

(19) DANMARK



PATENTDIREKTORATET
TAASTRUP

(12) FREMLÆGGELSESSKRIFT



(11) 158384 B

(21) Patentansøgning nr.: 2167/82

(51) Int.Cl.⁵

C 07 K 3/20

(22) Indleveringsdag: 13 maj 1982

A 61 K 39/395

(41) Alm. tilgængelig: 16 nov 1982

(44) Fremlagt: 14 maj 1990

(86) International ansøgning nr.: -

(30) Prioritet: 15 maj 1981 FR 8109740

(71) Ansøger: SOCIETE *NATIONALE ELF AQUITAINE; Tour Aquitaine; 92400 Courbevoie, FR

(72) Opfinder: Andre *Peyrouset; FR, Francois *Spring; FR

(74) Fuldmægtig: Ingeniørfirmaet Lehmann & Ree

(54) **Fremgangsmåde til ekstraktion af lactoferrin og immunoglobulin fra en væske hidrørende fra mælk**

(56) Fremdragne publikationer

DK ans. nr. 3891/76

(57) Sammendrag:

2167-82

Fra et vandigt miljø hidrørende fra mælk, der i alt væsentlig er udtømt for casein, ekstraheres proteiner, navnlig lactoferrin og immunoglobuliner, ved adsorption på et fast bæremateriale i et svagt basisk miljø med en pH-værdi på over 7,5, fortrinsvis mellem 7,7 og 8,8 og mest fortrinsvis mellem 7,9 og 8,5. De adsorberede proteiner elueres med en sur opløsning, hvis pH-værdi fortrinsvis ligger under ca. 4.

Den ved elueringen opnåede opløsning indeholder mere end 50% lactoferrin, og resten af proteinerne er i alt væsentlig immunoglobuliner.

DK 158384 B

Opfindelsen angår en fremgangsmåde til ekstraktion af lactoferrin og immunoglobulin fra en væske hidrørende fra mælk, hvilken væske i alt væsentligt er udtømt for casein, ved hvilken fremgangsmåde proteinerne adsorberes på et fast bæreremateriale, hvorefter de adsorberede proteiner elueres med en sur opløsning.

De forskellige proteiner, der foruden casein findes i pattedyrs mælk, har tiltrukket talrige industriens og forskeres opmærksomhed. Ligeledes har det arbejde, som man har foretaget med henblik på separation af de forskellige proteiner, navnlig de proteiner, som befinder sig i vollen, dvs. i lactoserum, efter separation af casein, tiltrukket sig opmærksomhed. Blandt meget interessante stoffer, der tilhører denne kategori, er α -lactalbumin, transferrin, lactoferrin, lysozym, serumalbumin, immunoglobuliner osv. Lactoferrinet har farmakologisk interesse: man ved, at dette protein, som fixerer jern, udgør en vigtig beskyttelse mod forskellige bakterieinfektioner. Denne betydning forklares netop ved dette proteins chelaterende virkning overfor jern, hvorved dette element fjernes fra miljøet, hvilket således forhindrer udviklingen af bakterier, for hvilke dette element er absolut nødvendigt. Denne bakteriostatiske egenskab udgør klart en vigtig fordel. Hvad angår immunoglobulinerne IgA, IgM og IgG stiger deres betydning hver dag med den fantastiske udvikling af immunologien. Man kender andetsteds fra nytten og anvendelsen af lactalbuminer, serumalbumin, lysozym og visse andre proteiner og ligeledes proteiner, der fikserer vitaminet B₁₂ eller ceruloplasmin, som har den egenskab at kombinere med kobber. Man forstår, at der har været udført arbejder med henblik på separationen af forskellige proteiner hidrørende fra mælkeprodukter og navnlig fra valle, som indeholder proteinerne i opløst tilstand og som almindeligvis udgør et restprodukt i mælkeindustrien. Den største del af de anvendte fremgangsmåder er baseret på anvendelsen af ionbyttere eller på kromatografi på Sephadex ved pH-værdier, som ikke overstiger 7, og som oftest er under 6,3. En sådan fremgangsmåde omtales f.eks. i beskrivelserne til US patenterne nr. 3.234.199 og nr. 3.969.337. Man har ligeledes anvendt elektroforese eller præcipitation via salte og centrifugering, denne sidste metode er blevet beskrevet af Montreuil og Mullet C.R. 250, 1736-7 (1960). Senere er arbejdet til separation af proteiner fra mælk blevet omtalt i beskrivelsen til FR patenter nr. 2.390.906 og nr.

2.399.214, hvor alle andre proteiner end casein først ekstraheres med en harpiksanionbytter og dernæst med silicium, eller omvendt; ekstraktionen finder sted ved en pH-værdi mellem 4 og 7,5.

