，本文描述的本发明不应当限于公开特征的具体实施例。

附图说明

图 2A-2C - 洗脱剂的盐浓度和流量对 IgA 洗脱的影响。

图 3A-3E - 与阳离子交换树脂接触的乳产品体积的影响。

图 4A-4C - 与阳离子交换树脂接触的脱脂乳产品体积的影响。

图 5A-5D - 流动相 pH 对洗脱的 IgA 组成的影响。

图 6A-6C - 来自乳清蛋白浓缩物(WPC)的 IgA 纯化。

图 7A-7E - 分离富集 IgA 的级分、乳铁传递蛋白和乳过氧化物酶的方法；流动相离子强度对不同级分中 IgA 的影响。

具体实施方式

以下是对制备本发明的富集 IgA 的级分的详细描述。

IgA 的合适来源可包括乳产品，例如来自哺乳动物例如人、牛、绵羊、山羊、母猪等的全乳、脱脂乳、乳清或初乳。在使乳产品与阳离子交换树脂接触以使 IgA 吸附时，乳产品的 pH 优选约为 6.5，尽管对于本发明不必调节乳产品的 pH。

用于使乳产品与阳离子交换树脂接触的流量可在大的范围内变化，

例如从 6-90 升每升树脂每小时 (线性流速 60-900 cm/h), 优选 6-70 升每升树脂每小时 (线性流速 60-700 cm/h), 更优选约 6-40 升每升树脂每小时 (线性流速 60-400 cm/h)。通过用于工业过程的成本有效性确定下限, 从而在非常低的流量下, 运行此方法的成本超过了回报。高流量适于 IgA 的纯化, 前提是树脂接触的乳产品的总量是有限的。

当大大超过树脂体积的乳产品体积适于纯化其它乳产品例如乳过氧化物酶和乳铁传递蛋白时, 如在澳大利亚专利 no. 613688 中所描述的, 本发明人已发现乳产品体积相对于树脂体积在 1000 级别上的柱体积 (升乳产品每升树脂) 不适合通过本发明的方法进行 IgA 的纯化。发明人发现, 乳产品体积相对于树脂体积超过约 400 的柱体积, 导致很少的 IgA 结合到树脂, 并且相对于起始原料中的 IgG, 回收的 IgA 不会富集。根据本发明, 在脱脂乳的情况下, 优选的上限为约 300 柱体积, 优选约 200 柱体积, 最优选约 34 柱体积。随着乳产品相对于树脂的比率增加, 结合的 IgA 的数量和洗脱的 IgA 的纯度逐渐降低。至于流量, 下限通过商业因素而非与柱相关的因素设定。如果装载的乳产品的体积下降大幅低于 16 柱体积, 则达到清洗和洗脱时间超过可纯化足够的 IgA 以使得此方法经济上可行的点。

在将乳产品装载到阳离子交换树脂的步骤之后, 且在用流动相洗脱 IgA 之前, 可通过用水或离子强度小于例如 0.0086M 氯化钠的缓冲液清洗柱来除去阳离子交换柱内的未结合的乳产品。

在洗脱吸附的 IgA 时, 使用由缓冲溶液组成的流动相, 所述缓冲溶液具有 0.086-0.4M 的氯化钠、氯化钾或等同的低离子强度。不限制在流动相中使用的盐的类型。随着离子强度增加超过 0.4, IgA 的纯度降低, 这是因为非 IgA 蛋白质开始洗脱, 因此其它蛋白质稀释了 IgA。优选地, 使用等同于或小于 0.35M 氯化钠的离子强度。

流动相可具有宽范围的 pH, 例如 4.5-9.0, 优选 5.5-7.5, 最优选约 6.5。在上限和下限处, 蛋白质稳定性和蛋白质与阳离子交换树脂结合的能力均受影响。5.5-7.5 的 pH 提供最高的 IgA 纯度, 同时不降低产率。

在本发明中, 适于吸附 IgA 的阳离子交换树脂的类型可包括例如为

Sepharose 阳离子交换树脂珠的树脂。例如, 分别含有磺丙基官能团和羧甲基基团的 SP Sepharose Big Beads 和 CM Sepharose 珠 (GE Healthcare 的产品) 是合适的。阳离子交换树脂珠的粒径优选在 45-300 μm 的范围内。根据本发明, 在 45-165 μm 范围内和在 100-300 μm 范围内的 SP Sepharose 珠都适合用于 IgA 的吸附和纯化。

可对富集 IgA 的乳产品提取物组合物进行的进一步处理之一是通过例如透析或超滤进行脱盐。可对富集 IgA 的乳产品提取物组合物进行的另一种处理是除去非 IgA 蛋白。可通过进一步的色谱法 (例如免疫吸附或体积排阻) 除去非 IgA 蛋白。

本发明的富集 IgA 的乳产品提取物组合物可用作食品物质或营养品, 优选用作婴儿食品物质或营养品。

可在分离中进行本发明的方法以制备富集 IgA 的乳产品提取物组合物, 或可以引入本发明的方法作为完整的分级方法的一部分, 在所述完整的分级方法中, 分级其它所需的乳产品提取物。

制备富集 IgA 的级分和贫 IgA 级分的方法

本发明一个优选的方法是用大于 45 μM (理想地为 90-300 μM) 的 SP (磺丙基) 琼脂糖凝胶装填 10 cm 高的柱。以 11 ml/分钟 (线性流速 331 cm/h 或 0.55 柱体积(CV)/分钟), 向柱中加入乳产品 (理想地为脱脂乳) 流直到上柱的乳的体积为装填到柱中的树脂体积的 134.6 倍。以 2.5 CV 的低离子强度 (<0.05% (0.0086M) NaCl 或等同物) 的缓冲液或 3.5 ml/分钟 (线性流速 147 cm/h 或 0.25 CV/分钟) 的水去除保留在柱中的乳 10 分钟。通过以 3.5 ml/分钟 (线性流速 102 cm/h 或 0.175 CV/分钟) 流过的阳离子溶液 20 分钟, 用 3.5 CV 的含有等于 1% (0.171 M) NaCl 的钠离子的 pH 6.5 的缓冲液, 将富集 IgA 的级分从柱中洗脱。排出弃去最初的 3 分钟(0.5 CV), 收集其后的 20 分钟(3.5 CV) 作为富集 IgA 的级分 (包括 3 分钟[0.5 CV] 与下一缓冲液应用时间的重叠, 即穿透时间)。通过以 3.5 ml/分钟 (线性流速 102 cm/h 或 0.175 CV/分钟) 流过的阳离子溶液 20 分钟, 用 3.5 CV 的含有等同于 8.75% (1.5M) NaCl 的钠离子的缓冲液, 将剩余的蛋白质 (贫 IgA 级分) 从柱中洗脱。排出弃去最初的 3 分钟(0.5

CV), 收集其后的 20 分钟(3.5 CV)作为贫 IgA 级分(包括 3 分钟[0.5 CV]与下一缓冲液应用时间的重叠, 即穿透时间)。通过超滤膜或等同物过滤回收的蛋白质级分以脱盐。对本领域的技术人员而言, 很清楚可将此 IgA 分级方法放大用于商业用途。

制备三种级分(富集 IgA 的级分、贫 IgA 的乳过氧化物酶和乳铁传递蛋白)的方法

本发明进一步优选的方法是用大于 $45\mu\text{M}$ (理想地为 $90\text{-}300\mu\text{M}$) 的 SP(磺丙基)琼脂糖凝胶装填 10 cm 高的柱。以 11 ml/分钟(线性流速 331 cm/h 或 0.55 CV/分钟)向柱中加入乳产品(优选地为脱脂乳)流直到上柱的乳的体积为装填到柱中的树脂体积的 134.6 倍。用 2.5 CV 的低离子强度 ($<0.008\text{M}$ 的 NaCl 或等同)的缓冲液或水以 3.5 ml/分钟(线性流速 147 cm/h 或 0.25 CV/分钟)去除保留在柱中的乳 10 分钟。通过以 3.5 ml/分钟(线性流速 102 cm/h 或 0.175 CV/分钟)流过阳离子溶液 20 分钟, 用 3.5 CV 的含有相当于 1% (0.171 M) NaCl 的钠离子的 pH 6.5 的缓冲液, 将富集 IgA 的级分从柱洗脱。排出弃去最初的 3 分钟(0.5 CV), 收集其后的 20 分钟(3.5 CV)作为富集 IgA 的级分(包括 3 分钟[0.5 CV]与下一缓冲液应用时间的重叠, 即穿透时间)。通过以 3.5 ml/分钟(线性流速 102 cm/h 或 0.175 CV/分钟)流过阳离子溶液 20 分钟, 用 3.5 CV 的含有相当于 2.5% w/v (0.43 M) 的 NaCl 的钠离子(尽管其它阳离子也将是适合的)的缓冲液, 将贫 IgA 的乳过氧化物酶级分从柱中洗脱。排出弃去最初的 3 分钟(0.5 CV), 收集其后的 20 分钟(3.5 CV)作为贫 IgA 的乳过氧化物酶级分(包括 3 分钟[0.5 CV]与下一缓冲液应用时间的重叠, 即穿透时间)。通过以 3.5 ml/分钟(线性流速 102 cm/h 或 0.175 CV/分钟)流过阳离子溶液 20 分钟, 用 3.5 CV 的含有相当于 8.75% (1.5 M) NaCl 的钠离子的缓冲液, 将乳铁传递蛋白级分从柱中洗脱。排出弃去最初的 3 分钟(0.5 CV), 收集其后的 20 分钟(3.5 CV)作为乳铁传递蛋白级分(包括 3 分钟[0.5 CV]与下一缓冲液应用时间的重叠, 即穿透时间)。通过超滤膜或等同物过滤回收的蛋白质级分以脱盐。对本领域的技术人员而言, 应当清楚可将此 IgA 分级方法放大用于商业用途。

以下通过参考实施例, 对本发明进行描述。

实施例 1: 由脱脂乳制备富集 IgA 的级分

在一个根据本发明优选的方法中, 在连续过程中以 22 升每升树脂每小时的流量将脱脂乳装载于每个床体积为 29.7 升的多个 SP Sepharose Big Beads 阳离子交换树脂柱中, 总共 134.6 柱体积。然后以低离子强度缓冲液(水)清洗柱, 并用由 0.3M NaCl 组成的 pH6.5 的流动相洗脱。收集洗脱的富含 IgA 的级分并透析以降低盐含量。通过 ELISA 分析洗脱级分的免疫球蛋白含量, 发现含有 4.7% w/w 的 IgA, 并且 IgA:IgG 的比率为约 1:2 (表 1)。然后可将分级的富集 IgA 的乳产品提取物组合物冻干并储存在 15°C 的稳定状态下。

表 1: 通过 ELISA 分析的各种动物产品中 IgA:IgG 的相对量

产品	IgG %w/w	IgA %w/w
牛血清 ¹	20.4	0.4
牛初乳 ²	46.4	5.4
IgG 级分 ³	41	5
乳清级分 (IgA 级分) ⁴	11	4.7

- 1) 未分级的牛血清样品。
- 2) 未分级的牛初乳样品。
- 3) 联用阴离子和阳离子交换色谱法的来自乳清的免疫球蛋白级分。
- 4) 使用本发明方法的来自乳清的免疫球蛋白级分。