5 Selv om de forskellige kendte fremgangsmåder egner sig godt til separationen af proteiner, såsom lactalbuminer eller serumalbumin, gør ingen af disse metoder det muligt på effektiv og praktisk måde at opnå proteiner, som fikserer jern, dvs. transferriner og lactoferriner. Skønt lactoserum er et lidet dyrt materiale, indeholder
10 det kun ca. 6,5 g proteiner pr. liter, hvorefter en lille del er lactoferriner: man skal derfor behandle meget store volumener af dette udgangsmateriale for at ekstrahere en lille vægt del af interessante proteiner. Det er derfor vigtigt at have en fremgangsmåde, der gør det muligt at gennemføre denne ekstraktion med et så godt
15 udbytte som muligt. Det er dette formål, der opnås med den foreliggende opfindelse. Den nye fremgangsmåde ifølge opfindelsen angår navnlig udvindingen af ferrochelaterende proteiner, navnlig lactoferrin og transferrin, og desuden immunoglobulinerne fra mælkeserum, der bliver tilbage efter separation af casein.

20 I den efterfølgende del af beskrivelsen omtales af forenklingssyn kun lactoferrin, men det skal forstås, at dette udtryk også omfatter transferrin og eventuelt andre ferrochelaterende proteiner af samme type, som kan forekomme i mælk fra forskellige pattedyr.

25 Fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse er et resultat af påvisningen af, at i modsætning til den kendte teknik foregår separationen ved adsorption af de ovenfor anførte proteiner bedst i et svagt basisk miljø.

30 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen med de indledningsvis angivne karakteristika er således ejendommelig ved, at adsorptionen finder sted i et svagt basisk miljø ved en pH-værdi over 7,5, og at elueringen efterfølges af en behandling med en basisk opløsning, og at
35 de herved frigjorte immunoglobuliner og lactoferrin indvindes. Miljøets pH-værdi ligger fortrinsvis mellem 7,7 og 8,8 og mere fortrinsvis mellem 7,9 og 8,5.

Det miljø, der skal behandles ifølge den foreliggende opfindelse,

kan bestå af en vandig væske omfattende de forskellige mælkeproteiner, befriet for i det mindste hovedparten af casein; den mest praktiske kilde er valle, evt. koncentreret eller allerede behandlet til ekstraktion af andre proteiner end lactoferrin.

5

Efter adsorptionen i svagt basisk miljø og eliminering af væsken, der flyder ovenpå, elueres de proteiner, der er bundet til adsorbenset, ved at sænke pH-værdien til under 7 og fortrinsvis til omkring 4; en foretrukket udførelsesform omfatter udnyttelse af et surt elueringsmiddel, hvis ionstyrke er blevet forøget ved tilsætning af et opløseligt salt.

10

Som adsorbens kan man med fordel anvende kisel med et gramoverfladeareal på fra 5 til 150 m²/g, repræsenterende en porediameter på fra 25 til 250 nm (250 til 2500 Å). Kiselen kan anvendes i pulverform med tilstrækkelig stor kornstørrelse, f.eks. mellem 5 µm og 5 mm. Til anvendelse i en søjle foretrækkes det at anvende sfæriske kugler med en diameter af en størrelsesorden på fra 10 til 500 µm.

15

Skønt kisel udgør et udmærket bærer materiale til præferentiel binding af lactoferrin kan andre bærer materialer anvendes, navnlig forskellige naturlige eller syntetiske silicater, såsom bentonit såvel som aktiveret aluminiumoxid.

20

Bindingen i et svagt basisk miljø giver den fordel, at der er en stor selektivitet overfor lactoferrin, som kun ledsages af en del af immunoglobulinerne. De andre proteiner, navnlig lactalbuminer, lactoglobuliner, serumalbumin og resten af immunoglobulinerne bliver tilbage i opløsning i den væske, der flyder ovenpå.

25

30

Efter udvindingen af lactoferrin'et og immunoglobulinerne bringes bærer materialet, navnlig kiselen, i kontakt med en svagt basisk opløsning med f.eks. en pH-værdi på fra 8 til 9, hvilket gør den egnet til at blive anvendt til en ny ekstraktion fra et mælkeprodukt. Det fremgår, at fremgangsmåden ifølge opfindelsen er meget mere simpel end de kendte fremgangsmåder; i forhold til de ovenfor omtalte FR patentskrifter er det således tilstrækkeligt med ét mineralsk bærer materiale i stedet for 2 bærer materialer, hvoraf det ene er en ionbytter. Desuden finder bindingen sted i et basisk miljø

35

i stedet for at blive udført ved pH-værdier under 7,5 og navnlig under 7, som det er tilfældet med alle de tidligere metoder.