实施例 2: 盐浓度和洗脱流量对 IgA 洗脱的影响

将强化 IgA 的 (IgA-spiked) 脱脂乳以 11 ml/分钟的流量通过用 90-300 μm SP Sepharose Big Beads (GE Healthcare) 装填的柱, 以使得树脂吸附脱脂乳中的含 IgA 的级分。总共 134.6 柱体积 (CV) 通过柱。去离子水以 5 ml/分钟的流量通过柱以清洗树脂, 然后含有 0.5、1、1.5、

2、2.5 或 8.75%NaCl 之一的 pH 6.5 的流动相以 2.4 或 5.0 ml/分钟的流量通过柱以洗脱含有 IgA 的级分。测定洗脱级分中的总蛋白质浓度 (图 2A), 洗脱级分中的 IgA 浓度 (图 2B) 和 IgA% (图 2C)。在离子强度大于 2% w/v NaCl 时, 从柱中洗脱的非 IgA 蛋白质洗脱物的量增加, 而没有洗脱额外的 IgA。当洗脱流量为 2.4 ml/分钟或 5 ml/分钟时, 在洗脱级分中的 IgA 浓度没有差别。

图 2A

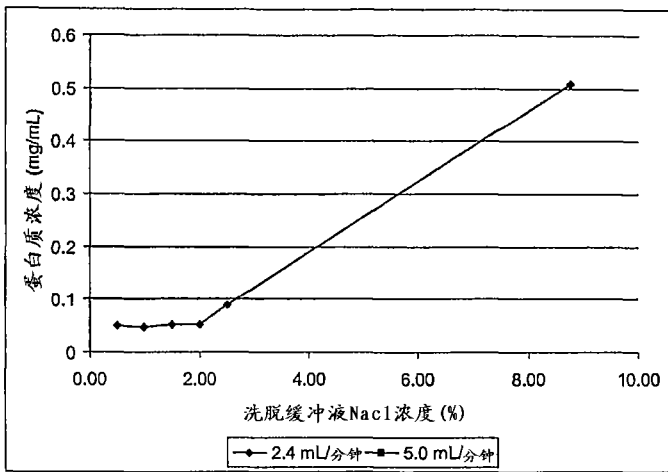


图 2B

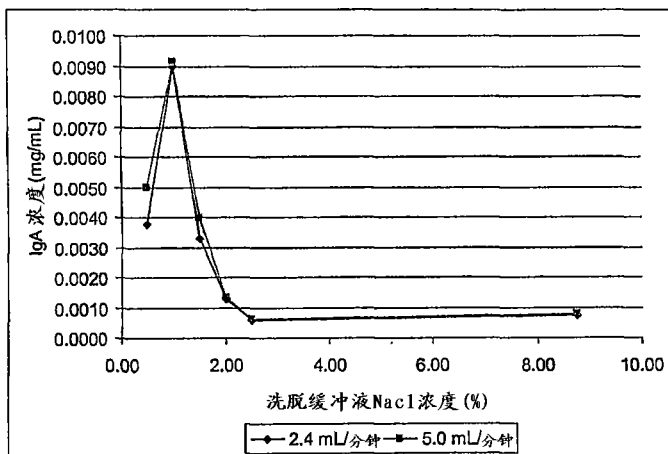
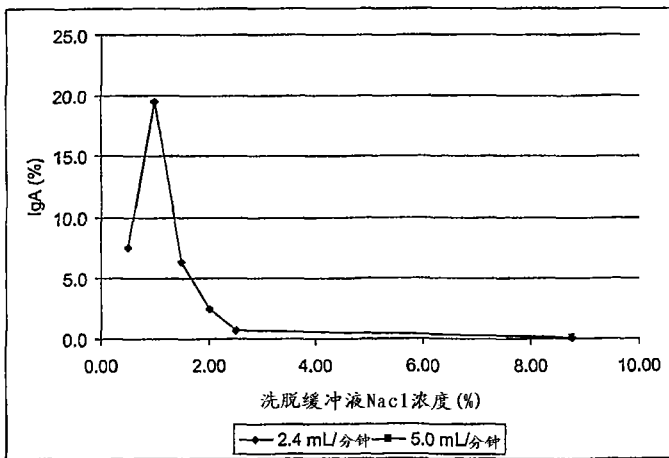


图 2C



实施例 3: 与阳离子交换树脂接触的乳产品体积的影响

将脱脂乳以 11 ml/分钟 的流量通过用 90-300 μm 的 SP Sepharose Big Beads (GE Healthcare) 装填的柱, 以使树脂从脱脂乳吸附蛋白质。增加通过的脱脂乳的量, 同时保持树脂的量不变。测试了相应于 33.6 (676 ml)、67.3 (1352 ml)、134.6 (2705 ml)、183.0 (3678 ml) 以及 231.5 (4652 ml) CV 的五种体积的脱脂乳。去离子水以 5 ml/分钟 的流量通过柱以清洗树脂, 然后含有 8.75% (1.5M) NaCl 的 pH 6.5 的流动相以 3.5 ml/分钟 的流量通过柱, 以洗脱吸附于树脂的总蛋白质。测定相对于总回收蛋白质的洗脱级分中 IgA 和 IgG 的量。随着脱脂乳的体积增加, 作为 IgA 洗脱的总蛋白质的比例下降 (图 3A 和图 3B)。随着脱脂乳体积的增加, 回收的 IgA 的纯度降低 (图 3C)。此外, 随着脱脂乳体积的增加, 以总蛋白质百分数的回收 IgG 的量降低 (图 3D), 尽管 IgA:IgG 的比率保持在 1:1.58 ~ 1:1.71 之间 (图 3E)。这些数据表明当通过树脂的乳产品的量增加时, IgA 的量及以总蛋白质比例的 IgA 降低, 但仍得到了高的 IgA:IgG 比率, 反映出 IgA 和 IgG 的产率均成比例降低。

图 3A

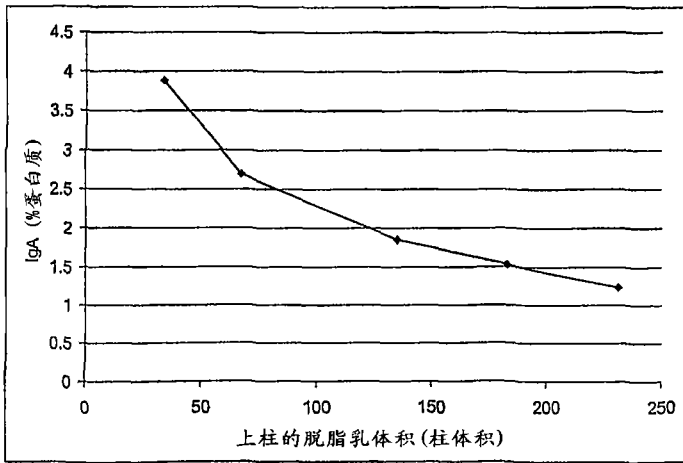


图 3B

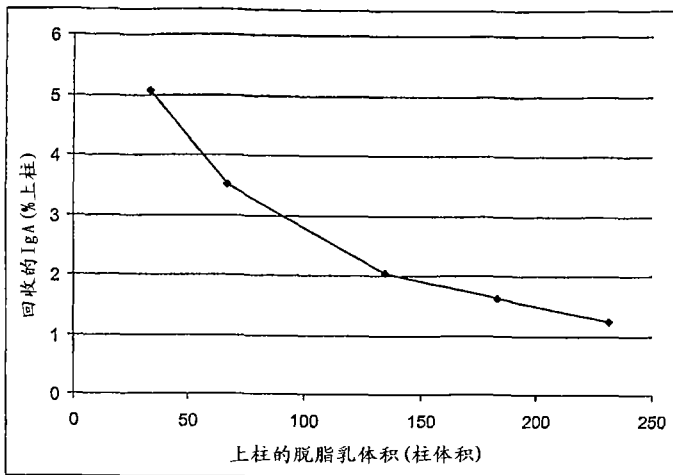


图 3C

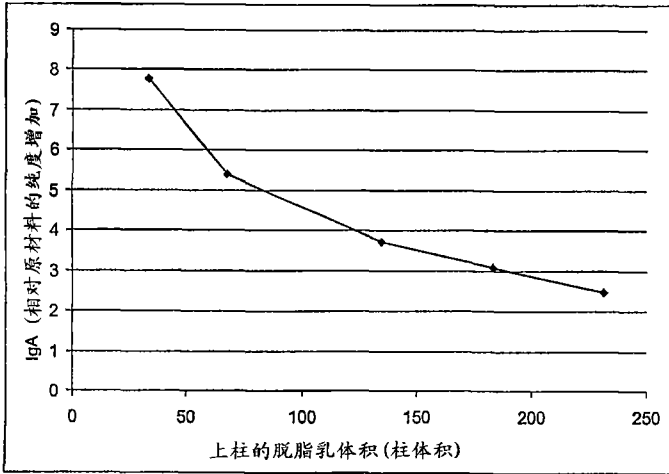


图 3D

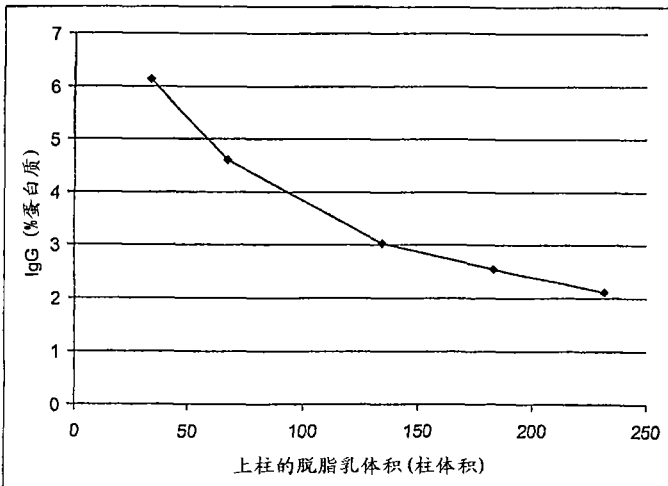
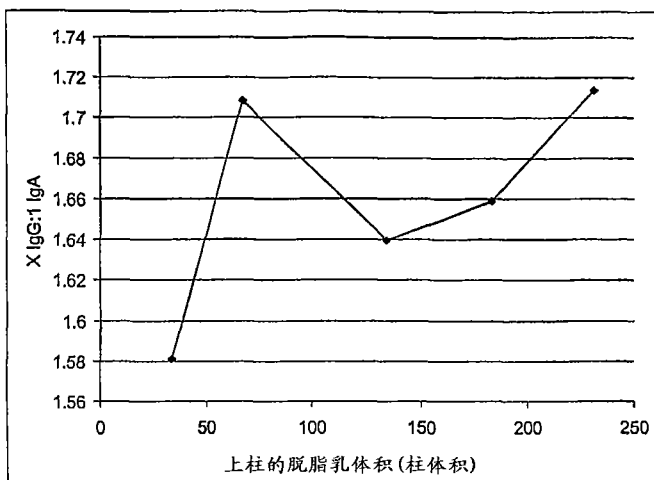