5 Efter eluering af bærer materialet med en sur opløsning vaskes dette bærer materiale i en variation af fremgangsmåden ifølge opfindelsen med en basisk opløsning, hvilket tillader ekstraktion af immu-
noglobulinfraktionen, som ikke er blevet elueret i surt miljø; i
dette tilfælde kan den basiske opløsning også gøre det muligt at
10 udvinde en rest af lactoferrin. Vasken i denne udførelsesform kan udføres ved f.eks. en pH-værdi mellem 8 og 10. Et kiselbærer materi-
ales kapacitet overfor lactoferrin påvirkes imidlertid ikke af en
sådan vask; vasken kan derfor udelades, når man kun forsøger at
ekstrahere lactoferrin.

15 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan anvendes på lactoserum, lige meget hvilken elimineringsmåde af casein, som har ført til denne lactoserum: med andre ord ligegyldigt om caseinet er blevet præcipi-
teret ved forsyning af den oprindelige mælk eller ved indvirkning
af et enzym. Fremgangsmåden kan anvendes på valle som sådan, såvel
20 som på væsker, der er opnået ved at opløse faste stoffer fra lacto-
serum, opnået på kendt måde, f.eks. ved ultrafiltrering eller
tørring.

25 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan anvendes til ekstraktion af lactoferriner fra forskellige mælkekilder, navnlig mælk fra får eller køer såvel som human mælk. Da de førstnævnte indeholder meget
mindre lactoferrin end den anden, er behandlingen af dem mindre
effektiv med de kendte metoder, og det er her, at anvendelsen af
fremgangsmåden ifølge opfindelsen gør sig specielt bemærket.

30 Fremgangsmåden ifølge opfindelsen kan udføres under de betingelser, der er beskrevet af Gordon, Ziegler & Basch, Biochem. Biophys. Acta 60, 410-411 (1962): i denne variation udføres bindingen til et
adsorberende materiale i svagt basisk miljø med en væske omfattende
35 lactoferinet, til hvilket man i forvejen har tilsat en jernforbin-
delse på en sådan måde, at det tilstedeværende lactoferrin mættes.

Ekstraktionsprocenten af lactoferrin er forøget ved fremgangsmåden ifølge den foreliggende opfindelse. Hvad angår sammensætningen af de

proteiner, der opnås ved denne fremgangsmåde, efter elueringen fra det adsorberende materiale ved hjælp af en sur opløsning, omfatter den mere end 50% lactoferrin, idet resten hovedsagelig udgøres af immunoglobuliner. Renheden af lactoferrinet, der hovedsageligt anvendes som bakterostatisk middel, er helt tilfredsstillende, og det er ikke nødvendigt at adskille det fra immunoglobulinerne; det har faktisk in vitro vist sig, at lactoferrins evne til at inhibere væksten af patogene bakterier forøges med tilstedeværelsen af immunoglobuliner.

I de industrielt vigtige tilfælde, hvor bærer materialet består af kisel, finder man en kapacitet overfor lactoferrin på mere end 20 mg pr. g kisel, hvilket fuldstændigt berettiger den industrielle anvendelse af fremgangsmåden ifølge opfindelsen.

Ved de betingelser, der hersker under fremgangsmåden ifølge opfindelsen, undergår de immunoglobuliner, som ledsager lactoferrinet, ingen denaturering, og kan derfor anvendes i den farmaceutiske industri og den veterinære industri, eftersom de bibeholder alle deres egenskaber.

De forskellige proteiner, som kan separeres med fremgangsmåden ifølge opfindelsen, kan identificeres med kendte metoder, og navnlig de metoder, der er blevet beskrevet af J. Garnier i Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys. 1964, 4 (2) 163-187. De efterfølgende eksempler illustrerer den foreliggende opfindelse.

EKSEMPEL 1

I en søjle med en indre diameter på 1 cm anbragtes 5 g kiselkorn med en kornstørrelse på fra 100 til 200 μm ; denne kisel havde et gram-overfladeareal på 20 m^2/g og en porediameter på 80 nm. Kiselen vaskedes med en 0,005M dinatriumphosphatopløsning Na_2HPO_4 . I en liter af denne phosphatopløsning opløstes 10 g af et pulver opnået ved tørring af det opsamlede faste materiale (resten) ved ultracentrifugeringen af en lactoserum; dette pulver indeholdt 6,5 g proteiner. pH-Værdien af den opnåede opløsning indstilledes til 8,2. Opløsningen førtes derefter gennem kisel materialet i den ovenfor anførte søjle med en hastighed på 60 ml/time; søjlen vaskedes