图 3E



实施例 4: 与阳离子交换树脂接触的脱脂乳产品的体积的影响

将脱脂乳以 11 ml/分钟 的流量通过用 90-300 μm 的 SP Sepharose Big Beads (GE Healthcare) 装填的柱, 以使树脂从脱脂乳吸附蛋白质。增加通过的脱脂乳的量而保持树脂的量不变。测试了相应于 16.8 (338 ml)、33.6 (676 ml)、67.3 (1352 ml) 和 100.9 (2028 ml) CV 的五个体积的脱脂乳。去离子水以 5 ml/分钟 的流量通过柱以清洗树脂, 用含有 0.192M Na^+ (0.84% 正磷酸氢二钠+0.89% NaCl (pH 6.5)) 的流动相以 3.5 ml/分钟 的流量洗脱富集 IgA 的级分, 然后含有 8.75% (1.5M) NaCl 的 pH 6.5 的流动相以 3.5 ml/分钟 的流量通过柱, 以洗脱剩余的吸附于树脂的蛋白质。测定相对于总回收蛋白质的洗脱级分中 IgA 和 IgG 的量。随着脱脂乳的体积增加, 作为 IgA 洗脱的总蛋白质的比例下降 (图 4A 和图 4B)。增加上柱的脱脂乳的体积, 则加入的 IgA 的回收率降低。随着上柱的脱脂乳体积的增加, IgA:IgG 的比率保持约 1:2 (图 4C)。

图 4A

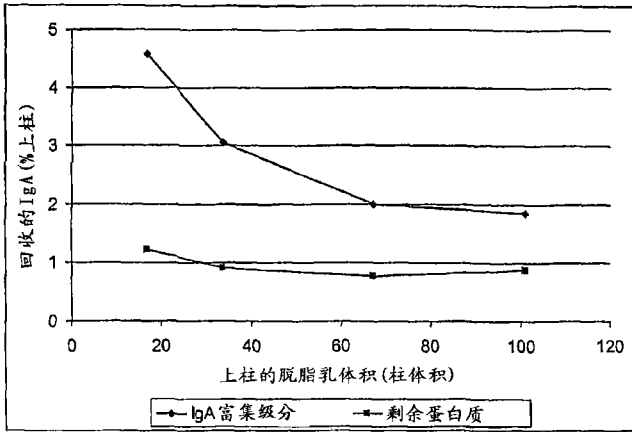


图 4B

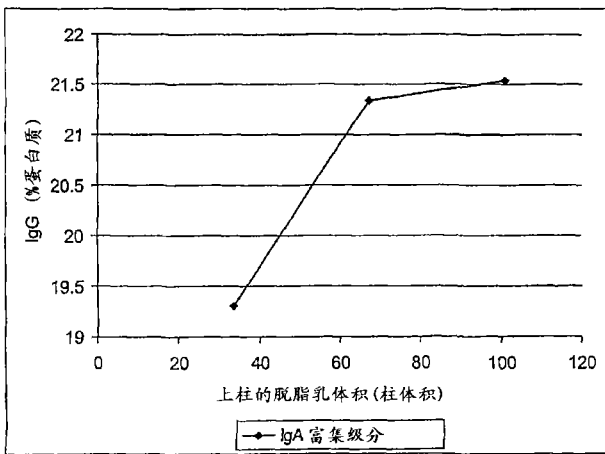
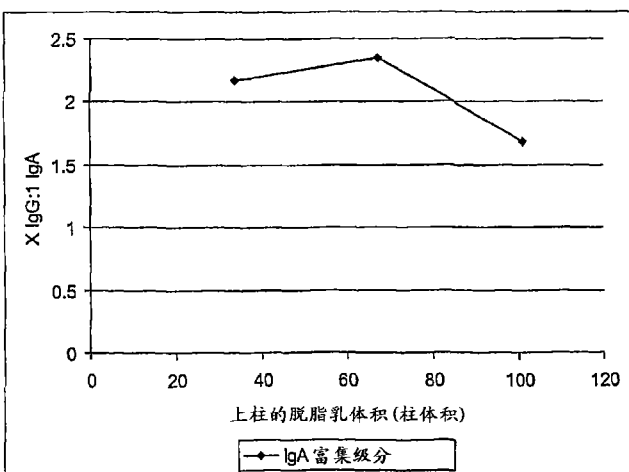


图 4C



实施例 5: 流动相 pH 对洗脱的 IgA 组成的影响

将脱脂乳以 11 ml/分钟的流量通过用 90-300 μm 的 SP Sepharose Big Beads (GE Healthcare) 装填的柱, 以使树脂吸附脱脂乳的含有 IgA 的级分。通过柱的脱脂乳的体积为 33.6 CV。去离子水以 5 ml/分钟的流量通过柱以清洗树脂, 然后离子强度等于 1.125% (0.19M) NaCl 的 pH 为 5.5、6.5、7.5、8.5 或 9.5 的流动相以 3.5 ml/分钟的流量通过柱, 以洗脱含有 IgA 的级分, 然后含有 8.75% (1.5M) NaCl 的 pH 6.5 的流动相以 3.5 ml/分钟的流量通过柱, 以洗脱剩余的吸附于树脂的蛋白质。测定洗脱级分中的总蛋白质浓度 (图 5A)、洗脱级分中 IgA 浓度 (图 5B)、IgA% (图 5C), 以及相对于起始乳产品的 IgA 纯度增加 (图 5D)。随着 pH 增大超过 6.5, 从柱洗脱的非 IgA 蛋白质的量增加, 没有洗脱额外的 IgA。此外, 洗脱级分中的 IgA% 随着 pH 的增加而降低, 当 pH 为 6.5 时, IgA% 为 18%, 当 pH 为 9.5 时, IgA% 下降到约 10%, 在 pH 大于 6.5 时 IgA 级分的纯度也降低。在 pH 为 5.5、6.5、7.5、8.5 和 9.5 时, IgA:IgG 的比率分别为 >1:1.5、>1:1.4、>1:1.5、>1:1.4 以及 >1:1.4。

图 5A

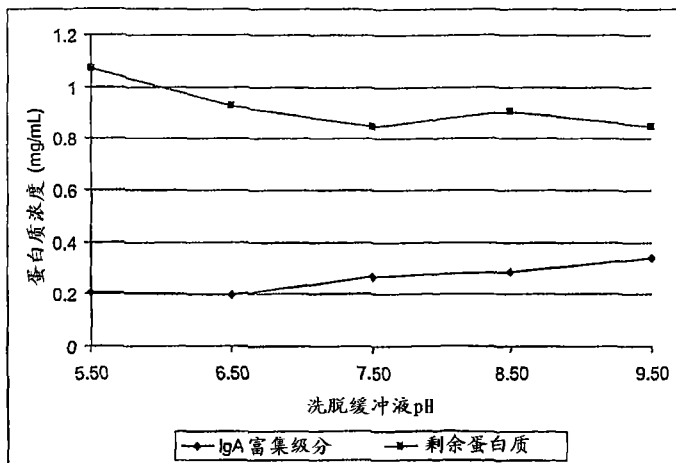


图 5B

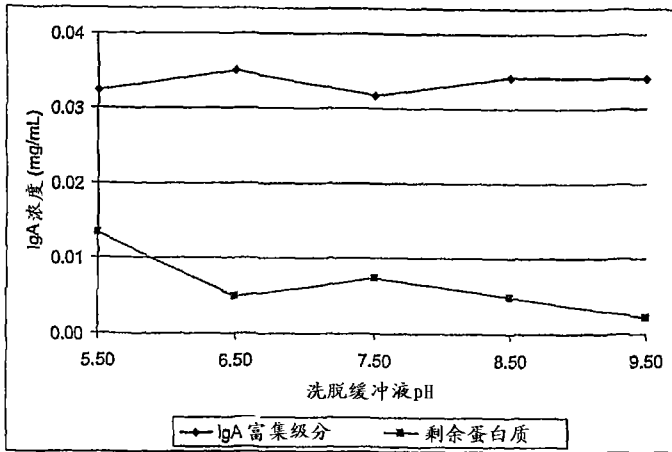


图 5C

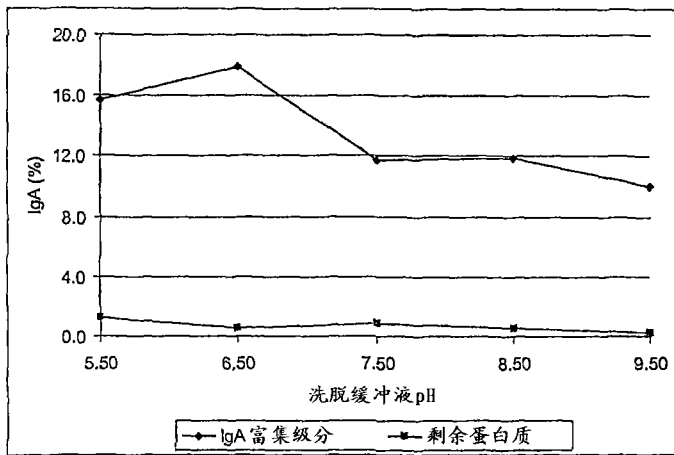
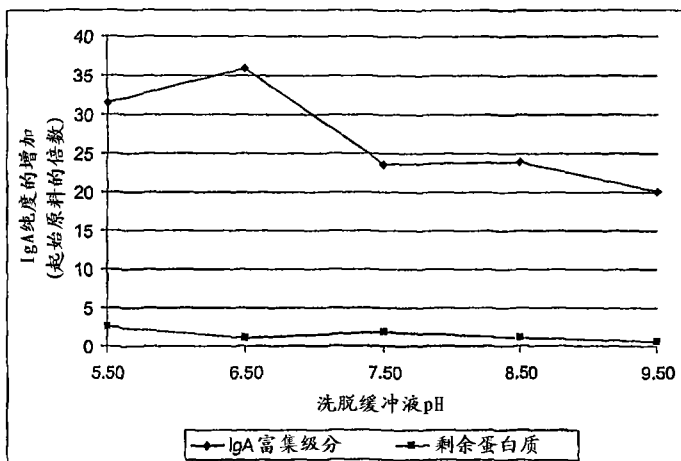


图 5D



实施例 6: 从乳清蛋白浓缩物(WPC)纯化 IgA

乳清蛋白浓缩物(WPC)以 11 ml/分钟的流量通过用 90-300 μm 的 SP Sepharose Big Beads (GE Healthcare)装填的柱, 以使得树脂从 WPC 吸附蛋白质。增加通过的 WPC 的量, 而保持树脂的量。相应于 25 (500 ml)、50 (1000 ml)、75 (1500 ml)和 100 (2000 ml) CV 的四个 WPC 体积通过柱。去离子水以 5 ml/分钟的流量通过柱以清洗树脂, 然后离子强度等于 1.125% (0.19M) NaCl 的 pH 7.5 的流动相以 3.5 ml/分钟的流量通过柱以洗脱含有 IgA 的级分, 然后含有 8.75% (1.5M) NaCl 的非缓冲的流动相以 3.5 ml/分钟的流量通过柱, 以洗脱剩余的吸附于树脂的蛋白质。测定相对于回收的总蛋白质的洗脱级分中的 IgA 和 IgG 的量。随着 WPC 体积的增加, 作为 IgA 洗脱的总蛋白质的比例降低(图 6A)。随着 WPC 上柱量的增加, 得到更少的 IgA(%蛋白质) (图 6B), 但 IgA 总量更多(图 6C)。相应于 25、50、75 和 100 CV 的 WPC 体积, 分别得到 1:2.59、1:2.76、1:2.471 和 1:2.61 的 IgA:IgG 比率。