derefter med en 0,005 M dinatriumphosphatopløsning med en pH-værdi på 8,2 for at fjerne alle de proteiner, der ikke er bundet til kiselen. Den bundne lactoferrin elueres derefter med en 0,1 N eddikesyreopløsning tilsat NaCl til en koncentration på 0,5 M. Der opnåedes således en fraktion på 25 ml af en rosafarvet væske indeholdende 40 mg proteiner omfattende 66% lactoferrin, idet resten er immunoglobuliner. Efter en vask af kiselmateriale ved en passage af en opløsning af 0,005 M dinatriumphosphatopløsning er søjlen parat til en ny adsorptionscyklus.

EKSEMPEL 2

På lignende måde som i eksempel 1 vaskedes søjlens materiale med en stødpufferopløsning af tris-HCl, pH-9, tilsat 0,5 M NaCl efter eluering med eddikesyre og udvinding af lactoferrinfraktionen. Dette gav en ny 20 ml fraktion indeholdende 30 mg proteiner, som hovedsageligt bestod af immunoglobuliner, lactoperoxidase og en meget lille mængde lactoferrin. Efter vask af kiselaterialet i søjlen med en 0,005 M dinatriumphosphatopløsning var søjlen påny parat til brug.

EKSEMPEL 3

Den i eksempel 1 anvendte fremgangsmåde gentoges, men lactoferrinkilden var 1 liter valle, der direkte er opnået ved fremstilling af ost, denne væske tilsattes uden koncentrering 0,005 M dinatriumphosphatopløsning pr. liter. Der opnåedes samme resultater som i eksempel 1.

EKSEMPEL 4

Den alkaliske vask i eksempel 2 anvendtes ved en fremgangsmåde, hvor der anvendtes valle ifølge eksempel 3. Dette førte til lignende resultater som i eksempel 2.

EKSEMPEL 5

Den i eksempel 1 anvendte fremgangsmåde blev gentaget under anvendelse af 6,5 g bentonit, der forudgående var blevet behandlet med

5 en vandig N HCl-opløsning, derpå vasket med destilleret vand og tørret. Denne bentonit, som erstatter de 5 g kisel i eksempel 1, har en kornstørrelse på fra 85 til 220 μm . Phosphatopløsningen, som omfatter 10 g faststof af lactoserumekstrakt per liter, blev justeret til pH 8,4 før den førtes gennem bentonitten med henblik på adsorption. Eluering med syre gav en proteinfraktion omfattende 53% lactoferrin.

EKSEMPEL 6

10

Fremgangsmåden ifølge eksempel 1 blev gentaget, idet kisen blev erstattet med 5 g aktiveret aluminiumoxid med en kornstørrelse på fra 105 til 250 μm . Opløsningen, der underkastedes adsorption, havde et pH på 8,06. Efter adsorption til aluminiumet gav syreeluering en proteinfraktion omfattende 57% lactoferrin.

15

20

25

30

35

P a t e n t k r a v

1. Fremgangsmåde til ekstraktion af lactoferrin og immunoglobulin fra en væske hidrørende fra mælk, hvilken væske i alt væsentligt er udtømt for casein, ved hvilken fremgangsmåde proteinerne adsorberes på et fast bæremateriale, hvorefter de adsorbere proteiner elueres med en sur opløsning, k e n d e t e g n e t ved, at adsorptionen finder sted i et svagt basisk miljø ved en pH-værdi over 7,5, og at elueringen efterfølges af en behandling med en basisk opløsning, og at de herved frigjorte immunoglobuliner og lactoferrin indvindes.
2. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at pH-værdien i det miljø, der udsættes for adsorptionen, ligger mellem 7,7 og 8,8, og fortrinsvis mellem 7,9 og 8,5.
3. Fremgangsmåde ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at elueringen finder sted ved en pH-værdi, der ligger under ca. 4, og at elueringsmidlet fortrinsvis indeholder et opløseligt salt, der forøger ionstyrken.
4. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-3, k e n d e t e g n e t ved, at adsorptionsmidlet er kisel med et gramoverfladeareal mellem 5 og 150 m²/g og en porediameter mellem 25 og 250 nm.
5. Fremgangsmåde ifølge et hvilket som helst af kravene 1-4, k e n d e t e g n e t ved, at kisel foreligger i pulverform med en kornstørrelse på fra 5 µm til 5 mm og fortrinsvis fra 10 til 500 µm.
6. Fremgangsmåde ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at adsorptionsmidlet er et naturligt eller syntetisk silicat og/eller et aktiveret aluminiumoxid.