图 6A

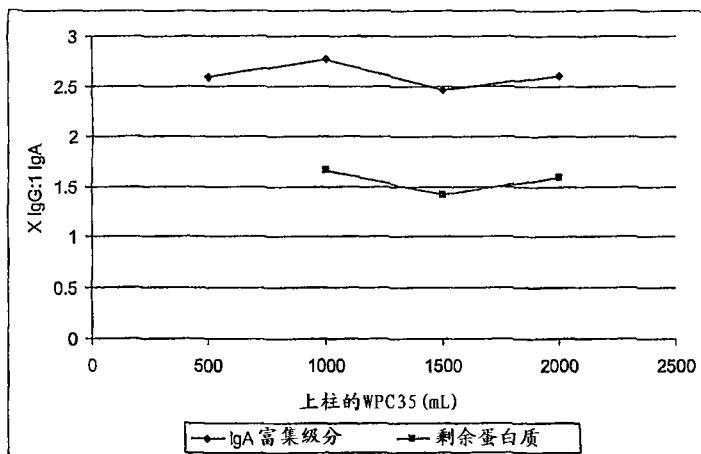


图 6B

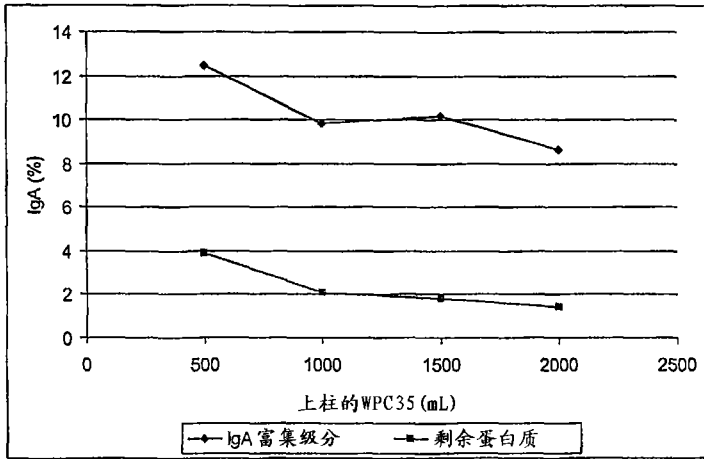
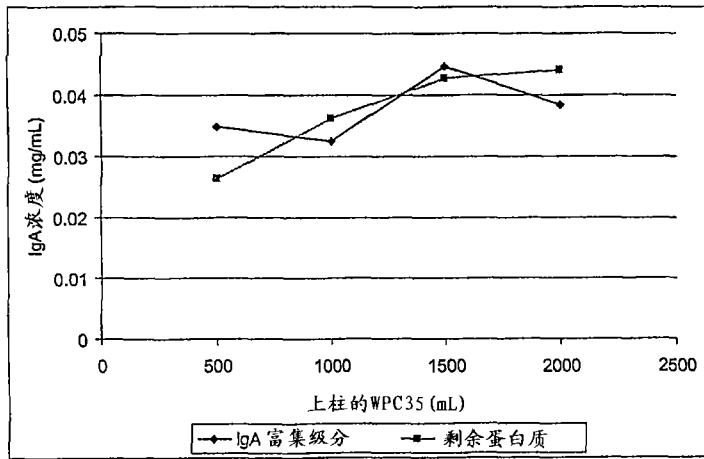


图 6C



实施例 7: 分离富集 IgA 的级分、乳铁传递蛋白和乳过氧化物酶的方法;
流动相离子强度对不同级分中 IgA 的影响

脱乳脂(134.6 CV)以 11 ml/分钟流量通过用 90-300 μm 的 SP Sepharose Big Beads (GE Healthcare)装填的柱以使树脂从脱乳脂中吸附蛋白质。将保留于柱中的乳用 2.5 CV 的去离子水以 5 ml/分钟 (线性流速 147 cm/h 或 0.25 CV/分钟) 去除 10 分钟。通过使流动相以 3.5 ml/分钟 (线性流速 102 cm/h 或 0.175 CV/分钟) 流动 20 分钟, 用 3.5 CV 的 pH 6.5 的缓冲液从柱中洗脱富集 IgA 的级分, 所述缓冲液含有 0.04M 正磷酸氢二钠和 NaCl 以提供等于 1% w/v (0.171 M)NaCl 或 1.125%

(0.193M) w/v NaCl 的钠离子。排出弃去最初的 3 分钟(0.5 CV)，收集其后的 20 分钟(3.5 CV)作为富集 IgA 的级分（包括 3 分钟[0.5 CV]的与下一缓冲液应用时间的重叠，即穿透时间）。通过使阳离子溶液以 3.5 ml/分钟（线性流速 102 cm/h 或 0.175 CV/分钟）流动 20 分钟，用 3.5 CV 的含有等于 2.5% w/v (0.43 M) NaCl 的钠离子的 pH 6.5 的缓冲液，从柱中洗脱第二级分—贫 IgA 的乳过氧化物酶。排出弃去最初的 3 分钟(0.5 CV)，收集其后的 20 分钟(3.5 CV)作为贫 IgA 的乳过氧化物酶级分（包括 3 分钟[0.5 CV]与下一缓冲液应用时间的重叠，即穿透时间）。通过使阳离子溶液以 3.5 ml/分钟（线性流速 102 cm/h 或 0.175 CV/分钟）流动 20 分钟，用 3.5 CV 的含有等于 8.75% w/v (1.5 M) NaCl 的钠离子的 pH 6.5 的缓冲液，从柱中洗脱乳铁传递蛋白级分。排出弃去最初的 3 分钟(0.5 CV)，收集其后的 20 分钟(3.5 CV)作为乳铁传递蛋白级分（包括 3 分钟[0.5 CV]与下一缓冲液应用时间的重叠，即穿透时间）。测定回收的蛋白质级分的 IgA、IgG 和生长因子 IGF1 的含量。

相对于 1% w/v 的 NaCl，用 1.125% w/v 的 NaCl 洗脱，增加了富集 IgA 的级分中的 IgA 的量并大幅降低了存在于随后级分（乳过氧化物酶和乳铁传递蛋白）中 IgA 的量（图 7A、图 7B）。此外，通过用 1.125% w/v 的 NaCl 洗脱，富集 IgA 的级分中的 IgG 的量减少了 50%（图 7C）。通过在更高 NaCl 浓度下洗脱，IgA:IgG 的比率也大幅提高（图 7D）。用 0.172M NaCl 和 0.193M NaCl 洗脱 IgA，分别得到具有 1:2.01 和 1:0.92 的 IgA:IgG 比率的级分。

有利的是在富集 IgA 的级分中没有 IGF1（图 7E）。在富集 IgA 的级分中发现很少的乳过氧化物酶（在 0.172M 和 0.193M 的 NaCl 下均 <0.005 %w/v），并且在乳铁传递蛋白级分中发现很少的乳过氧化物酶（在 0.172M 和 0.193M 的 NaCl 下均 <0.005 %w/v），但在乳过氧化物酶级分中发现了大量的乳过氧化物酶（在 0.172M NaCl 时为 0.074 %w/v，在 0.193M NaCl 时为 0.073 %w/v）。在富集 IgA 的级分中发现很少的乳铁传递蛋白（在 0.172M NaCl 时为 0.02 mg/ml，在 0.193M NaCl 时为 0.06 mg/ml），并且在乳过氧化物酶级分中发现很少的乳铁传递蛋白（在 0.172M NaCl 时为 0.01 mg/ml，在 0.193M NaCl 时为 0.03 mg/ml），但在乳铁传递蛋白级分中发现

了大量的乳铁传递蛋白(在 0.172M 的 NaCl 和 0.193M 的 NaCl 时均为 3.0 %w/v)。

图 7A

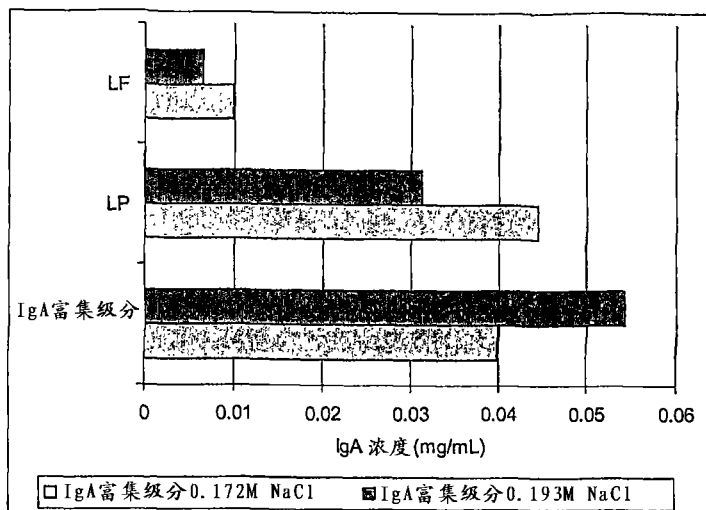


图 7B

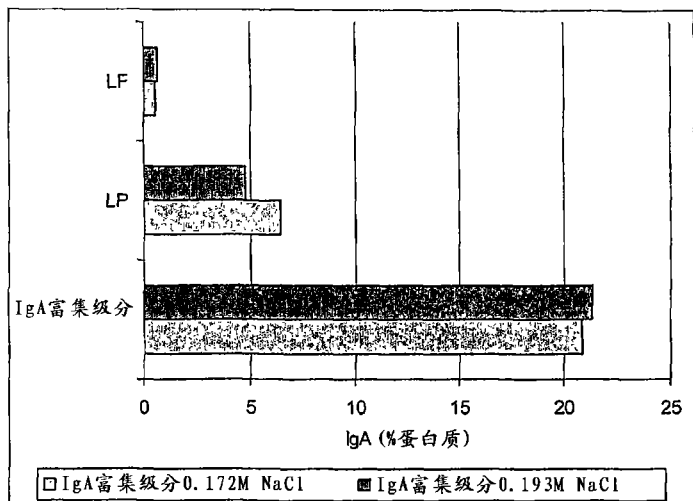


图 7C

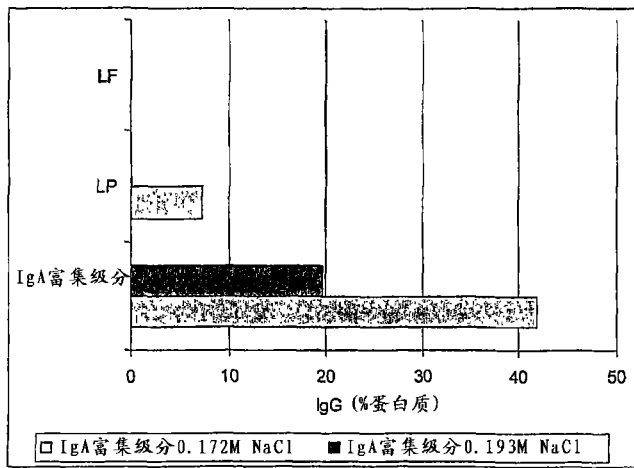


图 7D

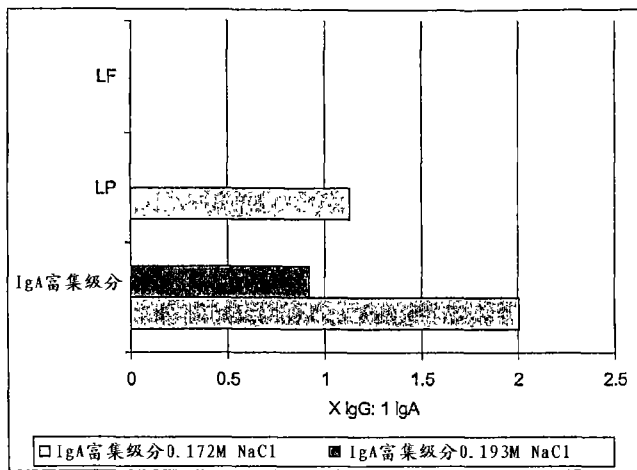


图 7E

